ISSN 0330 - 7956

REVUE DES REGIONS ARIDES

Editée par l'Institut des Régions Arides - Médenine - TUNISIE

Numéro Spécial

Actes du 6ème Meeting International sur l'Aridoculture et les Cultures Oasiennes

"AGRICULTURE OASIENNE ET DÉVELOPPEMENT DURABLE"

Zarzis (Tunisie)

19 - 21 Décembre 2018

TOME 2

46(1/2020)

Decembre 2020

Répertoriée dans la base PASCAL de l'INIST

Sommaire

Session 3 : Agriculture biologique et protection des cultures (Techniques des cultures biologiques, défense et protection des cultures);

Les moyens alternatifs de lutte en agriculture biologique en Tunisie, cas de la pyrale des dattes, *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera : Pyralidae) et de la mineuse de la tomate, *Tuta absoluta* (Lepidoptera : Gelechiidae) : Lebdi-Grissa Kaouthar, Attia Sabrine, Sahraoui Hajer, Cherif Asma, Hached Wiem, Zougari Sahar, Alloui Rafika……331

Role of Calcium, Magnesium and phosphorus to reduce fluoride toxicity on Pomegranate (Punica granatum) leaves : Afef Ben Amor, Nizar Chaira, Nada Elloumi, Marwa Kechnebbou, Leila Ben Yahia, Belgacem Lachiheb et Kamel Nagaz……..……345

Etude de l'effet du champignon entomopathogène *Lecanicillum muscarium* contre *Bemisia tabaci* sous serres géothermiques dans le sud tunisien : Besma Assadi, Sabrine Chouikhi, Refki Ettaib, Mohamed Laswad, Fawzi Aoun et Mohamed Sadok Belkhadi…….....353

L'utilisation des sucres comme des stimulateurs de défense pour lutter contre le carpocapse (*Cydia pomonella* L.) dans la région de Gosbat (Wilaya de Batna, Algérie) : Brahim Imene, Lombarkia Nadia, Bouabouche Amel…….……359

Punica granatum* Fruits Peels, Antifungal Source Against Date Palm Fusariosis*: Noureddine Boulenouar, Abdelkrim Cheriti, Abderrazak Marouf, Nasser Belboukhari……367

Secondary symbionts modify interactions between aphids and natural enemies : Sabrine Attia, Hajer Sahraoui, Thierry Hance, Kaouthar Grissa Lebdi……371

Essais de lutte contre l'acarien *Eutetranychus orientalis* Klein (Acari: Tetranychidae) sur agrumes : Sahraoui Hajer, Attia Sabrine, Lebdi-Grissa Kaouther…….375

Activité antifongique in vitro des huiles essentielles de deux espèces d'Armoise contre les champignons responsables de pourritures fongiques de la tomate : F. Bouchenak, A. Lamgharbi, H. Degaichia, C. chaouia, F.Z. Benrebiha……...381

Bio-écologie de la mineuse de la tomate *Tuta absoluta* dans la région de Ain Naga : Achoura Ammar, Khennouche Farid ……..…391

Etude de la biodiversité floristique des plantes spontanées dans deux stations de la région de Biskra: doucen et foughala : Bachar M.F., Djerouni H., Benqr F. ……399

Parasitoïdes d'*Aphis gossypii* et leur répartition au sud ouest de la Tunisie :Meriem Ayadi, Faouzi Aoun, Mohamed Sadok Belkadhi, Monia Ben Hlima Kamel…….409

Restauration de l'équilibre écologique dans les palmeraies de la Saoura (Bechar, Algérie), techniques et méthodes de lutte intégrées contre les ravageurs à importance économique majeure : Ali Boulanouar, Mohamed Anouar Khelil, Moussaoui Abdellah, Benlarbi larbi, Makhloufi Ahmed……...417

Etat de conscience sur le phénomène de désertification des populations de la région de Boussaâda (Wilaya de M'Sila), Algérie : Tir Chafia, Tantone khadidja, Madani Djamila, Cherief Abd Elkader, Benniou Ramdhan, Hiouani Fatima…….425

Efficacité de quelques plantes sous-jacentes en palmeraie dans la lutte contre la cochenille blanche *Parlatoria blanchardi* dans la région d'Ouargla (Sud-est Algérien) : Saggou Hayet, Idder Mohamed Azzeddine, Gassou Insar……..…429

Isolement et sélection de souches antagonistes à partir de différents milieux écologiques (Eau et Sol) : Almi Hiba, Balahouane Hadjer, Abdelaziz Ouided, Oufroukh Amar, Dehimat Laid……..437

La fusariose vasculaire chez le palmier dattier: agent pathogène, symptômes et moyens de lutte : Mebarki Lakhdar, Kaid Harche Meriem……447

Comparaison de deux parasitoïdes: *Bracon hebetor* Say. et *Phanerotoma flavitestacea* Fisch. dans la lutte contre l'*Ectomyelois cereatoniae* Zell. dans les Oasis des Zibans (Algérie) : Fateh Mimeche, Hakim Drouai, Abdelghani Zedam……457

Rôle des sémiochimiques dans l'écologie comportementale chez Aphidius ervi : Sabrine Attia, Hajer Sahraoui, Thierry Hance, Georges Lognay, Kaouthar Grissa Lebdi…….465

Bio-acaricidal activity of four extracts of *Salvia officinalis* against the two spotted spider mite *Tetranychus urticae* (Koch) (Acari: Tetranychidae): Sahraoui Hajer, Attia Sabrine, Othman Hafed, Rezgui Tarek, Jridi Mourad, Lebdi-Grissa Kaouther……469

Analyse physicochimique de cladodes de Cactus : *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.var. *inermis* cultivé en Tunisie : Sondes Stambouli-Essassi, Ichrak Samoud-Ben Rejeb, Samiha Kahleoui, Sadok Bouzid, Fathia Harzallah-Skhiri……475

Differential defense responses of new olive cultivars to Verticillium Wilt of Olive in Tunisia: MA. Triki, Y. Gharbi, F. ben Amar, E, Bouazizi, M. Cheffi, R. Gdoura……481

New specific real time PCR for the quantification of *Verticillium dahliae* affecting olive trees in Tunisia: Y. Gharbi, MA. Triki, E, Bouazizi, R. Gdoura……495

Contribution à l'étude bioécologique du psylle de l'olivier *Euphyllura olivina (Hémiptera Psyllidae)* en conditions semi-arides dans une oliveraie à Ain Errich, Wilaya de M'sila, Algérie : Hamdani M., Hoceini F., Sellami M., Cherief A., Chaima KH., Salem H…….505

Répartition spatio-temporelle des populations de Xiphenema spp. dans les vergers de vigne en Algérie. : Hoceini F., Bounaceur F., Nebih D., Hamdani M., Berrabah D……..…513

Structure trophique des nématodes du sol dans les agro-écosystèmes oléicoles algériens : Hoceini Faiza, Nebih Hadj-Saddouk Dhaouia, Bounaceur Farid, Hamdani Mourad, Berrabah Djamal Eddine, Aiche Messaouda, Saidi Souad……..….519

Evaluation of the contribution of crop residues in growth and yield of onion plant: Djilani Ghemam Amara, Abdelkrim rebiai, Zaid Alia, Saoud Djihad, Khaled Kherraz, Mohammed Adel Mesbahi, Ahmed Elkhalifa chemsa, Mohammad Mourad Senoussi……527

Biological effect of the bark Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil on *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi in vitro* and as epiphyte populations on olive plants: Nadia Ghanney, Leila Ben Yahia, Belgacem Lachiheb, Ali Ferchichi……533

Session 4 : Biotechnologies végétales et cultures alternatives en milieu oasien (Biotechnologie, amélioration des plantes, qualité, agroalimentaire, compostage, transformation, cultures alternatives…).

Pasteurisation et hygiénisation par champs électriques pulsés (CEP) des produits et sous-produits des industries alimentaires : Jean-Louis Lanoisellé, Xiaojun Liu, Thomas Lendormi……541

Activité β-glucosidase de *Lactobacillus plantarum* FSO1 et *Candida pelliculosa* L18 isolées des olives vertes en fermentation : Rokni Y., Abouloifa H., Ghabbour N., Bellaouchi R., Ben Salah R., Taybi A. F., Mabrouki Y., Chaoui J., Hasnaoui A., Nagaz K. Chaira N., Saalaoui E. et Asehraou A……..…555

Etude de l'effet de l'extrait du bourgeon terminal des gourmands du dattier (*Phoenix dactylifera.* L) sur le développement de ses cals embryogènes : Othmani Ahmed, Gemni Monia, Touati Marwa, Sellemi Amel, Touati Rabaa, Bedoui Khouloud……..565

Phenolic profiles and antioxidant activity of Tossa jute extracts (*Corchorus olitorius* L.) : Amira Racha Ben Yakoub, Ola Abdehedi, Mourad Jridi, Walid Elfalleh, Moncef Nasri, Ali Ferchichi……..577

Caractérisation chimique de l'huile d'écotypes d'olivier identifiés dans l'oasis de Degache (Tozeur, Tunisie) : Fathi Ben Amar, Mohamed Ayadi et Sihem Ben Maachia……587

Physicochemical properties, deoxynivalenol content and total antioxidant activity in whole grains of barley (*Hordeum vulgare. L*) grown in Tunisia: Teber Hajji, Sonia Mansouri, Debora Giordano, Massimo Blandino, Amedeo Reyneri, Cyrine Darej, Ali Ferchichi……593

Metabolites secondaires et activités biologiques de corètes (*Corchorus olitorius* L.) cultivées dans le sud tunisien : Yassine Yahia, Mohamed Bagues, Samir Tlahig, Monia Lazreg, Mohamed Loumerem, Kamel Nagaz……603

Chemical characterization and biological study of the species *Senecio cineraria:* Zine El Abidine Ababsa, Wahiba Kara Ali, Nacira Abidli, Salah Akkal, Kamel Medjroubi.....611

Extraction assistée par champ électrique pulsé de composés intracellulaires à partir de macroalgues : Pascal Morançais, James Desauté, Xiaojun Liu, Thomas Lendormi Nathalie Bourgougnon[1], Jean-Louis Lanoisellé..……627

Etude des caractéristiques physico-chimiques de noyaux de dattes : Essya Bensmida, Aida Ben Hassen, Maher Sghairoun, Aurore Richel, Nicolas Jacquet, Abdelwaheb Chatti……637

Authentication of Nineteen Tunisian Extra Virgin Olive Oil cultivated under arid conditions based on Phenolic and Fatty acid Contents: Amal Omri, Sofiane Abdelhamid, Mohamed Ayadi, Mariem Gharsallaoui, Amira Araouki, Mohamed Gouiaa, Cinzia Benincasa……641

Drying of food products in an air impingement dryer using intermittent conditions: Wajdi Ben Khalifa, Virginie Boy, Yves Lemée, Lucie Drévillon, Thomas Lendormi, Jean-Louis Lanoisellé……647

Continuous treatment of bacteria by Pulsed Electric Field (PEF): Florent Struyven, Xiaojun Liu, Virginie Boy, Yves Lemee, Thomas Lendormi, Philippe Mandin, Jean-Louis Lanoiselle……655

Développement préférentiel des pousses feuillées sur Deux milieux de culture *in vitro* chez l'olivier (*Olea europeae* L.) : Benderradji Laid, Elhadef Elokki Lydia, Messaoudi Noura, Djebri Fatima Zohra……..…659

Spontaneous genetic erosion of date palm (Phoenix dactylefera L.) in Boussaâda's Oasis(Algeria) and plant biotechnology techniques uses for its regeneration: Benderradji Laid, Chahredine Sadek, Kellou Kamel…….....667

Scarification des grains et régénération des plantules *in vitro* sous stress salin et thermique chez (*Retama sphaerocarpa*) : Laid Benderradji, Noura Messaoudi, Lydia Elhadef Elokki, Faiçal Brini……673

2-Oxoglutarate alleviates growth inhibition and oxidative stress caused by zinc toxicity in *Lepidium sativum* plants: Chiraz Chaffei Haouari, Rihab Ben Fattoum, Ahlem Ben Khedher and Houda Gouia.....687

Rôle du monoxyde d'azote dans l'amélioration de la tolérance de *Lepidium sativum* cultivé en présence du $ZnSO_4$: Chiraz Chaffei Haouari, Ahlem Ben Kedher et Houda Gouia……...697

Contribution à l'amélioration des paramètres morphométriques du développement chez les vitroplants de *Stevia rebaudiana* Bert. au cours de la micropropagation : Emna Jedidi, Kaouther Ben Mahmoud, Noura Jemai, Olfa Ayari, Ahmed Jemmali…….705

Enrichissement des huiles végétales par les polyphénols des dattes parthénocarpiques de la variété Deglet nour : Hammadi Hamza, Mouna Ben Mohamed, Hatem Hajjem, Tarek Tombari.……713

Étude préliminaire de la dynamique de la cochenille blanche *Parlatoria blanchardi* Targ du palmier dattier dans la palmeraie de Figuig (Maroc) : Hasnaoui Amina, Bellaouchi Reda, Rokni Yahya, Abouloif A Houssam, Hakkou Abdelkader, El Houmaizi Mohamed Aziz, Bechchari Abdelmajid, Asehraou Abdeslam…….....717

Valorization of pomegranate co-products: Biochemical composition and antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels: Hatem BEN MOHAMED…….721

***In vitro* micropropagation attempts of the high value spice saffron (*Crocus sativus* L.):** Kaouther Ben Mahmoud, Jeweher Rebaii, Noura Jemai, Emna Jedidi, Ahmed Jemmali……..727

Impact of *Streptomyces* spp. and *Glomus* spp. on growth of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) and suppression of fusarium wilt: Ghadbane Mouloud, Benderradji Laid, Medjekal Samir, Belhadj Hani, and Harzallah Daoud……735

Etude de la stabilité d'huile de noyaux de dattes au cours du stockage : Mouna Benmohamed, Hammadi Hamza, Sonia Boudiche, Tarek Tombari, Salwa Bornaz, Refki Ettaib……..749

Valorisation des écarts de triage des tomates géothermiques dans le sud tunisien : Refki Ettaib, Tarek Tombari, Mouna Ben Hammouda, Ali ben Belgacem, Besma Assadi, Mouna Ben Mohamed, Mohamed Sadok Belkhadi……755

Evaluation des méthodes d'extraction de la phycocyanine à partir de spirulina platensis *et sa valorisation :* Lafri Imène, Boutekrabt Lynda……767

Contribution à l'étude de l'effet des margines issues de l'extraction à froid des olives sur la germination des plantes : Kadi Kenza , Hamli Sofia, Boukeria Sabah, Dib Dounia, Addad Dalila, Yahia Abdelouahab…777

Session 5 : Investissements, structures de production et de commercialisation (Projets, systèmes de production, structures de production et d'encadrement, commercialisation, approches participatives…).

Commercialisation des dattes sur le marché mondial: Potentiel, contraintes et perspectives : Mohamed BEN SALAH…….785

Valorisation des coproduits oasiens dans l'alimentation ovine : Cas des pédicelles, des rebuts de dattes et de l'extrait du contenu du rumen : Arbouche HS, Arbouche Y, Mennani A, Arbouche R, Arbouche F…….793

Durabilité des exploitations irriguées dans le sud-est Tunisien: Cas du périmètre irrigué privé de Bsissi-Oued El Akarit, Gabès : Naceur Mahdhi, Hssan Abdelhapith, Farhat Soudi……803

Valorisation des produits de terroir en zones arides: diagnostic d'une petite entreprise produisant la confiture de dattes : Selt Mohammed Mostefa……...813

Contraintes et perspectives de développement des plantes aromatiques et médicinales au sud-est tunisien : analyse de jeux d'acteurs par l'outil MACOR : Hatem Khattali, Mongi Sghaier……825

Productivité Totale des Facteurs de Production des Dattes dans les Exploitations Phoénicicoles et ses Déterminants : Rached Zouhair, Ali chebil, Khadija Ouerghi, Saleh Selmi……..837

Les coproduits oasiens dans l'alimentation des volailles : Cas des rebuts de dattes et de l'extrait du contenu du rumen : Arbouche F., Arbouche R., Arbouche Y., Mennani A., Arbouche H.S……..845

Production laitière et croissance des agneaux de la race Ouled Djellal mené en région semi-aride : Yasmine Arbouche, Rafik Arbouche, Achour Mennani, Fodil Arbouche, Halima Saâdia Arbouche……855

Contribution des migrants au développement de l'agriculture oasienne: une perspective économique : Taoufik Gammoudi……..875

Effet du mode de reproduction sur les performances zootechniques de la race ovine Ouled Djellal colonisatrice des oasis du sud (Algérie) : Achour Mennani, Rafik Arbouche, Yasmine Arbouche, Fodil Arbouche, Halima Saâdia Arbouche……883

Session 3 : Agriculture biologique et protection des cultures (Techniques des cultures biologiques, défense et protection des cultures);

Les moyens alternatifs de lutte en agriculture biologique en Tunisie, cas de la pyrale des dattes, *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera : Pyralidae) et de la mineuse de la tomate, *Tuta absoluta* (Lepidoptera : Gelechiidae)

Lebdi-Grissa Kaouthar, Attia Sabrine, Sahraoui Hajer, Cherif Asma, Hached Wiem, Zougari Sahar, Alloui Rafika
Département Santé végétale et environnement,
LR14AGR02/ Bioagresseurs et Protection Intégrée en Agriculture,
43 Avenue Charles Nicolle, Tunis 1082, Tunisie
Email: kaogrissa@gmail.com, grissak@yahoo.fr

RESUME :
En agriculture biologique, la lutte contre les ravageurs des cultures repose essentiellement sur la gestion du système agricole afin que les nuisibles se maintiennent au-dessous d'un seuil économiquement rentable par le biais d'une faune auxiliaire composée d'ennemis naturels présents avec un nombre suffisant pour maintenir l'équilibre biologique nécessaire dans la parcelle. Le contrôle biologique doit être avant tout préventif que curatif.
La lutte en Agriculture Biologique repose sur trois piliers :
1- Elle doit favoriser la biodiversité qui à son tour favorisera la stabilité de l'entomofaune et l'équilibre entre les ravageurs et leurs ennemis naturels. Parmi les moyens qui permettent d'accroitre la biodiversité entomofaune, nous citons les bordures des champs, les haies et brise vents, les mauvaises herbes, les bandes de végétations et les plantes intercalaires.
2- La prévention doit être renforcée en Agriculture Biologique afin de limiter les activités des ravageurs et elle repose sur la gestion des cultures par des techniques culturales qui renforcent les défenses des plantes. Plusieurs méthodes culturales permettent de réduire les populations des ravageurs de façon préventive, choix des cultivars, date des semis, travail du sol, fertilisation, cultures pièges, agencement et rotation des cultures, lutte physique.
3- La lutte curative est le dernier maillon de la stratégie de lutte en Agriculture Biologique; elle repose sur une combinaison de plusieurs approches de lutte biologique. La lutte biotechnique repose sur les phéromones sexuelles, piégeage de masse et confusion sexuelle. La lutte microbiologique est à base de champignons (*Beauvariabassiana*), de bactéries (*Bacillus thuringiensis*),de virus ou encore de nématodes. Les bio-pespiticides à base d'extraits de plantes, de roténone et de pyrèthre, il faut cependant signaler que ces derniers peuvent aussi avoir des impacts négatifs sur les auxiliaires, la résurgence de ravageurs secondaires et le développement de résistance. La lutte biologique par acclimatation et par conservation inoculative ou inondative via des lâchers d'auxiliaires, cas des trichogrammes utilisés contre les lépidoptères nuisibles.
Toutes ses techniques alternatives de lutte ont montré leurs efficacités en Tunisie contre des ravageurs clés des cultures tels que, *Tuta absoluta* (sur tomate), *Ectomyeloisceratoniae* (sur agrumes, grenadiers et palmiers dattiers) *Deudorixlivia* (sur grenadier), *Silbaadipata* (sur figuier), *Ceratitiscapitata* (sur abricotier), *Cydiapomonella* (sur pommier), etc.
Mots-clés: agriculture biologique, moyens de lutte, ravageurs

1. INTRODUCTION

Quel que soit le type d'agriculture proposée (conventionnelle ou biologique), la protection des cultures est indispensable contre les nuisibles et nécessite de nombreuses interventions. L'agriculture conventionnelle a recours à la chimie de synthèse, alors que l'agriculture biologique vise le maintien des écosystèmes et l'amélioration de la biodiversité. La lutte biologique présente un immense potentiel comme alternative de lutte; elle permet d'intégrer différentes approches par utilisation de micro-organismes, de prédateurs, de parasitoïdes et de méthodes culturales et physiques. Le présent travail démontre l'immense potentiel de la lutte biologique en Tunisie vu l'efficacité de certains moyens biologiques de lutte pour maintenir les populations des nuisibles à un

niveau assez bas. Cet immense potentiel de la lutte biologique offre deux options complémentaires, une lutte préventive et précoce dès la reprise de l'activité des nuisibles et une lutte curative et répressive basée sur des techniques qui doivent être combinées ensemble afin de donner des résultats assez satisfaisants.

Les méthodes culturales défavorisent l'installation des ravageurs par des rotations de cultures et des associations de plantes, anticipation ou retardement des saisons de semis ou de récolte, l'assainissement des plantations après récolte, le sarclage des mauvaises herbes aux alentours des plantations, les jachères, l'utilisation de variétés résistantes (etc.). La lutte biologique curative repose sur l'utilisation d'insecticides botaniques (avec des propriétés anti-appétantes, répulsives ou même insecticides) ; de micro-organismes (virus, bactéries, champignons ou nématodes entomopathogènes); de moyens biotechniques cas du piégeage de masse et de la confusion sexuelle; par des lâchers inondatifs, inoculatifs ou augmentatifs de parasitoïdes ou de prédateurs ou alors par une manipulation génétique ou lutte autocide.

La pyrale des dattes, *Ectomyelois ceratoniae*, est présente sur l'ensemble du territoire tunisien du nord au sud du pays (Jerraya et Vinson, 1980; Jammazi, 1994). Elle vit aux dépens des fruits mûrs et proches de la maturité en vergers ainsi que dans les fruits desséchés stockés dans les entrepôts (Warner, 1988; Mediouni, 2005). En raison de son extrême polyphagie, plusieurs espèces fruitières à intérêt agronomique sont des hôtes potentiels de cet insecte (Balachowsky, 1972; Navarro *et al*., 1986; Jerraya 2003; Mehrnejad, 2002; Lebdi-Grissa, 2010).

Sur grenadier, la larve va dévorer les étamines du calice de la grenade (Mars et Sayadi, 1992). Le creux du calice est, en l'occurrence, tapissé de fils de soie et son contour se décolore. Aussitôt, la larve pénètre dans le fruit, la grenade ainsi endommagée, est prédisposée aux invasions mycéliennes de champignons agents de pourritures. L'attaque de cet insecte pourrait être associée à celle de *Ceratitis capitata* et *Deudorix livia* au niveau des fruits de grenades endommagés et chutés (Braham, 2014). En cas de forte infestation les dégâts peuvent même atteindre les 90%. En Iran, le taux d'infestation par *E. ceratoniae* est entre 25-30% (Peyrovi, 2011). En Tunisie, l'émergence des adultes débute lentement à partir de mars-avril dans les grenaderais ; mais l'attaque de la première génération ne s'observe que fin mai avec la nouaison des grenades et se poursuit jusqu'à fin août avec le murissement des fruits. L'attaque primaire (qui se développe sur le reliquat des étamines et des pistils des grenades) n'affecte guère l'aspect extérieur du fruit et passe souvent inaperçue (Mars et Sayadi, 1992); c'est seulement à partir de la deuxième génération et des générations suivantes que la pourriture va tendre à affecter toute la grenade avec la pénétration de la larve, le terme ultime étant la chute de celle-ci à plus ou moins brève échéance (Ben Ayed, 2006; Ksentini *et al.*, 2010). Quatre générations annuelles se succèdent dont la dernière est la plus importante au centre et au nord du pays (Ben Ayed 2006; Mejri, 2008). Jammazi (1994) a montré qu'*E. ceratoniae* évolue en trois générations à Ksar Ghriss et en deux à trois générations à Tozeur. Dans le sud tunisien, l'attaque débute dans les palmeraies et se poursuit dans les entrepôts et les usines de conditionnement (Khoualdia *et al.*, 1995). Sur dattes, l'orifice de pénétration de la larve est situé toujours au point d'insertion du fruit sur le périanthe, l'attaque va se matérialiser par un amas soyeux qui bouche l'orifice de pénétration de la larve. A l'intérieur du fruit, la larve est souvent présente près du noyau. Dans le cas où elle est absente, les granules d'excréments brunâtres reliés par des fils de soie renseignent sur son passage (Khoualdia *et al.*, 1996a,b). Les fruits attaqués se détachent facilement du régime, donc les fruits tombés sont souvent véreux (Ben Brahim, 2008). L'insecte commence à s'attaquer aux dattes qui sont en phase de maturation dès septembre et continue son activité jusqu'à décembre avec la formation de 2 à 4 générations selon les auteurs. Il semble que la variété Deglet-Nour, qui représente plus de la moitié de la production des dattes tunisiennes, est la plus endommagée, avec un taux d'infestation pouvant atteindre les 20% (Khoualdia et *al.*, 1995). En outre, les dégâts peuvent dépasser les 40% pour les dattes récoltées tardivement (fin d'octobre) (Skander Essid, 2011). Au Maroc, les dégâts peuvent atteindre 30% (Bouka *et al.*, 2001) et aux Etats-Unis, ils varient entre 10 et 40% (Nay *et al.*, 2006). Sur agrumes, la pyrale des dattes s'attaque essentiellement aux Oranges Navel (fruits ombiliqués). A Chypre et en Egypte, *E. ceratoniae* est signalé sur pamplemousse (Serghiou, 1983; Gumpf *et al.*, 1996) et en Turquie sur Washington Navel (Özturc *et al.*, 2011). En Tunisie, des dégâts conséquents attribués à

cet insecte ne sont apparus que depuis une dizaine d'années sur les Oranges Navels (CTA, 2008; Chakroun, 2010; Hached, 2012). L'ombilic du fruit semble fournir un endroit convenable et très important à la pénétration et à l'installation des chenilles dans les fruits**.** Ces dernières provoquent la nécrose de l'axe principal du fruit et entrainent par des réactions physiologiques un changement de couleur des fruits qui prennent l'aspect d'une fausse maturité (Alford, 2007; Chakroun, 2010; Hached, 2012). Les fruits attaqués pourrissent et chutent précocement avec un taux d'infestation pouvant atteindre les 30%; l'activité du nuisible sur oranges Thomson s'observe de juillet à novembre avec le développement de 3 à 4 générations (Chakroun, 2010; Hached, 2012).

2. LES ALTERNATIVES DE LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE LA PYRALE DES DATTES, *ECTOMYELOIS CERATONIAE*

En raison de l'ampleur des dégâts d'*E. ceratoniae* et compte tenu des particularités biologiques de développement du ravageur, de nombreuses techniques et alternatives de lutte biologique ont été développées afin de contrôler la nuisibilité de l'insecte.

La lutte culturale contre la pyrale des dattes constitue l'une des bases essentielles de la lutte biologique et elle peut être appliquée durant la production et en post-récolte. En post-récolte, la lutte se traduit par le ramassage des fruits non récoltés (momifiés) et ayant chutés et leur incinération ; cette opération va permettre de diminuer l'infestation pour l'année suivante en éliminant les foyers d'hibernation formés par les fruits abandonnés dans l'exploitation (Madge, 2012). Durant la production, il est impératif de nettoyer son verger toutes les semaines par l'élimination des fruits attaqués sur pieds et le ramassage des fruits chutés et leurs destructions vu que c'est un foyer de renouvellement de l'infestation et de redémarrage d'une nouvelle génération de la pyrale. Ce procédé a donné de bons résultats dans les palmeraies, les grenaderais et les agrumeraies entrainant jusqu'a' 60% de réduction de l'attaque (Ben Ayed, 2006; Ben Brahim, 2008; Mejri, 2008; Chakroun, 2010; Skander Essid, 2011; Hached, 2012; Zougari, 2018 en cours de soumission).

La lutte physique consiste à protéger les régimes de dattes en les couvrant par des moustiquaires (Khoualdia, 1996a) pour empêcher le contact entre la femelle et son site de ponte ce qui permettra de limiter l'infestation de la pyrale sur les dattes. Sur palmier dattier, Skander Essid (2011) a démontré l'efficacité de l'ensachage des régimes par une gaine moustiquaire de maillage de 0,8 mm^2 et de dimensions de l'ordre de 100 x 80 cm dans la réduction de l'infestation. Zougari (2018 en cours de soumission) a démontré que l'installation des moustiquaires au niveau des régimes doit être réalisée au mois d'août coïncidant avec le stade «Besr» du fruit et ce à fin d'éviter l'infestation par l'acarien jaune des dattes, *Oligonychus afrasiaticus*, qui coïncide avec le stade « Blah » (Zougari, 2015). La limite de cette méthode réside, donc, dans la date de son application qui doit impérativement avoir lieu avant l'activité des adultes. En effet, si elle survient tardivement, elle ne donnera pas les résultats escomptés (Skander Essid, 2011; Zougari, 2018 en cours de soumission). Actuellement, c'est la méthode la plus répandue dans les palmeraies tunisiennes et elle engendre un taux d'infestation des fruits très faible <3% (Zougari, 2018 en cours de soumission). Sur grenadier et sur Orange Navel, l'ensachage localisé des fruits peut être assez efficace mais s'avère peu pratique et assez coûteux (Hmid, 2013). En Iran, l'ensachage des fruits de grenades a permis une baisse de 50% de l'infestation totale (Taki *et al.*, 2014).

La lutte biotechnique repose sur le contrôle de la reproduction par le biais des phéromones sexuelles femelles. L'utilisation de la phéromone sexuelle est une technique polyvalente, qui assure le suivi des populations sauvages par le vol des adultes mâles (monitoring ou surveillance), comme elle assure la capture massive du ravageur (piégeage de masse) ou encore elle perturbe la rencontre entre les deux sexes (confusion sexuelle) (Bloem *et al.*, 2005). La surveillance des vols des adultes permet de détecter la présence de l'insecte et le suivi de sa population sauvage dans la parcelle; ce qui coïncide avec le démarrage d'une nouvelle génération et l'enclenchement du programme de lutte. Le seuil d'intervention est programmé dés observation de l'activité des adultes. En Tunisie, le piégeage de masse est une technique de lutte qui a permis de baisser les taux d'infestation d'*E. ceratoniae* dans les grenaderaies (Mediouni, 2005; Ben Ayed, 2006; Mejri, 2008); les palmeraies (Skander Essid, 2011; Zougari, 2018 en cours de soumission) et les agrumeraies (Chakroun, 2013; Hached, 2012, 2019). La mise en place des pièges se fait à une hauteur de 1,5 m du sol, en juin sur

grenadiers, en août sur palmier dattier et en juillet sur Oranges Navel. Le nombre de pièges à installer est de 10 à 12 pièges /ha pour les trois spéculations induisant des taux d'infestation ≤ 8% sur palmier dattier, ≤ 4,5% sur grenadier et ≤ 10% sur Oranges Navel (Ben Ayed, 2006 ; Skander Essid, 2011; Hached, 2012, 2019; Zougari 2018 en cours de soumission). La lutte par confusion sexuelle vise à désorienter les mâles par la diffusion d'une quantité importante de phéromones sexuelles ce qui perturbe l'accouplement des adultes et par conséquent la ponte des femelles. Les essais réalisés en Tunisie au niveau des grenaderaies (Dhouibi *et al.*, 2016, 2017), des palmeraies (Zougari, 2018 en cours de soumission) et des orangeraies (Alloui, 2018 encours de soumission) ont montré que cette technique est un outil prometteur pour le contrôle d'*E.ceratoniae*.

La lutte génétique ou autocide repose sur le concept de lâchers d'insectes stériles ou sub-stériles en vue de supprimer ou d'éradiquer les populations naturelles d'un ravageur donné (Knipling, 1955; Mediouni, 2005). La méthode exige la production massive d'insectes compétitifs capables de concurrencer les insectes sauvages, leur irradiation avec des doses stérilisantes ou sub-stérilisantes et leur lâcher de façon inondative dans les parcelles à traiter (Lance et Mc Innis, 2005). La transmission de la stérilité se fait à travers les générations ultérieures de l'insecte (Mediouni et Dhouibi, 2003; Ben Brahim, 2008; Chakroun *et al.*, 2015, 2017). En Tunisie, des essais de lutte autocide ont été effectués pour lutter contre la pyrale des dattes de 2001 à 2013 dans le but de découvrir les perspectives de cette méthode de lutte biologique (Mediouni, 2005; Ben Brahim, 2008; Chakroun *et al.*, 2015, 2017). Des lâchers d'insectes irradiés à la dose sub-stérilisante de 400 Gy ont été effectués dans deux parcelles de grenadiers en 2003 (Mediouni, 2005) et 2008 (Ben Brahim, 2008). L'évaluation de l'efficacité des lâchers a donné à la récolte un taux de fruits attaqués nul dans la parcelle recevant les lâchers contre 2,75% pour la parcelle témoin ; de plus, la dispersion des mâles stériles au niveau du verger est similaire à celle des mâles normaux (Ben Brahim, 2008). Les travaux de Chakroun *et al.* (2015 et 2017) ont montré que la dose d'irradiation de 250 Gy a permis une stérilité totale chez la femelle et une stérilité partielle chez le mâle. Alors que la dose de 350 Gy provoque la stérilité totale du mâle. La dose de 300 Gy permet quant à elle la stérilité totale des femelles et des mâles de la génération F1. Des lâchers d'insectes irradiés à la dose de 250 Gy dans une parcelle d'agrumes faiblement infestée ont donné à la récolte un taux de fruits attaqués nul dans la parcelle recevant les lâchers (Chakroun, 2013). Ces résultats sont très prometteurs et pourraient conduire à vulgariser cette approche de lutte biologique à grande échelle dans les palmeraies du sud tunisien. En effet, les oasis tunisiennes présentent un milieu isolé où cette technique peut être appliquée dans le cadre d'un programme national de lutte biologique (Mediouni, 2005; Ben Brahim, 2008; Chakroun *et al.*, 2015, 2017). Cette technique suppressive permet d'obtenir une production plus importante de fruits si elle est accompagnée d'un piégeage de masse qui baisse la population sauvage du ravageur. Pour la réussite de la technique des insectes stériles, l'un des facteurs essentiels est que les lâchers doivent commencer quand le niveau des populations de l'insecte cible est faible (Mediouni, 2005).

La lutte biologique inondative est la plus utilisées contre la pyrale des dattes, elle vise à augmenter artificiellement par le biais de lâchers répétitifs les populations de leurs antagonistes. Plusieurs travaux de recherche ont permis de déceler un nombre important d'ennemis naturels associés à la pyrale des dattes. Cependant, seuls les parasitoïdes appartenant aux familles des Brachonidae et des Trichogrammatidae ont montré le plus d'efficacité. *Habrobracon hebetor* parasite la larve âgée de la pyrale des dattes (Jerraya, 2003) et sa présence est signalée sur tout le territoire tunisien aussi bien en palmeraie, en orangeraies qu'en grenaderaie. La femelle d'*H.hebetor* doit son efficacité à sa capacité d'aller dénicher son hôte à l'intérieur du fruit. Les lâchers réalisés en grenaderais à Ksar-Ghriss ont montré que le taux de parasitisme d'*H.hebetor* sur *E. ceratoniae* varie de 18,75 à 55%. La limite de cette méthode, est l'emploi d'un grand nombre d'individus aux lâchers et l'augmentation du nombre de points de lâchers par unité de surface car ce parasitoïde se disperse très peu puisqu'il se trouve concentré autour du point de lâcher (Dhouibi et Jemmazi, 1993). Khoualdia *et al.* (1996b) ont signalé un taux de parasitisme de 55 à 95% de larves âgées sur grenadier et palmier dattier. *Phanerotoma flavitestacea* et *P. oculalis* sont des endoparasites fréquents sur les régimes des dattes et dans les vergers de grenadiers. Les lâchers de *P. flavitestacea* dans les palmeraies ont donné un taux de parasitisme de 50% selon Doumandji-Mitiche et

Doumandji (1982) et de 40% selon Dhouibi *et al.* (1998). Des lâchers inondatifs de *P. ocuralis* dans les palmeraies du sud tunisien ont permis de renforcer son action et d'atteindre un taux de parasitisme de 80% ; cependant, ces parasitoïdes n'iraient pas significativement au-delà d'un rayon de 16 m autour du point de lâcher. (Khoualdia *et al.*, 1996b). Les trichogrammes sont des parasitoïdes oophages qui font partie des agents de contrôle biologique des lépidoptères les plus utilisés dans le monde (Li, 1994). *Trichogramma cacoeciae*, espèce thélytoque à large répartition géographique, a été découverte dans les palmeraies tunisiennes par Khoualdia *et al.* (1995). Plusieurs études ont été réalisées au niveau des palmeraies, des grenaderaies et des agrumeraies visant à déterminer l'efficacité de ce parasitoïde dans le contrôle de la pyrale des dattes ; les densités de lâchers variant entre 16.000 et 25.000 trichogrammes/ha selon les auteurs. Ainsi, des taux d'infestation ≤ 5% sur palmier, ≤ 2,5% sur grenadier et ≤ 10% agrumes ont été observés selon différentes études (Khoualdia *et al.*, 1996a; Lebdi-Grissa et Ben Ayed, 2005; Hached, 2012, 2019; Dhouibi *et al.*, 2016; Zougari, 2018; Alloui, 2018).

La lutte microbiologique par l'utilisation de *Bacillus thuringiensis* est très efficace contre les chenilles de lépidoptères. Cette bactérie a été utilisée sur palmier dattier, grenadier et agrumes; cependant, la réussite du traitement repose sur le fait de faire coïncider le moment de son application avec le premier stade baladeur du nuisible qui se trouve à l'extérieur du fruit avant sa pénétration (Hached, 2012; Hached *et al.*, 2017). Sur palmier dattier, Dhouibi (1994) a signalé que l'utilisation de *B. thuringiensis* contre *E. ceratoniae* assure une réduction du taux d'infestation de 60%. Au niveau des grenaderaies, le taux de contrôle du ravageur était de 82% après 4 applications (Alrubeai, 1988). Au niveau des orangeraies, Aytas *et al.* (1996) ont indiqué que ce taux était de 53%.

L'effet répulsif de l'huile essentielle de l'ase fétide, *Ferula assa-foetida*, a été testé par Peyrovi (2011) contre les adultes d'*E. ceratoniae* dans un verger de grenadier en Iran. Le pourcentage de fruits endommagés était significativement moins important dans le verger traité que dans le verger témoin. Ces mêmes auteurs ont suggéré que cette technique pourrait être intégrée dans une stratégie de lutte intégrée contre *E. ceratoniae* dans les vergers de grenadiers.

3. LA MINEUSE DE LA TOMATE, *TUTA ABSOLUTA*

Tuta absoluta est une espèce invasive nouvellement introduite en Tunisie. Elle a été signalée en 2006 en Europe du sud (Espagne, France, Italie) et en 2008 en Afrique du nord (Maroc, Algérie et Tunisie) (Guenaoui & Ghelamallah, 2008 ; OEPP, 2008, 2009; Lebdi-Grissa, 2010). La principale plante hôte de *T. absoluta* est la tomate (*Lycopersicon esculentum*) ; cependant, elle peut, s'attaquer à d'autres plantes hôtes cultivées ou sauvages qui appartiennent en plus de la famille des solanacées, aux brassicales, astéracées, amarantacées, etc. (Desneux *et al.*, 2010, 2011; Tropea Garzia *et al.*, 2012; Cherif *et al.*, 2013; Cherif, 2018). Toutes les parties de la plante et à différents stades de son développement, peuvent être infestées par *T. absoluta*, feuilles, tiges et fruit verts ou mûrs (Tropea Garzia *et al.*,2012; Cherif *et al.*, 2013; Attrassi, 2015). La mineuse de la tomate peut développer sous serre 5 à 6 générations d'octobre à mai sur culture de tomate. En plein champ, ce ravageur peut achever 3 à 4 générations sur culture de tomate de saison de mars à juillet et 3 à 4 générations sur culture de tomate d'arrière-saison d'août à novembre (Lebdi-Grissa *et al.*, 2010; Cherif *et al.*, 2013). Au total, *T. absoluta* peut effectuer 12 à 14 générations par an sous conditions tunisiennes. Les pertes de rendement peuvent aller jusqu'à 80-100% aussi bien en plein champ que sous serre (Tropea Garzia *et al.*, 2012).

4. LES ALTERNATIVES DE LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE LA MINEUSE DE LA TOMATE, *TUTA ABSOLUTA*

Les pratiques culturales permettent d'éliminer les refuges naturels du nuisible et de rompre son cycle de développement. On note le désherbage à l'intérieur et aux alentours des serres cultivées; l'utilisation d'insectes-proof au niveau des ouvertures et des portes d'entrée et l'installation de doubles-portes ou SAS (Germain *et al.*, 2009; Arnó et Gabarra, 2010; Lebdi-Grissa *et al.*, 2010; Oztemiz, 2014). Un labour profond du sol permet de détruire les chrysalides enterrées en profondeur et entraine par conséquent l'interruption du cycle (Larrain, 1992). L'élimination des feuilles basales

sénescentes au niveau des cultures sous serre (pratique assez courante chez les agriculteurs) puisqu'elles présentent un niveau élevé d'infestation par les larves de *T. absoluta*. Ces feuilles doivent être éloignées de la parcelle cultivée (Cherif, 2012, 2018). La rotation des cultures est possible avec d'autres plants non hôtes de ce ravageur (Larrain, 1992; Oztemiz, 2014). Une période de vide sanitaire de l'ordre de 4 à 6 semaines est recommandée entre deux cultures hôtes de *T. absoluta*. La lutte par des variétés de tomate résistantes aux attaques de *T. absoluta* permet aussi de réduire les dégâts occasionnés. Proffit (2011) ont indiqué que ce ravageur préfère pondre sur la variété Aromata en comparaison aux autres variétés Santa Clara et Carmen. De même, en Tunisie, Cherif (2012) ont remarqué que la variété Ferrinz est plus attractive et plus sensible à *T. absoluta* que les variétés Chebli et Chams. La lutte physique utilise 3 types de bandes engluées (associés ou pas à des phéromones sexuelles) pour lutter contre la mineuse de la tomate, Tuta roll, Optiroll Tuta+ et Horiver black Tuta (RUSSEL IPM, 2012; Cherif, 2018) qui permettent de diminuer les populations du nuisible au niveau des serres. D'autres études ont comparé l'efficacité des pièges lumineux (associés ou pas à des phéromones sexuelles) qui ont été installés sous serres géothermales localisées dans le sud tunisien (Etaieb *et al.,* 2016a).

Les bio-insecticides à base de micro-organismes ont, également, montré leur efficacité contre *T. absoluta*. Le spinosad agit par ingestion et par contact et constitue une alternative intéressante pour la lutte contre *T. absoluta* (Benchaâbane *et al.,* 2016); cependant, certains pays comme le Brésil ont signalé la résistance de la mineuse au spinosad (Campos *et al.*, 2014a). *Bacillus thuringiensis* var *Kurshaki* est, aussi, toxique pour les larves de *T. absoluta* qui présentent une forte mortalité après son application (Giustolin *et al.,* 2001). Des études récentes ont indiqué que l'utilisation du spinosad et du *Bt* entraine un effet additif dans le cadre d'un programme de lutte (Hashemitassuji *et al.,* 2014). Mollá *et al.* (2014) ont étudié l'utilisation combinée de la punaise prédatrice *Nesidiocoris tenuis* avec des pulvérisations de *Bt* et ont démontré que les dégâts foliaires ont été minimisés jusqu'à 97% en les comparant au témoin. Parmi les microorganismes utilisés dans le contrôle biologique de *T. absoluta*, il y a les champignons entomopathogènes, *Metarhizium anisopliae* et *Beauveria bassiana*. Inanli *et al.* (2012) ont montré que *M. anisopliae* affecte significativement les œufs et le premier stade larvaire de la mineuse tandis que *B. bassiana* est efficace principalement sur les œufs. Contreras *et al.* (2014) ont signalé l'efficacité de *M. anisopliae* appliqué à la dose de 5,58 10^9 conidies/litre sur les chrysalides de *T. absoluta*. Certains nématodes entomopathogènes tels que *Steinermena carpocapsae, S. feltiae* et *Heterorhabditis bacteriophora* sont capables de parasiter les larves et les chrysalides de T. *absoluta* (Battala-Carrera et al., 2010). Ainsi, le traitement du sol par des préparations à base de ces nématodes ont entrainé de fortes mortalités larvaires allant de 52,3% pour *S. feltiae* jusqu'à 96,7 et 100% pour *H. bacteriophora* et *S. carpocapsae* respectivement (Garcia-Del-Pino *et al.,* 2013).

Des traitements par des bio-insecticides à base d'extraits de plantes ont, également, donné satisfaction. Ainsi, l'utilisation d'extraits méthanoïques tirés des grains d'*Annona coriacea* (Annonacaea) sur des larves néonates de *T. absoluta* placées sur des feuilles de tomate, a montré des mortalités larvaires respectives de 86,4% pour une concentration de 0,5% et de 100% pour une concentration de 1% (Silva *et al.,* 2007). L'utilisation d'extraits aqueux de feuilles et de branches de *Trichilia pallida* (Meliaceae) sur les larves de *T. absoluta,* a causé une mortalité de 86,8% à une concentration de 50% après 72h (Folcia *et al.*, 2003). GoudarzvandChegini & Abbasipour, (2017) ont indiqué que l'huile essentielle extraite à partir de cardamom, (*Elettaria cardamomum*) est toxique à *T. absoluta* ayant un fort potentiel dans le contrôle de ce ravageur surtout dans les zones protégées.

L'utilisation des phéromones sexuelles permet la surveillance du vol des adultes pour une détection précoce de l'activité du ravageur ; ainsi que la lutte contre les populations du nuisible par piégeage de masse ou confusion sexuelle. En Tunisie, le seuil de tolérance économique défini par le ministère de l'agriculture pour *T. absoluta* est de 50 adultes/piège/semaine. Des capsules à phéromones sexuelles avec différentes concentrations ont été testées en vue de fixer la dose la plus convenable en termes de durée de vie et d'efficacité (Cherif & Lebdi-Grissa, 2014). En outre, Chermitti et Abbes (2012), ont démontré que les capsules à phéromones sexuelles faiblement concentrées (0,5 mg) sont à utiliser pour le suivi des faibles populations alors que celles fortement concentrées (0,8

mg) sont recommandés en cas de fortes infestations. Différents types de pièges sont recommandés tels que les pièges delta et les pièges à eau qui sont les plus utilisés (Hassan et Al-Zaidi S., 2010 ; RUSSEL IPM, 2012 ; Cherif *et al.*, 2013). La densité des pièges recommandée est de 40 pièges/ha (2 pièges/500m^2) dans les serres et 40-50 pièges/ha en plein champs (Bolckmans, 2009; Braham, 2014; Aksoy et Kovanci, 2016; Cherif, 2018). Certaines études ont montré que l'utilisation du piégeage de masse seul n'est pas efficace pour lutter contre *T. absoluta* vu qu'ils sont incapables de réduire les dégâts causés par ce ravageur sur feuilles et fruits (Cocco *et al.,* 2013). Des études réalisées sous serres en Tunisie ont montré que l'utilisation combinée du piégeage de masse avec les filets insectes-proof peut limiter les dégâts causés par *T. absoluta* en limitant le nombre de mines foliaires (Harbi *et al.,* 2012; Cherif *et al.,* 2013). La confusion sexuelle vise à perturber la rencontre des deux sexes et inhiber l'accouplement en saturant l'atmosphère par la phéromone sexuelle femelle. Ce moyen de lutte permet de réduire l'infestation et par conséquent les dégâts causés par *T. absoluta.* La confusion sexuelle sous serre est appliquée dès la détection des premiers vols et permet la protection de la culture pendant 4 mois. Certaines études ont montré que l'utilisation de la confusion sexuelle avec une dose de 30 g/ha (500 diffuseurs/ha chargés de 60 mg de phéromone sexuelle) dans des serres à haut confinement peut donner des résultats satisfaisants (Vacas *et al*., 2011). Cocco *et al.* (2013) ont démontré que l'application de 1000 diffuseurs/ha à raison de 60 g/ha au niveau de serres isolées a permis de réduire le taux d'infestation des feuilles et des fruits de 85 et 89% respectivement. Certaines études ont montré que la libération de 30 à 50 g/ha de la phéromone sexuelle de *T. absoluta* en plein champ est efficace pour la perturbation de l'orientation des mâles (60-90%) alors que les dégâts sont semblables aux témoins (Filho *et al.*, 2000).

Plusieurs espèces de trichogrammes ont été étudiées pour lutter contre la mineuse de la tomate, *Trichogramma pretiosum, T. achaeae, T. bactrae, T. nerudai et T. cacoeciae* (Virgula *et al.*, 2006; Faria et *al.*, 2008; Cabello *et al.*, 2012; Cherif et Lebdi-Grissa, 2013). En Espagne, Cabello *et al.* (2009) ont montré que *T. achaeae* sous serres a entrainé un taux de parasitisme allant jusqu'à 83,3% ; avec une réduction des dégâts allant jusqu'à 91,7% lorsque les plants de tomate sont infestés en moyenne par 75 adultes/m^2 avec des lâchers tous les 3-4 jours, durant les mois d'août-septembre. Au Pérou, *T. bactrae* a été utilisé pour lutter contre *T. absoluta* (Virgula *et al.*, 2006). Au Chili, *T. nerudai* a permis d'obtenir un taux de parasitisme allant jusqu'à 79,3% (Gerding et Torres, 2003). En Turquie, sept lâchers de *T. evanescens* sous serres à raison de 75 adultes/m² tous les 3-4 jours ont montré un taux de parasitisme des œufs de *T. absoluta* de l'ordre de 60,3% ; avec une réduction du nombre d'œufs, de larves et de fruits infestés de l'ordre de 63,3, 54,6 et 85,3% respectivement (Oztemiz *et al.,* 2012). En Tunisie, différentes doses de *T. cacoeciae* ont été testées sous serres et en plein champs (Cherif et Lebdi-Grissa, 2013; Zouba *et al.*, 2013). Dans le nord tunisien, Cherif et Lebdi-Grissa, (2013) ont indiqué que 3 lâchers de *T. cacoeciae* à raison de 30 adultes/plant/lâcher en plein champ ont montré un taux de parasitisme des œufs de *T. absoluta* de l'ordre de 54,7% ; ainsi, le nombre moyen de larves dans la parcelle traitée a diminué et n'a pas dépassé 2,5 larves/100 feuilles en le comparant à celui du bloc témoin (7 larves/100 feuilles) (Cherif & Lebdi-Grissa, 2013). Plus récemment, des lâchers de 20 trichogrammes/plant a été suffisant pour générer des réductions significatives aussi bien des populations de *T. absoluta* que des niveaux d'infestation dans les cultures de tomates en serre et en plein champ (Cherif, 2018). Dans le sud tunisien, des lâchers de *T. cacocciae* à la dose de 40 adultes/plant, sous serre tous les 3 à 4 jours durant les mois de février-mars, ont entrainé un taux de réduction des dégâts supérieur à 75% (Zouba et Mahjoub, 2009). Zouba *et al.* (2013) ont étudié l'efficacité de *T. bourarachae* et *T. cacoeciae* suite à des lâchers innodatifs (25000 parasitoïdes/ semaine) sous serres de tomate chauffées (480 m^2) par les eaux géothermales dans le sud-ouest tunisien. Les taux de parasitisme étaient de 63,9% et 57,1% ; avec une réduction du nombre de galeries sur feuilles de l'ordre de 87,6% et de 78,9% respectivement pour *T. bourarachae et T. cacoeciae* (Zouba *et al.*, 2013). D'autres chercheurs ont étudié l'effet combiné de l'utilisation de *T. pretiosum* et du *BT* (Haji *et al.*, 1995). *Stenomesius japonicus* signalé en Espagne est, aussi, capable de parasiter les 2éme et 3éme stades larvaires de *T. absoluta* (Urbaneja *et al.,* 2012). *Necremnus artynes*, parasitant préférentiellement le troisième stade larvaire de *T. absoluta* et testé en plein champ, a présenté un taux de parasitisme moyen de l'ordre de 20,4% (Dehliz et Guenaoui, 2015). *Bracon nigricans* est,

également, signalé comme parasitant *T. absoluta* dans divers pays comme l'Italie, l'Espagne et la Tunisie (Urbaneja *et al.*, 2012; Zapallà *et al.*, 2012; Abbes *et al.*, 2013). Comme prédateurs, *Nesidiocorus tenuis* et *Macrolophus pygmaeus* s'attaquent aux œufs et aux larves *de T. absoluta* (Cabello *et al.*, 2009; Urbaneja *et al.*, 2009). L'inoculation de *M. pygmaeus* en plein champ a entrainé une réduction des dégâts sur feuilles et fruits de tomate de l'ordre de 76 et 56% respectivement (Mollà *et al.*, 2009). Ils ont, également, indiqué que *N. tenuis* introduit sous serre a entrainé une réduction du taux d'infestation des feuilles et des fruits de 97 et 100% respectivement. De même, il a été prouvé que ces mirides prédatrices étaient des agents de lutte biologique prometteurs contre *T. absoluta* dans le sud-ouest tunisien, où la densité des œufs de *T. absoluta* avait été réduite de manière significative après la libération de *N. tenuis* dans des serres de tomates chauffées (Ettaib *et al.*, 2016b). La combinaison de deux punaises prédatrices, *M. pygmaeus* et *N. tenuis*, lors de lâchers inoculatifs à raison de 1 à 2 prédateurs/m², montre leur efficacité sous serre et en plein champ avec des réductions des taux d'infestation de 80 et 95% respectivement. Des traitements à base de *B. thuringiensis* avec des lâchers inoculatifs de *N. tenuis* sous serre a réduit les dégâts foliaires de 97% et n'a pas entrainé de dégâts sur fruits.

5. CONCLUSION

L'agriculture biologique repose sur l'aménagement du système agricole pour qu'il soit favorable aux ennemis naturels et défavorable aux ravageurs. Elle se base, donc, sur le renforcement de la biodiversité et la prévention par différentes techniques (rotation, choix des cultivars, plantes intercalaires…) afin de défavoriser l'installation des nuisibles. Cependant, ces approches ne permettent pas, à elles seules, de réprimer et de ramener certains ravageurs en dessous du seuil économique; du coup, des stratégies de lutte curatives doivent s'imposer par l'utilisation de bio-pesticides (microorganismes ou extraits de plante) ou d'agents biologiques (prédateurs et parasitoïdes).

REFERENCES

- Abbes K., Biondi, A., Zapallà L. et Chermiti B. 2013. Fortuitous parasitoids of the invasive tomato leafminer *Tuta absoluta* in Tunisia. Phytoparasitica, 42(1), 85-92.
- Aksoy E. & Kovanci O.B. 2016. Mass trapping low-density populations of *Tuta absoluta* with various types of traps in field-grown tomatoes. J. of Pl. Diseases and Protection 123(2), 51-57.
- Alford DV, 2007. Pests of fruits crops. Academic press, USA, 296p.
- Alrubeai HF, 1988. Susceptibility of *Ectomyelois ceratoniae* to *Bacillus thuringiensis* isolates under laboratory and field conditions. Journal of Agriculture and Water Resources Research Plant Production, 7:125–136.
- Arnó, J. et Gabarra, R. 2011. Side effects of selected insecticides on the *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) predators *Macrolophus pygmaeus* and *Nesidiocoris tenuis* (Hemiptera: Miridae). Journal of Pest Science, 84, 13-52.
- Attrassi, K. 2015. Study of the Evaluation of Damage Caused By *Tuta Absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) on Tomato Field in Morocco. International Journal of Emerging Trends in Science and Technology, 2(3), 2046-2053.
- Aytas M, Yumruktepe R, Aktura T, 1996. Studies on the chemical control of carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* Zeller [*Apomyelois ceratoniae*] on citrus in the Eastern Mediterranean region. Zirai Mucadele Arastirma Yilligi: 28–29; 81–82.
- Balachowsky AS, 1972. Entomologie appliquée à l'agriculture, Tome II : Lépidoptères, 2 : 1199-1205.
- Battalla-Carrera L., Morton A. et Gracia-del-Pino F., 2010. Efficacy of etomopathogenic nematodes against the tomato leafminer *Tuta absoluta* in laboratory and greenhouse conditions. Departament Biologia Animal, Vegetal i ecología, faculta de Biociencies, Universitat autónoma de Barcelona. Spain. 55,4. 1p. abstract.
- Ben Ayed N, 2006. La lute contre la pyrale des dattes *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidopterae : pyralidae) par des lâchers de *Trichgramma cacoaeciae* (Héminoptèr : Trichogrammatidae). Mémoire de mastère en sciences agronomiques, Institut National Agronomique de Tunis, 76 p.

- Ben Brahim H, 2008. Etude de tests de qualité et optimisation de la dose d‟irradiation dans le cadre d'un programme de lutte contre la pyrale des dattes *Ectomyelois ceratoniae* par la technique des insectes stériles. Mastère en sciences agronomiques, INAT, 91p.
- Benchaâbane S., Aribi N., Morakchi S. K. and Chaabane M., 2016. Delayed Toxic Effects of Spinosad on G1 Progeny of an Invasive Species, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae), African Entomology, 24(2):412-420.
- Bloem KA, Bloem S, Carpenter JE, 2005. Impact of moth suppression/eradication programmes using the sterile insect technique or inherited sterility, pp. 677Ð700. In V. A. Dyck, J. Hendrichs, and A. S. Robinson. (eds.), Sterile insect technique: principles and practice in area wide integrated pest management. Springer, Dordrecht, The Netherlands
- Bolckmans K., 2009. Integrated pest management of the exotic invasive pest *Tuta absoluta*. In: International Biocontrol Manufacturers Association and Research Institute of Organic Agriculture, eds. Proceedings of the 4th Annual Biocontrol Industry Meeting Internationals, Lucerne, Switzerland.
- Bouka H, Chemseddine M, Abbassi M, Brun J, 2001. The date moth in the area of Tafi lalet in the southeast of Morocco. Fruits, 56: 189–196
- Braham, M. 2014. Is Mass Trapping Technique useful for the Control of the Tomato Leafminer, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae)? *Greener Journals*: 1-19
- Cabello T., Gallego J.R., Vila E., Soler A., Del Pino M., Carnero A., Hernández-Suárez E. et Polaszek A. 2009. Biological control of the South American Tomato Pink worm, *Tuta absoluta* (Lep.: Gelechiidae) with releases of *Trichogramma achaeae* (Hym.: Trichogrammatidae) on tomato greenhouse of Spain. Blog cientifico-tecnico sobre la *Tuta absoluta*. 6p.
- Cabello T., Gámez M., Varga Z., Garay J., Carreño R., Gallego J. R., Fernández F. J., Vila E. 2012. Selection of *Trichogramma spp.* (Hym.: Trichogrammatidae) for the biological control of *Tuta absoluta* (Lep.: Gelechiidae) in greenhouses by an entomo-ecological simulation model.
- Campos M.R., Silva T.B.M., Silva W.M., Siqueira H.A.A. 2014. Spinosyn resistance in the tomato borer *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Journal of Pest Science DOI: 10.1007/s10340-014-0618-y
- Chakroun S, 2010. La pyrale des dattes, *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera : Pyralidae) sur agrumes, bio-écologie et lutte biologique. PFE, INAT, 55p.
- Chakroun S, 2013. La bio-écologie de la pyrale des dattes *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (1881) (Lepidoptera : Pyralidae) en vergers d'agrumes et les moyens alternatifs de lutte. Mastère de recherche en sciences agronomiques, INAT, Université de Carthage, 140p.
- Chakroun S, Skander M & Grissa-Lebdi K. 2015. Sterile Insect Technique against date moth, *Ectomyelois ceratoniae* Zeller 1881, in Tunisia: Research of Gamma Radiation Sterilising Dose. International Journal of Scientific Research & Engineering Technology (IJSET), Vol 3, Issue 2, pp.55-62.
- Chakroun S, Rempoulakis P, Lebdi–Grissa k, Vreysen MJB, 2017. Gamma irradiation of the carob or date moth *Ectomyelois ceratoniae*: dose–response effects on egg hatch, fecundity, and survival. Entomologica Experimentalis et Applicata.164 (3): 257-268.
- Chérif, A 2012. Stratégie de lutte intégrée contre la mineuse de la tomate par des combinaisons de lâchers de trichogrammes et des traitements biologiques et chimiques. Mastère en sciences agronomiques, INAT, 160p.
- Cherif A & Lebdi-Grissa K, 2013. Trichogramma cacoeciae as a biological control agent of the tomato pinworm *Tuta absoluta* in Northeastern Tunisia. Entomologia Hellenica, 22: 35-42.
- Cherif A., Mansour R., et Grissa-Lebdi K. 2013. Biological aspects of tomato leafminer *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) in conditions of Northeastern Tunisia: possible implications for pest management. Environmental and Experimental Biolology, 11: 179–184
- Cherif A. et Lebdi-Grissa K. 2014. Control of the tomato leafminer *Tuta absoluta* (Lepidoptera; Gelechiidae) using the mass trapping tool in tomato open field plot and greenhouses in Tunisia. Agriculture Science Research Journal, 4(10):161- 173.

- Cherif, 2018. La mineuse de la tomate Tuta absoluta (Lepidoptera : Gelciidae) : Paramètres biologique, écologiques et alternatives de lutte. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques de l'INAT, 190p.
- Chermiti B. et Abbes K. 2012. Comparison of pheromone lures used in mass trapping to control the tomato leafminer *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) in industrial tomato crops in Kairouan (Tunisia). Bulletin OEPP/EPPO, 42(2), 241-248.
- Cocco A., Deliperi S. et Delrio G. 2012. Potential of mass trapping for *Tuta absoluta* management in greenhouse tomato crops using light and pheromone traps. *IOBC-WPRS Bull*., 80, 319-324.
- Cocco A., Deliperi S. et Delrio G. 2013. Control of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lep., Gelechiidae) in greenhouse tomato crops using the mating disruption technique. Journal of Applied Entomology, 137(1-2): 16-28.
- Contreras J., Mendoza J.E., Martinez-Aguirre M.R., Garcia-Vidal L., Izquierdo J. et Bielza P. 2014. Efficacy of Enthomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* Against *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). Journal of Economic Entomology, 107(1): 121-124.
- CTA, 2008. Lutte intégrée de certains ravageurs de citrus. Rapport annuel du centre technique des agrumes 2008.8p
- Dehliz A. et Guenaoui Y. 2015. Natural Enemies of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) in Oued Righ Region, An Arid Area of Algeria. Academic Journal of Entomology, *8*(2): 72-79.
- Desneux N., Wajnberg E., Wyckhuys K.A.G., Burgio G., Arpaia S., Narvaez-Vasquez C.A., Gonzalez-Cabrera J., Catalan Ruescas D., Tabone E., Frandon J., Pizzol J., Poncet C., Cabello T., Urbaneja A. 2010. Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, history of invasion and prospects for biological control. Journal of Pest Science, 83 :197–215.
- Desneux N., Luna M.G., Guillemaud T., Urbaneja A. 2011. The invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: the new threat to tomato world production. Journal of Pest Science, 84 :403–408.
- Dhouibi MH, Jemmazi A, 1993. Lutte Biologique contre la Pyrale des caroubes *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae) par *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) en vergers de grenadiers. Medical Faculty of Landbouw Ghent University, 58: 427-436
- Dhouibi MH, Hawlitzky N, Krissaane T, 1998. Biological control of the carob moth in Tunisian oasis by the egg- larval parasitoid, *Phanerotoma ocularis* Kohl (Hymenoptera: Braconidae) during 1996. IOBC WPRS BULLETIN, 21(6): 29-40
- Dhouibi MH, Hermi H, Soudani D, Thlibi H, 2016. Biocontrol of the carob moth *Ectomyelois ceratoniae* in pomegranate and citrus orchards in Tunisia. International Journal of Agricultural Innovations and Research, 4(5): 849-856.
- Dhouibi MH, Hawari W, Touil S, Zouba A, Ben Hamida F, 2017. Biocontrol of the Carob Moth *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera, Pyralidae) in Two Oases in the South of TUNISIA using Mating Disruption with SPLAT EC O. International Journal of Agriculture Innovations and Research, 5(5): 2319-1473.
- Doumandji-Mitiche B, Doumandji S, 1982. Les ennemis naturels d'*Ectomyelois ceratoniae* Zeller dans les palmeraies de Biskra. Bulletin de Zoologie Agricole, 4 : 110
- Ettaib R., Belkadhi M.S., Ben Belgacem A., Aoun F., Verheggen F et Caparros Megido R., 2016a. Effectiveness of pheromone traps against *Tuta absoluta*. Journal of Entomology and Zoology studies, 4(6): 841-844.
- Ettaib R., Belkadhi M.S.et Ben Belgacem A. 2016b. Study of the biotic potential of indigenous predator *Nesidiocoris tenuis* on *Tuta absoluta* pest of geothermal culture in the south of Tunisia. Journal of Entomology and Zoology Studies, 4(6): 692-695.
- Faria C.A., Torres J.B., Fernandez Vieira A.M et Isidro Faries A.M., 2008. Parasitism of Tuta absoluta in Tomato plants by *Trichogramma pretiosum* Riley in response to host density and plants structures. Ciéncia Rural, 38 (6): 13p.
- Filho M.M., Vilela E.F., Jerrold M.A.S et Jham G. 2000. Field trappping og tomato moth, Tuta absoluta with pheromone traps. Journal of Chemical Ecology, 26(4): 875-885.
- Folcia A.M., Gaudio G., Franzetti D., Botto E.N. et Mareggiani G., 2003. Effect of vegetal extracts on the survival of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). Acta Toxicol. Argent, 11(1): 7-47.

- Garcia-Del-Pino F., Alabern X. et Morton, A. 2013. Efficacy of soil treatments of entomopathogenic nematodes against the larvae, pupae and adults of *Tuta absoluta* and their interaction with the insecticides used against this insect. BioControl, 58(6) : 723-731.
- Gerding M. & Torres C., 2003. Control biológico de *Tuta absoluta* con *Trichogramma nerudai* et *Trichogrammatoidea bactrae*. Simiente, 73: 15-61.
- Germain, J.F., Lacordaire, A.I., Cocquempot, C., Ramel, J.M. et Oudard, E. 2009. Un nouveau ravageur de la tomate en France: *Tuta absoluta*. *Phm-Revue Horticole, 512*, 37-41.
- Giustolin T.A., Vendramin J.D., Alves S.B., Vieira S.A. et Pereira R.M., 2001. Susceptibility of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) reared on two species of *Lycopersicon* to *Bacillus thuringiensis* var. *kurchasi*. Journal of Applied Entomology, 125: 551-556.
- Goudarzvand Chegini S. & Abbasipour H. 2017. Chemical composition and insecticidal effects of the essential oil of cardamom, *Elettaria cardamomum* on the tomato leaf miner, *Tuta absoluta*. Toxin review, 36 (1): 12-17. dx.doi.org/10.1080/15569543.2016.1250100
- Guenaoui Y., Ghelamallah A. 2008. *Tuta absoluta (*Meyrick) (Lep: Gelechiidae) a new pest on tomato in Algeria. First data on its development time at different temperatures.
- Gumpf DJ, Luck RF, Morse J, 1996. Citrus pest problems and their control in the near east. FAO Plant production and protection, p31.
- Hached W, 2012. Lutte Biologique contre la pyrale des dattes *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller, 1881), en vergers d'agrumes. Mastère en sciences agronomiques, INAT, 137 p.
- Hached W, Chamkhi A, Lebdi-Grissa K, 2017. Side-effects of some insecticides used in citrus cultivation on the egg parasitoid *Trichogramma cacoeciae* Marchal immature stages. Journal of Entomology and Zoology Studies, 5 (6) AD: 2176-2178
- Hached W, 2019. Les ravageurs des oranges Thomson, cas d'*Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera : Pyralidae) : diversité génétique, bio-écologie et moyens de lutte. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques de l'INAT, 160p.
- Haji F.N., Freire L.C.L., Silva C.N., Souza M.M. et Silva M.I.V. 1995. Manejo integrado de *Scropalpuloides absoluta* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae) no submedio Sao Francisco. Anals da Sociedade Entomologicado Brazil, 24: 587-592.
- Harbi A., Abbes K., Chermitti B. 2012. Evaluation of two methods for the protection of tomato crops against the tomato leafminer *Tuta absoluta* (Meyrick) under greenhouses in Tunisia. OEPP/EPPO Bulletin, 42 (2): 317–321.
- Hashemitassuji A., Safaralizadeh M.H., Aramideh S., Hashemitassuji Z. 2014. Effects of *Bacillus thuringiensis* var . kurstaki and Spinosad on three larval stages 1st, 2nd and 3rd of tomato borer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in laboratory conditions. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 48(5):1-8.
- Hassan N. & Al-Zaidi S. 2010. *Tuta absoluta* - pheromone mediated management strategy. International Pest Control, 52(3):158-160.
- Hmid I, 2013. Contribution à la valorisation alimentaire de la grenade marocaine (Punica Granatum L) : caractérisation physicochimique, biochimique et stabilité de leur jus frais. Alimentation et Nutrition. Thèse de Doctorat, Université d'Angers. 179p.
- Inanli C., Yoldas Z. et Birgucu A.K. 2012. Effects of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (Bals.) and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) on larvae and egg stages of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Ege Üniversitesi Ziraat Fakultesi Dergisi, 49(3): 239-242.
- Jammazi A, 1994. Contribution à l'étude de la bioécologie d'*Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera : Pyralidae) et possibilité de lutte biologique par utilisation de l'éctoparasite *Habrobracon hebetor*. Mémoire du cycle de spécialisation de l'INAT, p95.
- Jerraya A, 2003. Principaux nuisibles des plantes cultivées et des denrées stockées en Afrique du Nord. Ed Climat Pub, 398 pp.
- Jerraya A, Vinson G, 1980. Contribution à l'étude de l'entomofaune du pistachier- IV Observations biologiques et écologiques sur *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lep.Pyralidae). Annales de l'INRAT, 53 :5-36.

- Khoualdia O, R'houma A, Jarraya A, Marro JP, Brun J, 1995. Un trichogramme, nouveau parasite *d'E. ceratoniae* Zeller (Lep: Pyralidae) en Tunisie. Annales de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie, 68:145–151.
- Khoualdia O, R'houma A, Marro JP, 1996a. Utilisation de *Trichogramma cacoeciae* Marchal (Hymenoptera, Trichogrammatidae) contre la pyrale des dattes. Ann. de l'INRAT, 69:197-205.
- Khoualdia O, R'houma A, Marro JP, Brun, J. 1996b. Lâcher de *Phanerotoma ocuralis* Kohl contre la pyrale des dattes, *Ectomyelois ceratoniae* Zeller, dans une parcelle expérimentale à Tozeur en Tunisie. Fruits, 51: 129-132.
- Knipling EF, 1955. Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. Journal of Economic Entomology, 48: 459–462.
- Ksentini I., Monje J.C., Jardak T. et Zeghal N. 2010. Naturally occurring egg parasitoids of the genus *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in a pomegranate orchard in Tunisia. Entomological science, 13: 99-106.
- Lance DR, Mc Innis DO, 2005. Biological Basis of the sterile insect technique. Sterile Insect Technique, Principles and Practice in Area-wide Integrated Pest Management. Ed.V.A.Dyck, J. Hendrickset A.S. Robinson, Vienna, Austria, 69-94.
- Larrain P. 1992. Palagas en culivos bajo plástico. IPA la Platina, 73: pp 41-52.Laterrot H & Philouze J, 2003. Tomates. *In* : Histoire de légumes des origines à l'orée du XXI siècle, INRA, Paris, France : 266-276.
- Lebdi-Grissa K, Ben Ayed N, 2005. Lutte biologique contre *Ectomyelois ceratoniae* sur grenadier par des lâchers de *Trichogramma cacoeciae*. AFPP 7ème Conférence Internationale sur les Ravageurs en Agriculture, Montpellier, 7p.
- Lebdi Grissa k, 2010. Etude de base sur les cultures d'agrumes et de tomates en Tunisie, Regional Integrated Pest Management Program in the Near East GTFS/REM/070/ITA Juillet – Septembre 2010. Adresse URL : < http://www.ipmneareast.com/index.php>. Page consultée le 27/02/ 2012.
- Lebdi Grissa K, Skander M, Mhafdhi M, Belhadj R, 2010. Lutte intégrée contre la mineuse de la tomate, *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) en Tunisie. Entomologie Faunistique-Faunistic Entomology, 63(3):125-132
- Li LY, 1994. Worldwide use of Trichogramma for biological control of different crops: A survey. In: Wajnberg E, Hassan SA (Eds.). Biological control with egg parasitoids CAB International; Wallingford, U. K, 37-54pp.
- Madge D, 2012. Australian almond conference, 2012. Carob Moth - Eating Your Profits? (http://australianalmonds.com.au/documents/Industry/Conference/2012/Presentations.pdf), 24p., page consultée le 13 avril 2013
- Mars M, Sayadi S, 1992. Etude comparative de la qualité des fruits de cinq variétés de grenadier (*Punica granatum* L.). Revue des Régions Arides, 4/92 : 45-57.
- Mediouni J, 2005. Lute génétique contre la pyrale des caroubes *Ectomyelois ceratoniae* Zeller 1881 (Lepidoptères: Pyralidae) par le biais de la technologie des insectes stériles. Thèses de Doctorat en sciences agronomiques, INAT, 153 p.
- Mediouni J, Dhoubi MH, 2003. Study of the Inherited Sterility effect on the behavior of the carob moth *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae). Oral presentation. Eighth Arab Congress of Plant Protection El-Beida, Great Jamahirya, Oct 12-16.
- Mehrnejad M., 2002. Biology of carob moth, *E. ceratoniae* new pest on pistachio in Rafsanjan. Applied Entomology and Phytopathology, 60, 1-11.
- Mejri O, 2008. Contribution à l'étude du phénomène de la diapause chez la pyrale des dattes *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller, 1881), Perfectionnement des conditions de l'élevage en masse. Et essais de lutte biologique. Mémoire de Mastère en sciences agronomiques. INAT. 2008. 96p.
- Mollà O., Monton H., Vanaclocha P., Beitia, F. et Urbaneja, A. 2009. Predation by the mirids *Nesidiocoris tenuis* and *Macrolophus pygmaeus* on the tomato borer *Tuta absoluta*. IOBC WPRS Bulltin, 49: 209-214.
- Mollá O., Biondi A., Alonso-Valiente M. et Urbaneja A. 2014. A comparative life history, study of two mirid bugs preying on *Tuta absoluta* and *Ephestia kuehniella* eggs on tomato crops: implications for biological control. BioControl, 59: 175-183.

- Navarro S, Donahaye E, Calderon M, 1986. Development of the carob moth, *Spectrobates ceratoniae*, on stored almonds. Phytoparasitica, 13: 177-186.
- Nay JE, Boyd EA, Perring TM, 2006. Reduction of carob moth in 'Deglet Noor' dates using a bunch cleaning tool. Crop Protection, 25:758–765.
- EPPO. 2008. First record of *Tuta absoluta* in Algeria. EPPO reporting service 2008/135.
- EPPO. 2009. First report of *Tuta absoluta* in Tunisia. EPPO reporting service 2009/042.
- Oztemiz S., Kutuk H. et Portakaldali M. 2012. Biological control of tomato leafminer (Lepidoptera: Gelechiidae) on greenhouse-grown tomato in Turkey. Journal of Entomological Science, 47(3): 272–274.
- Oztemiz S. 2014. *Tuta absoluta* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae), The exotic pest in Turkey. Romanian Journal of Biology – Zoology, 59(1): 47-58.
- Özturk N, Olculu M, Ulusoy MR, 2011. The adult population dynamics of the Carob moth (Ectomyelois ceratoniae Zell. (Lepidoptera: Pyralidae) in citrus orchards in Adana and Mersin provinces. Bitki Koruma Bulteni, 51(4): 347–358.
- Peyrovi M, 2011. Using *Ferula assafoetida* essential oil as adult carob moth repellent in Qom pomegranate orchards (Iran). African Journal of Biotechnology, 10(3): 380385. http://dx.doi.org/10.5897/AJB10.1232.
- Russell IPM. 2012. *Tuta absoluta* products, http://russellipmagriculture.com/ solutions.php?id_ctg=1&lang=en, (visité le 10/08/12).
- Serghiou CS, 1983. The citrus mealybug, *Planococcus citri*, Risso carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* Zeller, Pest complex on grapefruit and its chemical control. Agricultural research institute. Technical bulletin 56.
- Silva A.P.T., Pereira M.J.B et Bento L.F. 2007. The methanolic extract of the seed of Annona coriácea (Mart) about the mortality of tomato's moth caterpillars (*Tuta absoluta*). Rev. Bras. de Agroecologia, 2 (2): 150-153
- Skander Essid M, 2011. Application de la lutte thermique au moyen de l'air chaud contre deux ravageurs des dattes stockées : *Ectomyelois ceratoniae* Z. (Lepidoptera, Pyralidae) et *Carpophilus hemipterus* L. (Coleoptera, Nitidulidae). Master de recherche de l'INAT. 77p.
- Taki M, Dabbagh GR, Torabi R, Kavianpoor MR, 2014. Some mechanical methods to behavior manipulation of the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* in pomegranate orchards. International Journal of Biosciences, 4 (6): 67–73.
- Tropea Garzia G., Siscaro G., Biondi A., Zappala` L. 2012. *Tuta absoluta*, an exotic invasive pest from South America now in the EPPO region: biology, distribution and damage. EPPO Bulletin 42 :205–210.
- Urbaneja A., Monton H. et Mollà O. 2009. Suitability of the tomato borer *Tuta absoluta* as prey for *Macrolophus pygmaeus* and *Nesidiocoris tenuis*. J. of Applied Entomology *133* :292-296
- Urbaneja, A., Gonzalez-Cabrera, J., Arno, J. et Gabarra, R. 2012. Prospects for the biological control of *Tuta absoluta* in tomatoes of the Mediterranean basin. *Pest Management Science*, *68*(9), 1215-1222.
- Vacas S., Alfaro C., Primo J. et Navarro-Llopis V. 2011. Studies on the development of a mating disruption system to control the tomato leafminer, *Tuta absoluta* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae). Pest Management Science, 67(11): 1473-1480.
- Virgala R., Marea B., Botto E.N. et Lafalce C. 2006. Evaluacion de algunos insectidas para el control de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Lepidóptera: Gelechiidae) y su efecto residual sobre el parasitoide *Trichogrammatoidea bactrae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Revista de la Sociedad Entomologica, 65, (3-4): 57-65.
- Warner RL, 1988. Contributions to the biology and the management of the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller) in 'Deglet Noor' date gardens in the Coachella Valley of California (260 pp). PhD thesis, University of California, Riverside, California, USA.
- Zapallà L., Bernardo U., Biondi A., Cocco A., Deliperi S., Delrio G., Giorgini M., Pedata P., Rapisarda C., Tropea Garzia G. et Siscaro G. 2012. Recruitment of native parasitoids by the exotic pest *Tuta absoluta* in Southern Italy. Bulletin of Insectology, 65(1): 51-61.

- Zouba A. et Mahjoubi K. 2009. Biological control of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) with release of *Trichogramma cacoeciae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in tomato greenhouses in Tunisia. African Journal of Plant Science and Biotechnology, 4: 85-87.
- Zouba A., Chermiti B., Chraiet R., et Mahjoubi, K. 2013. Effect of two indigenous Trichogramma species on the infestation level by tomato miner *Tuta absoluta* in tomato greenhouses in the south-west of Tunisia. Tunisian Journal of Plant Protection 8 : 87- 106.
- Zougari, 2015. Contribution à l'étude de la bioécologie et de la lutte contre L'acarien tisserand du palmier dattier, *Oligonychus afrasiaticus* Me Çregor, dans ta région du Djérid. Mastère en Ecologie Evolutive, Faculté des Sciences mathématiques, Physiques et naturelles de Tunis, 95p.

Role of Calcium, Magnesium and phosphorus to reduce fluoride toxicity on Pomegranate (Punica granatum) leaves

Afef Ben Amor[1*], Nizar Chaira[1], Nada Elloumi[2], Marwa Kechnebbou[3], Leila Ben Yahia[1], Belgacem Lachiheb[1] et Kamel Nagaz[1]
[1]Laboratory of drylands and oases cropping , Institute of Arid Regions, Médnine, Tunisia
[2]Laboratory of Water, Energy and Environment, Higher Institute of Biotechnology of Sfax, Tunisia
[3]Laboratory of Animal Husbandry and Wildlife, Institute of Arid Regions, Médnine, Tunisia
[*]Email : afef.ranim@gmail.com

SAMMARY
In Gabes region, in spite of the continuous emission of air pollutants especially fluoride by the industrial chemical complex, pomegranate (*Punica granatum*) trees still growing around the factory. In order to reveal strategies adopted by this species to survive under fluoride pollution, leaves were used to study the distribution of some chemicals elements. Two sampling sites at various distance from the factory were chosen. The polluted site at 1 km from the source of pollution. Control site at 37 km from the factory. Monthly fluoride concentrations were measured. Morphological observation and the distribution of Calcium (Ca), Magnesium (Mg), and phosphorus (P) were also investigated in both sites. Our results show that the highest fluoride concentration was found in the closet site from the factory (148 µg/g dry weight) compared to control site (72,5 µg/g dry weight), this concentration increase with increasing time of exposure. To avoiding fluoride toxicity, the Gabsi variety of pomegarante tend to accumulate calcium and magnesium. The increase of calcium and magnesium play a protective role to reduce the toxic effects of F by trapping of fluoride in the form of CaF_2 and MgF_2. With the increase of exposure time of fluoride pollution, calcium and magnesium contents decrease. When Ca is no more available, necroses apperas Parallely to Ca and Mg a slight increase in phosphorus content was observed. Accumulation of Ca and Mg content compared to control site could be considered as adaptative strategy adopted by pomegranate trees to reduce fluoride toxicity
Key words : Calcium, Fluoride toxicity, Leaves, Magnesium, Phosphorus, *Punica granatum*

RESUME
La ville de Gabes est caractérisée par une atmosphère très polluée à cause de forte émission industrielle des polluants par les unités de groupe chimique. Malgré, l'émission continue des polluants, le grenadier (*Punica granatum)*, variété 'Gabsi', la composante principale de l'écosystème oasien, existe encore. Pour étudier les stratégies adoptés par cette espèce pour survivre sous la pollution fluorée, on a choisi les feuilles de grenadier.Deux sites ont été choisis : le premier à 1 km de la source polluante, le deuxième se situe à 37 km en dehors de toute sorte de pollution. Cette étude montre que les feuilles de grenadier accumulent des larges quantités de fluor qui dépassent 148 µg/g M.S par rapport au control site (72,5 µg/g M.S). Pour éviter les effets toxiques de fluor, les feuilles de grenadier tendent à augmenter les teneurs en Ca et Mg. En fait, le calcium joue un rôle important dans le piegeage du fluor sous forme de complexe CaF_2 insoluble ce qui permet la neutralisation des effets toxiques du fluor. De meme , le magnésium joue un rôle protecteur pour réduire les effects toxiques de fluor sous forme MgF_2. En coincidence avec les hautes conentrations de fluor, les teneurs de calcium et magnesium diminuent avec le temps ce qui cause l'apparition des nécroses dans les feuilles.Parllèlemment, les teneurs en phosphore ne subissent pas des variations nettes suite à l'augmentation des teneurs du fluor dans les feuilles. L'accumulation de Ca et Mg peut être considéré comme une stratégie d'adaptation.
Mots-clés : adaptation, fluor, calcium, grenadier, magnésium, *Punica granatum*

1. INTRODUCTION

With progressive industrialization severe pollution problems have been arising in different countries in the world. Air pollution in considered one of the major important problem. In Tunisia, this problem occurs especially in the southern region.

The Gabes region, located in the south-east of Tunisia, harbors one of the most important industrial complex in Tunisia, including the phosphate fertilizer factory. During the production of phosphoric acids, diammonium phosphate and dicalcium phosphate several air pollutants; especially fluorides are vented to the atmosphere (Mezghani et al., 2005; Boukhris et al., 2015). The agrosystem around the factory has exhibited morphological abnormalities, a reduction of plant biodiversity and for many sensitive species, death. Fluorides absorbed through leaf stomata and move by transpiration into the principal sites of accumulation at the tip and leaf margins (Jacobson et al.,1966). The F phytotoxicity is visible in many sensitive species. For example apricot and almond trees present clear intoxication signs such as necroses (Elloumi et al ., 2014). However, the date palm trees do not show any morphological abnormalities (Ben Amor et al., 2018). The F toxicity could affect morphological, physiological, biochemical and nutritional traits in plants. Accumulation of reactive oxygen species (Chakrabarti et Patra.,2015), reduction of photosynthetic pigments (Velikova et al., 2011; Ben Amor et al., 2018), changes in enzymatic activities (Sobkowiak et al., 2004) are some effects to fluoride exposure. The pomegranate (*Punica granatum*), Gabsi variety constitute one of the most important commercially species in Gabes still survive in the area surrounding the chemical industrial complex.

In order to explain the role of some mineral elements to minimize fluoride toxicity ,we studied the variation of fluoride contents with calcium, magnesium and phosphorus.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Experimental site

The investigation area (33°53’ N, 10° 5’ E) lies on the southern side of the Gulf of Gabes, Gabes city, Tunisia. Gabes is characterized by arid climate with medium to high temperature and a low average rainfall, and is known by the only coastal oases in the Mediterranean area characterized by an agricultural wealth based in vegetables, pomegranates, fruit trees and date palm trees.

2.2. Plant species and sample collection

In Gabes oases, the Pomegranate *Punica granatum* trees are typical fruit trees and constitute 63 percent of the national production. In order to understand the role of certain elements in avoiding fluoride toxicity, leaves of pomegranate trees ‘Gabsi’ variety were collected from two sampling sites. The sampling sites was chosen at different distances from the pollution source. The polluted site (Ps) was situated at 1 km from the factory (Oases of Chott Essalem). Control samples (Cs) were collected from non-polluted area situated at a distance of 37 km from the factory (Zarat Oases). At each site, leaf samples were taken from five randomly selected trees exposed to the factory fume. Samples placed in labeled plastic bags. After collection, the bags were deposited in ice and immediately transported to the laboratory. Sampling was done from March to July 2014.

2.3. Determination of fluoride content.

Fluoride concentration was determined using the potentiometric technique as described by the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1975). Leaves were dried at 70 °C until reaching constant weight. After that 2g powdered sample was calcinated in a muffle furnace for 5h at450 °C. The resultant materiel was dissolved in NaOH with pH equal at 5.3 by the addition of acetic acid glacial. 10ml of Total Ionic Strength Adjustment Buffer solution (TISAB) was mixed with the solution. The measure of fluoride content was determine with a specific fluoride electrode (inoLab/ModelWTW).

2.4. Calcium (Ca), Magnesium (Mg) and Phosphorus (P) content contents

Dried leaves were calcined at the oven (550 °C) and were digested in a nitric and perchloric acid . The content of Ca and Mg were analysed by the atomic absorption spectrophotometry technique (Perkin Elmera Analyst 300, USA) according the method described by Bankaji et al (2015) .
Phosphate (P) was determined by the vanado-molybdate phosphoric yellow colour method Fleury et Leclerc (1943).

2.5. Statical analysis

Statistical analysis were performed with the STATICA package using Duncan multiple range tests at the 5% significance level.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Morphological observations

The present observations clearly indicate morphological changes in the leaves of *Punica granatum*. The visible injuries such as apical and marginal necroses, burning of leaves and diminution in surface foliar is documented in figures 1 and 2.



Figure 1 : Necroses on leaves of *Punica granatum* tree in polluted site.



Figure 2 : Pomegranate tree leaf showing reduce in foliar surface at polluted site (right) and control site (left).

The morphological responses are the primary defence reaction developed by the pomegranate trees in order to limit surface of contact with the pollutants. According to Charlot and kisman 1983, the appearance of necroses are induced by double interaction of calcium and magnesium to reduce the impact of fluoride stress. On the other hand, the apical and marginal necroses probably represent typical symptoms of fluoride toxicity (Ben Abdallah et al.,1994; Elloumi et al., 2016).

3.2. Leaf fluoride accumulation

The fluoride concentration decreased significantly ($p \leq 0.05$) with increasing distance (Figure 3). The highest increase of F content was found in the polluted site (148,2 µg/g d.w) compared to control site (72,5 µg/g dry weight). The highest concentration is registered respectively in the month of May (148,2 µg/g d.w) and July (130 µg/g d.w). The dry period is an important factor that

influence accumulation of air pollutant. The highest temperature accelerates deposition of pollutant. Also, during dried period, the availability to absorb pollutant is more important than cold period (Allen et al., 2006). A smaller decrease of F content is observed in June and this is explained by a marked precipitation received during this month (117 mm) that washes leaves.

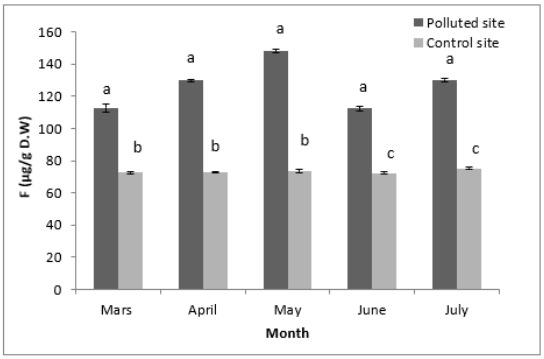


Figure 3 : Temporal variation of fluoride (µg/g dry weight) in *P.granatum* leaves at polluted site and control site. For each month, means with different letters (a, b, c, and d) indicate a significant difference between the sites at $p \leq 0.05$ using the Duncan multiple range test.

3.3. Leaf calcium accumulation

In the control site, leaves of pomegranate showed a slight increase in calcium concentration. The Ca content varied from 10,46 mg /g d.w to 14,40 mg /g d.w. However, in the polluted site, calcium content increased in leaves with the increase of fluoride, this value is higher than the control site. Hight content of Ca registered in pomegranate leaves was more than 3 times in compared to control site are able to sequester fluoride, as CaF_2 (Machoy-Mokrzynska A., 1995; Ben abdalah et al., 2006). According to Charlot and Kisman (1983), the exclusion of fluoride from protoplasm and cellular juice can only be as insoluble CaF2.The highest calcium contents registered in the polluted area could be considered as adaptative strategy to reduce F toxicity. In fact, when trapped in this insoluble form, fluoride cannot disturb the metabolism of trees. Stevens D.P and al (1998) reported the non-translocation of fluoride through phloem towards lower plant organs. The interaction between fluoride and calcium has also been reported with other cations such as silicon, aluminium (Diesendorf M.,1986) and cadmium (Zouari et al., 2016).

Our results showed that Pomegranate leaves tends to accumulate Ca until the end of April (50,380 mg /g d.w). In the month of May, when the F contents depassed 148µg/g d. w, calcium contents decrease (41,49 mg /g d.w). This decrease is parallelly with the appear of necroses. Appearance of necroses with the decrease of Ca contents, suggests the relation between F and Ca. When Ca quantities are no available, signs of F toxicity such as necroses appear.

On the other hand, Ben Abdallah et al. (2016) ascertained the existence of a threshold concentration above which fluoride becomes toxic. F contents could depassed 170 µg/g d.w in pomegranate trees in the industrial are of Sfax , in the end of August. At the moment necroses invaded the total leaf area proves that F became toxic at threshold F level.

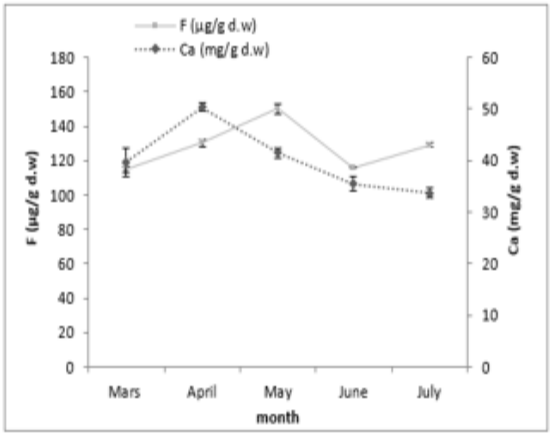


Figure 4. Temporal distribution of Gabsi leaf fluoride and calcium contents in the polluted site

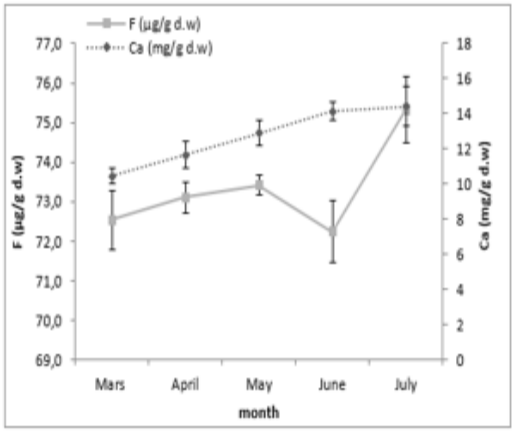


Figure 5. Temporal distribution of Gabsi leaf fluoride and calcium contents in the control site

3.4. Leaf magnesium accumulation

Pomegranate trees growing in the polluted area accumulates Mg more than the control site. As calcium, the increase of Mg in polluted leaves consists in trapping fluoride in the form of MgF_2 in order to protect metabolic activities from its toxicity. Accumulation of Magnesium content in plants to stressful condition as demonstrated in previous research. Gonçalves et al. (2009) observed an important increase of magnesium content in potato (*S. tuberosum*) under cadmium stress. Examing variation of Mg with time, in the control site, pomegranate trees showed a increase in their Mg leaf contents with increasing time. However, in the polluted area, Mg concentration increase during growing season (Mars, April and May), with the increase of F contents. After that, Mg concentration decrease, it passed from 6,54 mg /g d.w to 5,85 mg /g d.w. The increased of F concentration reduces leaf Mg concentration and consists in inactivating Mg at its sites of physiological activities and cause the inhibition of the enzyme systems in which Mg is involved (Weinstein et al,.1982). The interaction Mg-inhibit all enzyme activities (Machoy-Mokrzynska, 1995). Mg might taken from Chlorophyll which could limit synthesis of chlorophyll and cause necroses.

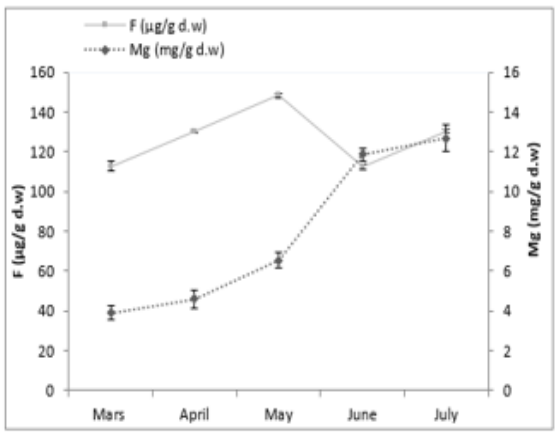


Figure 6. Temporal distribution of Gabsi leaf fluoride and magnesium contents in the polluted site

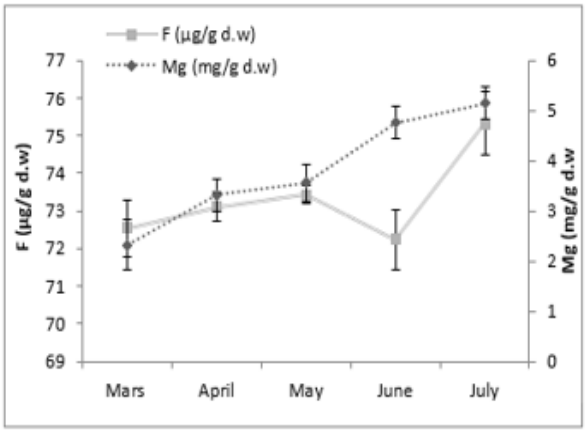


Figure 7. Temporal distribution of Gabsi leaf fluoride and magnesium contents in the control site

3.5. Leaf phosphorus accumulation

In both sites, during the growing season, from April to July, in spite of the increase of fluoride, phosphorus content keeps on increasing. This increase seems to be a tendency of the plant to provide a supply of this element in order to protect enzyme systems in which P and Mg are involved. This increase seems to have a beneficial effect allowing pomegranate trees to flower and to fructify in the polluted area. Phosphorus is the principal component of phospholipid and nucleic acids. It has an important role of the metabolism as PO_2^{4-} group in phosphorylated compounds involved (Turk et al., 1993).

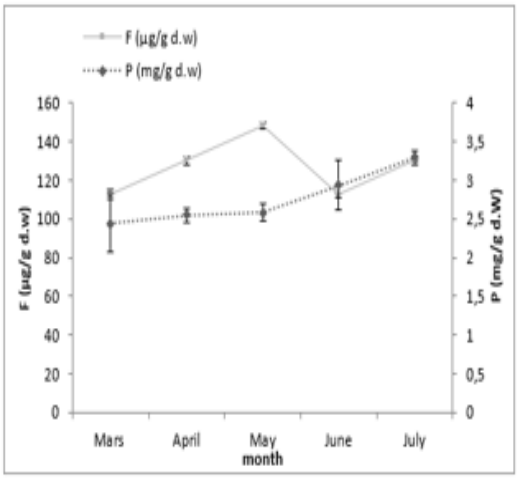


Figure 8. Temporal distribution of Gabsi leaf fluoride and phosphorus contents in the polluted site

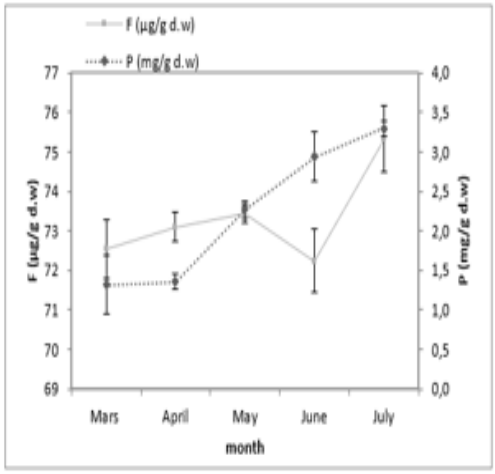


Figure 9. Temporal distribution of Gabsi leaf fluoride and phosphorus contents in the control site

4. CONCLUSION

Leaves of the pomegranate trees, possesses accumulative capacity of fluoride, it can accumulate fluoride up 140 µg/g d.w in the polluted site compared to non-polluted site. Necroses, most damage caused by fluoride appear when F concentration increase. To reduce fluoride toxicity, the Gabsi variety of pomegranate tend to accumulate calcium and magnesium. The increase of calcium plays a protective role to reduce the toxic effects of F by trapping of fluoride in the form of CaF_2 and MgF_2. The appearance of necroses coincide with the decline in Calcium and magnesium content suggest that the complex Ca-Mg-P might be the cause of fluoride inactivation.

REFERENCES

- Allen RG, Pereira L S, Raes, D, Smith M.2006. Meteorogical data. Evaporacióndelcultivo. Guíaspara la determinacion de los requerimientosde agua de los cultivos.In : Food and Agriculture Organization of the UnitedNations, Rome, Italy, pp 29-64
- A.O.A.C., 1975. Fluoride potentiometric method—official first action. Journal Association of Official Analytical Chemists,58, 25–434.
- Bankaji I, Caçador I, Sleimi I. 2015. Physiological and biochemical responses of Suaeda fruticosa to cadmium and copper stresses: growth, nutrient uptake, antioxidant enzymes, phytochelatin, and glutathione levels : Environmental Science and Pollution Research, 22, 13058-13069.
- Ben Abdallah F, Henchi B, Boukhris M. 1994. Réponses des végétaux d'une région aride à une pollution atmosphérique double (SO_2^+composés fluorés) : pollution Atmosphérique,117–122.
- Ben Abdallah F, Elloumi N, Mezghani I, Boukhris M, Garrec GP.2006. Survival strategies of pomegranate and almond trees in a fluoride polluted area : Comptes Rendus Biologies,329, 200-207.

- Ben Amor A, Elloumi N, Chaira N, Nagaz K. 2018. Morphological and physiological changes induced in the date palm trees (*Phoenix dactylifera*) exposed to atmospheric fluoride pollution : Tunisian Journal of Plant Protection, 13 ,11-22**.**
- Boukhris A, Laffont-Schwob I, Mezghani I, El Kadric L, Prudent P, Pricop A, Taton T, Chaieb A.2015. Screening biological traits and fluoride contents of native vegetations in arid environments to select efficiently fluoride-tolerant native plant species for in-situ phytoremediation : Chemosphere, 119,117-223.
- Chakrabarti S, Patra P.K.2015. Biochemical and antioxidant responses of paddy (*Oryza sativa* L.) to fluoride stress: Fluoride, 48,56-61.
- Charlot , Kisman S.1983. Effets de la pollution fluorée sur la répartition des éléments minéraux dans les feuilles et les racines tubérifiées de Radis *Raphanus Sativus* L. : Environmental pollution, 31,311–319.
- Diesendorf M, Sutton P RN.1986. New grounds for concern, The Ecologist : Fluoride, 16, 237–242.
- Elloumi N, Ben Amor A, Zouari M, Belhaj D, Ben Abdallah F, Kallel M.2016.Adaptive biochemical responses of *Punicagranatum* to atmospheric fluoride pollution: Fluoride, 49,357-365.
- Elloumi N, Zouari M, Chaari L, Jomni C, Ben Rouina B, Ben Abdallah F. 2014. Eco-physiological responses of almond (Prunus dulcis) seedlings to cadmium stress : Biologia, 69, 604–609.
- Fleury P, Leclerc M. 1943. La méthode nitro-vanado-molybdique de Misson pour le dosage colorimétrique du phosphore. Son intérêt en biochimie : Société de Chimie Biologique, 25, 5-201.
- Gonçalves JF, Antes FG, Maldaner J, Pereira LB, Tabaldi LA, Rauber R, Rossato LV, Bisognin D A, Flores VLM,Nicoloso FT.2009. Cadmium and min-eral nutrient accumulation in potato plantlets grown under cadmium stressin two different experimental culture conditions : Plant Physiology Biochemisty ,47,814–821.
- Jacobson JS, Weinsten LH, Mc Cune, Hitchcock A E.1966. The accumulation of fluoride by plants: Journal of the Air Pollution Control Association ,16, 412-417.
- Machoy-Mokrzynska A.1995.Fluoride–magnesium interaction : Fluoride, 28, 175–177.
- Mezghani I, Elloumi N, Ben Abdallah F, Chaieb M,Boukhris, M.2005.Fluoride accumulation by vegetation in the vicinity of a phosphate fertiliser plant in Tunisia: Fluoride ,38,69-75.
- Sobkowiak R, Rymer Katarzyna, Rucinska R, Deckert J.2004.Cadmium-induced changes in antioxidant enzymes in suspension culture of soybean cells: Acta biochimica Polonica,51,22,219.
- Stevens D P, Laughlin M J MC, Alston A M.1998. Phytotoxicity of the fluoride ion and its uptake from solution culture by *Avena sativa* and *Lycopersicon esulentum:* Plant Soil, 200, 119–129.
- Turk S, Gulpen M, Fink S Aufnahme. 1993. Transport and Verbleinf ion Calcium und Magnesium in Fichten (*Picea abies* L. karst) und kiefern (*Pinus sglvestris* L.) bei unter-schiedlicher Ernahrrung und Schadstoffbelastung: Forstwiss Central, 112,191-208.
- Velikova V, Varkonyi Z, Szabo M.2011. Increased thermostability of thylakoid membranes in isoprene-emitting leaves probed with three biophysical techniques. Plant Physiology 157, 905–916.
- Weinstein L H, Alscher-Herman R.1982., Physiological responses of plant to fluoride. In: M.H. Unsworth, D.P. Ormrod (Eds.), Effects of Gaseous Pollutants in Agriculture and Horticulture, Butterworths, London, pp, 139–167.
- Zouari M, Ahmed CB, Zorrig W, Elloumi N, Rabhi M, Delmail D, Ben Abdallah F. 2016.Exogenous proline mediates alleviation of cadmium stress by promoting photosynthetic activity, water status and antioxidative enzymes activities of young date palm (Phoenix dactylifera L.). Ecotoxicology and Environmental Safety, 128, 100–108.

Etude de l'effet du champignon entomopathogène *Lecanicillum muscarium* contre *Bemisia tabaci* sous serres géothermiques dans le sud tunisien

Besma Assadi, Sabrine Chouikhi, Refki Ettaib, Mohamed Laswad, Fawzi Aoun et Mohamed Sadok Belkhadi.
Laboratoire d'Aridoculture et Cultures Oasiennes,
Institut des Régions Arides, 4119 Médenine, Tunisie
Email: bessadi_27@yahoo.fr

RESUME
Bemisia tabaci est l'un des ravageurs les plus redoutables dans les cultures protégées et géothermiques. A la recherche de développement des moyens de lutte biologique, une étude de l'efficacité du champignon enthomopathogène *Lecanicillum muscarium* a été effectuée comparativement à un produit de référence à base d'Imidaclopride dans deux serres géothermiques, l'une de piment et l'autre de tomate, dans la région d'El Hamma à Gabes en Tunisie. Ce produit montre une efficacité importante sur les œufs et les adultes de *B. tabaci* pour les deux cultures de tomate et de piment. Ce champignon entraine un taux élevé de mortalité des œufs de *B. tabaci* variant entre 70 et 89% et entre 62 et 70 % respectivement dans la serre de tomate et de piment.
Mots-clés: *Lecanicillum muscarium, Bemisia tabaci*, serres géothermiques

SUMMARY
Bemisia tabaci is one of the most harmful pests in protected and geothermal crops. In the search for development of means of biological control, a study of the efficiency of the enthomopathogenic fungi *Lecanicillum muscari*um was carried out compared to a reference product based on Imidacloprid in two geothermal greenhouses, one of pepper and the other of tomato, in the region of El Hamma in Gabes in Tunisia. This product shows significant efficacy on *B. tabaci* eggs and adults for both tomato and pepper crops. This fungus causes a high mortality rate of *B. tabaci* eggs ranging between 70 and 89% and between 62 and 70% respectively in tomato and pepper greenhouse.
Keywords: *Lecanicillum muscarium, Bemisia tabaci*, geothermal greenhouses.

1. INTRODUCTION

La mouche blanche, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera : Aleyrodidae), est largement répandue dans le monde (Byrne, 1999). La présence de *B. tabaci* dans le bassin méditerranéen est connue depuis longtemps et elle a été signalée en Tunisie en 1997 (Chermiti *et al.,* 1997). Dans le sud tunisien, *B. tabaci* constitue un fléau réel pour les cultures sous serre par la transmission des virus. Sous serres chauffées, *B. tabaci* s'accroît et manifeste une plasticité écologique très large (Bel Kadhi, 2004). Le contrôle conventionnel de *B. tabaci* nécessite des applications répétées de substances chimiques. Par conséquent, *B. tabaci* a développé une résistance à de nombreux insecticides classiques à travers le monde (Plumbo *et al.,* 2001), ce qui peut augmenter le risque de transmission des virus (Gerling *et al.,* 2001). C'est pour cela qu'il faut opter pour l'application de programmes de lutte intégrée (Gerling *et al.,* 2001). Les souches de *Lecanicillium muscarium* peuvent avoir un potentiel de développement en tant qu'agent de contrôle microbien unique efficace contre plusieurs maladies des plantes, insectes nuisibles et nématodes phytoparasites en raison de ses caractéristiques antagonistes, parasitaires et induisant une résistance aux maladies (Goettela *et al.,* 2008). *Lecanicillium muscarium* est un champignon entomopathogène largement répandu.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel végétal

L'essai a été mené dans deux serres infestées naturellement par *B. tabaci* : une serre de tomate (s*olanum lycopersicum*) variété « Maria » et une serre de piment (*Capsicum annuum*) variété « Chargui ». Ces cultures de primeur ont été plantées en mois d'octobre dans des serres mono tunnels géothermiques d'une superficie de 500 m^2, conduites en mode conventionnel. Les serres

choisies sont en pleine production, pendant l'essai les agriculteurs n'ont effectué aucun traitement fongicide.

2.2. Matériel biologique

Au cours de cet essai, nous avons utilisé un produit biologique à base des spores de *lecanicillum muscarium* souche 1979 :48 g/kg ($1.1*10^{10}$ spores /g) qui est connu par son activité contre la mouche blanche et les acariens.

2.3. Protocol expérimental

Pour chaque serre, les essais sont conduits selon le dispositif de blocs complètement aléatoires. Trois traitements ont été appliqués: un traitement avec un insecticide de référence systémique, un traitement témoin avec de l'eau distillée et un traitement à base spores de *lecanicillum muscarium* qui est répété tous les 7 jours.

Chaque bloc est devisé en parcelles élémentaires séparées par des zones tampons (non traitées). Au sein du bloc, chaque parcelle élémentaire de 36 plants est traitée par un produit tout en évitant les bordures.

- Traitement 1 : Eau distillée

- Traitement 2 : Imidaclopride à une dose de 50 ml/hl

- Traitement 3 : spores de *Lecanicillum muscarium* à une dose de 1 g/l de produit et 2,5 ml/l d'adjuvant

2.3.1. Echantillonnage

Pour chaque serre, l'échantillonnage est pratiqué chaque semaine de la manière suivante : pour chaque parcelle élémentaire on choisit quatre plantes au hasard et pour chaque plante on prélève trois feuilles, une de la partie basse, une de la partie médiane et l'autre de la partie haute de la plante.

2.3.2. Paramètres calculés

Chaque échantillon est examiné sous loupe binoculaire afin de compter le nombre des individus morts et vivants de chaque stade de développement de *B. tabaci.* En effet, on compte le nombre des œufs et des adultes. Ainsi, on détermine le pourcentage de mortalité qui est déterminé comme étant le rapport entre le nombre des individus morts de chaque stade de développement et le nombre total des individus morts et vivant du stade correspondant.

2.4. Analyses statistiques

Les variables étudiées ont été soumises à l'analyse de la variance (ANOVA) suivie par le test de Duncan pour comparer les moyennes au niveau de signification $\alpha = 0.05$. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel statistique IBM SPSS Statistics 20.0 (IBM SPSS 2011).

3. RESULTAT ET DISCUSSION

L'évaluation de l'efficacité des produits testés repose sur le calcul du pourcentage de mortalité de tous les stades de développement de *B. tabaci* qui sont les œufs les adultes.

3.1. Evaluation de l'effet de *L. muscarium* sur la mortalité des œufs

L'effet du produit à base du champignon entomopathogène *L. muscarium* sur les œufs de *B. tabaci* dans les deux serres de tomate et de piment est illustré, respectivement, dans les figures 1 et 2. Les taux de mortalité des œufs causés par le produit à base de *L. muscarium* et le produit de référence à base d'imidaclopride montrent une différence significative avec les taux de mortalité causés par le traitement à l'eau distillée au cours du temps qui ne dépassent pas 6% dans les deux serres de tomate et de piment. Le traitement à base de *L. muscarium* se montre le plus efficace dans la serre de tomate à partir de j+14 entrainant des taux de mortalités très importants et croissants au cours du temps qui dépassent 70% dès la deuxième semaine de traitement et atteignent 89% à j+35. Tandis que dans la serre de piment, le produit à base du champignon entomopathogène *L. muscarium* entraine des taux de mortalité des œufs importants mais comparables à ceux causés par le produit de référence à base d'imidaclopride à partir de j+21 variant entre 62 et 70% à j+35.

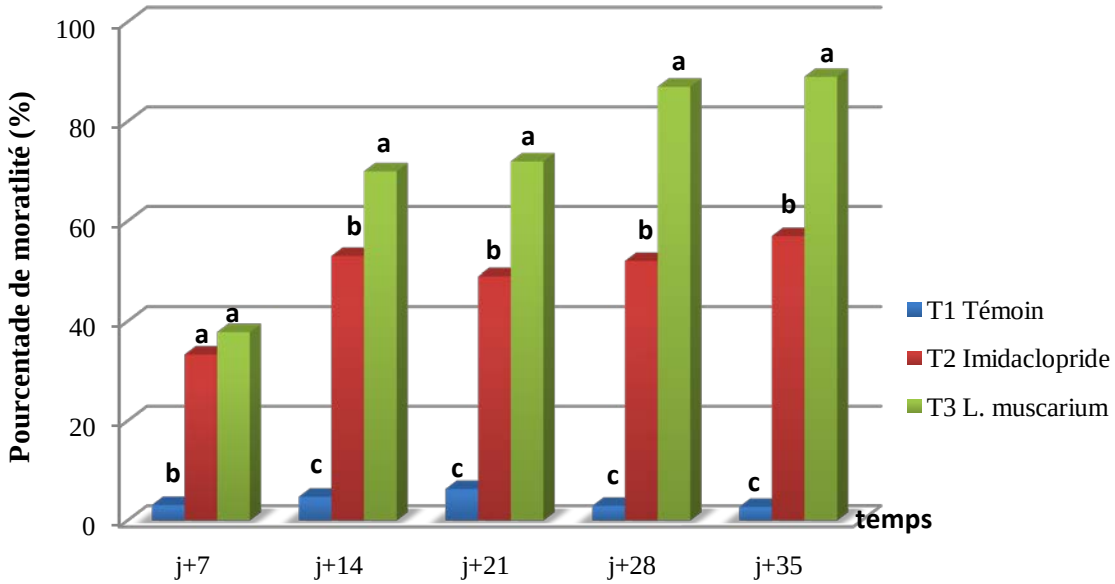


Figure 1 : Taux de mortalité des œufs de *Bemisia tabaci* dans la serre de tomate (Les taux marqués par des lettres différentes sont statistiquement différentes au seuil de 5 % (ANOVA suivie par le test Duncan)

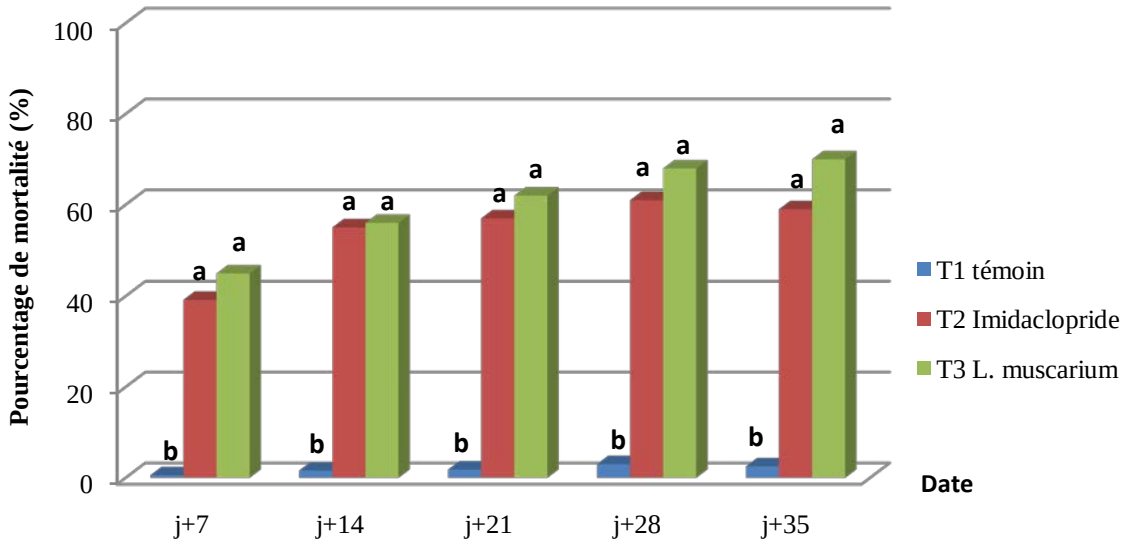


Figure 2 : Taux de mortalité des oeufs de *Bemisia tabaci* dans la serre de piment (Les taux marqués par des lettres différentes sont statistiquement différentes au seuil de 5 % (ANOVA suivie par le test Duncan)

3.2. Evaluation de l'effet de *L. muscarium* sur la mortalité des adultes :

L'étude de l'effet des spores de *L. muscarium* sur les adultes de *B. tabaci* comparativement au témoin et au produit de référence dans les deux serres de tomate et de piment est présentée dans les figures 3 et 4. En effet, l'analyse de la variance des taux de mortalités montre que les deux produits celui à base de champignon entomopathogène et l'imidaclopride ont un effet insecticide important sur les adultes *B. tabaci*. D'autant plus, le produit à base de champignon entomopathogène se montre le plus efficace dès la quatrième semaine du traitement dans les deux serres mais avec des taux de mortalité des adultes plus importants dans la serre de tomate qui varie entre 65 et 72%.

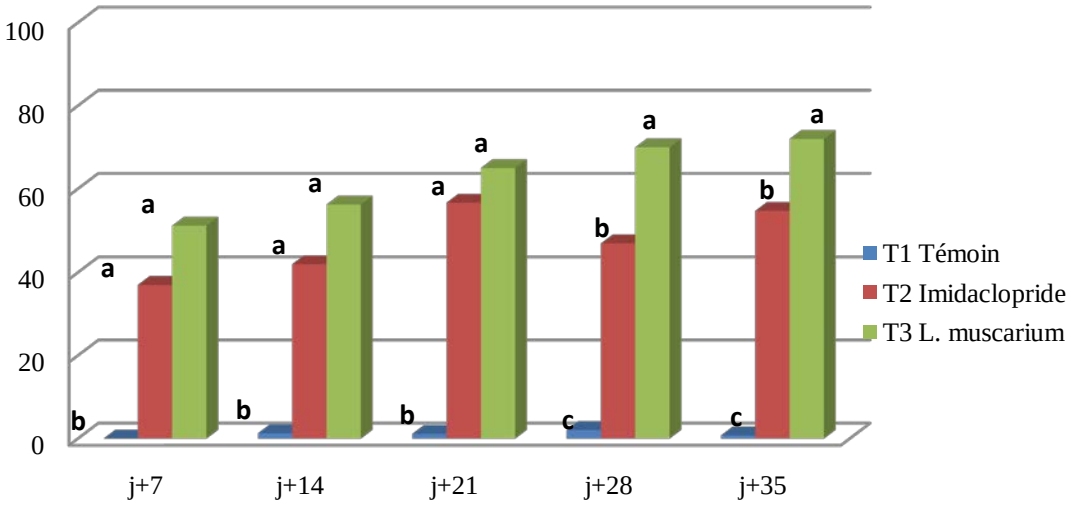


Figure 5 : Taux de mortalité des adultes de *Bemisia tabaci* dans la serre de tomate (Les taux marqués par des lettres différentes sont statistiquement différentes au seuil de 5 % (ANOVA suivie par le test Duncan)

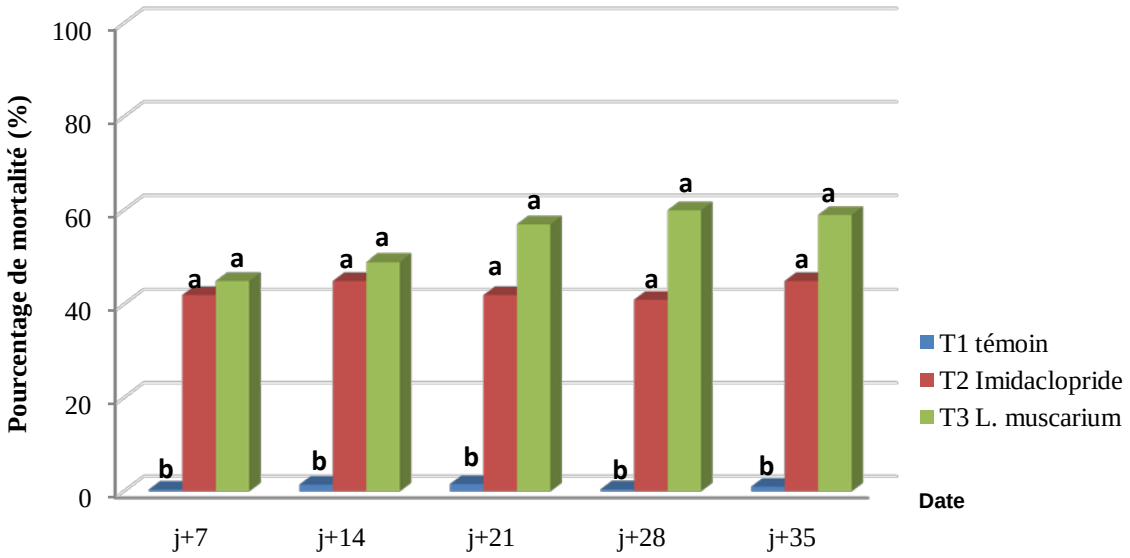


Figure 6: Taux de mortalité des adultes de *Bemisia tabaci* dans la serre de piment (Les taux marqués par des lettres différentes sont statistiquement différentes au seuil de 5 % (ANOVA suivie par le test Duncan)

Il en ressort de cette étude que le produit à base de champignon enthomopathogène *L. muscarium* possède un pouvoir insecticide très important sur les œufs et les adultes de *Bemisia tabaci*. Ces résultats s'accordent avec ceux de Scorsetti et *al*. (2008) qui ont montré que ce champignon est efficace contre *Trialeurodes vaporariorum* entrainant la mortalité de 65% de la population traitée mais supérieure à celle trouvée par Cuthbertson et *al*. (2005) avec une mortalité de *Bemisia tabaci* qui ne dépasse pas 50%. Ceci est confirmé aussi par Gindin *et al.* (2000) qui montre que ce champignon également possède un potentiel de suppression des larves de *B. tabaci* dans les serres sur une gamme de végétaux et une forte pathogénicité à tous les stades de développement de *B. argentifolii.* D'autant plus, des travaux menés par Assadi, B. et *al.* (2017) dans des conditions climatiques pareilles au sud tunisien dans des serres chauffées par l'eau géothermale ont montré qu'un autre champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* s'est révélé efficace contre les œufs, les pupes et les adultes de *B. tabaci.*

Par ailleurs, notre étude a montré que les pourcentages de mortalité des œufs et des adultes de la mouche blanche sont plus importants dans la serre de tomate que dans la serre de piment. Cette différence de l'effet de biopesticide à base de champignon entomopathogène peut être due à la différence des conditions climatiques dans les deux serres qui peut influencer la réponse enthomopathogène de ce champignon. Selon Silvy et Riba (1999) pour être efficace le champignon a besoin d'une température d'au moins 18° C et une humidité relative de plus de 75% pour les 10-12 heures après l'application. De même, la variation de l'efficacité du produit en fonction de la plante hôte peut être expliquée par la différence entre les morphologies des feuilles des plantes hôtes qui possèdent des capacités différentes de rétention en inoculum fongique.

4. CONCLUSION

Le champignon entomopathogène *L. muscarium* possède un potentiel de réduction très important des populations de *B. tabaci* sur les cultures de tomate et de piment. De ce fait, ce produit peut être incorporé comme moyen de lutte microbiologique dans un programme de gestion intégré (IPM) sous serres chauffées par l'eau géothermale dans le sud tunisien dès le début d'attaque lorsque le nombre des œufs est important.

REFERENCES

- Assadi, B., Ettaib, R., Ben Belgacem, A., Larayedh, A., Aoun, F. et Belkhadi, M. S. (2017). Etude de l'effet du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* contre *Bemisia tabaci* sous serres géothermiques. Revue des Régions Arides n°43 (3/2017).

- Bel Kadhi, M. S. (2004). Etude bioécologique de Bemisia tabaci (Homoptera : Aleyrodidae) dans les serres géothermiques du sud tunisien. Possibilité de son contrôle biologique au moyen de parasitoïdes indigènes. Thése de doctorat Biosciences de l'Environnement Chimie et Santé. Faculté des Sciences et Techniques de Saint-Jerome, Université Paul Cezanne AIX-Marseille, 158.

- Byrne, D. (1999). Migration and dispersal by the sweet potato whitefly, Bemisia tabaci. *Aerial dispersal of pests and pathogens* 97(4), 309-316.

- Chermiti, B., Brahem, M., Cenis, J. L., Alonso, C., and Beitia, F. (1997). La présence en Tunisie des Biotypes B et non B de Bemisia tabaci (Homoptera, Aleyrodidae) et de leurs parasitoides associés. *Bulletin OILBsrop/IOBC Wprs* 20(4), 108-113.

- Cuthbertson, A. G., Walters, K. F. A., and Northing, P. (2005). The susceptibility of immature stages of Bemisia tabaci to the entomopathogenic fungus Lecanicillium muscarium on tomato and verbena foliage. *Mycopathologia* 159, 23–29.

- Gerling, D., Alomar, O., and Arnot, J. (2001). Biological control of Bemisia tabaci using predators and parasitoids. *Crop Protection* 20, 779-799.

- Gindin, G., Geschtovt, N. U., Raccah, B., and Barash, I. (2000). Pathogenicity of Verticillium lecanii to different developmental stages of the silverleaf whitefly, Bemisia argentfolii. *Phytoparasitica* 28, 229–239.

- Goettela, M. S., Koikeb, M., JunKimc, J., Aiuchib, D., Shinyad, R., and Brodeure, J. (2008). Potential of Lecanicillium spp. for management of insects, nematodes and plant diseases. *Journal of Invertebrate Pathology* 98, 256-261.

- Plumbo, J. C., Horowitz, A. R., and Prabhaker, N. (2001). Insecticidal control and resistance management for Bemisia tabaci. *Crop Protection* 20, 739-765.

Scorsetti , A. C., Humber, R. A., Gregorio, C. D. and Lo´pez Lastra, C. C. (2008). New records of entomopathogenic fungi infecting Bemisia tabaci and Trialeurodes vaporariorum, pests of horticultural crops, in Argentina. BioControl 53, 787–796.

L'utilisation des sucres comme des stimulateurs de défense pour lutter contre le carpocapse (*Cydia pomonella* L.) dans la région de Gosbat (Wilaya de Batna, Algérie)

Brahim Imene[1]*, Lombarkia Nadia[1], Bouabouche Amel[2]
[1]Laboratoire d'Amélioration des Techniques de Protection Phytosanitaire en Agrosystèmes Montagneux (LATPPAM), Département des sciences Agronomiques, ISVSA, Université de Batna 1.
[2]Institutdes Sciences Vétérinaires et des Sciences Agronomiques, Département des sciences Agronomiques, Université de Batna 1.
*Auteur de correspondance :BRAHIM_IMENE@gmx.fr.

RESUME
La défense liée aux sucres est un nouveau concept nouvellement explorée. Notre étude présente les résultats des essais menés dans la région de Gosbat et visant à tester l'effet de pulvérisations d'infra-doses des sucres de laboratoire et de commerce (saccharose et fructose) en alternance, aux doses 50ppm et 100ppm, sur pommier (variété Anna) pour limiter les attaques, ainsi que le nombre des larves de *C. pomonella* capturées dans les bandes-pièges. Les traitements ont été appliqués, à partir de 16h00, dès la fin de la floraison jusqu'à la récolte, tous les 21 jours. Les résultats montrent que quelle que soit la modalité testée, les sucres réduisent les attaques dus au *C. pomonella* vs. le témoin. L'efficacité des traitements (Abbott) à la récolte est meilleure, de l'ordre de 69,99± 6,97, avec le fructose de laboratoire et de commerce. De même toute les modalités réduisent le nombre de larves diapausantes capturées; dont l'application de saccharose de laboratoire et de commerce offrent une meilleur efficacité. L'utilisation de la voie de signalisation des sucres en tant que des stimulateurs naturels de défense pour induire la protection des vergers de pommier est une alternative prometteuse.
Mots-clés : *Cydia pomonella*, Dégâts, Pommier, Stimulateurs de défense, Sucres.

SUMMARY
Defense related to sugars is a new concept recently explored. Our study presents the results of field trials carried out in the region of Gosbat and was contributed to test the effect of spraying of infra-doses of laboratory and commercial sugars (sucrose and fructose) in alternation, at 50 and 100ppm, on apple tree (Anna variety) to limit attacks, as well as the number of *C. pomonella* larvae captured in corrugated cardboard placed on tree trunk. Treatments were applied from the end of flowering stage until the harvest, at 16h00 p.m., every 21 days. The results of this study showed that all tested modalities reduced fruits damaged by *C. pomonella* vs. untreated trees. At harvest the best efficacy (Abbott) provided by laboratory and commercial fructose with 69,99% ± 6,97. The treatments also affected the number of larvae caught; the application of laboratory and commercial sucrose reduced the number of *C. pomonella* larva per band and provides the best efficacy. The use of the signaling pathway of sugars as natural defense stimulators to induce protection of apple orchards is a promising alternative.
Key-words: Apple, *Cydia pomonella*, Damage, Defense Stimulators, Sugar.

1. INTRODUCTION

Dans toutes les zones de production de pommes, le carpocapse (ou ver de pomme) des pommes et des poires, *Cydia pomonella* L., reste le ravageur principal (Tronel, 2009). Le développement des dégâts provoqués par ce lépidoptère a motivé des stratégies de protection obligatoires qui ont assez rapidement conduit le carpocapse à devenir résistant à différentes familles de produits phytosanitaires à travers le monde (Sauphanor *et al*., 2000 ; Boivin *et al*., 2001; Tronel, 2009). En Algérie, les producteurs sont indirectement encouragés à protéger leur verger contre ces attaques. Cette protection est assurée actuellement seulement par une lutte chimique préventive et intensive; malgré tous ces effet nocifs. surtoutsur la santé et l'environnement, Baldi *et al.*, (2013), signalent que les pesticides de synthèse ont des liens supposés avec des maladies neurologiques. Se traduit aussi par l'absence de la diversité de l'entomofaune utile (Ismail et Albitar, 2016) et impactent leurs milieux naturels (eau, sol, air) déstabilisant les écosystèmes (Damalas, 2015). En plus, le risque de contamination des fruits avec des résidus toxiques. Le recours aux méthodes alternatives, demeure nécessaire. Une nouvelle technologie reposant sur l'utilisation des substances naturelles comme produit de bio-contrôle. Selon Berger et Delval (2018), ce sont des substances présentes dans le milieu naturel et pouvant être d'origine végétale, animale ou minérale. Ces substances peuvent se substituer à des pesticides de synthèse et ainsi limiter leur utilisation. Elles présentent en effet dans la plupart des cas un avantage en

matière de durée de demi-vie assez courte ce qui limite les résidus dans les denrées alimentaires et leur persistance dans l'environnement. Leur utilisation est de plus intéressante dans le cadre de la gestion des résistances car leurs modes d'action sont généralement différents de ceux des pesticides de synthèse. Il est cependant souvent conseillé de les utiliser en combinaison avec d'autres méthodes alternatives (préventives ou curatives). Le comportement de l'insecte lui permet de sélectionner sa plante hôte en évitant les plantes défavorables. Les insectes lépidoptères comme la pyrale du maïs *Ostrinia nubilalis* et le carpocapse, perçoivent par contact les sucres solubles à la surface des plantes comme des signaux influençant la reconnaissance de la plante et le dépôt de leurs œufs (Derridj *et al.,* 1989 ; Lombarkia et Derridj, 2002 et 2008). Dont l'application foliaire des sucres en infra-doses (1 à 10g/100L) sur les plantes constituent de véritables signaux entraînant une cascade de réactions de défense de la plante et l'aider à se défendre contre des bio-agresseurs, par une modification physiologique à la surface des feuilles ; ce qui influence par la suite sur le comportement et la sélection de la plante hôte pour pondre (Derridj *et al*., 2011). Des applications foliaires de saccharose ou de fructose de laboratoire de l'ordre de 100 ppm ont induit des réactions systémiques de la plante rendant difficile la reconnaissance de l'hôte par le carpocapse (Ferré *et al*., 2008; Derridj, 2009; Derridj *et al*., 2011; Arnault *et al*., 2012; Derridj *et al.,* 2012; Arnault *et al*., 2017). Les essais conduits au champ indiquent que le fructose et le saccharose achetés dans le commerce (100 ppm) permettent de réduire les dommages causés par le carpocapse de la pomme à la récolte (Ondet et Gorski, 2015; Ondet 2016) avec des effets différents selon les variétés. L'objectif de cette étude vise à tester l'effet de pulvérisations d'infra-doses des sucres de commerce et de laboratoire (saccharose et fructose) à une dose de 100 ppm (=100 parties par million=10g pour 100L) et 50 ppm en alternance pour limiter les attaques de *C. pomonella,* ainsi que le nombre des larves capturées dans les bandes-pièges dans un verger de pommier (variété Anna) situé dans la région de Gosbat (35° 61' 90.81'' Nord, 5° 41' 77.0'' Est).

2. MATERIEL ET METHODES

L'étude a été effectuée sur la variété de pommier Anna. Les applications ont été commencées dès la fin de la floraison (10 Avril 2017). Les traitements (un traitement= une pulvérisation) sont effectués à partir 16h00, à la fin de photosynthèse, car à ce moment-là la feuille contient naturellement moins de sucre (l'apoplaste ou espace intercellulaire est pauvre), ce qui favorise leur pénétration et modifié les équilibres à la surface de la plante et induit une résistance systémique par un signal « sucre ». La femelle du carpocapse reconnaît mal le végétal traité et n'y dépose pas ses œufs (Derridj, 2009 ; 2013). Les traitements sont réalisés tous les 21 jours, jusqu'à la récolte (06 Juillet 2017) (Tableau 1) (Ondet et Gorski, 2015). Les changements induits dans la plante par le saccharose et le fructose mettent un certain temps à se mettre en place et ils doivent l'être avant l'arrivée du bio-agresseur, leur efficacités va dépendre de la coïncidence spatiotemporelle entre la nature des effets induits et le bio-agresseur.

Les sucres utilisés dans l'expérimentation sont le saccharose et le fructose de laboratoire et acheté du commerce, aux doses100 et 50 ppm et appliqués d'une manière alternée. Le mode d'alternance veux dire que lors du premier traitement nous commençons par le saccharose de laboratoire, le traitement suivant est réalisé avec le saccharose du commerce et ainsi de suite, pour finir avec le saccharose du commerce au quatrième traitement. Le même procédé est appliqué pour les modalités de fructose, où nous avons commencé par le fructose de laboratoire et achevé avec le fructose de commerce.

Pour effectuer les différents traitements, trois pulvérisateurs à dos (Matériel Principal : Plastique, Source d'énergie : Pression, Type: Compression à Main, Pression d'utilisation: 0.2-0.4 Mpa, Pulvérisation non ruisselante) d'une capacité de 16 litres (pour éviter le risque de contamination du sucre), en essayant de pulvériser l'ensemble de l'arbre. Les essais sont basés sur un plan expérimental en carré latin à 5 répétitions, dont chaque bloc comporte 2 arbres.

Les observations portent sur le dénombrement des fruits attaqués par le carpocapse à la récolte. Les pommes au sol sont aussi estimées et retirées de l'essai. Car elles pourrissent et l'on ne voit plus les dégâts dus au carpocapse. L'observation et la confirmation des attaques du carpocapse sur les pommes sont effectués au laboratoire.

En parallèle des bandes-pièges ont été utilisées afin d'évaluer les larves diapausantes en fin de saison. Ces bandes comportent 2 feuilles de cartons ondulés superposées recouvertes d'un grillage de polyéthylène. Les 3 couches sont rendues solidaires par un fil de fer. Le grillage a pour but

d'empêcher les oiseaux de se nourrir des larves. Les bandes-pièges sont disposées autour de la base des troncs des 50 arbres, près du sol, au mois de mai et retirées la fin du mois d'octobre 2017.
La comparaison des pourcentages moyens des fruits attaqués par arbre à la récolte et tombés à terre ainsi que le nombre de larves diapausantes, a été effectuée par une analyse de la variance (ANOVA) suivie par le test de Fisher L.S.D. ($P < 0.05$) à l'aide du logiciel STATISTICA 6. L'efficacité des traitements est également calculée grâce à la formule d'Abbott (1925) :

$$\text{Efficacité} = 100 \times ((To - Tt) / Tt)$$

To : % total des fruits attaqués dans la parcelle Témoin,
Tt : % total des fruits attaqués dans la parcelle traitée.

Tableau 1. Calendrier des traitements

Traitements	Dates des traitements	Observations	Sucre utilisé	
			Modalité de Saccharose	Modalité de Fructose
1ier	10/04/2017	Réalisé	Saccharose de laboratoire	Fructose de laboratoire
2ème	1/05/2017	Réalisé	Saccharose de commerce	Fructose de commerce
3ème	21/05/2017	Réalisé	Saccharose de laboratoire	Fructose de laboratoire
4ème	10/06/ 2017	Réalisé	Saccharose de commerce	Fructose de commerce
5ème	30/06/2017	A cause du vent, ce traitement n'a pas été réalisé	/	/
Récolte 06 et 07 /07/2017				

3. RESULTATS

3.1. Taux d'infestation

Les résultats obtenus de cette étude révèlent que la variété Anna présente un taux d'infestation par le carpocapse sur le témoin sans traitements s'élève à 4.76% ± 0.48, 22,74% ± 3,18 et 13,43 % ± 3,67 des pommes attaqués à la récolte, des fruits tombés au sol à la récolte et total tombé respectivement (Figures 1 et 2). Signalons que toutes les modalités montrent un nombre de fruits tombé à la récolte plus élevé par apport au nombre total tombé, à l'exception des arbres traités par le fructose de laboratoire et de commerce (FrucL/FrucC) à une dose de 100 ppm, c'est le cas inverse (Figure 2). À la récolte, les trois modalités testées montrent une réduction des dégâts dus aux carpocapses, où l'alternance du FrucL/FrucC à une dose de 100 ppm révèle un meilleur résultat avec un taux d'infestation de l'ordre de 1,36%± 0,33 et diffère significativement des autres modalités (Figure 1). De même pour les fruits tombés attaqués total ou tombés à la récolte respectivement, à la dose de 100ppm, les traitements des arbres par le fructose de laboratoire et de commerce (FrucL/FrucC) montrent une réduction importante des dégâts de carpocapse (5,7%± 1,43et 3,28% ± 1,99) par rapport aux témoins (Figure 2).

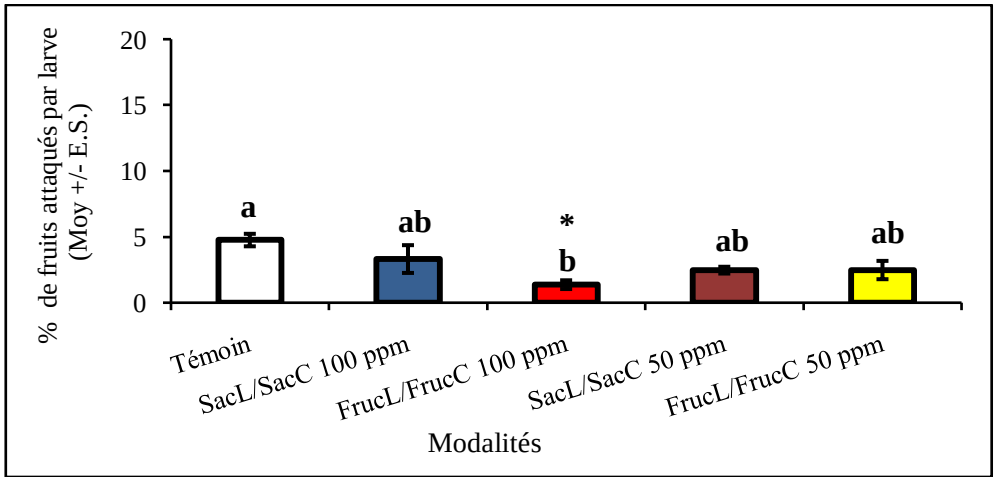


Figure 1: Pourcentage moyen des fruits attaqués à la récolte par arbre. Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (ANOVA, test de Fisher L.S.D.,P< 0.05). *: P < 0.04.

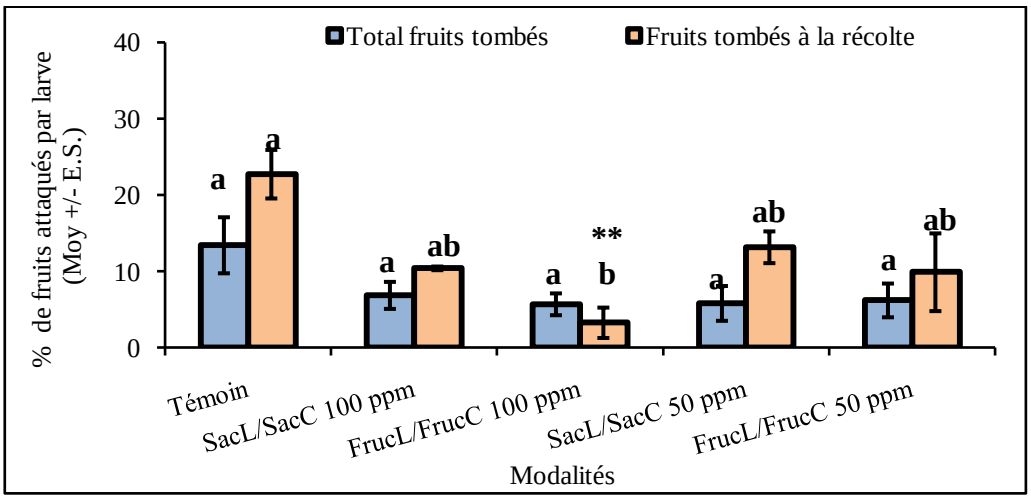


Figure 2: Pourcentage moyen des fruits tombés attaqués à la récolte et total par arbre. Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (ANOVA, test de Fisher L.S.D.,P< 0.05). **: P < 0.01).

3.2. Efficacité Abbott des traitements

Des moyennes d'efficacité Abbott très élevés et semblables sont enregistrées quelles que soit les modalités testées et les fruits attaqués tombés (total ou tombés à la récolte) ou récoltés. Dont l'alternance du fructose de laboratoire et de commerce (FrucL/FrucC) à la dose de 100 ppm montre une efficacité très élevée pour les fruits à la récolte et les fruits récoltés de l'ordre de 62,54± 23,26 et 69,99±6,97 (Figures 3 et 4). Concernant les fruits tombés total, l'alternance du saccharose de laboratoire et de commerce (SacL/SacC) à 50 ppm donne une meilleure efficacité égale à 47,46±13,92 (Figure 4). Notons aussi qu'aucune différence significative n'a été détectée entre les différents traitements (ANOVA, test de Fisher L.S.D., P< 0.05).

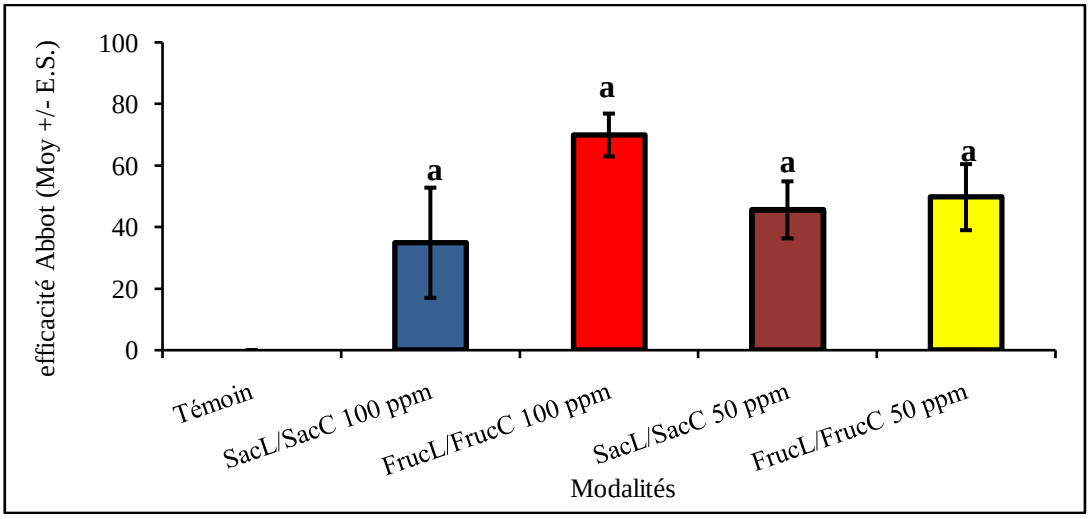


Figure 3: Efficacités des traitements Abbott pour les fruits récoltés par arbre. Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (ANOVA, test de Fisher L.S.D., P< 0.05).

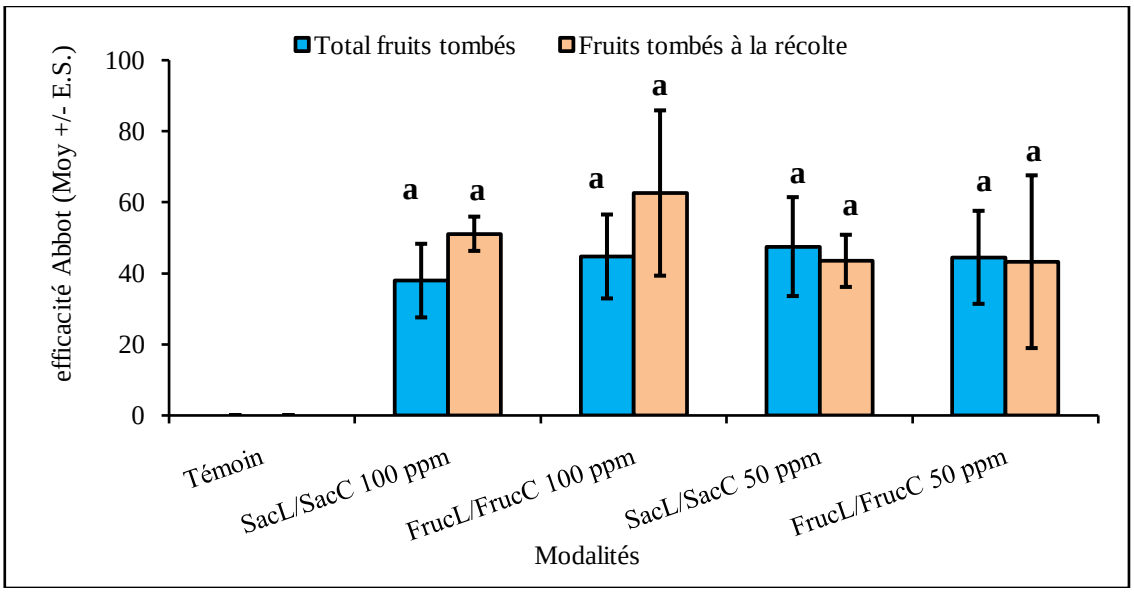


Figure 4: Efficacités des traitements Abbott pour les fruits tombés attaqués à la récolte et total par arbre. Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (ANOVA, test de Fisher L.S.D., P< 0.05).

3.3. Nombre des larves diapausantes

La plupart des larves des trois générations en 2017 ; ont été observés et retiré de bandes pièges installées au début de l'expérimentation sont localisés dans les arbres du témoin. Ces résultats confirmes ceux observés en ce qui concerne les dégâts larvaires sur les fruits à la récoltes et tombés au sol. A l'exception du SacL/SacC appliqué en alternance à 100 ppm, montre une réduction du nombre moyen de larves dans les bandes pièges de l'ordre de 2,60 ±0,51 contre, 9,00 ± 0,71 pour le témoin (Figure 5). Une différence significative observée pour le nombre moyen des larves diapausantes entre le témoin et les différentes modalités traitées (ANOVA, test de Fisher L.S.D., P< 0.05).

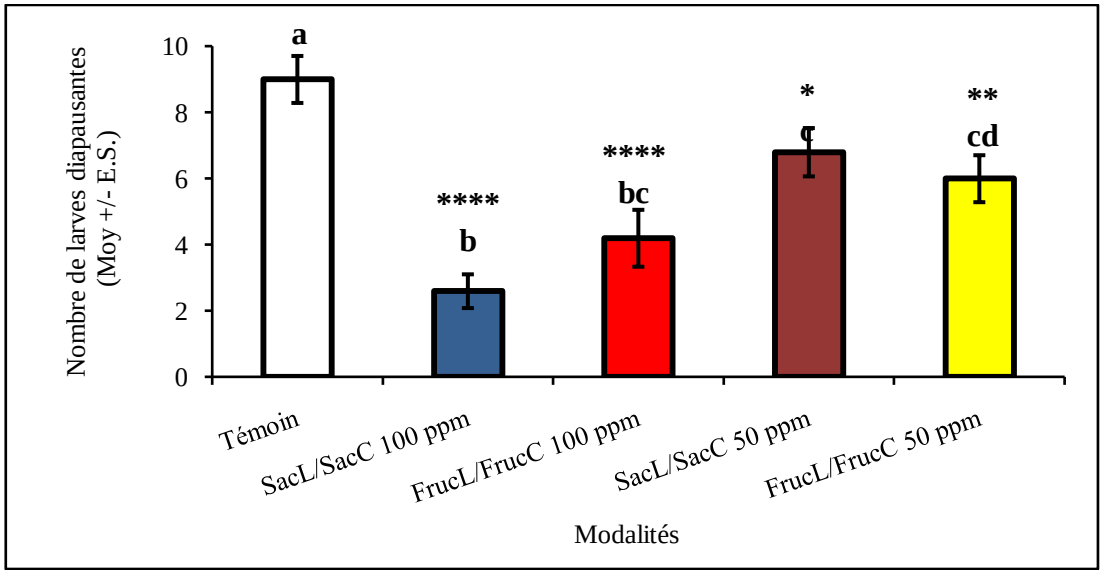


Figure 5 : Nombre moyen de larves diapausantes capturées dans les bandes pièges. Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (ANOVA, test de Fisher L.S.D., P< 0.05).* : P ≤ 0.05, **: P < 0.01,***: P < 0.001,****: P < 0.0001.

4. Discussion

Nous avons testé à travers cette étude l'application foliaire d'infra-doses de sucres de laboratoire et de commerce alternés, sur pommier pour renforcer et accélérer le processus de *Sweet Immunity* contre le carpocapse, dont les traitements ont été réalisés à partir de 16h00 au moment de début de l'activité des adultes. Ceci lorsque les quantités des sucres sont très faibles à cette heure d'application (Derridj, 2013). Au total quatre traitements ont été réalisés au cours de la saison, dont le cinquième est annulé à cause des vents. Les résultats obtenus montrent un niveau d'infestation à la récolte de l'ordre de 4.76%. Ce pourcentage est jugé très faible par rapport aux années précédentes où l'arboriculteur enregistre des pourcentages plus élevés. Signalons aussi que la récolte est pratiquée avant la maturité finale, vu que les fruits vont être stockés dans une chambre froide. Le cycle entier de la plante coïncide avec la première et le début de la deuxième génération, dont cette dernière cause les dommages les plus importantes, ce qui explique le pourcentage d'infestation qui est faible . Les quatre modalités ont une efficacité variable mais ils semblent globalement être très efficaces . Présentant une efficacité Abbott comprise entre 69,99% et 37,89%.

Ondet (2016), mentionne que les travaux de (Derridj *et al* /INRA, Birch*et al*/SCRI en Ecosse, Elad/Volcani en Palestine occupée, soc. Anadiag, l'ENSP Versailles, Innophyt) montrent des effets de limitation des dégâts de quatre bio-agresseurs par l'application d'infra doses de sucres : la pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis*), le carpocapse du pommier/poirier (*Cydia pomonella*), le nématode à galle (*Meloidogyne javanica*) sur racines de tomate, *Botrytis cinerea* provoquant la pourriture grise de la tomate et du haricot. Induisant un effet de résistance de la plante à un insecte ou à une maladie Fongique. Le déclenchement par le sucre exogène d'un signal à la surface des feuilles, transmis dans toute la plante. Plusieurs références signalent que les sucres des plantes (glucose, fructose, saccharose, raffinose…) ont un rôle dans la résistance de la plante à différents stress : nouveau concept de Sweet Immunity ou défense liée aux sucres (Bolouri Moghaddam et Van Den Ende, 2012 ; Arnault *et al*., 2013). Selon Derridj *et al.* (2012), l'application exogène du saccharose et du D-fructose seul induit une résistance systémique par antixénose à la ponte du carpocapse.

En France, Sur la variété Golden et à la présence d'une forte pression de carpocapse, le saccharose et le fructose de laboratoire et achetés dans le commerce, appliqués en alternance, très tôt le matin limitent les dégâts de carpocapse avec une efficacité égale à 41,08 % et 35,85% par ordre pour des pourcentages moyens des dégâts à la récolte 24,1 et 26,2 % contre 40,6 % sur le témoin (Ondet, 2016). Arnault *et al*. (2016), montrent que les essais conduits en plein champ en France et en Algérie, dans des vergers de pommier (variété Golden Delicious, Anna et Starkrimson) pour limiter les dégâts due

au carpocapse révèlent des efficacités abbott pour le fructose et le saccharose de laboratoire (100ppm) égales à 48.9 ± 9.1% et 40.8 ± 11.1% respectivement.
Nos résultats montrent aussi que les modalités testées diminuent significativement la population larvaire de carpocapse. Une diminution du nombre de larve de carpocapse de la pomme dans les bandes-pièges laisse présager une plus faible population d'adultes l'année suivante.
On outre, le saccharose et le fructose ont été approuvés comme substance de base (règlement d'exécution UE n° 916/2014 de la commission du 24 aout 2014 et 1392/2015 par ordre) pour le contrôle de la pyrale de maïs et le carpocapse des pommes et des poires (Arnault *et al*., 2015).

5. CONCLUSIONS

La stratégie de l'application foliaire des infra-doses de sucres est plutôt simple et facile, consiste à leur application juste après leur préparation, tous les 21 jours. Notre étude montre que l'application très tard dans la journée est aussi possible comparant aux autres études qui exigent leur application très tôt le matin au début de la photosynthèse. Il est nécessaire de tester ces sucres sur d'autres variétés de pommiers et sur poiriers. En effet il n'est pas impossible que les variétés ne se comportent pas toutes comme la variété Anna. De plus cette variété est assez précoce, il sera important de tester ces infra doses de sucre sur des variétés plus tardives. Nous pouvons dire que l'utilisation d'infra-doses de certains sucres, qui induisent une résistance de la plante par des voies de signalisation des sucres qui atteignent toute la plante, a un intérêt en tant que technique de lutte biologique contre le ravageur le plus redoutable des pommes et des poires.

REFERENCES

- Abbott WS. 1925. A method of computing effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, **18**, 265-267.
- Arnault I, Bardin M, Ondet SJ, Furet A, Chovelon M, Kasprick AC, Marchand P, Clerc H, Davy M, Roy G, Romet L, Auger J, Mançois A, Derridj S. 2015. Utilisation de micro-doses de sucres en protection des plantes. *Innovations Agronomiques*,**46**, 1-10.
- Arnault I, Chovelon M, Derridj D. 2012. Preliminary tests in field conditions of alternatives substances against grape downy mildew in organic farming. *Working Group Biological Control Of Fungal And Bacterial Plant Pathogens. Biocontrol of plant pathogens in sustainable agriculture:* 24- 27 juin 2012,Reims, France.
- Arnault I, Furet A, Chovelon M, Gomez C, Derridj S.2013. Reducing the amounts of copper in vineyards against *Plasmopara viticola* by the use of a low dose of D-fructose. *IOBC-WPRS Bulletin: Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens*,**86**, pp. 237.
- Arnault I, Ondet SJ, Lombarkia N, Warlop F, Derridj S. 2016. Preliminary results of foliar applications of fructose to reduce codling moth *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera, Tortricidae) damages on apple tree in organic farming. Ecofruit. 17th International Conference on Organic Fruit-Growing: Proceedings, 15-17 February 2016, Hohenheim, Germany, pp.196-199.
- **Arnault I, Zimmermann M, Furet A, Chovelon M, Thibord JB, Derridj S. 2017. Fructose and sucrose as priming molecules against pathogens and pests?.*Abstract book of*** *IOBC-WPRS general assembly Meeting of the WGs Integrated protection in viticulture, Induced resistance in plants against insects and diseases and Multitrophic interactions in soil* **:** 15-20 October 2017, Riva del Garda, Italy **,380 p.**
- Baldi I, Cordier S, Coumoul X, Elbaz A, Gamet-Payrastre L, Le Bailly P, Multigner L, Rahmani R, Spinosi J, Van Maele-Fabry G. 2013. Pesticides - effets sur la santé, Expertise collective, synthèse et recommandations. INSERM, Paris.
- Berger F, Delval Ph. 2018.Substances naturelles. EcophytoPIC. **Actualité publiée le:** 08/11/2018. Disponible sur : www.ecophytopic.fr/tr/méthodes-de-lutte/biocontrôle/substances-naturelles.
- Boivin TC, Chabert d'Hieres JC, Bouvier D, Beslay D, Sauphanor B. 2001. Pleiotropy of insecticide resistance in the codling moth, *Cydia pomonella*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **99**,381-386.
- Chouinard G, Firlej A, Cormier D. 2016. Going beyond sprays and killing agents: Exclusion, sterilization and disruption for insect pest control in pome and stone fruit orchards. *Scientia Horticulturae*,**208**, 13-27.

- Damalas CA. 2015. Pesticide Drift: Seeking Reliable Environmental Indicators of Exposure Assessment. In: Armon, R.H., Hänninen, O. (Eds.), Environmental Indicators, Springer, pp. 251-261.
- Derridj S. 2009. L'induction de la résistance à des phyto-agresseurs par des infra dose des sucres : une nouvelle technologie. *Institut technique de l'agriculture biologique (ITAB), journées fruits et légumes*. Paris, pp. 9-14.
- Derridj S. 2013. Applications foliaires d'infra-doses de sucres solubles. Recherche de l'amélioration de méthodes de protection des cultures contre les bio-agresseurs. Journées techniques: Techniques Culturales Simplifiées 6 décembre 2013, Paris, France.
- Derridj S, Gregoire V, Boutin JP, Fiala V. 1989. Plant growth stages inthe interspecific oviposition preference of the European corn borer and relation with chemicalspresent on the leaf surface. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **53**, 267-276.
- Derridj S, Cabanat I, Cochet E, Couzi P, Lombarkia N, Wu BR. 1999. Incidence des métabolites présents à la surface des organes du pommier sur le comportement de *Cydia pomonella* (Lepidoptera, Tortricidae). *A.N.P.P. 5ème conférence internationale sur les ravageurs en agriculture*. 7-8-9 décembre, II, Montpellier, pp. 279-286.
- Derridj S, Arnault I, Lombarkia N, Férre E, Galy H, Lambion J, Auger J. 2011. Les sucres solubles utilisés comme inducteurs de résistance de la plante aux bio-agresseurs. *AFPP-Quatrième conférence internationale sur les méthodes alternatives en protection des cultures Lille* : 8 au 10 Mars 2011, France, pp. 382-387.
- Derridj S, Lombarkia N, Garrec JP, Galy H, Ferré E. 2012. Sugars on leaf surfaces used as signals by the insect and the plant: implications in orchard protection against *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera, Tortricidae). In: Luis Cauterrucio Nova science Publishers Incedition. Moths: types, ecological significance and control, USA, pp 1-38.
- Ferré E, Galy H, Moulin F, Clement G, Derridj S. 2008. Le saccharose inducteur de résistance du pommier contre *Cydia pomonella* L. 8ème Conférence Internationale sur les ravageurs en agriculture. Montpellier, France, Octobre 2008, 8 P.
- Ismail M, Albitar L. 2016. Mortality factors affecting immature stages of codling moth *Cydia pomonella* (Lepidoptera; Torticidae), and the impact of parasitoid complex. *Biocontrol Science and Technology*, **26(1)**, 72-85.
- Lombarkia N, Derridj S. 2002. Incidence of apple fruit and leaf surface metabolites on *Cydia pomonella* oviposition. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **104**, 79 –87.
- Lombarkia N, Derridj S. 2008. Resistance of *M. domestica* to *Cydia pomonella* egg-laying due to leaf surface metabolites. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **128**, 57–65.
- Moghaddam MRB, Van den End W. 2012. Sugars and plant innate immunity. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 3989-3998.
- Ondet SJ. 2016. Des infra doses de sucre sur pommiers pour limiter les dégâts de carpocapse (*Cydia pomonella* L.). GRAB, 11P.
- Ondet SJ, Gorski C. 2015. Stratégie de maîtrise du carpocapse du pommier par infra doses de sucre. *Arboriculture*, fiche 17.2011.04 AB. 4 p.
- Sauphanor B, Brosse V, Bouvier JC, Speich P, Micoud A, Marnet C. 2000. Monitoring resistance to diflubenzuron and deltamethrin in French codling moth populations (*Cydia pomonella*). *Pest Management Science*, **56**, 74-82.
- TronelC. 2009. Le point sur la validation du modèle carpocapse. Infos-Ctifl, **250**, 37-39.

Punica granatum Fruits Peels, Antifungal Source Against Date Palm Fusariosis

Noureddine Boulenouar[1, 2], Abdelkrim Cheriti[2], Abderrazak Marouf[3], Nasser Belboukhari[4]
[1]Biological Sciences Department, Nour Bachir University Center, El-Bayadh 32000, Algeria.
[2]Phytochemistry & Organic Synthesis Laboratory, Tahri Mohamed University, Bechar 08000, Algeria
[3]Biological Sciences Department, Salhi Ahmed University, Naama 45000, Algeria
[4]Bioactive Molecules and Chiral Separation Laboratory, Tahri Mohamed Laboratory, Bechar 08000, Algeria

SUMMARY
The date palm "*Phoenix dactylifera* L.*"* represents for the saharan ecosystem the principal component. It gives for this desertic region a microclimate to survive and cultivate many crops. The date palm has numerous enemies (biotic and abiotic), among them the Bayoud disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa). Till know there is no efficient treatment for this disease. The present study has been established on the basis of two observations: the decrease of *Punica granatum* trees in oases during last decades with increase in Foa infection; and many studies have demonstrated the richness of *Punica granatum* fruits in antimicrobial metabolites.
The effect of *Punica granatum* fruits extracts on Foa has been evaluated using radial growth method. The extracts have been prepared with heat reflux using four solvents (Hexane, Dichloromethane, Ethyl Acetate, and Methanol).
The best effect was shown by dichloromethane extracts (0.05 and 0.1% w/v) with radial growth decrease (13.70±1.52% and 29.95±0.24%), respectively. The important effect of dichloromethane extract reflects its richness in bioactive compound(s) that can be investigated for the development of efficient Bayoud disease treatment.
Key words: Date palm, bayoud, *Fuasarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, *Punica garanatum*, radial growth, antifungal.

RESUME
Le palmier dattier « *Phoenix dactylifera* L.» représente le composant principal pour l'écosystème saharien. Il donne pour cette région désertique un microclimat pour survivre et cultiver de nombreuses cultures. Le palmier dattier a de nombreux ennemis (biotiques et abiotiques), parmi lesquels la maladie de Bayoud causée par *Fuasarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa). Il n'existe pas un traitement efficace pour cette maladie. La présente étude a été établie sur la base de deux observations: la diminution des arbres de *Punica granatum* dans les oasis au cours des dernières décennies avec une augmentation de l'infection au Foa, et de nombreuses études ont montré la richesse des fruits de *P. granatum* en métabolites antimicrobiens. L'effet des extraits de fruits de *P. granatum* sur Foa a été évalué par la méthode de croissance radiale. Les extraits ont été préparés par l'extraction à reflux avec quatre solvants (Hexane, Dichlorométhane, Ethyle acétate, Méthanol). Le meilleur effet a été démontré par l'extrait dichlorométhanique (0,05 et 0,1% p/v) avec une diminution de la croissance radiale (13,70±1.52% et 29.95±0.24%), respectivement. L'importance de l'effet de l'extrait dichlorométhanique reflète sa richesse en composé(s) bioactif(s) qui peut être utilisés pour le développement d'un traitement efficace contre la maladie du Bayoud.
Mots-clés: Palmier dattier, bayoud, *Fuasarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, *Punica garanatum*, croissance radiale, antifongique.

1. INTRODUCTION
Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) is very important tree in the Saharan regions. This tree is the principal component for the survival of the local community (human, plants, animals). *P. dactylifera* is affected by some biotic factors among them *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (the causal agent of Bayoud) (Jain, 2012; Bouguedoura *et al.*, 2015).
Punica granatum L. is a widely known plant for its benefits. Among most known goods is its richness in antimicrobial compounds (Foss *et al.*, 2014; Barathikannan *et al.*, 2016; Gomes *et al.*, 2016). The choice of *P. granatum* L. was based on: 1. Historical presence of this tree in abundance in date palm oases (south-west of Algeria) and possible relation between decrease in this tree cultivation and

increase in Foa infection (Laoufi *et al.*, 2014). 2. Richness of this species in secondary metabolites with proven physiological effects especially the peels.
This study was realized to evaluate the effect of *P. granatum* fruits peels extracts on the causal agent of Bayoud disease, *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. It is a continuity of our research (Boulenouar *et al.*, 2009, 2011, 2012, 2014; Laoufi *et al.*, 2015; Ghazi *et al.*, 2018). The tests were done using the radial growth technique and the results were presented as percentage of radial growth decrease.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant material

This study was carried out using *P. granatum* obtained from South-West of Algeria (Bechar). The species was identified and a voucher specimen was stored at Phytochemistry and Organic Synthesis Laboratory under N° CA99/64. The fruits peels were separated from other parts of the fruits, washed, dried in shade, then grinded until obtention of homogenous powder.

2.2. Preparation of *Punica granatum* Extracts

The extracts were prepared using heat reflux extraction of 120 g of the peels powder with 600 ml of the solvent (Hexane, Dichloromethane, Ethyl Acetate, Methanol) for 2 hours, then filtrated and evaporated. The crude extracts were conserved at 4°C till use.

2.3. Antifungal Test

- Fungal Strain

The fungal strain used in this study is *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, the causal agent of Bayoud disease which affects the date palm trees (*Phoenix dactylifera* L*)*. The strain used in this study was obtained from the Technical Institute for Saharan Agronomy (TISA), Adrar, Algeria. The strain was identified and a voucher specimen was stored at Phytochemistry and Organic Synthesis Laboratory under N° POSL/2011/01.

- Procedure

Discs (6mm in diameter) were removed from 7 days Foa cultures on PDA and put face down on the center of petri dishes containing PDA and extract (0.05% and 0.1% w/v). The control petri dishes contain the PDA without extract. The controls testing solvents effect were not being realized because the protocol used with radial growth diminishes the residual solvents to neglected quantities (the mixture of extracts with culture medium).
Evaluation of inhibition was carried out by measuring the radial growth (diameter measurement) with respect to the control diameter. The degree of inhibition is presented as a percentage calculated according to the following formula (Dalili *et al.*, 2015):

$$PGR=[(C-T)/T]\times 100$$

Where:
PGR: Percentage of radial growth (%); T: diameter of Foa growth for test (mm); C: diameter of Foa growth for control (mm).

3. Results and Discussion

The development of efficient treatment against Bayoud disease represents an important step to protect Saharan regions. The use of plants as source of bioactive metabolites has various advantages. Our study was based on the use of *P. granatum* fruits as source of treatment against date palm fusariosis.
The evaluation of the antifungal effect of two concentrations of *P. granatum* extracts with four solvents has demonstrated that the most important is dichloromethane extract which induces a decrease of growth by 29.95±0.24% (Table 1). Dichloromethane extracts compounds with moderate polarity may reflects that antifungal effect on Foa is related to compounds with medium polarity. Al-Khateeb *et al*. (2013) demonstrated that Pomegranate methanolic leaves extract has decreased radial growth of *F. oxysporum* by 57.8%. This effect is higher than our findings as previously cited. These researchers were used *F. oxysporum* without referring to the *forma specialis* which make a difference

for this species. On the other hand, the difference in part used causes a difference in composition of the extract and/or concentration of bioactive compounds.
Natural products have proven to be the principal source for new bioactive substances (Foss *et al.*, 2014). Contrary to our finding, Santos *et al.* (2015) demonstrated that dichlorometane fraction from *P. granatum* represents less antimicrobial activity. This may be due to difference between microorganisms interaction to different fractions. On the other hand, different fractions reflect the presence of different metabolites.

Table 1: Effect of *Punica granatum* fruit peels extracts on *Fuasarium oxysporum* f. sp. *albedinis* radial growth (results are expressed as percentage of radial growth decrease compared to control).

Extraction Solvent	Extract Concentration (% w/v in PDA)	
	0.05	0.1
Hexane	7.61±0.18	12.18±0.22
Dichloromethane	13.70±1.52	29.95±0.24
Ethyl acetate	ND	ND
Methanol	ND	4.06±0.20

ND: No decrease of radial growth; Results are expressed as Mean ± SEM from five replicates.

Jurenka (2008) clearly demonstrated the importance of this species as source of antimicrobial substances through presentation of many studies dealing its effectiveness. Among secondary metabolites, polyphenols extracted from *P. granatum* fruit peels were active against phytopathogenic fungi (El-Khateeb *et al.*, 2013). Therefrom, the effectiveness of dichloromethanic extracts is probably related to the presence of polyphenols in this extract. This proposition is in accordance with Brown and Mora (1997) and Nita-Lazar *et al.* (2004). They indicated that phenolic pathway is activated in plants as part of defense mechanism.
No positive control has been used because of absence of known antifungal used for this fungus (Boulenouar *et al.*, 2009; Boulenouar *et al.*, 2012). This reflects the resistance of this forma specialis.
The absence of decrease in radial growth of Foa (two extracts with ethyl acetate and one extract with methanol) can be related to the presence of metabolite(s) that can play role in stimulating Foa growth (Table 1). The study realized by Laoufi *et al.* (2015) using bioautography has demonstrated the presence of antifungal compounds against Foa in ethyl acetate extract. The absence of antifungal effect in the present study is possibly due to antagonism present in ethyl acetate crude extract.
El-Khateeb *et al*. (2013) showed that methanolic extract of *P. granatum* leaves decrease the growth of *Fusarium oxysporum*. The controversy is probably related to difference in composition between methanolic extracts from fruit peels and leaves. The absence of antifungal effect is sometimes related to detoxification mechanism done by the fungus as resistance mechanism or presence of less effective metabolites.

4. CONCLUSION

This study indicated that dichloromethane extract from *P. granatum* is a good target for development of treatment against Foa compared to other extracts. Therefore, the bioactive compound(s) need(s) to be studied separately to prove the effect. The antifungal effect is caused by one or many compounds that interact in different manner (antagonism, synergism…). Thus, the study of separated compounds may increase or decrease the effect.
As concluded from this study, the development of treatment from *P. granatum* passes through investigation of dichloromethane extracts to more developed tests. As done in our previous studies, the evaluation of antifungal effect on Foa is not so easy but it can predict the next steps.

REFERENCES

- Barathikanan K, Venkatadri B, Khusro A, Al-Dhabi NA, Agastian P, Arasu MV, Choi HS and Kim YO. 2016. Chemical Analysis of *Punica granatum* Fruit Peel and Its in Vitro and in Vivo Biological Properties. *Complementary and Alternative Medicine*, **16**, 264.

- Bouguedoura N, Bennaceur M, Babahani S, Benziouche SE. 2015. Date palm status and perspective in Algeria. In: Al-Khayri J, Jain S and Johnson D, Editors. Date palm genetic resources and utilization, In: Springer: Dordrecht, pp. 125-168.
- Boulenouar N, Marouf A, Cheriti A. 2009. Effect of some poisonous plants on *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Journal of Biological Sciences*, **9**(6), 594-600.
- Boulenouar N, Marouf A and Cheriti A. 2011. Antifungal activity and phytochemical screening of extracts from *phoenix dactylifera L*. cultivars. *Natural Product Research*, **25**(20), 1999-2002.
- Boulenouar N, Marouf A., Cheriti A. and Belboukhari N. 2012. Medicinal Plants Extracts as Source of Antifungal Agents Against *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis. Journal of Agricultural Science and Technology*, **14**, 659- 669.
- Boulenouar N, Marouf A and Cheriti A. 2014. Direct Bioautography for antifungal activity measurement "case of Bayoud disease". *PhytoChem. and Biosub. Journal*, **8**(1), 33-37.
- Brown PD, Morra MJ. 1997. Control of soil-borne plant pests using glucosinolate containing plants. *Advances in Agronomy*, **61**, 167-231.
- Dalili A, Bakhtiari S, Barari H and Aldaghi M. 2015. Effect of Some Fungicide Against the Growth Inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum* Mycelial Compatibility Groups. *Journal of Plant Protection Research*, **55**(4), 354-361.
- Ghazi R, Boulenouar N, Cheriti A, Reddy H K and Govender P. 2018. Bioguided fractionation of *Citrullus colocynthis* extracts and antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. *Current Bioactive Compounds*, **14**, 1.
- Gomes LAP, Figueirido LMA, Palma ALR, Geraldo BMC, Castro KCI, Fugisaki LRO, Jorge AOC, Oliveira LD and Junqueira JC. 2016. *Punica granatum* L. (Pomegranate) Extract: In Vivo Study of Antimicrobial Activity Against *Porphyromonas gingivalis* in *Galleria mellonella* Model. *The Scientific World Journal*, 1-5.
- Jain SM. 2012. Date palm biotechnology: Current status and prospective - an overview. *Emirate Journal of Food and Agriculture*, **24**(5), 386-399.
- Jurenka J. 2008. Therapeutic Applications of Pomegranate (*Punica granatum* L.): A Review. Alternative Medicine Review, **13**(2), 128-144.
- El-Khateeb AY, Elsherbiny EA, Tadros LK, Ali SM and Hamed HB. 2013. Phytochemical Analysis and Antifungal Activity of Fruit Leaves Extracts on the Mycelial Growth of Fungal Plant Pathogens. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, **4**(9), 199.
- Foss SR, Nakamura CV, Nakamura TU, Cortez DAG, Endo EH and Filho BPD. 2014. Antifungal activity of pomegranate peels extract and isolated compound punicalagin against dermatophytes. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, **13**:32.
- Laoufi A, Boulenouar N, Cheriti A and Marouf A. 2014. *Punica granatum* et Bayoud: Enquête au Niveau de la Région de Bechar. *PhytoChem and Biosub Journal*, **8**(4), 247-252.
- Laoufi A, Boulenouar N, Cheriti A and Marouf A. 2015. Bioautographic Test of *Punica granatum* extracts on *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *PhytoChem and Biosub Journal*, **9**(3), 98-104.
- Nita-Lazar M, Heyraud A, Gey C, Braccini I and Lienart Y. 2004. Novel oligosaccharides isolated from *Fusarium oxysporum* L. rapidly induce PAL activity in Rubus cells. *Acta Biochimica Polonica*, **51**, 625-647.
- Santos ES, Hoscheid J and Mata PTGh. 2015. Antimicrobial Activity of Crude Ethanolic Extracts of *Punica granatum* Linn. Fruit Peels. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, **36**(2), 219-225.

Secondary symbionts modify interactions between aphids and natural enemies

Sabrine Attia[1], Hajer Sahraoui[2], Thierry Hance [3], Kaouthar Grissa Lebdi[1]
[1]Laboratoire d'Entomologie-acarologie, Institut National Agronomique de Tunisie, (UR : Bio-agresseurs et lutte intégrée en agriculture), Tunis, Tunisia
[2]Centre Technique d'agrumes, Beni Khaled, Tunisia
[4] Earth and Life Institute, Biodiversity Research Centre, Université catholique de Louvain, 4-5, Place Croix du Sud, B- 1348 Louvain-la-Neuve, Belgium
Correspondence to**:** Sabrine Attia Mail: sabine_bio5@yahoo.fr

SAMMARY
Serratia symbiotica is one of the most common symbionts found in aphids. It exhibits a wide diversity of strains that vary in their degree of reliance on hosts. This symbiont, can affect the fitness of their hosts with protection parasites or predators. This review will provide a relevant and valuable addition to the scientific literature by integrating the impacts of climate change on insects endosymbiosis to further our knowledge and predict how such facultative bacteria will be affected in a changing planet. Specifically, we predicted that secondary symbionts would negatively impact the behavior of aphid natural enemies. These findings highlight the often far-reaching consequences that facultative symbionts can have in co-evolution systems.
Key-words: symbionts, aphid, natural enemies, behavior

1. INTRODUCTION

With a growing human population and changes to the earth's climate putting increased pressure on agricultural practices, it is paramount that researchers better understand how global change in the form of changing climate and land use will affect insect thermal tolerance and life history traits. This in turn will have implications for potential pest outbreaks in a warming climate and the efficiency with which natural control agents can control pest populations. Among pests, aphids are vectors in the transmission of approximately 275 plant viruses which equates to over 50% of all insect transmitted plant viruses (Nault, 1997). For the past several decades, aphids (Hemiptera: Aphididae) have received attention from biologists interested in dissecting the mechanisms and consequences of symbiosis.
Aphids possess the obligate primary bacterial endosymbiont, *Buchnera aphidicola*, which provides the aphid with essential amino acids lacking from their phloem sap diet. Several aphids harbour facultative maternally transmitted bacteria, known as secondary symbionts wish are shown in a few species of aphids to confer resistance against parasitoids (Oliver *et al*., 2003), and resistance to heat stress. The generality of the parasitoid resistance and of the heat tolerance is currently unclear.
This review will provide a relevant and valuable addition to the scientific literature by integrating the impacts of climate change on insects endosymbiosis to further our knowledge and predict how such facultative bacteria will be affected in a changing planet.

2. IMPACT OF CLIMATE CHANGE ON INSECTS

Climate change related conditions are among the biggest threat to biodiversity in the near future (Thomas *et al*., 2004). It appeared that an increased weather variability and higher incidence of extreme events, such as droughts, heat waves and cold waves are to be expected (Easterling *et al.,* 1997; *Karl et al.,* 1995, 1998; Walther *et al*., 2002) in the future. Several types of impacts of such climate changes on ecosystem functioning such as changes in phenology, life history or distribution of species (Parmesan, 2006; Hance *et al*., 2007; Radchuk *et al.,* 2013) have already been studied. In any given ecosystem, the multi-trophic interactions between the different trophic levels, for example between plants, herbivorous insects and their natural enemies (predators, parasitoids and pathogens) result from a long co-evolutionary process specific to a particular environment and relatively stable climatic conditions. These multi-trophic interactions are particularly affected by climatic changes as exemplified from several studies that showed that a change in the temperature influenced the biology of each component species of a system differently, provoking a destabilization in their population dynamics that may lead to the extinction of part of the system (Hance *et al.,* 2007; Parmesan *et al.,* 2013).

The impacts of above changes are particularly relevant in agro-systems of economic importance, such as citrus orchards in Tunisia. Indeed, many models estimate that the negative impact of climate changes on multi-trophic interactions will increase the severity and timing of pest outbreaks in addition to ecosystem functioning (Hance *et al*., 2007). Moreover, crop protection strategies based mainly on chemicals are widely questioned with documented negative effects on health, natural flora and fauna and even on agricultural production and sustainability through the decimation of beneficial natural enemies of pests and parasites, and selection of resistance in targeted organisms (Pimentel *et al*., 1992; Wilson & Tisdell, 2001; Gullino *et al*., 2000). Altogether, the need for improved control of agricultural pests and diseases and the necessity to reduce the use of chemicals require a change in the paradigm of crop protection, especially in the context of climate change.

Consequently, numerous private companies provide advice to farmers to better manage their fields through ecological engineering in order to decrease the amount of pesticides and increase the action of natural enemies, whilst maintaining productivity. However, climate change weakens the action of the natural enemies. In order to provide better help for crop management and pest control, it is necessary to understand how species, and particularly species in interactions inside a trophic chain will respond to climate changes.

In agro-systems, the tri-trophic interactions between plant-pest and pest-natural enemies are relatively well known, but a part of the system remains a black box, especially in the context of climate change: how the relation between pests and their endosymbionts under climate change will evolve, and how this evolution will impact the relation of the pests with their natural enemies?

3. SYMBIONTS AND INSECTS

Phloem-feeding insects (aphids, whiteflies, psyllids, scales and mealybugs) harbour bacterial endosymbionts with both obligate and facultative relationships (Moran, 2001). Most aphid species possess the obligate primary bacterial endosymbiont, *Buchnera aphidicola*, which provides the aphid with essential amino acids lacking from their phloem sap diet. Many species of aphid can also harbour facultative secondary endosymbiotic bacteria. The significance of these bacteria remained elusive until recent studies on the secondary symbionts of the pea aphid *Acyrtosiphum pisum* revealed several effects on aphid fitness and phenotypes. In this species, three facultative symbionts, *Serratia symbiotica*, *Hamiltonella defensa*, and *Regiella insecticola* have been discovered. Almost all aphids that were screened had a facultative symbiont infection. However, infection by more than one facultative symbiont in the same aphid was rare. Although these secondary bacteria are not essential for survival, they play an important role in the ecology and evolution of aphids by affecting important traits such as insecticide resistance, natural enemy resistance, thermal resistance, viral transmission, reproduction and development (Morin *et al*., 1999; Gottlieb *et al*., 2010).

4. SYMBIONT CONFER RESISTANCE TO PARASITOIDS

In controlled genetic background strains of aphids, secondary endosymbionts confers resistance to parasitoid attack, causing high mortality of developing parasitoid larvae. Compared with uninfected controls, experimentally infected aphids were more likely to be attacked by ovipositing parasitoids but less likely to support parasitoid development. This strong interaction between a symbiotic bacterium and a host natural enemy provides a mechanism for the persistence and spread of symbiotic bacteria (Oliver *et al.,* 2003). There is an enormous clonal variation for susceptibility to parasitoids in natural populations of aphids (Von Burg *et al.,* 2008; Vorburger *et al.,* 2009). Some of this variation is explained by genetic differences among aphid clones (von Burg *et al.,* 2008; Vorburger *et al.,* 2009), but most of the variation is owing to endosymbiotic bacteria that some clones possess (Oliver *et al.,* 2003). Moreover, it has been shown that heat negatively affects pea aphid resistance, suggesting the thermosensitivity of its defensive symbiosis with *H. defensa*. In addition, *S. symbiotica* has been demonstrated to confer heat tolerance in *A. pisum* at 37°C, in saving the obligate primary bacteria *B. aphidicola* by maintaining a high number of bacteriocytes (Chen *et al.,* 2000; Montllor *et al.,* 2002). Some studies showed that the prevalence of facultative bacteria such as S. *symbiotica, H. defensa* and *R. insecticola* varies considerably across pea aphid host plant races and geographic areas (Tsuchida *et al.,* 2002; Russell & Moran 2006) possibly influenced by the selective advantage of carrying different symbionts in different habitats (Oliver *et al.,* 2005). There are lot of techniques that were developed recently in order to study these endosymbionts such as identification, transmission, fitness and thermo

tolerance of their hosts and their resistance against natural enemies. The host consequences of symbiotic interactions seem to vary with environment, and such variation is expected to play an important role in shaping the prevalence and distributions of symbiosis throughout nature.

2. CONCLUSION

In conclusion, our knowledge on how climate affect the presence of symbionts in aphid species under natural conditions will aid in the development of agricultural practices, pest management and forecasting systems for predicting the impact of climate change on pest outbreaks for the future.

REFERENCES

- Chen D.Q, Montllor C.B and Purcell A.H. (2000). Fitness effects of two facultative endosymbiotic bacteria on the pea aphid, **Acyrthosiphon pisum**, and the blue alfalfa aphid, **A. kondoi**. *Entomol. Exp. Appl.*, 95:315–323.
- Easterling D. R., et al. (1997). Maximum and minimum temperature trends for the globe. *Science*. 277: 364 – 367.
- Gottlieb Y., Zchori-Fein E., Mozes-Daube N., Kontsedalov S., Skaljac M., Brumin M et al. (2010). The transmission efficiency of tomato yellow leaf curl virus by the whitefly *Bemisia tabaci* is correlated with the presence of a specific symbiotic bacterium species. Journal of Virology.,18: 9310-9317.
- Gullino M., Leroux L.P. and Smith C.M (2000). Uses and challenges of novel compounds for plant disease control. *Crop Protection*.,19:1–11.
- Hance T., Van Baaren J., Vernon P., Boivin G (2007). Impact of extreme temperatures on parasitoids in a climate change perspective. *Annu Rev Entomol.*, 52:107-26.
- Karl T. R., Knight R. W.and Plummer N. (1995). Trends in high-frequency climate variability in the twentieth century. *Nature.*, 377:217-220.
- Karl T. R., and Knight R. W. (1998). Secular trends of precipitation amount, frequency, and intensity in the USA. *Bull. Am. Meteorol. Soc*., 79:231-241.
- Morin S. and GroEL A. (1999). Homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl virus. *Virology*., 256:75-84. 5.
- Montllor C.B, Maxmen A. and Purcell A.H. (2002). Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids **Acyrthosiphon pisum** under heat stress. *Ecol. Entomol*. 27:189–195.
- Nault, L.R. (1997). Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 90, 521–541.
- Oliver K.M, Russell J.A, Moran N.A and Hunter M.S. (2003). Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proc. Natl Acad. Sci.USA.*,100:1803–1807.
- Oliver K.M. and Moran N.A, Hunter M.S. (2005). Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*.102:12795–12800.
- Parmesan C. (2006). Evolutionary Responses to Recent Climate Change. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 37:637-669.
- Parmesan C., Burrows M.T., Duarte C. M., Poloczanska E. S., Richardson A. J., Schoeman D. S. and Singer M. C. (2013). Beyond climate change attribution in conservation and ecological research. *Ecol. Lett.*, 16, 58–71.
- Pimentel D., Acquay H., Biltonen M., Rice P., Silva M., Nelson J., Lipner V., Giordano S., Horowitz A., and D'Amore M. (1992). Assessment of environmental and economic costs of pesticide use. In D. Pimentel and H. Lehman, eds. The Pesticide Question: Environment, Economics and Ethics. Chapman and Hall, New York.
- Russell J.A. and Moran N.A. (2006). Costs and benefits of symbiont infection in aphids: variation among symbionts and across temperatures. *Proc. R. Soc. B.*, 273:603–610.
- Sandström J.P., Russell J.A., White J.P., Moran N.A. (2001). Independent origins and horizontal transfer of bacterial symbionts of aphids. *Mol Ecol.*, 10:217-28.
- Thomas C.D., Cameron, A., Green, R.E. et al. (2004). Extinction risk from climate change. *Nature*, 427: 145-148.

- Tsuchida T., Koga R., Shibao H., Matsumoto T., Fukatsu T. (2002). Diversity and geographic distribution of secondary endosymbiotic bacteria in natural populations of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum. Molecular Ecology*, 2002: 2123-35.
- Von Burg S., Ferrari J., Müller C.B. and Vorburger C. (2008). Genetic variation and covariation of susceptibility to parasitoids in the aphid Myzus persicae: no evidence for tradeoffs. Proceedings B, 2008; 275:1089-1094.
- Vorburger C., Sandrock C., Gouskov A., Castaneda L.E. and Ferrari J. (2009). Genotypic variation and the role of defensive endosymbionts in an all-parthenogenetic host–parasitoid interaction. *Evolution*.,63:1439-1450.
- Walther G.R., Post E et al. (2002). Ecological responses to recent climate change. *Nature.*, 416:389-395.
- Wilson C. and Tisdell C. (2001). Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. *Ecol Econ.*, 39: 449-462.

Essais de lutte contre l'acarien *Eutetranychus orientalis* Klein (Acari: Tetranychidae) sur agrumes

Sahraoui Hajer[1], Attia Sabrine[2], Lebdi-Grissa Kaouther[2]
[1]Centre Technique des Agrumes, Beni Khalled, Tunisie
[2]Laboratoire de Recherche : Bio-agresseurs et lutte intégrée en agriculture, Institut National Agronomique de Tunisie, Université de Carthage, Tunisie
Email: hajersahraoui@yahoo.fr

RESUME
Certains produits de synthèse comme les huiles minérales et le soufre mouillable offrent de nombreux avantages dans la lutte intégrée et en agriculture biologique en comparaison à d'autres produits de synthèse à large spectre. Dans ce contexte, des études ont été effectuées dans un verger d'agrumes tunisien pour tester l'efficacité des huiles minérales et du soufre mouillable contre l'acarien *Eutetranychus orienalis* en comparaison avec l'acaricide spécifique « Bifenazate ».
Les résultats du premier essai, effectué au mois de Décembre, a montré que l'huile minérale est la plus efficace à partir du 21e jour après traitement avec un taux de réduction de 84% d'œufs par rapport à l'acaricide Bifenazate qui est de 76% calculé à la même date. Le soufre utilisé en traitement d'hiver n'a pas donné une efficacité significative contre *E. orientalis* par rapport au témoin. Par contre, dans un deuxième essai réalisé en été dans la même parcelle le traitement a permis une réduction de 93% des formes mobiles et 83% des œufs d'*E. orientalis* au 14ème jour après traitement.
Mots-clés: *Eutetranychus orientalis*, Bifenazate, huiles minérales, soufre mouillable.

SUMMARY
Some synthetic products such as mineral oils and wettable sulfur offer many benefits in integrated pest management and in organic agriculture compared to other broad spectrum products. In this context, studies were carried out in a Tunisian citrus orchard to test the effectiveness of mineral oils and wettable sulfur against the mite *Eutetranychus orienalis* in comparison with the specific acaricide "Bifenazate". Results of the first trial, carried out in December, showed that mineral oil is the most effective from the 21st day after treatment with 84% reduction rate of eggs compared to Bifenazate with 76% on the same date. The sulfur used in winter did not give significant efficacy against *E. orientalis* compared to the control. On the other hand, the wettable sulfur used in the same orchard in summer allowed 93% reduction of the mobile forms and 83% of the *E. orientalis* eggs at the 14th day after treatment.
Keywords: *Eutetranychus orientalis*, Bifenazate, mineral oils, wettable sulfur.

1. Introduction

Eutetranychus orientalis Klein est l'un des acariens phytophages les plus importants de la Méditerranée orientale, de l'Asie et de la plus grande partie de l'Afrique (Migeon & Dorkeld, 2019). Cette espèce a été signalée en Tunisie depuis 1998 (Bolland *et al.*, 1998). Elle peut causer des dégâts importants principalement sur agrumes, mais elle peut également infester d'autres plantes cultivées telles que le caroubier, le palmier, le noyer, l'amandier, le poirier, la vigne, le ricin, le coing et d'autres espèces de légumes et de plantes ornementales (Migeon & Dorkeld, 2019). En Tunisie, ce ravageur apparait sur agrumes en début juin et reste actif en automne (Lebdi et khoufi, 2012).
Le soufre est utilisé depuis longtemps en agriculture comme fongicide et acaricide (Goodwin and Martin, 1928; Hoy, 1987). Il était le seul acaricide utilisé pour lutter contre les acariens jusqu'à 1920 (Jeppson et *al.*, 1975). Cependant l'efficacité de ce produit dépend de certaines conditions spécifiques comme la température et l'humidité (Auger et *al.*, 1999, 2003), bien qu'il soit phytotoxique pour de nombreuses espèces de plantes lorsque les applications sont réalisés à haute température (Jeppson et *al.*, 1975).
Les huiles minérales offrent également de nombreux avantages par rapport aux pesticides à large spectre et conviennent à une utilisation en agriculture biologique et dans les programmes de lutte intégrés. Les applications de ces produits en traitements d'hiver sont efficaces pour lutter contre les acariens de la famille des Tetranychidae (Jeppson *et al.*, 1975).

L'objectif de ce travail est d'étudier l'efficacité de ces deux produits sur l'acarien *E. orientalis*, un des ravageurs importants des agrumes en Tunisie.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Parcelle expérimentale

L'essai a été réalisé dans une parcelle expérimentale dans la région du Cap-Bon au centre technique des agrumes (C.T.A : 36°37'53.7"N 10°33'24.1"E). La parcelle est plantée par des clémentines cv. Cassar plantées en 1998. La parcelle est composée de 44 pieds avec une densité de plantation de 4mx5m et un système d'irrigation de type goutte à goutte. Aucun autre traitement n'a été appliqué durant la période de suivi.

2.2. Dispositif expérimental et d'échantillonnage

Les traitements dans les deux essais ont été appliqués selon un dispositif en blocs aléatoires avec 4 répétitions. Trente feuilles ont été prélevées au hasard chaque semaine pour les blocs traités et non traités (témoins). Les échantillons ont été disposés dans des sacs en plastique et conservées au réfrigérateur puis observés sous loupe binoculaire au laboratoire.

Les produits acaricides testés au cours du premier essai sont : L'huile minérale (Citrole®) avec la dose de 200 ml/ hl ; Le Bifénazate 240 g/l SC (Floramite®) avec la dose 400cc/hl ; et le Soufre mouillable (Agrosoufre®) avec la dose 150g/hl. Les traitements ont été appliqués le 01 Décembre 2017 et les suivis ont été faits durant 21 jours.

Pour le deuxième essai, les produits acaricides testés sont : Le Bifénazate (240 g/l SC) (Floramite®) avec la dose 400cc/hl et le Soufre mouillable (Agrosoufre®) avec la dose 150g/hl. Les traitements ont été appliqués en Juillet 2018 et les suivis ont été faits durant 21 jours.

2.3. Les conditions climatiques

Les conditions climatiques (Température maximale, température minimale et précipitations) enregistrés au niveau de la parcelle expérimentale sont présentées dans la figure 1.

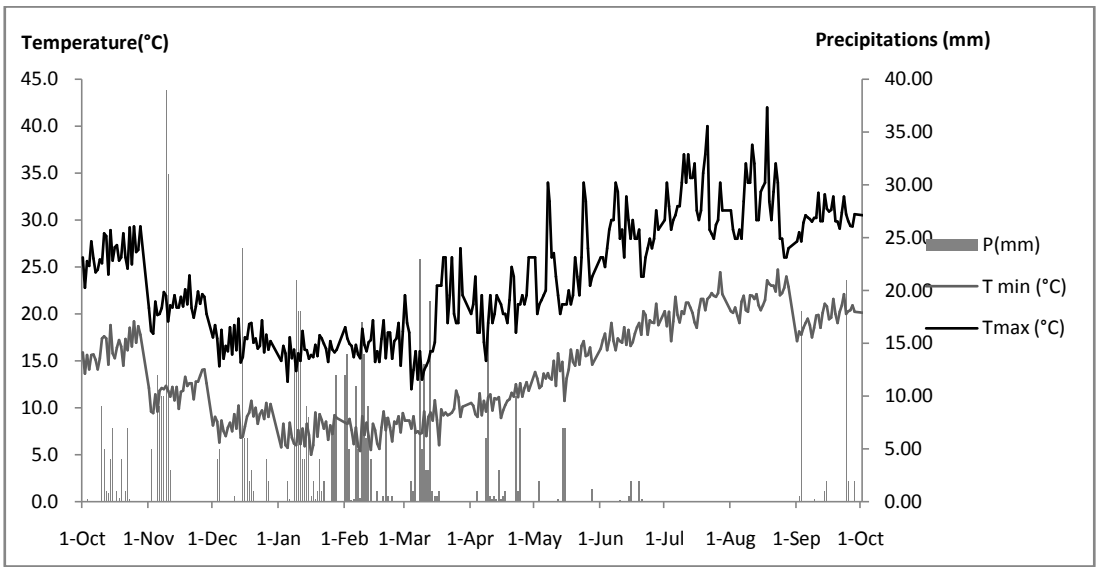


Figure 1. Températures maximales et minimales (°C) et précipitations (mm) enregistrées durant la période d'essai (Source : Station météorologique du C.T.A)

2.4. Evaluation des traitements

Les comparaisons des moyennes des effectifs d'acariens ont été comparées pour chaque date grâce à des analyses de la variance (ANOVA). Si des différences significatives ont été détectées, des comparaisons multiples ont été faites en utilisant la méthode LSD (multiple range test: $P < 0,05$), le niveau de signification est fixé à 5%. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide de la version logiciel Statgraphics Centurion XV version 15.1.02. Les taux de réduction sont calculés selon la formule d'Abbot (1925).

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Le premier essai

Durant la période du premier essai, les températures minimales enregistrées ont été variables entre 6°C et 9°C et les maximales entre 15°C et 18°C. La figure 2 présente la structure de la population d'*E. orientalis* durant la période de suivi au niveau des blocs non traités. D'après les résultats, durant la période de décembre le stade œuf s'est montré dominant avec une faible présence des femelles et des formes immobiles (chrysalides). Pour l'évaluation de l'efficacité des produits testés, on s'est basé uniquement sur l'effet ovicide.

Les résultats du premier essai sont présentés dans la figure 3. Une réduction du nombre d'œufs de 84% et 76% a été observée après 21 jours après traitement par l'huile et le Bifénazate respectivement ($P<0.05$).

A notre connaissance, aucun travail similaire avec l'huile minérale n'a été effectué contre l'acarien *E. orientalis*. Par contre, un traitement similaire réalisé par Church *et al.* (2009) contre l'acarien tétranyque *Eotetranychus willamettei* (McGregor) a permis de réduire 95.4% de la population.

Le soufre n'a pas d'effet sur les œufs à la dose appliquée. Ce résultat est cohérent avec ceux en littérature. D'après Klett (1965), le soufre mouillable n'a pas un effet acaricide à des températures inférieures à 17°C. Pour confirmer cette hypothèse, un deuxième traitement a été réalisé par le soufre dans la même parcelle au mois de juillet.

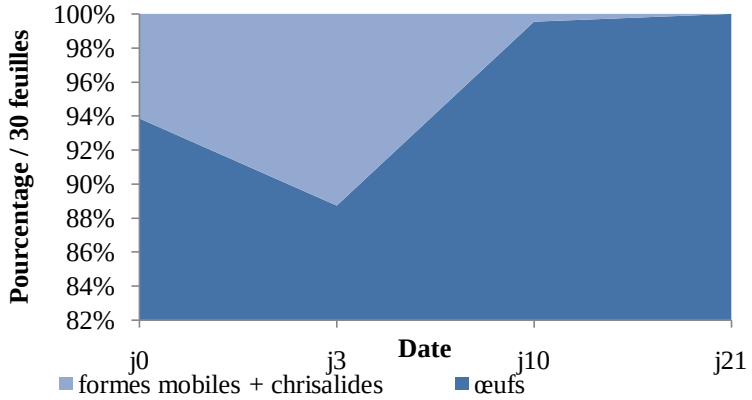


Figure 2. Structure de la population dans les blocs non traités durant la période d'essai

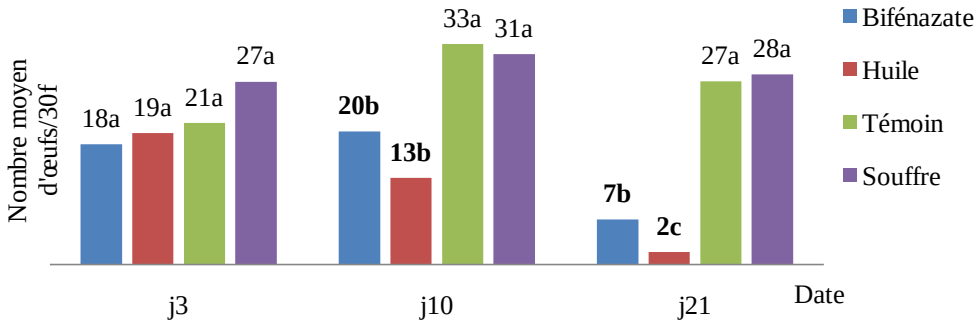


Figure 3: Evolution des nombres moyens d'œufs *d'E. orientalis* après traitement par le l'huile, le soufre et le Bifenazate en comparaison avec le témoin (les chiffres différents indiquent une différence significative)

3.2. Le deuxième essai.

Le deuxième essai a été réalisé dans la même parcelle pour tester l'effet du soufre mouillable en été au mois de juillet contre *E. orientalis.*

Durant la période du premier essai, les températures maximales enregistrés ont été variables entre 20 et 21°C et les maximales entre 33 et 35°C. Pour éviter le risque de phytotoxicité, la dose choisie est une faible dose (150 g/hl). Les résultats du deuxième essai sont présentés dans les figures 4 et 5.

Le soufre appliqué dans la même parcelle en juillet à permis de réduire significativement les formes mobiles de 93% et les œufs de 83% au 14eme jour (P<0.05) avec une durée d'efficacité ne dépassant pas les 14 jours.
Ce résultat confirme notre hypothèse et montre que les conditions climatiques, notamment la température peut influencer l'efficacité du soufre lors du traitement contre les acariens.

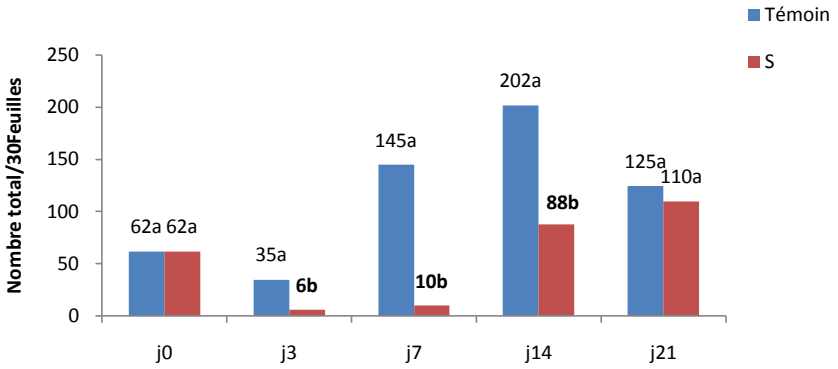


Figure 4: Evolution des nombres moyens des formes mobiles *d'E. orientalis* après traitement avec le soufre (les lettres différentes indiquent une différence significative)

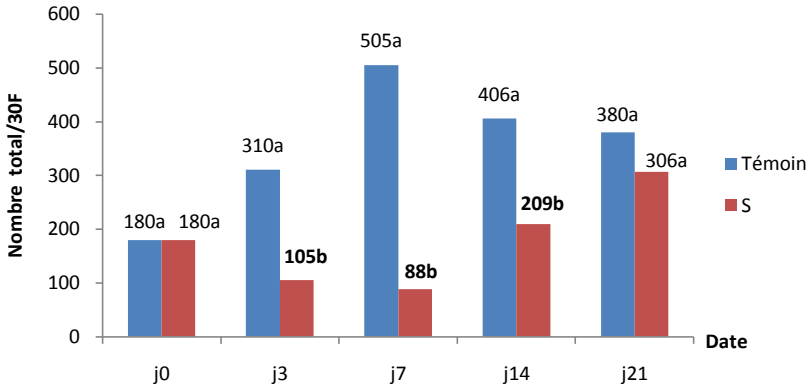


Figure 5: Evolution des nombres d'œufs *d'E. orientalis* après traitement avec le soufre (les lettres différentes indiquent une différence significative)

4. CONCLUSION

L'utilisation de l'huile minérale en traitement d'hiver contre *E. orientalis* peut réduire la population en nombre d'œufs jusqu'à 84% sur agrumes. Appliqué à la dose de 150g/hl le soufre mouillable est efficace dans la lutte contre cet acarien en été dans des intervalles de température allant de 20° C à 35°C. Cependant ce même produit, appliqué en hiver, n'a pas d'efficacité.

RÉFÉRENCES

- Abbott WS. (1925): A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, **18**:265–267.
- Auger P, Tixier M-S, Kreiter S and Vergonjeanne H. (1999): The miticide effects of sulphur in the control of *Tetranychus urticae* spider mite. *Phytoma*, 515: 24-29.
- Auger P, Guichou S, and Kreiter S. (2003): Variations in the acaricidal effect of wettable sulfur on *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae); effect of temperature, humidity, and life stage. *Pest Management Science*, 59: 559-565.
- Bolland HR, Gutierrez J, Flechtmann CHW. (1998): World catalogue of the spider mite family. Brill, Leiden, Boston, Koln, 392 pp.

- Church ERB. (2009): Efficacy of Botanical and Mineral Oils on Willamette Mite (Acari: Tetranychidae). A Thesis presented to the Faculty of California Polytechnic State University, San Luis Obispo, p 64.
- Goodwin W and Martin H. (1928): The action of sulphur as a fungicide and as an acaricide. Part I. *Annals of Applied Biology***, 15**:623–638.
- Hoy MA. (1987): Sulfur as control agent for pest mites in agriculture, in *Proc Internat Symposium—Elemental sulphur in agriculture*, Vol 1, Nice, Syndicat Français du Soufre, Marseille, France, pp 51–61.
- Migeon A. and Dorkeld F. (2019): Spider Mites Web: a comprehensive database for the Tetranychidae. Availabe from http://www.montpellier.inra.fr/CBGP/spmweb (Accessed 05/04/2019)
- Lebdi-Grissa K and Khoufi A. (2012). Bio-ecology of phytophagous mites on Citrus. Proceeding of the 7th Symposium of the European Association of Acarologists, Vienna, Austria, p 92.
- Klett M. (1965). Uber die einwirkung von schwefelpräparaten auf einige Tetranychiden (Acari: Tetranychidae). Zeitschrift Angewandte Zoologie, 52: 59-130.
- Jeppson LR, Keifer HH and Baker EW. (1975): History of chemical control and mite resistance to acaricides: Acaricid effect of sulfur. *In* Jeppson L R, Keifer H H and Baker E W (Eds.). Mites injurious to economic plants. University of California Press, Berkley. 545pp. 47-61.

Activité antifongique in vitro des huiles essentielles de deux espèces d'Armoise contre les champignons responsables de pourritures fongiques de la tomate

F. Bouchenak, A. Lamgharbi, H. Degaichia, C. chaouia, F.Z. Benrebiha
Université Saad Dahlab,Blida1, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Laboratoire des Biotechnologies , Blida 09000 Algérie

RESUME
Cette étude vise à l'évaluation de l'activité antifongique in vitro des huiles essentielles de deux espèces *d'armoise Artemisia Herba alba* et *Artemisia absinthium* contre six espèces de champignons responsables des maladies cryptogamiques de la tomate : *Botrytis cinerea, Fusarium sp, Rhizoctonia solani, Alternaria sp,Cladosporium solani et Sclerotinia spp*
Les compositions chimiques des huiles essentielles isolées par hydrodistillation des parties aériennes d'*Artemisia herba alba* et *Artemisia absinthium*, ont été analysées par CG et CG-SM. Les résultats de l'analyse ont montré que l'huile d'*A.herba alba* est constituée principalement de Camphre (32,12%). Le profil chimique de l'huile d'Artemisia *absinthium* est dominé par le βThujone (60.93%). Cette étude a été conçue aussi pour examiner les activités antifongiques des deux huiles essentielles. Leur pouvoir antifongique a été testé par la méthode de diffusion et la détermination des zones d'inhibitions de la croissance mycélienne, et en dilution en milieu solide pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI). Les résultats ont montré que les deux huiles essentielles *d'Artemisia herba alba*, et *Artemisia absinthium* ont un pouvoir antifongique important vis-à-vis des souches testées. Less résultats démontrent clairement que l'huile essentielle pourrait constituer une alternative valable aux traitements chimiques sur la base de leur efficacité sur différents types d'agents phytopathogènes et de leur souplesse d'utilisation.
Mots-clés: *Artemisia herba alba, Artemisia absinthuim*, activité antifongique, biopesticides, composition chimique, huile essentielle,GC/MS

1.INTRODUCTION

Les maladies des plantes sont principalement contrôlées par des pesticides chimiques et dans certains cas par des pratiques culturales. Cependant, l'utilisation massive de produits chimiques dans l'agriculture a été un sujet de préoccupation public en raison des effets indésirables de certains produits chimiques sur les organismes non cibles et leurs effets cancérigènes et nocifs sur l'environnement (Cook et Baker, 1983).
La croissance des plantes est fortement influencée par de nombreux facteurs biotiques et abiotiques. La salinité est l'un des facteurs majeurs limitant la productivité des plantes et par conséquent la production agricole. Dans le monde, 340 millions d'ha de surfaces agricoles sont affectées par la salinité soit 23% des terres cultivées (Cheverry, 1995) dont 3,2 millions d'ha en Algérie (Hamdy, 1999). Cette salinisation est surtout rencontrée dans les zones arides et semi-arides du pays. Elle conduit à l'appauvrissement des sols en matières organiques et à l'accumulation d'ions toxiques. Par conséquent, les terres agricoles productives sont détériorées. D'un autre côté, l'accroissement de la population a augmenté la demande pour les produits agricoles. Ceci n'a pas seulement menacé la suffisance des ressources alimentaires disponibles, mais aussi a nécessité l'exploitation de terres marginales cultivées.
En Algérie, les céréales constituent la base de l'alimentation et occupent une place privilégiée dans les habitudes alimentaires des populations aussi bien dans les milieux ruraux qu'urbains. La production actuelle des céréales en Algérie ne couvre que partiellement les besoins de la population. Le recours aux importations pèse lourdement sur l'économie de l'état. Les données du problème auquel la céréaliculture algérienne fait face n'ont pas fondamentalement changé. Elle est essentiellement pluviale; elle est soumise à des régimes pluviométriques variables et bien souvent faibles qui se traduisent par de fortes contraintes hydriques et saline. Ceci explique la stagnation du rendement qui dure depuis près d'un demi-siècle.
L'Algérie est aujourd'hui de plus en plus confronté aux problèmes de sécheresse et de salinité (90% environ du territoire national est aride à semi-aride). L'orge ou la production de l'orge en Algérie comme toutes les autres céréales a toujours fait face à des complications culturales, représentées par

différents type de stress. Beaucoup de travaux ont été menés dans le but de réduire l'effet du stress salin sur la croissance et la productivité des plantes. La plupart ne s'intéressent qu'au développement des variétés résistantes (Essemine 2010).

L'application exogène de solutés compatibles tels que la proline et la glycine bétaïne a retenu l'attention de nombreux chercheurs depuis plusieurs années (Mansoor, 1998). Actuellement, plusieurs questions se sont soulevées concernant la sécurité et l'efficacité des produits chimiques synthétiques utilisés en médecine, en industrie alimentaire et en agriculture. En effet, l'usage abusif et inapproprié des agents antimicrobiens chimiques dans l'agriculture a entrainé l'émergence de microorganismes phytopathogènes multirésistants, engendrant un problème épineux pour la production végétale et pour l'environnement (Chang et al., 2007).

Pour faire face à ce problème de maladies fongiques, la lutte chimique est souvent la méthode la plus utilisée. Malheureusement, celle-ci, semble néfaste pour l'homme et pour son environnement (Barnard et., 1997). En outre, elle présente des effets négatifs sur d'autres microorganismes représentant une source de fertilisation des sols et d'une importance dans les réseaux trophiques (Thiam, 1991). De multiples alternatives ont été proposées ces dernières décennies pour remplacer ces pesticides chimiques, notamment la lutte biologique utilisant des biopesticides. Cependant, celles-ci restent d'une utilisation très limitée, et sont encore dans leur phase préliminaire ou en expérimentation.

Actuellement, beaucoup d'espèces végétales ont fait l'objet de nombreuses recherches. Leurs métabolites secondaires ont été formulés en tant que pesticides botaniques pour la protection des végétaux, car ils ne laissent pas de résidus toxiques pour l'homme et son environnement (Duke, 1985). Pour remédier à cette situation, les travaux scientifiques se sont de nouveaux orientés vers le patrimoine naturel et traditionnel, en particulier les plantes médicinales, ces dernières possèdent des propriétés biologiques avérées très intéressantes, qui trouvent leurs applications dans divers domaines, à savoir en médecine, en cosmétologie et en l'agriculture.

Les métabolites secondaires des plantes sont réputés depuis fort longtemps pour leurs propriétés phytothérapeutiques et depuis quelques années l'Homme s'intéresse également à leurs autres activités biologiques. Ces métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches *in vivo* et *in vitro* notamment la vulgarisation de nouveaux constituants naturels (Bezza et al., 2010).

Le genre *Artemisia* est parmi les genres les plus importants de la famille des composées (Astéracées). Il a été enregistré onze espèces d'Artemisia en Algérie (Bezza et al., 2010). *Artemisia absinthium* L communément appelé « Chedjret Meriem » et *Artemisia Herba alba* appelé « chih ». Ces espèces ont été utilisées depuis l'antiquité dans la médecine populaire (Hose, 2002). De nombreuses études sur la caractérisation chimique et les activités biologiques ont été menées sur ces espèces. Leurs huiles essentielles ont été largement utilisées principalement pour leurs propriétés antifongiques (contre les champignons pathogènes pour l'homme), antioxydants (Kordali et al., 2005) et insecticides (Derwiche et al., 2009)

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés aux deux espèces Artemisia *absinthium* L. collectée dans la région de cherchell (située à l'ouest de l'Algérie) et *Artemisia herba alba* collectée dans la région de Djelfa. Nous avons recherché à mettre l'accent sur les potentialités de de ces espèces en tant que biopesticide pour lutter contre les champignons phytopathogènes. Ainsi, nous avons extrait les huiles essentielle des parties aériennes et nous avons déterminé leur rendement, la composition chimique ainsi que leurs activités antifongiques.

La croissance des plantes est fortement influencée par de nombreux facteurs biotiques et abiotiques. La salinité est l'un des facteurs majeurs limitant la productivité des plantes et par conséquent la production agricole. Dans le monde, 340 millions d'ha de surfaces agricoles sont affectées par la salinité soit 23% des terres cultivées (Cheverry, 1995) dont 3,2 millions d'ha en Algérie (Hamdy, 1999). Cette salinisation est surtout rencontrée dans les zones arides et semi-arides du pays. Elle conduit à l'appauvrissement des sols en matières organiques et à l'accumulation d'ions toxiques. Par conséquent, les terres agricoles productives sont détériorées. D'un autre côté, l'accroissement de la population a augmenté la demande pour les produits agricoles. Ceci n'a pas seulement menacé la suffisance des ressources alimentaires disponibles, mais aussi a nécessité l'exploitation de terres marginales cultivées

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1.Matériel végétal

Les deux espèces d'Armoise ont été récoltées en période végétative. Les échantillons ont été identifiés par référence au spécimen disponible dans l'herbier du Département de Botanique, de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (E.N.S.A.) El Harrach, Alger. par le biais de la flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales (Santa, 1963).Les plantes, fraîchement récoltées, ont été séchées pendant deux mois à l'ombre dans un endroit sec et aéré .Le matériel végétal utilisé est composé de feuilles sèches et tiges .Celles-ci ont été ensuite pesées, broyées grossièrement et récupérées dans des sacs en papier.

2.2. Extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation

Les huiles essentielles des feuilles *d'Artemisia absinthium* L. et *Artemisia herba alba* (100g) ont été obtenues par hydrodistillation pendant 3 heures d'extraction dans un appareil de type clevenger (Clevenger, 1928). L'huile essentielle est conservée à 4°C dans un flacon hermétiquement fermé.

Elle consiste à immerger directement la matière végétale (200 g) à traiter (coupé) dans un ballon rempli d'eau distillée (3.5 L) surmonté d'une colonne de 60 cm de longueur reliée à un réfrigérant. Le tout est ensuite portée à ébullition pour 3 h. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide. Les vapeurs ascendantes provenant de l'alambic ou du réacteur progressent, puis se condensent par refroidissement. Le condensat est récupéré, puis l'huile est séparée de la phase aqueuse.

L'huile essentielle a été stockée à -4 °C dans l'obscurité en présence de sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) avant de procéder aux analyses.

2.3. Détermination du rendement

Le rendement d'extraction (%) est calculé par la formule ci-dessous : R (%) = (Masse de l′extrait sec / Masse du matériel végétal utilisé)*100 (Afnor, 1986).

2.4. Détermination de la composition chimique d'huile essentielle par CPG couplée à la spectrométrie de masse

L'analyse chromatographique a été effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse à régulation électronique de pression de type HP série Agilent 6890 N piloté par ChemStation «NIST98» et couplée avec un spectromètre de masse de type HP série Agilent 5973.

La fragmentation est effectuée par impact électronique à 70 eV. La colonne utilisée est capillaire HP-5MS (30m x 0.25 mm) avec une épaisseur du film de la phase 0.25 µm.

Le mode d'injection utilisé est le Splitless avec un débit de 0.2 µl par 30 secondes et une température de 250°C. La température de la colonne est programmée de 60 à 250°C à raison de 3°C /min. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est de 1ml/min. , d'un détecteur FID règlé à 250 °C et alimenté par un mélange de gaz H2/Air et un injecteur split-splitless règlé à 250 °C. Le mode d'injection est split (rapport de fuite : 1/50, débit : 66 ml.min-1). Le gaz utilisé est l'azote avec un débit de 1,7 $ml.min^{-1}$.La température de la colonne est programmée de 50 à 200 °C pendant 5 min à raison d'une montée de 4 $°C.min^{-1}$. L'appareil est piloté par un système informatique de type « HP ChemStation », gérant le fonctionnement de l'appareil et permettant de suivre l'évolution des analyses chromatographiques. Le volume injecté est 1 µl.

L'identification des constituants a été réalisée en se basant sur leurs indices de Kováts (IK) et sur la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Cette dernière est réalisée sur un chromatographe en phase gazeuse de type HewlettPackard (série HP 6890) couplé avec un spectromètre de masse (série HP 5973). La fragmentation est effectuée par impact électronique à 70eV. La colonne utilisée est une colonne capillaire HP-5MS (30 m x 0,25 mm), l'épaisseur du film est de 0,25 µm. La température de la colonne est programmée de 50 à 200 °C pendant 10 min à raison d'une montée de 4 °C.min-1. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est fixé à 1,5 $ml.min^{-1}$. Les huiles essentielles ont été diluées (1:100) dans du n-hexane ; puis 2 µL ont été injectés dans le système GC-MS. L'identification des constituants a été par une co-injection avec des standards commerciales, qui ont utilisés chaque fois que possible, en même temps a été réalisée par comparaison de : leurs spectres de masse (MS), l'indices de rétention (RI), et de leurs indices de Kováts (IK) avec ceux des bases de données (Adams, 2007).

2.5. Etude de l'activité antifongique d'huile essentielle

2.5.1. Souches fongiques étudiées

Pour la détermination de l'activité antifongique des huiles essentielles des deux espèces d'Artemisia six espèces de champignons responsables des maladies cryptogamiques de la tomate : *Botrytis cinerea, Fusarium sp, Rhizoctonia solani, Alternaria sp,Cladosporium solani et Sclerotinia spp* ont été choisies. Les six espèces appartiennent à la collection de la mycothèque du Laboratoire de mycologie.

Elles sont cultivées par repiquage sur le milieu nutritif PDA (Potato Dextrose Agar) pendant 7j à l'obscurité à 25 ˚C. Les micromycètes ont été maintenus sur de la gélose au malt et les cultures ont été conservées à 4 ° C et repiquées une fois par mois (Booth, 1971).

2.5.2 Activité antifongique de l'huile essentielle d'Artemisia absinthium L et Artemisia herba alba

Elle a été évaluée sur six souches fongiques. Le milieu de culture utilisé est Sabouraud Dextrose Agar (SDA) Cette activité est répétée trois fois. Tout d'abord, cette activité a été déterminée par la méthode de diffusion de disque (NCCLS, 1997). 10^6 CFU/mL de cellule fongique, ont été étalées sur des boîtes de Pétri contenant Sabouroug Dextros Agar (SDA). Les disques (6 mm de diamètre) ont été séparément imprégnés avec 15 µl de l'huile essentielle et placés sur la gélose qui a déjà été inoculée avec le microorganisme sélectionné. Un disque d'antibiotique (Fluconazole) de référence approprié a été appliqué sur chaque boite de Pétri 20 µg/disque. Ces disques ont servi comme contrôle positif efficace contre les quatre espèces microbiennes. Des disques vierges ont été utilisés comme contrôle négatif. Les boites ont été incubées pendant 7J à 27°C. L'activité antifongique a été évaluée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition de croissance en millimètres (y compris le diamètre du disque de 6 mm).

La concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle des parties aériennes d'*Artemisia absinthium* L.et *Artemisia herba alba* ont été déterminées selon la méthode de dilution en gélose (Robert-Dernuet, 1995). En bref, des boîtes de Pétri contenant SDA à différentes concentrations d'huile essentielle ou d'extrait allant de 0,01 %jusqu'à 1,0% (v/v) ont été inoculées avec les souches testées. La culture microbienne utilisée (2×10^7 UFC/ml) a été diluée dans l'eau peptonée (0,1% p/v) jusqu'à 10^4 et 10^5 UFC/ml. 50 µl de chaque culture dilué ont été répandus sur la surface de la gélose solidifiée. Le contrôle positif se composait de SDA inoculé seulement avec la suspension microbienne. Les boites non inoculés contenant de l'huile essentielle ont servi comme témoin négatif. Les boites d'essai et de contrôle ont ensuite été incubées pendant 7j à 27°C. Pour chaque traitement, l'absence de colonies sur toutes les plaques testées a été considérée comme un effet inhibiteur. La plus faible concentration d'huile essentielle nécessaire pour inhiber totalement la croissance des microorganismes testés a été désignée comme la MIC.

2.7. Analyse statistique

Toutes les expériences ont été répétées trois fois, les résultats ont été présentés par la moyenne avec son écart type pour chaque cas.

Les analyses statistiques des résultats sont traitées par le logiciel STAT-ITCF 1987-1988 vers.4 par une analyse de variance au seuil de 5%. Le test de Newman et Keuls est utilisé pour la comparaison des moyennes.

3. RÉSULTATS

3.1. Rendement et composition chimique

Le rendement moyen en huile essentielle a été calculé en fonction de la matière végétale sèche de la partie aérienne de la plante. Le rendement en huile essentielle d'*Artemisia absinthium* L. a fourni un taux de 0,5 %. Ce rendement peut être considéré comme moyen par rapport à certaines plantes qui sont exploitées.

La composition chimique de l'huile essentielle de la partie aérienne de l'armoise obtenue par hydrodistillation a été analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les pourcentages et temps de rétention des composants identifiés sont répertoriés dans le tableau 1 dans l'ordre de leur élution.

Tableau 1 : Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de *l'Artemisia absinthium* récoltées dans la région de Cherchell

Numéro	IR(min)	IK	Constituants	Aire (%)
1	5,92	938	α-Pinène	0, 2
2	6,01	950	camphène	0,05
3	6,24	965	Sabinène	0,18
4	6,53	980	β-Thujène	0,14
5	6,78	902	β Pinène	0,1
6	7,65	915	β-Mycrène	0,93
7	8,12	924	Phellandrène	0,71
8	8,64	985	4+-Carène	4,25
9	9 ,12	1030	1,8 Cineole	1,28
10	9,73	1045	3-Carène	0,34
11	10,23	1058	γ-Terpinene	3,71
12	13,66	1112	**βThujone**	**60,82**
13	15,96	1177	4-Terpinéol	2,89
14	16,55	1189	α-Terpinéol	0,58
15	19,3	1209	Camphor	0,09
16	21,2	1246	Borneol	0,24
17	23,93	1279	β- Bourbonène	0,09
18	26,0	1480	Germacrène	0,36
19	35,32	1537	β- Eudesmol	1,13
20	36,12	1638	Caryophyllène	1,15
21	38,82	1716	**Chamazulène**	**16,65**
22	47,34	1829	ρ-Cymène	4,29

IR=indice de rétention (RI), indice de Kováts =(IK)

Tableau 2: Composition chimique de l'huile essentielle des parties aériennes de *l'Artemisia herba alba* récoltées dans la région de Djelfa.

Numéro	IR(min)	IK	Constituants	Aire (%)
1	5,928	939	α-Pinène	1,2
2	6,2	950	camphène	3 ,90
3	6,34	975	Sabinène	0,28
4	6,53	980	β-Thujène	0,14
5	6,78	902	β Pinène	0,1
6	7,65	915	β-Mycrène	0,93
7	84	928	Paracymène	0,81
8	9 ,12	1030	1,8 Cineole	11,2
9	10,23	1058	γ-Terpinene	0,45
10	11,66	1112	βThujone	4,58
11	12,1	1177	**Chrysanthenone**	**12,89**
13	15,96	1180	**Camphre**	**32 ,13**
14	16,55	1189	α-Terpinéol	0,58
15	19,3	1209	Camphor	0,09
16	20,2	1226	Terpinene 4-ol	1,24
17	23,93	1279	Verbenone	0,23
18	26,0	1480	Germacrène D	1,36
19	27,6	1490	β- Eudesmol	0,11
20	30,34	1629	Davanone	4,29

La classification des composants identifiés basée sur les groupements fonctionnels montre la dominance des monoterpènes oxygénés chez l'*A.absinthium.* Sa distribution est relativement élevée (71,61%). La ß-thujone est le constituant principal (60,82%) suivi du chamazulene (16,65%), γ terpinène (3,71%), βcymène (4,21%) 4+Carène (4,29%), 4 Terpinéol (2,89 %). Ils sont accompagnés d'autres constituants minoritaires qui ne sont pas dénués d'importance: 1,8-cinéole (1,28%), β Eusmidol (1,15 %) et Caryophyllène 1,15%).
La classification des composants identifiés basée sur les groupements fonctionnels montre la dominance des monoterpènes oxygénés chez l'*A.herba alba* Sa distribution est relativement élevée (71,61%). Le camphre est le constituant principal (32,13%) suivi du chrysanthenone (12,89%) , 1,8-cinéole (11,2%) davanone (4,29%),. Ils sont accompagnés d'autres constituants minoritaires qui ne sont pas dénués d'importance :, Germacrène D (1,36 %) et Terpinène 4-ol (1,24%).

3.2. Activité antifongique des huiles essentielles des deux espèces.

Le pouvoir antifongique d'huile essentielle des feuilles d'*Artemisia absinthium* L. et *A.herba alba*, a été étudié vis-à-vis six souches pathogènes causant des dégâts importants sur plantes cultivées. Ce pouvoir est évalué par la détermination de zone d'inhibition et de la CMI (Tableau 3). Les résultats obtenus ont montré que l'huile essentielle des feuilles d'*Artemisia absinthium* L. et Artemisia absinthium ont une activité antifongique importante.

Tableau 3: Activité antifongique des huiles essentielles et des deux espèces d'*Artemisia*

	A.absinthium	*A.herba alba*	Fluconazole	*A.absinthium*	*A.herba alba*	Fluconazole
Espèces fongiques	DZI (mm)	DZI(mm)	DZI(mm)	CMI(mg/ml)	CMI(mg/ml)	CMI (mg/ml)
Botrytis cinerea	25,67±0,68[a]	21,4±0,6[a]	20±0,2[b]	0,125	0,12	0,1
Fusarium sp	24,0±0,58[a]	23,8±0,5[a]	21±0,5[a]	0,125	0,12	0,12
Rhizoctonia solani	17,2±1,04[b]	17,6±0,8[b]	22±0,3[a]	0,5	0,34	0,2
Alternaria sp	12,33±0,58[c]	14,1±0,7[c]	19±0,5[b]	0,25	0,2	0,2
Cladosporium	13,1 + 0,23[c]	15,2 +0,1[c]	16,2+0,1[b]	0,22	0,2	0,14
solani	12,3+ 0,2[c]	14,4+0,1[c]	15,5+0,3[b]	0,24	0,2	0,2
Sclerotinia sp						

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type de trois déterminations, à $P < 0,05$.
diamètre de la zone d'inhibition (DZI=mm+ ET), concentration minimale inhibitrice (CMI=mg/ml).

Dans cette étude, nous avons examiné l'activité antifongique des huiles essentielles des deux espèces sur six souches fongiques différentes. Le tableau 3 résume les résultats. A titre de comparaison, on a utilisé des disques d'antibiotiques comme standards contenant de la Flucanazole. Dans l'ensemble, les résultats indiquent que 10 µL d'extraits à 10 mg/ml et 10 µL d'huile pure ont une activité antifongique considérable. Les huiles essentielles des deux espèces des feuilles et des tiges ont présenté une très bonne activité contre les *Botrytis cinerea* et *Fusarium sp et Rhizoctonia solani* par rapport aux trois autres espèces ($P \leq 0,05$).Dans l'ensemble, les huiles essentielles d'*Artemisia absinthium* ont montré une bonne activité antifongique (DZI : 17-25 mm) et une CMI (0,125-0,5mg/ml) , Ainsi que les huiles essentielles d'Artemisia herba alba (DZI =14-21 mm) et une CMI comprise entre (0,2-0,500mg/ml).). Globalement, les zones d'inhibition et les CMI sont relativement équivalentes que celles obtenues par l'antibiotique de référence qui a un effet fongistatique DZI= (22-25mm) et une CMI comprise entre (0,2-0,500mg/ml). L'effets fongistatiques des HE d'*Artemisia absinthium* L. et *Artemisia herba alba* sur les souches et *Fusarium sp* et *Botrytis cinerea* et *Rhizoctonia solani* DZI=(25-24mm)est très important par rapport à celui du fluconazole ($p \leq 0,05$) (tableau3). L'analyse comparative de l'effet des huiles essentielles des deux espèces sur les souches phytopathogènes n'a pas objectivé de différence significative ($p \geq 0,05$) (Tableau 3).

4. DISCUSSION

Le rendement en HE de notre échantillon est similaire à celui estimé par Schulz et *al.* (2004), il a été remarqué que les rendements varient respectivement de 0.3% à 0.5% en HE. La teneur en HE est très

proche de celle obtenue par Lopes-Lutz et *al.* (2008) au Canada et par DERWICH et *al.* [19 au Maroc, elle a été évaluée respectivement à 0.5% et à 0.57%.

La composition chimique des huiles essentielles d'*Artemisia absinthium* L. a été rapportée par quelques auteurs et le chémotype a été différent d'une région à une autre. Nous avons remarqué que la teneur du composé majoritaire « thuyone » de l'HE de l'absinthe obtenue en Algérie (2010, 2011) , au Maroc (Derwiche et al., 2009), en Tunisie (Msaada et al., 2015) présente des quantités, respectivement, de 90.12% ,60.82/54.07% et 46.94% en thuyone. L'absinthe récoltée en Algérie en Tunisie et au Maroc est chimiotaxonomique de type thuyone. Ce dernier est présent dans l'huile à des pourcentages qui varient entre 40-70% et selon l'origine de plante (Msaada et al., 2015). Par exemple, en Iran (Rezaeinodehi et Khangholi, 2008) l'analyse de l'HE de l'absinthe récoltée dans le Nord-Ouest du pays, présente le chimiotype suivant par ordre majoritaire décroissant: β-pinène, thuyone et le sabinène, alors que celle récoltée dans le Nord-Est du pays (Nezhadali et Parsa, 2010) donne le chimiotype composé de : camphor, ρ-cymène et isoledène. Par ailleurs, l'analyse de l'HE de la même plante, récoltée au Canada, Greece, Espagne, France , Italie (Nezhadali et Parsa, 2010), présente le chimiotype suivant : sabinyl acétate, myrcène et thuyone. Tandis que, en Turquie (Kordali et al., 2007), l'analyse de l'HE montre un chimiotype composé de : chamazulène, nuciferol butanoate et nuciferol propionate.

A l'issu de ces résultats, nous constatons que l'origine géographique a un effet important sur la composition chimique de l'HE d'*Artemisia absinthium* L. (Kordali et al., 2007). En effet, nos résultats présentent un chimiotype qui ne concorde pas avec ceux du Canada (Nezhadali et Parsa, 2010), de l'Iran (Nezhadali et Parsa, 2010) et de la Turquie (Kordali et al., 2007).

L'HE d'*Artemisia absinthium* est comparable dans sa composition chimique à l'*Artemisia herba alba* (Astéracées) sauf pour la chrysanthénone, qui est inexistante chez *A.absinthium* L. communément, l'huile essentielle d'armoise blanche est connue par sa composition en monoterpénoides, surtout oxygénés, comme le 1,8 cinéole, chrysanthénone, α/β thujones, et le camphre comme composants majoritaires (Lopes-Lutz et a., 2008). La chrysanthénone est ainsi présente comme constituant majeur (47,71%) (Ghanmi et al., 2010) chez la plupart des armoises. Cette différence de composition chimique peut être un indicateur pour différencier entre deux espèces voisines qui abondent à la même hauteur altitudinale (Ouyahya et al., 1990).

De ce fait, ce qui caractérise particulièrement la famille des Astéracées, c'est le polymorphisme chimique surtout chez les Artemisia. Cette variation ou chimiovariété peut se présenter d'un peuplement à l'autre ou même d'un individu à l'autre et peut être due à des facteurs exogènes comme l'ensoleillement, la nature et les composants du sol, la température, l'altitude, etc. et aux facteurs endogènes tel que le patrimoine génétique des individus. Ces facteurs constituent autant de paramètres qui influencent à la fois le rendement et la qualité chimique de l'huile essentielle .

L'activité antifongique de l'huile d'absinthe peut être expliquée par sa richesse en composés oxygénés monoterpéniques (64.29%) comme le thuyone, le 4-terpinéol et le α-terpinéol contenus dans cette huile, qui agissent comme des antiseptiques, anti-inflammatoires et antimicrobiens (Ghanmi et al., 2010).

L'étude menée par Juteau et al. (2003), a montré que le taux élevé de thuyone est la principale cause de l'activité antimicrobienne de l'huile d'*Artemisia absinthium* L. Cette activité pourrait être liée à la présence du thuyone qui est le majoritaire dans cette huile.

Les travaux de Juteau et al. (2003), montrent que les huiles essentielles extraites à partir de feuille d'*A. absinthium* L. ont une bonne activité fongique contre *Candidas albicans*. Les résultats obtenus ont montré que cette plante qui est riche en 1,8-Cineole possède un pouvoir modéré sur les champignons testés.

Le pouvoir antifongique des constituants majoritaires de notre huile essentielle dont le Thujone, Chamazulène, Limonene a été validé par de nombreux chercheurs (Ghanmi et al., 2010; Zheng, 1994). Les huiles essentielles d'*Artemisia absinthium* possèdent des activités antifongiques contre trois champignons phytopathogènes du genre *Fusarium*, le pouvoir antifongique est attribué au chamazulene. (Ghanmi et al., 2010) et Thuyone (Juteau et al., 2003).

Cependant, l'huile essentielle d'*Artemisia absinthium* en provenance de France riche en(Z)-epoxyocimene et chrysanthenyl acetate inhibe la croissance de *candidas albicans* et *Saccharomyces cerevisiae* var. chevalieri (Ghanmi et al., 2010).

Le pouvoir antifongique des huiles essentielles étudiées pourrait être attribué à la présence des composants qui possèdent une activité antifongique provoquant des dommages membranaires sévères et une perte d'homéostasie d'où elle entraine à l'inhibition totale ou la mort cellulaire.
Par ailleurs, l'activité antifongique des huiles essentielles peuvent être expliquée par l'effet synergique entre les différents composés d'huile essentielle, les composés majoritaires sont souvent responsables de l'activité antifongique ; cependant, les composés mineurs peuvent contribuer significativement à cette activité.

5. CONCLUSION

Le présent travail vise à valoriser deux plantes médicinales et aromatiques très répandues dans le monde et en Algérie. Notre étude a porté sur l'analyse chimique de leurs huiles ainsi que leurs potentiels antifongiques *in vitro*. L'analyse de la composition chimique des huiles des deux espèces a permis d'identifier a permis d'identifier, respectivement, 22 composés chez d'*Artemisia absinthium* et 20 composés chez Artemisia herba alba,les principaux constituants sont : le thuyone suivi de chamazulène et ensuite de ρ-cymène chez Artemisia absinthium . Cette huile révèle un chémotype très riche en cétone. Par contre Artemisia herba alba est très riche en Camphre suivi du Chrysanthénone.
L'activité antifongique de l'huile d'absinthe et de l'armoise blanche ont été testés *in vitro* sur six souches fongiques phytopathogènes .Les résultats de la méthode de diffusion sur gélose de la méthode de microdilution ont révélé une sensibilité accrue des différentes souches fongiques testées. Les huiles ont une bonne efficacité. Ce pouvoir bioactif observé chez ces huiles est attribué principalement par la teneur élevée en monoterpènes oxygènes chez absinthe et composés camphrés chez armoise blanche. Par ailleurs, cette activité dépend de la nature de l'huile et du germe lui-même.
Ces résultats présentent un intérêt pour des applications phytosanitaires comme des procédés de lutte biologique basés sur des substances naturelles afin d'éradiquer les infections d'origine fongique et en vue d'une utilisation dans le cadre d'une agriculture biologique.

RÉFÉRENCES

- Adams R.P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th ed., Allured Publishing: Carol Stream, IL, USA. 7
- Afnor, 1986: Huiles essentielles. Recueil de normes françaises. Edition Tec&Doc Lavoisier. 2e édition.
- Barnard, M., Padgitt, M., and Uri, N.D. 1997. Pesticide use and its measurement. Int. Pest Control, 39, 161-164
- Bezza, L, Mannarino, A., Fattarsi, K., Mikail, C., Abou, L., Hadjminaglon, F. et Kaloustian, J., (2010). Chemical composition of the essential oil of Artemisia herba alba from the region of Biskra (Algeria). Phytotherapy , 8: 277-281.
- Booth, C. (1971). Fungal culture media, In: Methods in microbiology (Eds. J. R. Norris, and D. W. Ribbons), 49-94. Academic Press, London, New York.
- Chang, H.Y., Ho Y.L., Sheu, M.J., Lin, Y.H., Tseng, M.C., Wu, S.H., Huang, G.J, and Chang, Y.S., (2007). Antioxidant and free radical scavenging activities of Phellinus merrillii extracts. Botanical Studies 48: 407-417.
- Clevenger J.F., 1928. Apparatus for the determination of volatile oil. J. Am. Pharm. Assoc., 17,345-349.
- Cook, R., and Baker, K.F., (1983). The nature and practice of biological control of plant pathogens. The APS. St. Paul. Minnesota, pp: 539
- Derwiche E., Benziane Z and Boukir A., (2009). Chemical compositions and insectisidal activity of essential oils of three plants *Artemisia* species : *Artemisia Herba-Alba*, *Artemisia Absinthium* and *Artemisia Pontica* (Morocco) EJEAF Che, 8 (11). 1202 – 1211p.
- Duke J.A. 1985. Handbook of Medicinal Herbs. CRC Press, Boca Roton, FL.

Ghanmi M., Satrani B., Aafi A., Ismaili M.R., Houtia H., Manfalouti H., Benchakroun K., Abarchane M., Harki L., Boukir A, Chaouch A. & Charrouf Z. (2010). Effet de la date de récolte sur le rendement, la composition chimique et la bioactivité des huiles essentielles de l'armoise blanche (Artemisia herba-alba) de la région de Guercif (Maroc oriental). Phytothérapie, 8, 5, 295-301.

- Hose, S., (2002). Der Wermut - *Artemisia absinthium* L. Zeitschrift Phytother 23: 187-194.

- Juteau, F., Jerkovic, I., and Masottietal., V. (2003) .Composition and antimicrobial activity of the essential oil of Artemisia absinthium from Croatia and France. Planta Medica, vol. 69, no. 2, pp. 158–161,.
- Kordali S., Cakir A., Mavi A., Kilic H and Yildirim A., (2005). Screening of Hose S., 2002- Der Wermut - *Artemisia absinthium* L. Zeitschrift Phytother 23: 187-194. Chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential from three Turkish *Artemisia* species J. Agric. Food Chem. 53, 1408 – 1416.
- Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A., Ala, A., and Yildirim, A. (2005). Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of Artemisia dracunculus and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish Artemisia absinthium, A. dracunculus, Artemisia santonicum, and Artemisia spicigera essential oils," Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol.53, 24, 9452–9458.
- Lopes-Lutz D., Alviano D.S., Alviano C.S., Kolodziejczyk P.P., (2008). Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry.*; 69 (8) :1732-1738.
- Msaada.,K., Salem,N., Bachrouch,O., Bousselmi,S., Tammar,T., Alfaify,A., AlSane,K., Azeiz,S., Brahim,A., Hammami,A., Selmi,S., Limam, and Marzouk, C.(2015)Chemical Composition and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Wormwood (Artemisia absinthium L.) Essential Oils and Phenolics. Journal of Chemistry Volume 2015
- NCCLS, (1997). (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Sixth ed. Approved Standard M2-A6, Wayne, PA.
- Nezhadali A., Parsa M., (2010). Study of the volatile compounds in *Artemisia absinthium* from Iran using HS/SPME/GC/MS, Advances in Applied Science Research, 1 (3): 174-179.
- Ouyahya A., Nègre R., Viano J., Lozano Y.F. & Gaydou E.M. (1990). Essential oils from Moroccan Artemisia negrei, A. mesatlantica and A. herba-alba. Lebensm.-Wiss. u.-Technol, 23, 528-530.
- Rezaeinodehi A and Khangholi S., (2008). Chemical composition of the essential Oil of *Artemisia absinthium* growing wild in Iran. Pakistan journal of biological sciences 11 (6): 946-949.
- Robert-Dernuet S., (1995). Antibiotiques et Antibiogrammes. Décarie Vigot, Montréal. p322.
- Santa S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Vol. 1-2. Ed. Centre National de la Recherche Scientifique CNRS.Paris, 1170 p
- Schulz V., Hansel R., E.Tyler V., Blumenthal M, 2004. Rational phytotherapy: a reference guide for physicians and pharmacists, 417 P,Germany, 5éme edition, Ratgeber für Ärzte und Apotheker Publié par Springer, " Pages 367.
- Thiam , A. 1991. Problématique de l'utilisation des insecticides chimiques dans la lutte anti-acridienne au Sahel. Ed. AUPELF-UREF, John Libbey Eurotext, Paris, 193-206
- Zheng, G.Q (1994). Cytotoxic terpenoids and flavonoids from Artemisia annua. Planta Medica, 60, 54–57,

Bio-écologie de la mineuse de la tomate *Tuta absoluta* dans la région de Ain Naga

Achoura Ammar, Khennouche Farid
Université de Biskra,
Biskra Algérie
E-mail : achouraammar@yahoo.fr

RESUME
La pullulation rapide des populations de *Tuta absoluta* et la vitesse avec laquelle la mineuse s'est dispersée avec des dégâts spectaculaires observés sur la tomate de plein champ et sous serres, a poussé les agriculteurs à recourir à la lutte chimique de façon massive. L'étude de la biologie et de l'écologie de cette nouvelle espèce invasive dans la région de Ain Naga, a permis de mettre en évidence certains aspects de la biologie, de l'écologie et du comportement de l'espèce dans les conditions de la serre canarienne. L'observation des différentes phases du cycle de développement de ce ravageur et les mesures biométriques des stades ovo-larvaires ont permis de caractériser ses écophases. L'étude a permis déterminer la durée d'accouplement (1h33-6h 20), le nombre des œufs pondus par femelle (18-177 œufs), La durée d'incubation des œufs (2-5 jours), les jours de ponte (2-7 jours). La Fertilité est de 25% à 100%. La durée de vie des adultes varie pour les males de 1 à 5 jours et pour la femelle de 5 à 12 jours, paramètres permettant de mener d'autres moyens de lutte.
Mots-clés : Ain Naga, Lutte, Serres, Tomate, *Tuta absoluta*.

SAMMARY
The rapid population growth of *Tuta absoluta* and the speed with which the leaf miner dispersed with spectacular damage to field tomatoes and greenhouses has led farmers to resort to chemical control in a massive way because medium is the only one available to them usually without efficiency. The study of the biology and ecology of this new invasive species in the region of Ain Naga has made it possible to highlight certain aspects of the biology, ecology and behavior of the species under the conditions of the Canarian greenhouse. The observation of the different phases of the development cycle of this pest and the biometric measurements of ovo-larval stages made it possible to characterize its ecophases. The study determined the duration of mating (1h33-6h20), the number of eggs laid per female (18-177 eggs), the incubation period of eggs (2-5 days), the days spawning (2-7 days). Fertility varies from 25 to 100%). The lifespan of adults varies foe males from 1 to 5 days and for the female from 5 to 12 days, parameters allowing to lead other means of struggle.
Key words: Ain Naga, Wrestling, Greenhouses, Tomato, *Tuta absoluta*.

1. INTRODUCTION

Au début du printemps 2008, dans la région de Mostaganem en Algérie les agriculteurs ont signalé pour la première fois la présence de la mineuse de la tomate *Tuta absoluta* en serres de tomate. Depuis, l'insecte s'est rapidement propagé vers d'autres zones du pays, en attaquant la tomate de plein champ et d'autres solanacées.

La pullulation rapide des populations de *Tuta absoluta* et la vitesse avec laquelle la mineuse s'est dispersée avec des dégâts spectaculaires observés sur la tomate de plein champ et sous serres, a poussé les agriculteurs à recourir à la lutte chimique de façon massive car c'est le seul disponible à leur disposition.

Plante hôte:
La tomate (Lycopersicon esculentum Mill) appartient à la grande famille des solanacées.
- Taxonomie
Règne: Plantae.
Sous règne: Trachenobionta.
Division: Magnoliophyta.
Classe: Magnoliopsida

Sous classe: Asteridae.
Ordre: Solonales.
Famille: Solanaceae.
Genre: Solanum ou Lycopersicon
Espèce: *Lycopersicon esculentum* Mill
La classification de la tomate se fait selon plusieurs critères :

- type de croissance végétale (déterminé ou indéterminé),
- Qualité génétique (hybride ou fixée).

La tomate se caractérise par une tige, comme celle des autres solanacées, vigoureuse et ramifiée. La feuille est composée et velue. Elle répand une odeur caractéristique, due à la solanine, si on la froisse. Les fleurs sont de couleur jaunâtre, regroupées en cyme. Le fruit est une baie charnue et contient plusieurs loges.
Les principales maladies et ravageurs de la tomate sont:
-Maladies Virales
Virus de la mosaïque de tabac TMV (Tobacco Mosaic Virus)
Virus de la mosaïque du concombre CMV ou CV1
-Maladies cryptogamiques
Alternariose (*Alternaria solani*)
Mildiou (*Phytophtora infestans*)
Fusariose (*F, oxysporum*)
Oïdium (*Leveillula taurica*)
Flétrissement bactérien (*Ralstonia solanacearum*)
Feu bactérien (*Xanthomonas axonopodis* p,v,vesicatoria)
-Ravageurs
P uceron (Aphidae)
Thrips (Thripidae)
Mineuse de tomate (Tuta absoluta)

Tuta *absoluta* (Meyrick ,1917):
- Taxonomie

Embranchement	: Arthropodes
Sous embranchement	: Mandibulates
Classe	: Insecta
Ordre	: Lepidoptera
Famille	: Gelechiidae
Genre	: Tuta.
Espèce	: *T. absoluta* (Meyrick 1917)
Nom commun	: Mineuse de la tomate

- Morphologie

Tuta absoluta est un lépidoptère : les ailes antérieures, ostérieures et le corps sont recouverts d'écailles. *T. absoluta* est un Gelechiidae. Cette famille est caractérisée par une petite taille comprise entre 5 et 20 mm. Les ailes postérieures sont étroites et frangées.
Les antennes sont filiformes, ornées d'une bande brune foncée et blanche
L'insecte est actif la nuit, apparait clairement le matin surtout dans les premières heures.
Dans la journée, il reste caché en dessous des feuilles de tomate
- Description et cycle biologique
Œuf:
L'œuf est ovale-cylindrique, habituellement étendu du côté inférieur de la feuille, sur les bourgeons et le fruit vert, de couleur crème à jaune, mesure environ 0.4 millimètre de long et 0.2 mm de diamètre**).**
Les œufs sont pondus isolement ou en petits tas, l'incubation dure de 4 à 10 jours selon la température
Chenille:
La chenille de premier stade est de couleur beige clair avec une tête noire.. Elle mesure à la naissance entre 0,6 et 0,8 mm. Les larves L2 et L3 sont verdâtres puis elles virent à la couleur rose du second au quatrième stade

Le stade L3 mesure environ 4,5 mm et le dernier stade (L4) environ 7,5 mm, au maximum 8 mm. La larve mineuse peut sortir de sa mine pour en percer d'autres. *Tuta absoluta* est une espèce multivoltine qui fait son cycle en moins d'un mois selon les conditions climatiques. La chrysalide, de couleur brune, mesure de 4 à 5 mm de long **.**

Adulte:

L'adulte de *Tuta. absoluta* mesure environ 7 mm de long et 10 mm d'envergure chez les mâles et 11 mm chez les femelles . Selon certains auteurs, la couleur des adultes peut varier du gris argenté au gris foncé, parfois la couleur est noirâtre.

- Plantes hôtes

Tuta absoluta attaque l'aubergine (*Solanum melongena*), la pomme de terre *(Solanum tuberosum)*, le tabac (*Nicotina tabacum)*, le poivron (*Capsicum annuum)* et certaines mauvaises herbes de la famille des solanacées comme la morelle noire (*Solanum nigrum*).

L'attaque se caractérise par la présence sur les feuilles de plages décolorées nettement visibles. Les larves dévorent seulement le parenchyme en laissant l'épiderme de la feuille. Par la suite, les folioles attaquées se nécrosent entièrement, sur tige ou pédoncule, la nutrition et l'activité de la larve perturbent le développement des plantes, sur fruits, les tomates présentent des nécroses sur le calice et trous de sortie à la surface. Les fruits sont susceptibles d'être attaqués dès leur formation jusqu'à la maturité. Une larve peut provoquer des dégâts sur plusieurs fruits d'un même bouquet.

- Moyens de lutte:
- Labour profond précoce pour détruire les chrysalides et créer un vide sanitaire.
- Gestion des déchets de fin de cycle (incinération ou enterrement).
- Surveillance de la parcelle par l'installation des pièges à raison de 4 pièges par hectare avant chaque plantation.

La lutte biologique consiste à utiliser des organismes vivants

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Matériels utilisés

- Sur terrain

Le piège de type Delta + phéromone + d'une pIaque engluée
Une pince entomologique
Des sacs en papier kraft

- Au laboratoire

Loupe binoculaire Loupe à main
Source de lumière froide Boite d'élevage
Tube pasteur à bouchon Para Film
Boite de pétri

2.2. Cadre méthodologique

-Dénombrement des captures d'adultes males par les pièges a phéromones

L'étude a été menée dans la région d'Ain Naga (Figure 1). L'échantillonnage se fait chaque semaine, en prélevant 30 feuilles selon un dispositif aléatoire dans sachets en 4 papiers kraft à chaque semaine.

Les feuilles prélevées sur le terrain sont examinées minutieusement à l'œil un et au loup binoculaire et ce, afin d'en déterminer le nombre de feuilles infestées, de mines pleines ou vides, de larves de tout stade vivantes et mortes afin d'évaluer le taux de mortalité larvaire, d'œufs sur chacune des faces foliaires et le nombre de chrysalides et ça fait salon les critères d'identification comme la taille et la couleur.



Figure 1 : Région d'Ain Naga (w: Biskra)

2.3. Elevage de la mineuse de la tomate

Pour procéder à l'élevage de la mineuse de la tomate, nous avons mis plusieurs larves dans les boites de pétries et boites d'élevage pour les inciter à entrer en nymphose et chaque couple et mis dans un tube à essai (pasteur) bien fermé par le couvercle.

Les tubes à hémolyse dans la chambre d'élevage à une température de 28°C et une humidité relative de 60 et une photopériode de 16 heures lumière et 8 heures obscurité, afin de favoriser et d'accélérer l'émergence des adultes de la mineuse de tomate.

2.4. Suivi des paramètres bioécologiques de la mineuse

- Durée d'accouplement

Pour déterminer la durée d'accouplement, nous avons introduit des couples d'adultes (Mâle et femelle) de la mineuse dans des boites de Pétri, et nous avons suivi l'accouplement du début jusqu' à la fin l'accouplement, puis on a enregistré la durée. On a mis 20 couples au total.

- Fécondité

Le dénombrement des œufs a été effectué chaque jour pour déterminer le nombre des œufs pondus par femelle.

- Incubation

L'observation des œufs pondus a été réalisé chaque jour l'aide la loupe binoculaire, ensuite on a indiqué la date de commencement d'éclosion par rapport la date de ponte pour déterminer la durée d'incubation de chaque couple.

- Fertilité

Pour déterminer la fertilité nous avons calculé le rapport entre le nombre des œufs éclos par rapport au nombre total des œufs pondus.

- Longévité

A la fin de l'accouplement on sépare les couples chaque individu est mis dans une boite de Pétri, pour déterminer la durée de vie du mâle et celle de la femelle.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

En exploitant Los résultats enregistrés sur les figures et les tableaux suscités, nous pouvons juger que la durée d'accouplement varie de 1h33 à 6h 20. Le nombre d'œufs pondus par femelle se situe entre 18 et 177 œufs. La durée d'incubation des œufs varie de 2 à 5 jours et les jours de ponte entre 2 et 7 jours. Une fertilité de 25% à 100% a été également enregistrée. La durée de vie des adultes mâles est de 1 à 5 jours et des femelles de 5 à 12 jours; également, le nombre maximum enregistré (157 adultes dans le mois d'Avril) est en étroite relation avec les conditions climatiques de l'année, surtout de température. Les abris serres donnent aussi des milieux et des microclimats favorables au développement de ce parasite, qui s'avère très

difficile à combattre aux stades larvaires. D'autres chercheures Baazizi (2015) et Bousserhane (2012) trouvent qu'une simple présence de *Tuta absoluta* sur la culture de tomate, la rend impraticable.

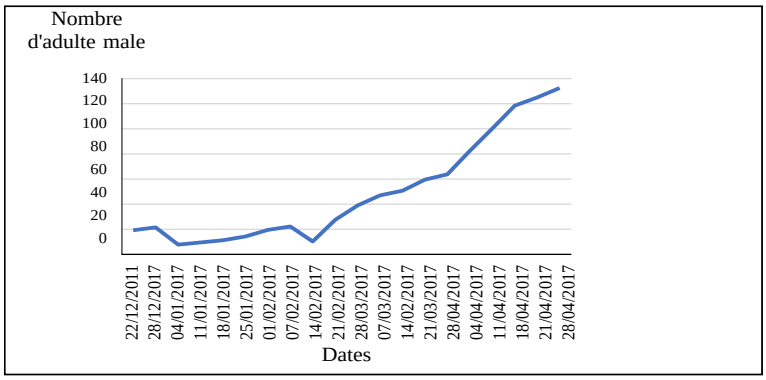


Figure 2 : Evolution temporelle du nombre d'adulte mâle capturés sous serre canarienne

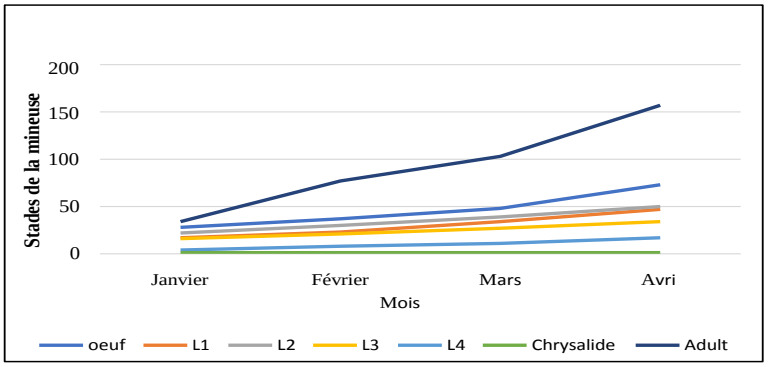


Figure 3 : Evolution temporelle des stades larvaires, œuf , chrysalide et Adulte sous serre canarienne

Tableau 1 : La durée d'accouplement des papillons de la mineuse de la tomate

Couples	Durée	Couples	Durée
C 1	5h44	C 11	5h09
C 2	3h28	C 12	4h41
C 3	4h17	C 13	4h12
C 4	3h58	C 14	5h20
C 5	6h20	C 15	3h20
C 6	1h33	C 16	4h39
C 7	2h07	C 17	4h00
C 8	2h38	C 18	4h14
C 9	3h50	C 19	3h29
C	3h01	C 20	1h58
Min		1h33	
Max		6h20	
Moyenne		3h48	

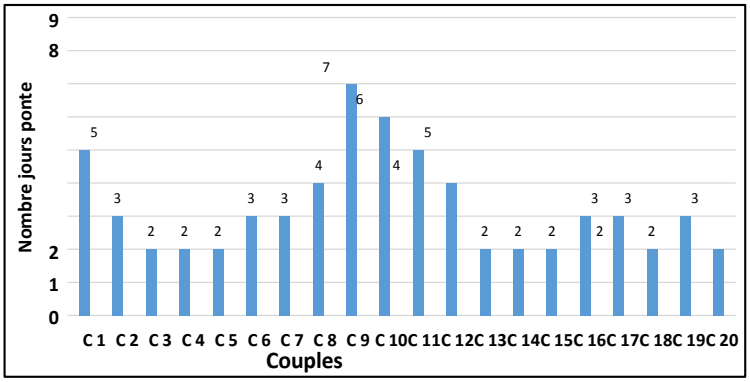


Figure 4 : Nombre des jours de ponte de la mineuse de la tomate.

Tableau 2 : Durée d'incubation des œufs

Couples	Nombre de jours de ponte	Couples	Nombre de jours de ponte
C 1	2	C 11	4
C 2	3	C 12	4
C 3	5	C 13	4
C 4	5	C 14	5
C 5	5	C 15	5
C 6	4	C 16	5
C 7	4	C 17	3
C 8	3	C 18	2
C 9	2	C 19	2
C 10	2	C 20	4
Minimum			2
Maximum			5
Moyenne			3.65

Tableau 3 : Fécondité et Fertilité des œufs

Les couples (C)	**Oeufs pondus**	**Oeufs écols**	**Fertilité**	**Durée d'accouplement**
C 1	25	10	40%	5h44
C 2	29	7	25%	3h28
C 3	40	40	100%	4h17
C 4	47	47	100%	3h58
C 5	55	30	55%	5h20
C 6	67	27	40%	1h33
C 7	80	40	50%	2h07
C 8	60	48	80%	2h38
C 9	18	18	100%	3h50
C 10	30	30	100%	3h06
C 11	109	99	91%	3h09
C 12	125	100	80%	4h42

C 13	40	26	67%	4h12
C 14	177	160	90%	5h10
C 15	155	154	99%	3h20
C 16	100	40	40%	4h39
C 17	138	134	97%	4h00
C 18	20	5	25%	4h14
C 19	36	26	72%	3h20
C 20	28	18	67%	1h58
MOYENNE	69%	52,9	71 %	3h40

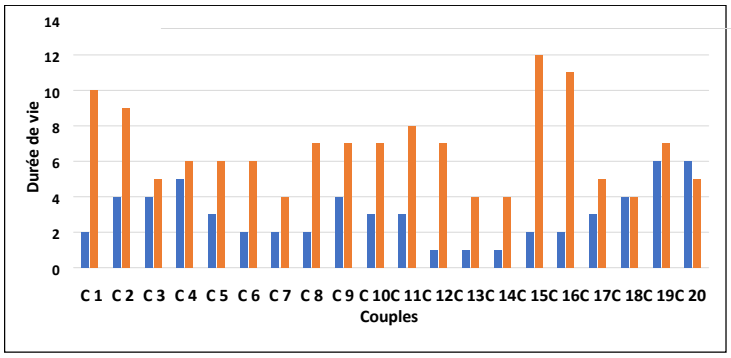


Figure 5 : Longévité de la mineuse de la tomate

4. CONCLUSION

Le présent travail a permis de tirer les conclusions suivantes:

- La mineuse de la tomate, *Tuta absoluta* est considérée comme un des ravageurs les plus redoutables de la tomate. Elle a été signalée en Algérie au printemps 2008
- L'étude de la biologie et de l'écologie de cette nouvelle espèce invasive dans la région de Ain Naga, a permis de mettre en évidence certains aspects de la biologie, de l'écologie et du comportement de l'espèce dans les conditions de la serre canarienne. L'observation des différentes phases du cycle de développement de ce ravageur et les mesures biométriques des stades ovo-larvaires ont permis de caractériser ses écophases.
- L'étude a permis déterminer la durée d'accouplement (de 1h33 à 6h 20), le nombre des œufs pondus par femelle (de18 à 177 œufs), La durée d'incubation des œufs (de 2 à 5 jours), les jours de ponte (de 2 à 7 jours). La Fertilité est (de 25% à 100%). la durée de vie des adultes (males de 1 à 5 jours -la femelle de 5 à 12 jours).
- Le nombre maximum enregistré est 157 adultes dans le mois d'Avril et ça en relation avec la température.

REFERENCES

- Anonyme 1. (2012). La tomate http : fr.wikipedia.org/wiki/tomate.
- Anonyme2. (2009). Ministère de l'agriculture et du développement rural, direction des statistiques. 89p.
- Anonyme 3. (2010). Association Méditerranéenne internationale de la tomate .la tomate d'industrie en Algérie (archive).2p. Site officiel : http://www.amiton.org.
- Baazizi khamsa (2015). Les stratégies de la lute intégrée de la culture de tomate sous serre (*Solanium lycopersicum L*), Ed, Université Mohamed Khider, département d'agronomie, Biskra, 68p.
- Bousserhane Asma 2012. Comportement de quelque variétés de tomate et utilisation de 2 types de

pièges vis-à-vis de *Tuta absoluta* Meyrick(1917) (Lepidoptera : Gelechiidae) dans la région d'El-Hamiz, ED, Ecole Nationale supérieur Agronomique-El Harrach.144p.
- Chaux C.L., Foury C.L. (1994). Culture légumineuses potagères, légumes fruits. Tec et Doc. Lavoisier, Paris : 563p.
- Dounes kh,et Hasni A (2010),Etude de quelque paramètres bioécologiques de la mineuse de la tomate *Tuta absoluta* (MEYRICK) sous serre , dans la région du Biskra, Ed, Université Mohamed khaider , département d'agronomie, Biskra, 146p.
- Gallais A. et Bennerot H. (1992). Amélioration des espèces végétales cultivées. Objectifs et critères de sélection .Ed, INRA, Paris, 56p.
- Kolev N. (1976). Les cultures maraichères en Algérie. Tome 1, légumes et fruits. Edition Ministère de l'agriculture et des reformes Agricoles : 52p.
- Latigui A,(1984). Effets des différents niveaux de fructification de la tomate cultivée en hiver sous serre non chauffée. Thèse de magister. INRA El Harrach, Algérie, 174p.
- Othmane Laalma R., Yaich Temam D.E. (2011).Aperçu sur les ravageurs de la culture de tomate sous serre dans la région de Biskra, faculté du sciences exactes et sciences de la nature et de la vie, Département d'agronomie Universite de Biskra, 166p.
- Shankara N., Van lidt de jeud J, de Goffan M, Hilmi M, Van Dam B., Florijin A. (2005), la culture de la tomate : production, transformation et commercialisation. 5eme Ed. Fondation agromisa et CTA, Wageningen, 82p.

Etude de la biodiversité floristique des plantes spontanées dans deux stations de la région de Biskra: doucen et foughala

Bachar M.F., Djerouni H., Benqr F.
Département d'agronomie, Université de Biskra , Biskra, Algérie
Email: bamoharouk@gmail.com

RESUME
Un échantillonnage floristique sur terrain a été réalisé afin d'étudier l'écosystème des plantes spontanées à Doucen et Foughala durant la période 2016-2018 dans la région de Biskra.
La campagne menée à Doucen montre une fréquence d'occurrence élevée de l'espèce: *Cleome Arabica* (74,9%) , appartenant à la catégorie "Espèce constante" avec une présence d'espèces rares : *Ferula vesceritensis* (0,48%) . La station de Foughala présente l'espèce : *Anabasis articulata* (30,8%) comme espèce très dominante de catégorie "Espèce accessoire", par contre la deuxième campagne présente une dominance de l'espèce accessoire : *Cynodon dactylon* (44,8%) .
La mesure de la biodiversité au cours des deux campagnes a révélé un couvert végétal de plantes spontanées stable, continue et diversifié en genres et espèces endémiques (persistantes). La station de Doucen à la campagne 1 montre que *Cleome arabica* est la plus dominante en nombre à raison de 850 plantes/100 m² ainsi qu'une abondance d'*Anabasis articulata* (1 plantes/m²). La campagne 2 a révélé une dominance et une adaptabilité des espèces et genres suivants : *Cynodon dactylon* (Fo=44,8%) et *Thymelaea microphylla* (Fo=21%). Cela démontre que les deux stations appartiennent à un même écosystème steppique saint spécifiant la partie Ouest de la région de Biskra.
Mots-clés : Plantes spontanées, écosystème stéppique, Cleome Arabica, Anabasis articulata, Biskra.

1. INTRODUCTION

Les régions arides en Algérie occupent des surfaces spacieuses sillonnant le pays d'Est en Ouest, ce tapis floristique comporte une diversité de peuplements d'espèces spontanées (herbacées) et d'arbustes très variés en constituant un écosystème steppique stable et rentable : pâturages extensifs, industrie du papier, agriculture céréalière, tourisme et élevage d'animaux (Ozenda, 2004). Cet écosystème et très vulnérable aux différentes contraintes d'origines anthropologiques ainsi que naturelles à savoir surpâturage, pollutions industrielles et désertification (Limons et al., 2003; McKenzie et Barr, 2000).
Le travail effectué consiste à une étude botanique des différentes espèces de plantes spontanées sur deux stations de la partie Ouest de la région de Biskra (Doucen et Foughala) avec une réalisation d'un inventaire botanique des espèces cueillis sur terrain.
Les données recueillis sont utilisée comme base de calcul pour des mesures de la biodiversité floristiques dans les stations d'étude, les indices de mesure utilisés sont la richesse spécifique et générique (Sm et Sg), la fréquence d'occurrence (Fo) ainsi que l'indice de Shannon (H') et d'équitabilité (E'). Ces indices devront indiquer l'état de santé écologique de la steppe Ouest de la région de Biskra ainsi que la bio-répartition des genres et espèces végétales. Notons que la zone de cette étude est située sur le parcours des éleveurs de camelins comme pâturage, ces terres sont le siège de mises en valeur agricoles : des exploitations plasticoles et phoenicicoles (Nesson, 1965).

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Les stations d'étude

La végétation naturelle est relativement riche dans la région de Biskra, elle dépend fortement des conditions du milieu (eau, sol, température, relief…). Elle est plus dense et variée dans les lits d'oueds et les dépressions où les nappes sont peu profondes (Faurie et al., 2003) .

- Doucen

C'est une station située à l'Ouest de la région de Biskra (Zeb-Gharbi) au Nord de la commune de Doucen (Figure 1), définie par les coordonnées suivantes: (Latitude: 34° 6' Nord, Longitude: 5° 1' Est), cette station est située à la base du versant sud de l'Atlas Saharien d'altitude (200 m) et une pente de 30%, les deux relevées floristiques sont orientés Nord-Sud, le sol est de texture limono-Sablonneux.



Figure 1-Stations d'étude de Doucen et de Foughala (2016).

- Foughala

La station est située à l'Ouest de la région de Biskra (Zeb-Gharbi) à l'extrême Ouest de la commune de Foughala (Figure 1), définie par les cordonnées : (Latitude: 34° 43' Nord, Longitude: 5° 19' Est), la texture du sol est limono-sablonneux avec un relief rocailleux et caillouteux, les relevées floristiques sont orientés Nord-Sud, la pente de la station est de 30% à une altitude de 150 m.

2.2. Méthodes d'étude

2.2.1. Echantillonnage

La méthode des quadras a été utilisée, un carré de 10 m x 10m (100 m²) a été tracé, puis on converti les données en hectare; on peut également choisir une ligne d'échantillonnage de 200 m de longueur et de un mètre de largeur (Ramade, 1984).

Le cadran est orienté Nord-Sud et doit être très représentatif de la zone d'étude (Végétation, Relief, Pente, ...etc.), le choix de la prise des relevés floristiques est basé sur des observations oculaires aléatoires balayant toute la surface visée (Ramade, 1984).

Les prélèvements des échantillons floristiques (feuilles, tiges, racines, fleurs) sont réalisées à la diagonale du carré (10 m²) à l'aide d'un sécateur, c'est à dire la cueillette est concentrée sur toute la surface de la diagonale.

Les données obtenues de la diagonale sont converties pour toute la surface du carré sélectionné.

2.2.2. Mesure de la diversité floristique

- Richesse moyenne spécifique

La richesse moyenne spécifique (Sm) est calculée à partir du nombre totale d'espèces par rapport au nombre total des relevés (Ramade, 1984).

- Fréquence d'occurrence (fréquence relative)

D'autre part la fréquence d'occurrence (Fo) est exprimée sous la forme de pourcentage du nombre de relevés (Pi) contenant l'espèce (i) présent par rapport au nombre total de relevés (P) (Mulleure, 1985).

2.2.3. Mesure de la biodiversité

- Indice de Shannon

L'indice de Shannon (H') est l'indice écologique le plus utilisé par les experts écologistes, c'est la somme des erreurs commise l'hors du recensement des espèces (Blondel, 1975).

- L'équitabilité

L'équitabilité ou indice d'équi-répartition (E) est le rapport entre la diversité observée H' et la diversité maximale H' max (Blondel, 1975). Les valeurs de l'Equitabilité obtenues varient entre 0 et 1 (Barbault, 1981).

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Evolution quantitative des plantes spontanées

- Doucen

Le deuxième relevé floristique effectué à la station de Doucen montre des richesses spécifiques et génériques très importantes (Figure 5) en nombre (par exemple (C.a): *Cleome arabica* 850 plantes/100 m²) par rapport au premier relevé peu occupé par les espèces et les genres végétales : (*Cleome arabica* présentant 700 plantes/100 m²) (Figure 3). cette différence est du semble-t-il au basses températures du mois de Décembre , ne permettant pas l'élancement de la croissance des biomasses végétales (la dormance hivernal des végétaux) (Ramade, 1984), cependant le mois de Janvier dans cette région présente des élévations de températures atmosphériques et telluriques au mois de Décembre (Ozenda,2004).



Figure 3: *Cleome arabica*.



Figure 4: *Anabasis articulata*.

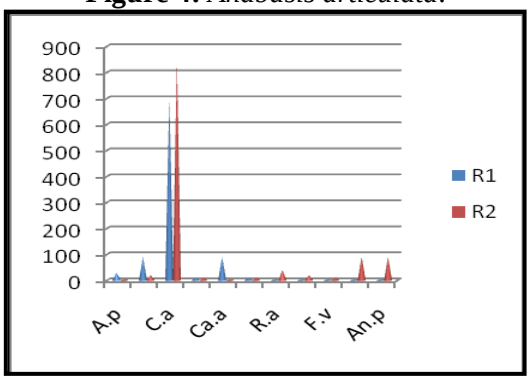


Figure 5: Evolution quantitative des plantes spontanées au niveau des deux relevés floristiques R1 et R2 à Doucen.

-Foughala

D'après les données des deux relevées (Figure 6), nous avons remarqué la dominance quantitative et spécifique des deux espèces et genres (An.a): *Anabasis articulata* (100 plantes/100 m²), *Cynodon dactylon* (75 plantes/100 m²), ces deux espèces sont adaptés au biotope de la station de Foughala

puisque cette dernière est caractérisé par un biotope très convenable au développement de ces deux espèces végétales spontanées, le sol de cette station porte une texture limono-sablonneuse, ainsi qu'une altitude de 200 mètre.

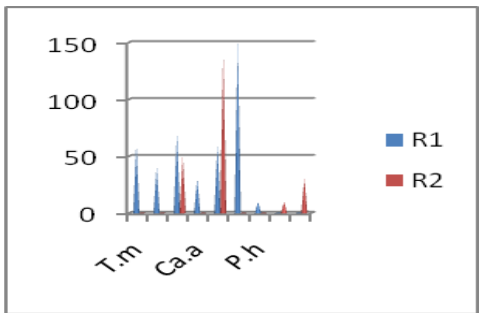


Figure 6: Etude quantitative des plantes spontanées au sein des deux stations.

3.2. Etude comparative des données des deux stations.

La figure 7 montre une dominance des deux espèces (C.d) : *Cynodon dactylon* (40 plantes/100 m²) et (A.a) : *Astragalus armatus* (14 plantes/100 m²) au premier relevé R1 de Décembre. Par contre, la station de Doucen présente des relevées floristique assez pauvres en couverture végétale sur le plan densité quantitative et qualitative à cause des variations édapho-climatiques (Blondel, 1975): Avec une espèce rare (F.v) : *Ferula vesceritensis* (1 plante /100 m²); ces espèces spontanées citées persistent dans les deux stations sur un plan spatio-temporel indiquant leur statut endémique de premier choix dans cette partie de la région de Biskra.

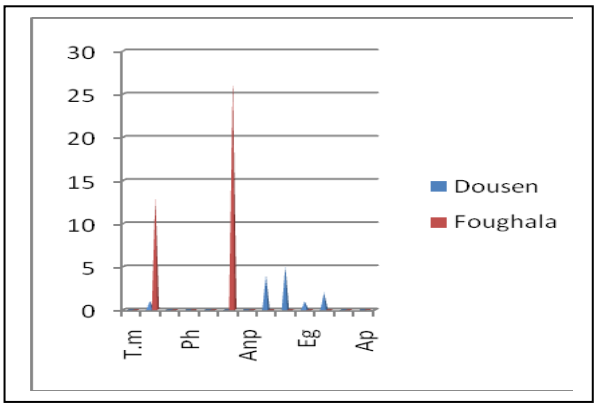


Figure 7: Etude quantitative des plantes spontanées au sein des deux stations.

3.3. Mesure de la diversité

3.3.1. Richesse moyenne spécifique

- Première campagne

- Doucen

Nous remarquons que la richesse spécifique moyenne de l'espèce : *Cleome arabica* (Sm= 7.75) est la plus élevée, ce qui prouve que cette espèce est adaptée au biotope de Doucen caractérisé par des sols sablonneux à limono-sablonneux ainsi que des conductivités électriques (C.E) relativement élevée et une pluviométrie moins importante, suivi par l'espèce (Tm) : *Thymelaea microphylla* (Sm= 5.5) adaptée aussi à ce pédo-climat. Par contre, le deuxième relevé montre une population appartenant a l'espèce : *Cleome arabica* (Figure 3), qui est fréquemment la plus dominante pour les deux relevés floristiques (Décembre et Janvier).

-Foughala

D'après les calculs des richesses génériques, nous avons décelé qu'elle est constante pour les deux relevés floristiques et présentant des valeurs ne dépassent pas la valeur de 0,5. Par ailleurs, les richesses spécifiques relatent des valeurs de Sm oscillant entre 0.5 et 10. Ceci montre que le relevé de

Décembre est le plus élevé pour l'espèce (An.a): *Anabasis articulata* (Figure 4) qui est dominante au cours du mois de Décembre, prouvant que cette plante spontanée est endémique dans cette station et résistant aux températures hivernales basses.

- **Deuxième campagne**

- Doucen

La richesse spécifique moyenne (Tableau 1) de l'espèce (C.d): *Cynodon dactylon* (Sm= 0.75) est la plus élevée au sein du deuxième relevé R2 floristique (Décembre), ce qui prouve que cette espèce est adaptée au biotope de Doucen caractérisé par des sols sablonneux à limono-sablonneux, ainsi que des conductivité électrique relativement élevée et une pluviométrie moins importante, suivi par l'espèce (C.a) : *Cleome arabica* (Sm= 0.22) adaptée aussi à ce pédo-climat qui sont toujours les plus dominantes pour les deux relevées floristique (Décembre et Janvier).

- Foughala

D'après les calculs des richesses génériques et spécifiques réalisés, pour l'espèce *Cynodon dactylon* (Sm= 1.66) ainsi que l'espèce : *Astragallus armatus* (Sm= 0.50), nous observons qu'elle est constante pour les deux relevés floristiques recensés est présentant des valeurs ne dépassent pas 0,5. Ce qui montre que le relevé de Janvier 2017 est le plus élevé avec ces deux espèces dominantes, prouvant que ces deux plantes spontanées sont endémiques à la station de Foughala et résistantes aux températures hivernales moyennes faibles.

3.3.2.Fréquence d'occurrence (fréquence relative).

- Première campagne

- Doucen

Nous avons remarqué que les espèces *Cleome Arabica* (74,9%) et *Thymelaea microphylla* (5,3%) (Figure 8) sont les plus fréquentes au cours des deux relevés floristiques (Figure 7). Ces deux espèces appartiennent aux catégories respectives constante et accidentelle, ainsi que des espèces rare tels que *Ferula vesceritensis* (0,48%) et *Euphorbia guyoniana* (0,96%).



Figure 8: *Thymelae microphylla* Coss. et Dur.

-Foughala

Nous avons observé des fréquences d'occurrences (Fo) assez élevées pour les espèces *Anabasis articulata* (30,8%) et *Cynodon dactylon* (23,1%) qui sont très dominantes dans cette station et sont, respectivement, des espèces accessoire et accidentelle; Ce qui nous révèle que l'espèce *Anabasis articulata* est une espèce endémique et adaptée à cette station, en parallèle d'espèces rares non endémiques telles que *Ferula vesceritensis* (1,53%) et (P.h) : *Peganum harmala* (1,53%).

- **Deuxième campagne**

- Doucen

Les résultats montrent que les espèces *Cynodon dactylon* (44,8%) et *Thymelaea microphylla* (21%) sont les plus fréquentes au cours des deux relevés floristiques. Ces deux espèces appartiennent aux

catégories, respectives, espèce accessoire et espèce accidentelle, cependant il y a des espèces rare telles que *Ferula vesceritensis* (0,7 %) et (E.g) *: Euphorbia guyoniana* (1,4%).

- Foughala

Nous avons observé que les espèces *Cynodon dactylon* (47,7%) et *Anabasis articulata* (26,5%) sont des espèces très dominantes dans cette station qui sont, respectivement, des espèces accessoire et accidentelle, ce qui nous révèle que ces deux espèces sont endémiques et adaptées à cette station. Cependant, nous remarquent la présence d'espèces rares non endémiques tels que *Artemisia herba alba* (0,8%) et *Peganum harmala* (0,8%).

3.4. Mesure de la biodiversité

3.4.1. Indice de Shannon

D'après l'indice de Shannon (Tableau 1) de la station de Doucen (H'= 1,554) la somme des erreurs de calculs des recensements des plantes spontanées est faibles et loin de 5, ce qui indique que la biodiversité à cette station est assez significative montrant ainsi que l'écosystème est relativement saint. Par contre, la station de Foughala (Tableau 2) montre un indice de la biodiversité de Shannon (H'= 2,616) proche de 5, ce qui montre une biodiversité végétales peu altérée, donc cette diversité spécifique est peu significative, cela pourrait être la cause d'un sol accidenté et halomorphe.

Tableau 1: Indice de Shannon pour les deux stations (campagne 1)

Indice de Shannon	Doucen	Foughala
H'	1,554	2,616

Tableau 2: Indice de Shannon les deux stations d'étude (campagne 2).

Stations et Relevés floristiques		Moyenne des relevés
Doucen	E	0.011
	H'	0.739
	H max	1.833
Foughala	E	0.009
	H'	0.509
	H max	1.752

D'après l'indice de Shannon (Tableau 2) de la station de Doucen (H'= 0,739) la somme des erreurs de calculs des recensements des plantes spontanées est faibles et loin de 5, ce qui implique que la biodiversité à cette station est assez significative, montrant que l'écosystème est relativement saint. Par contre, la station de Foughala (Tableau 3) , montre un indice de la biodiversité de Shannon (H'= 0,509) loin de 5 , ce qui déduit une biodiversité végétales altérée ,et donc très peu significative, cela pourrait être la cause du type physico-chimique du sol ou l'impact des pollutions chimiques provenant des cultures avoisinantes.

Tableau 3: Indice de Shannon pour les deux stations d'étude.

Stations et Relevés floristiques		Moyenne des deux relevés
Doucen	E	0,24
	H'	1,55
	H max	6,94
Foughala	E	0,45
	H'	2,66
	H max	5,78

3.4.2. L'équitabilité

La valeur de H' de la station de Doucen (H'= 1,55) est inférieure à celle de la station de Foughala (H'= 2,66), ce qui signifie qu'il y a une stabilité dans l'écosystème étudié (Zab-Gharbi), (Tableau 3).
Les valeurs des indices d'équitabilité pour les deux stations montrent un faible éloignement, résultat d'une stabilité spécifique et impliquant que ces espèces spontanées recensées in-situ, sont dominantes et occupent en permanence ces sols. Ces espèces sont donc adaptées et endémiques (Barbault, 1981).

Tableau 4: Indice d'équitabilité pour les deux stations d'étude

Stations et Relevés floristiques		Moyenne des relevés
Doucen	E	0.011
	H'	0.739
	H max	1.833
Foughala	E	0.009
	H'	0.509
	H max	1.752

D'après le tableau 4 , la valeur d'équitabilité (E') de la station de Doucen (E= 0,011) est supérieure à celle de la station de Foughala (E= 0,009), ce qui signifie qu'il y a une faible stabilité de la biocénose floristique de l'écosystème étudié du (Zab-Gharbi).
Les valeurs des indices d'équitabilité pour les deux stations montrent aussi un faible éloignement indiquant une stabilité spécifique peu importante. Cependant, ces espèces plantes spontanées occupent en permanence ces sols, elles sont adaptées et endémiques dans cette partie de la région de Biskra. Les valeurs des indices d'équitabilité pour les deux stations et au cours des deux campagnes, montrent un faible éloignement, résultat d'une certaine stabilité spécifique et générique de ces herbacées.
Cette adaptabilité floristique est due semble-t-il à l'influence des facteurs édapho-climatiques environnants tels que la température du sol et atmosphérique, le nombre d'heures d'ensoleillement, le taux annuel de pluviométrie, la texture du sol et l'humidité relative de l'air (ONM, 2014).
Ces différences entre indices de diversité floristiques (E, H') ne sont pas très significatives, cependant les richesses spécifiques (H'max ou S) sont très importantes en nombres et espèces. Pratiquement, cela peut démontré que les deux stations choisi appartiennent à un même écosystème steppique de type aride (Dajoz, 1971)**,** occupant la partie Ouest de la région de Biskra.

4. CONCLUSION

L'étude sur terrain a divulgué des résultats significatifs importants :
La campagne 1 montre que la station de Doucen présente l'espèce *Cleome arabica* comme dominante en nombre à raison de 850 plantes/100 m² au premier relevé et 700 plantes/100 m² au deuxième relevé; Le mois de Janvier présente le plus de spécimens de cet espèce puisque c'est un mois marquant des de température atmosphériques et telluriques convenables pour la croissance de cet espèce adaptée (Limons et al., 2003).
La station de Foughala présente une abondance du genre *Articulata* et de l'espèce *Anabasis articulata* (100 plantes/100 m²). Il semble que cette station à texture tellurique (limono-sablonneux) est très convenable pour la croissance de cette espèce.
La campagne 2 montre que l'espèce *Cynodon dactylon* (Sm= 0.75) est la plus élevée au sein du deuxième relevé R2 floristique (Décembre) . Ce qui prouve que cette espèce est adaptée au biotope de Doucen caractérisé par des sols sablonneux à limo-sablonneux; à Foughala l'espèce : *Cynodon dactylon* (Sm= 1.66) ainsi que celle *Astragallus armatus* (Sm= 0.50) sont dominantes et constantes pour les deux relevés floristiques recensés est présentant des valeurs ne dépassent pas 0,5.
L'espèce *Cleome arabica* montre une richesse spécifique très élevée à la station de Doucen (Sm= 7.75). Cette espèce semble être adaptée au facteurs physico-chimiques du milieu, elle est suivie directement par l'espèce *Thymelaea microphylla* (Sm= 5.5).
L'espèce *Anabasis articulata* couvre la plupart de la surface de la station de Foughala (Sm= 100), cette richesse spécifique assez élevée décèle une adaptabilité de l'espèce citée au sol et aux conditions climatiques spécifiques de la station (Faurie et., 2003) . Par contre, la campagne 2 exprime une

dominance de *Cynodon dactylon* (Sm= 0.75) au sein du deuxième relevé floristique (Décembre), ce qui prouve que cette espèce est adaptée au biotope de Doucen, mais aussi à Foughala nous remarquons que l'espèce *Astragallus armatus* (Sm= 0.50) est très répondu et constante pour les deux relevés recensés, en présentant des valeurs ne dépassant pas 0,5.

Les fréquences d'occurrence (Fo) des espèces *Cleome Arabica* (74,9%) et *Thymelaea microphylla* (5,3%) sont les plus élevées au cours des deux relevés floristiques de Doucen, elles sont très fréquentes sur les surfaces examinées, or ces deux espèces appartiennent aux catégories, respectives, constante et accidentelle, ainsi que des espèces rare telles que *Ferula vesceritensis* (0,48%) et *Euphorbia guyoniana* (0,96%).

La station de Foughala montre clairement que les espèces *Anabasis articulata* (30,76%) et *Cynodon dactylon* (23,07%) sont des espèces très dominantes dans cette station, impliquant que l'espèce *Anabasis articulata* est endémique et adaptée. Néanmoins, il y a présence d'espèces rares non endémiques (non persistantes) telles que *Ferula vesceritensis* (1,53%) et *Peganum harmala* (1,53%).

D'autre part, la deuxième campagne montre que les espèces *Cynodon dactylon* (44,8%) et *Thymelaea microphylla* (21%) sont les plus fréquentes au cours des deux relevés floristiques. Ces deux espèces appartiennent aux catégories, respectives, accessoire et accidentelle), pour la station de Foughala nous découvrons une forte densité des espèces *Cynodon dactylon* (47,7%) et *Anabasis articulata* (26,5%), espèces très dominantes dans cette station.

La campagne 1 montre un H' (H'=1,554) supérieur à celui de la campagne 2 (H'=0.739), pour la station de Doucen ce qui montre une stabilité significative de la biocénose végétale spontanée (espèce et genre) due peut être aux facteurs édapho-climatiques enregistrés au cours de cette période.

Cependant, la station de Foughala présente un indice de Shannon H' (H'=2,616) nettement supérieur à celui de la deuxième campagne (H'=0.509), ce qui montre une stabilité spécifique et générique des plantes spontanées recensées dans cette station au cours de la première campagne, cela semble-t-il à cause des contraintes bioclimatiques et anthropique du biotope steppique étudié.

Les équitabilités spécifiques et génériques des deux stations au cours de la première campagne (E= 0,224) et (E= 0,452) sont supérieurs à celles de la deuxième campagne (0.011 et 0.009), montrant que la première période est très proche d'une certaine stabilité de son écosystème, mais en générale les valeurs de (E') sont très éloignées de 1 (échelle de 0-1) prouvant ainsi une faible densité floristique de l'entropie à la station de Foughala. Ceci est due à un surpâturage extensifs et des pollutions chimiques non contrôlées par les phytosanitaires des plasticultures avoisinantes, qui nuisent certainement à la croissance des plantes spontanées (Faurie et., 2003) dans cette partie Ouest de la région de Biskra.

Cependant, cette étude confirme que les facteurs édapho-climatiques environnants ont influencé la croissance et la bio-répartition de ces plantes xérophytes (Douguedroit, 2010; Aidoud, 2010). Les différences entre mesures enregistrées à partir des indices de biodiversité floristiques (E, H') ne sont pas significatives pour les deux campagnes, d'autre part les indices spécifiques sont très importants sur les plans qualitatifs et quantitatifs. Ainsi, les deux stations étudiées interférent au même écosystème steppique de type aride caractérisant la partie Ouest de la région de Biskra.

REFERENCES

- O.N.M., 2014. Office nationale de météorologie (station de Biskra).
- Ramade F., 1984. Eléments d'écologie fondamental. Ed. Mc Graw-Hill, Paris.397 p.
- Mulleure Y., 1985. L'avifaune forestière nicheuse des vosgers du Nord- Sa place dans le contexte médio-Européen. Thèse Doc. Sci., Univ. Dijon., 318 p.
-Blondel J., 1975. L'analyse des peuplements d'oiseaux – élément d'un diagnostic écologique : la méthode des échantillonnages fréquentiels progressifs (E.F.P.). Rev. écol. (Terre et vie), Vol. 29, (4) : pp: 533 - 589.
- Barbault R., 1981. Ecologie des populations et des peuplements. Ed. Masson, Paris, 200 p.
- Limons J. et al., 2003. Conserving biodiversity in arid regions. Ed Kluwer Academic Publishers, Perth, pp: 41-211.
- Dajoz R., 1971. Précis d'écologie. Ed. Dunod, Paris, 434 p.
- Douguedroit A., 2010. Perspectives d'augmentation de la sécheresse de la saison chaude dans le bassin méditerranéen à la fin de ce siècle. Univ. de Provence-France, Atelier international sécheresse (analyse et stratégies d'adaptation), CRSTRA Biskra 2010.

- Faurie C., Ferra Ch., Medori P., Deuaun J., Hemptinne J. L., 2003. Ecologie- approche scientifique et pratique. 5ém édition.
- McKenzie J.B. et Barr D.A., 2000. Stabilisation des dunes à Queensland. Conférence sur la Gouvernance et lutte contre la Désertification, Berlin.
- Nesson C., 1965. Structure agraire et évolution sociale dans les oasis de oued Righ .Travaux de l'Institut de Recherches Sahariennes, 126p.
- Ozenda P., 2004. Flore et végétation du Sahara. 3eème édition-CNRS éditions, 666p.
-Vilain M., 1999. Méthodes expérimentales en agronomie (pratiques et analyses).
- Aidoud A., 2010. Réponse des écosystèmes steppiques aux sécheresses. Univ. De Rennes-France; Atelier international sécheresse (analyse et stratégies d'adaptation), CRSTRA de Biskra 2010.

Parasitoïdes d'*Aphis gossypii* et leur répartition au sud ouest de la Tunisie

Meriem Ayadi[1,2*], Faouzi Aoun[1], Mohamed Sadok Belkadhi[1], Monia Ben Hlima Kamel[3]
[1]Laboratoire d'Aridoculture et Cultures Oasiennes, Institut des Régions Arides (IRA),
Route du Djorf km 22, 4119 Médenine, Tunisie.
[2]Faculté des Sciences de Gabès, Cité Erriadh 6072 Zrig, Gabès, Tunisie.
[3]Institut Supérieur Agronomique Chott Mériem, 4042 Chott Mériem, Sousse, Tunisie.
*Email: meriemayadi.fsg@gmail.com

RESUME
Le but de ce travail est l'étude de la diversité des parasitoïdes (Aphidiinae) *d'Aphis gossypii* dans le sud-ouest de la Tunisie, notamment dans les serres géothermiques de Kébili et aux alentours. Les Aphidiinae sont des importants agents de lutte biologique contre de nombreuses espèces de pucerons nuisibles. Par conséquent, l'étude de la biosystématique des parasitoïdes, y compris les associations tritrophiques (puceron- parasitoïde -hôte) est une nécessite. Les parasitoïdes et les pucerons sont collectés sur des plantes hôtes puis ils sont transférées dans l'éthanol au laboratoire. Cinq espèces de parasitoïdes *Lysiplebus testaceipes* Cresson, *Binodoxys angelicae* Haliday, *Ephedrus persicae* Frog, *Aphidius matricariae* Haliday et *Aphidius colemani* Viereck ont été collectées et identifiées en association avec *Aphis gossypii* présentes sur 6 plantes hôtes: *Cucumis melo* (Flexuosus), *Cucumis melo* (Melon), *Curcubitace pepo* (courgette), *Hibiscus rosacinensis, Cestrum nocturnum* et *Mentha spp*. Au total, 12 associations parasitoïdes-*Aphis gossypii* ont été enregistrées.
Mots-clés: Association tritrophique, parasitoïde, puceron, plante hôte, Kébili, Tunisie.

SUMMARY
The aim of this work is the study of the diversity of parasitoids (Aphidiinae) of *Aphis gossypii in* southwestern Tunisia, particularly in the geothermal greenhouses of Kebili and its surroundings. Aphidiinae are important biological control agents against many aphid species. Therefore, the study of the biosystematics of parasitoids, including tritrophic associations (aphid-parasitoid-host) is a necessity. Parasitoids and aphids are collected on host plants and then transferred to ethanol in the laboratory. Five species of parasitoids *Lysiplebus testaceipes* Cresson, *Binodoxys angelicae* Haliday, *Ephedrus persicae* Frog, Aphidius matricariae Haliday and *Aphidius colemani* Viereck were collected and identified in association with Aphis gossypii present on 6 host plants: *Cucumis melo* (Flexuosus), *Cucumis melo* (Melon), *Curcubitace pepo*, *Hibiscus rosacinensis, Cestrum nocturnum* and *Mentha spp*. A total of 12 parasitoid associations - *Aphis gossypii* were recorded.
Key words: tritrophic association, parasitoid, aphid, host plant, Kebili, Tunisia.

1. INTRODUCTION

Les pucerons sont considérés actuellement parmi les insectes les plus nuisibles et les plus dommageables aux plantes (Dixon, 1998). Ils sont devenus des ravageurs majeurs des forêts, des cultures et des plantes ornementales (Harmel et *al.*, 2010). Leur contrôle chimique pose souvent des problèmes, du fait, qu'ils se fixent généralement sur la face inférieure des feuilles, à l'abri des traitements (Sauvion, 1995). En raison de l'effet nocif des insecticides sur l'environnement (Harmel et *al.*, 2010) et les cas de résistance qui sont de plus en plus fréquents chez les pucerons (Sauvion, 1995), il est temps d'adopter de nouvelles stratégies de lutte contre ces bio-agresseurs. En fait, ils sont souvent contrôlés par un grand nombre d'espèces d'ennemis naturels, notamment les parasitoïdes qui participent d'une manière active à la réduction des populations de pucerons ravageurs (Rakhshani, 2007; Van Emden et Harrington, 2007 cités par Barahoei *et al.*, 2010; Ben Halima Kamel, 2011; Dedryver et *al*., 2010).
Ces Aphidiinae comprennent environ 60 genres et sous-genres et plus de 400 espèces dans le monde (Stary, 1988). Tous sont des endoparasitoïdes solitaires de pucerons. Par conséquent, la biosystématique des parasitoïdes d'Aphidiinae, y compris les associations tritrophiques (hôte parasitoïde-puceron), a été étudiée dans de nombreuses régions du monde (Mossadegh et *al*., 2011). Pour la Tunisie, peu d'enquêtes sur les parasitoïdes des pucerons ont été effectuées (Ben Halima et Ben Hamouda, 1994, 1995, 1998 et 2005; Boukhris Bouhachem, 2011). La recherche sur les

Hyménoptères parasitoïdes des pucerons et la connaissance des faunes locales basées sur les associations plante-puceron-parasitoïde revêtent une importance primordiale en tant que sources d'informations écologiques importantes sur les agents de lutte biologique. De plus, la connaissance des interactions du réseau alimentaire dans les études de la biodiversité et la conservation de la nature est importante. À cet égard, le manque d'informations sur ces associations, en particulier dans la partie désertique de la Tunisie, nous a incités à présenter cette étude.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Description de la zone d'étude

La collecte de parasitoïdes de pucerons et des pucerons a été réalisée sur des cultures sous serres géothermale dispersées dans la région de Kebili (Figure 1) qui se caractérise par son climat aride ou des plantes se trouvant à proximité. Elle est exposée à un large éventail de facteurs défavorables d'ordre abiotiques et biotiques (Belkadhi et *al.*, 1993). Parmi les problèmes abiotiques la température moyenne est de 22,4 ° C, la vitesse du vent de 18,3 km / h et les précipitations de 17,2 mm au cours de la période d'étude (mars 2015 à juin 2015).

Des parasitoïdes et des pucerons infestant *Cucumis melo* ont été observés dans le gouvernorat de Kebili à Douz (L: 33 ° 26'11.06 "N, L: 9 ° 2'25.22" E), Radwan (L: 33 ° 44 ' 28,53 "N, L: 9 ° 15'21,39" E), Limaguess (l: 33 ° 46'21.28 "N, L: 9 ° 4'8.51" E), El Hamaa (33 ° 54'53.58 "N, L : 9 ° 39'18.50 "E) et Steftimi (l: 33 ° 47'28.80" N, L: 9 ° 1'9.44 "E) et *Capsicum annum* à Bazma (l :, 33 ° 41'2.97" N, L : 9 ° 0'58.14 "E). Les plantes spontanées (*D. carota, P. communis, Medicago sativa, Solanum nigrum, Sonchus et Beta vulgaris*) autour des serres ont été, également, observées des parasitoïdes. A la station d'IRA Kebili, des parasitoïdes et des pucerons ont été recueillis chez *Senecio gallicus, Hibiscus rosa-sinensis, Nerium oleander, Cestrum nocturnum, P. communis, Sonchus, Mentha spp et P. granatum*.

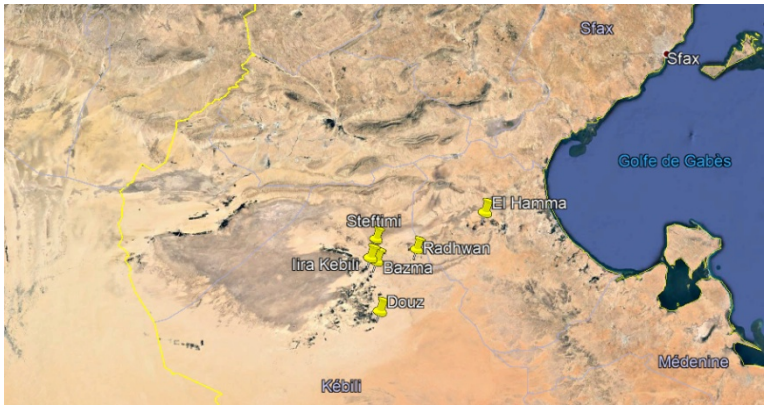


Figure1 : Répartition spatiale des sites de collecte.

2.2. Méthodes de collecte et de détermination des pucerons

Les échantillons sont prélevés à partir des différentes plantes cultivées et spontanées présentant à la fois des colonies d'aphides et des traces de parasitismes (momies), chaque échantillon est placé séparément dans un sachet en plastique préalablement étiqueté. Une fois au laboratoire, Les pucerons vivants ont été recueillis à l'aide d'une petite brosse et déposés dans de l'éthanol à 75% afin de préparer les lames à l'identification. La détermination a été faite dans le laboratoire de Zoologie à l'université de León (Espagne) par le professeur Juan Manuel Nieto Nafría.

Les pucerons momifiés de la même espèce et de la même plante hôte sont placés dans des boites de Pétri. Les colonies momifiées sont contrôlées chaque jour afin de récupérer les Hyménoptères adultes fraichement émergés. Ces derniers sont placés ensuite dans des tubes contenant de éthanol à 96% pour une identification ultérieure. L'identification des Hyménoptères parasitoïdes a été réalisée par le Professeur Peter Stary de l'Institut d'Entomologie, République Tchèque.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

Dans la région d'étude 5 espèces de parasitoïdes Aphidiinae sont recensées sur les colonies *d'Aphis gossypii*. Ces Hyménoptères parasitoïdes sont recueillis à partir de 7 plantes hôtes dans la zone étudiée. En tout, 12 associations de pucerons et de plantes sont rapportées.

Tableau 1: Associations tri-trophiques (plante - puceron - parasitoïde)

Parasitoïdes	**Pucerons**	**Plantes**
Aphidius colemani Viereck	*Aphis gossypii* Glover	*Cestrum nocturnum* *Cucumis melo* (Flexiosus) *Cucumis melo* (Melon)
Aphidius matricariae Haliday		*Cucumis melo* (Melon) *Mentha spp*
Binodoxys angelicae Haliday		*Mentha spp*
Ephedrus persicae Frogatt		*Mentha spp*
Lysiphlebus testaceipes Cresson		*Cestrum nocturnum* *Cucumis melo* (Flexiosus) *Cucumis melo* (Melon) *Curcubitace pepo* (Courge) *Hibiscus rosacinensis*

3.1. Relations fauniques

Sur le fond méditerranéen, les guildes de parasitoïdes cibles dans les serres géothermiques reflètent les caractéristiques de la Méditerranée occidentale. On peut trouver des preuves sur les domaines connexes (Stary, 1976 ; Tomanovic et *al*., 2014), au Maroc (Stary et Sekkat, 1987), en Algérie (Laamari et *al*., 2011, 2012 ; Chaouch Tahar et al., 2010), Tunisie (Ben Halima Kamel et Ben Hamouda, 1998 ; Ben Halima-Kamel, 2011).

La sous famille des Aphidiinae regroupe des espèces qui sont largement utilisées dans certains pays pour maitriser les populations des pucerons dans les divers agro-écosystèmes (Mackauer et Stary, 1967). Ils sont connus dans tous les principaux habitats du monde (Akhtar *et al.,* 2011), spécialement dans les zones tempérées et subtropicales de l'hémisphère Nord (Boivin *et al.,* 2012). D'après Rachshani *et al.,* 2008) les espèces du genre *Aphidius* sont les plus abondantes et les plus cosmopolites. Ces espèces sont *A. colemani* et *A. matricariae* présentes dans la région d'étude (Figure 2). Certaines espèces sont produites en masse et utilisées dans les serres comme agents de lutte biologique contre les pucerons (Stary, 1979 ; Hagvar et Hofsvang, 1991 cités par Tomanovic *et al.*, 2003).

A. colemani, avec les 3 associations formées, occupe le deuxième rang. Il a été signalé sur *Aphis gossypii* inféodées à *Cestrum nocturnum, Cucumis melo* (Melon) *et Cucumis melo* (Flexiosus). D'après Elliott *et al.,* (1994) et Stary (1975) cités par Waterhouse (1998), ce parasitoïde préfère s'installer sur des aphides de la famille des Aphididae. Il a été signalé en Tunisie sur *Aphis gossypii* (Ben Halima Kamel et Ben Hamouda, 1998, Boukhris-Bouhachem, 2011).

Concernant *A. matricariae, il s'agit d'une* espèce dominante qui a pu parasiter les pucerons installées sur *Cucumis melo* (Melon) *et Mentha spp* (Tableau 1). Ce parasitoïde a été déjà observé dans plusieurs pays méditerranéen, en particulier, en Tunisie (Ben Halima-Kamel & Ben Hamouda, 2005), en Turquie (Olmez & Ulusoy, 2003) et en Grèce (Kavallieratos *et al.*, 2001). Il a été signalé également au Brésil sur *Aphis gossypii* (Stary *et al.*, 2007).

Le genre *Lysiphlebus* occupe le 1er rang dans la région d'étude est représenté par l'espèce *L. testaceipes.* Ce genre regroupe environ 30 espèces à travers le monde (Rakhshani *et al.*, 2007). D'après Stary et *al.,* (1971), les espèces appartenant à ce genre ont une grande capacité d'adaptation aux différentes conditions climatiques. il a été collecté à partir des momies *d'Aphis gossypii* installé sur *Cestrum nocturnum, Cucumis melo* (Flexiosus),*Cucumis melo* (Melon), *Curcubitace pepo* (Courge) et *Hibiscus rosacinensis.* Ce parasitoïde est déjà signalé en Grèce et au Portugal (Kavallieratos *et al.*, 2001; Costa & Stary, 1988) et en France (Stary *et al.*, 1975). D'après Stary et *al., Lysiphlebus testaceipes* a été largement introduit dans de nombreux pays à partir de Cuba pour son application dans des programmes de lutte biologique contre plusieurs espèces aphidiennes. Par la suite, il est devenu le parasitoïde le plus repandu en France et dans la région

méditerranéenne (Carver, 1984). Le genre *Binodoxys* et le genre *Ephedrus* sont également représentés dans la région d'étude par *B. angelicae* et *E. persicae*. (Tableau 1).

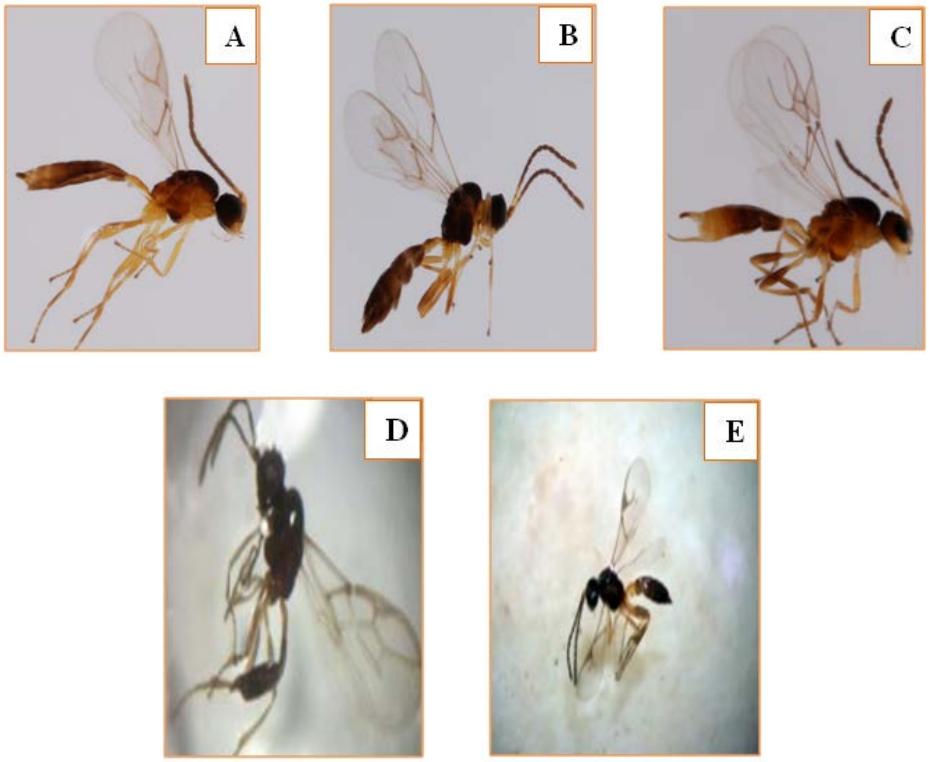


Figure 2 : Quelques espèces de parasitoïdes des aphides rencontrées dans la région d'étude. **A:** *Aphidius colemani,* **B:** *Aphidius matricariae,* **C:** *Binodoxys angelicae,* **D:** *Ephedrus persicae,* **E:** *Lysiplebus testaceipes.*

3.2. Les associations tri-trophiques (hyménoptères parasitoïde-pucerons-plantes)

Si nous analysons les interrelations dans les écosystèmes sur le terrain des associations tritrophiques (plante-puceron-parasitoïde), il est nécessaire de souligner qu'elles peuvent être identiques ou complètement différentes si l'on considère la gamme d'hôtes des pucerons et celle des parasitoïdes (Stary, 1972). Ainsi, dans le cas *d'Aphis gossypii*, les interactions sont identiques compte tenu de la gamme d'hôtes des pucerons et surtout des parasitoïdes passant par *Aphidius colemani* (Rakhshani et *al*., 2008; Talebi et *al*., 2009; Nazari et *al*., 2012), *Aphidius matricariae* (Starý, 1979; Starý et *al*., 2000; Rakhshani et *al*.,2008; Talebi et *al*., 2009; Mossadegh et *al*., 2011; Nazari et *al*., 2012; Barahoei et *al*.,2013), *Binodoxys angelicae* (Yaghubi, 1997; Starý *et al*., 2000; Mossadegh *et al*., 2011; Nazari *et al*., 2012; Barahoei et *al*., 2013), *Ephedrus persicae* (Barahoei *et al*., 2013) et *Lysiphlebus testaceipes* (Stary et *al*.,1993) (Tableau 1).

4. CONCLUSION

Les résultats de ce travail ont permis de ressortir la richesse en Hyménoptères parasitoïdes des pucerons inféodés aux espèces végétales des milieux cultivés dans la sud Tunisien. Une analyse des guildes de parasitoïdes montre clairement que la liste des espèces indique une situation similaire à celle de l'ensemble de la Méditerranée (Stary, 1976), avec quelques particularités pour sa partie occidentale, comme suit: *Lysiphlebus testaceipes*, une espèce exotique introduite et progressivement indigène, a démontré ses deux extensions, même dans la zone ciblée. Alors que *Aphidius colemani* révèlent ses particularités ouest-méditerranéennes (Tomanovic et *al*., 2014).

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient l'IRA Kebili (Tunisie) d'avoir fourni les installations nécessaires à la réalisation de ce projet. Les travaux de recherche de P. Stary ont été financés par l'Institut d'entomologie, Centre de biologie ASCR.

RÉFÉRENCES

- Akhtar A, Dey D, Usmani M K. 2011. A catalogue of aphid parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) from India. *Insecta Mundi*, 0151: 1-31.
- Barahoei H, Madjdzadeh SM, Mehrparvar M, Stary P. 2010. A study of praon haliday (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) in south-east Iran with two new records, *Acta entomologica serbica*, 15(1): 107-120.
- Barahoei H, Rakhshani E, Madjdzadeh SM, Alipour A, Taheri S, Nader E, Mitrovski Bogdanović A. Petrović- Obradović O, Starý P, Kavallieratos NG, Tomanović, Ž. 2013. Aphid parasitoid species (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) of central submountains of Iran. *North-Western Journal of Zoology*, 9: 70-93.
- Bel Kadhi MS. 2014. Importance des facteurs naturels de regulation de la population de Bemisia tabaci sous serre géothermique dans le sud tunisien. *Revue des régions arides* N° 34(2/2014).pp 19-34.
- Ben Halima KM, Ben Hamouda MH, Rabasse JM. 1994. Les pucerons des agrumes et leurs ennemis en Tunisie. *Tropicultura12* (4), p. 145-147.
- Ben Halima KM. 1995. Contribution à l'étude de la dynamique des populations de pucerons en vergers d'agrumes. *Bulletin OILB/SROP* 18 (5), p. 39-46.
- Ben Halima KM, Ben Hamouda MH. 1998. Contribution à l'étude de la bioécologie des aphides d'une région côtière de la Tunisie. *Med. Fac. Landbouww.* Univ. Gent 63/2a, p. 365-378.
- Ben Halima KM, Ben Hamouda MH. 2005. A propos des pucerons des arbres fruitiers de Tunisie. Dans : *Notes fauniques de Gembloux*, 2005, 58, p. 11-16.
- Ben Halima KM. 2011. Effectiveness of *Lysiphlebus testaceïpes* Cresson as Biocontrol agent of *Aphis gossypii* Glover infesting pepper plants. Acta Universitatis Carolinae *European journal of Environmental Sciences.* Charles University in Prague.*Karolinum press.*1(1),28-32.
- Boivin G, Hance T, Brodeur J. 2012. Aphid parasitoids in biological control. *Can.J. Plant Sci.*, 92: 1-12.
- Boukhris BS. 2011. Aphid Enemies Reported from Tunisian *Citrus* Orchards. *Tunisian Journal of Plant Protection*. 6 (1), 21-27.
- Carver M, 1984. The potential host ranges in Australia of some imported aphid parasites (Hym: Ichneumoniodea: Aphidiidae). *Entomophaga* 29(4):351-359.
- Costa A, Stary P. 1988. *Lysiphlebus testaceipes* an introduced aphid Parasitoïd in Portugal (Hym: Aphidiidae). *Entomophaga* 33(4), p. 3-412.
- Dedryver CA, Le Ralec A, Fabre F. 2010: The conflicting relationships between aphids and men: A review of aphid damage and control strategies. *Comptes Rendus Biologies* 333: 539–553.
- Dixon AFG. 1998. *Aphid ecology*. Ed Chapman & Hall 300p Stary et *al* cités par Ehsan R, Zeljko T, - Stary P, Sghar TA, Nickolas Gk, Abba L, Srdjan S. 2008. Distribution et la diversité des parasitoïdes de pucerons du blé (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) en Iran, 105(1): 863-870.
- Elliott N, Burd J, Armstrong J, Walker C, Reed D, Peairs F. 1995. Release and recovery of imported parasitoids of the Russian wheat aphid in eastern Colorado. *Southwestern Ento mologist* 20:125- 129.
- Harmel N, Haubruge É, Francis F. 2010. Étude des salives de pucerons: un préalable au développement de nouveaux bio-insecticides. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 14, 369–378.
- Kavallieratos NG, Lykouressis DP, Sarlis GP, Stathas GJ, Sanchis Segovla A, Athanassiou CG. 2001. The Aphidiinae (Hymenoptera: Ichneumonoidea) of Greece. *Phytoparasitica* 29(4), p. 306-340.

- Laamari M, Tahar CS, Benferhat S, Abbès SB, Merouani H, Godbane S, Khenissa N, Stary P. 2011. Interactions tritrophiques: plante-puceron-hyménoptère parasitoïde observées en milieux naturels et cultivés de l'Est algérien. *Entomologie faunistique – Faunistic Entomology,* 63 (3), 115-120.
- Laamari M, Tahar CS, Halimi CW, Benferhat S, Abbes SB, Khenissa N, Stary P. 2012. A review of aphid parasitoïds and their associations in Algeria (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae; Hemiptera: Aphidoidea). *African Entomology*, 20 (1): 161-170.
- Mackauer M, Stary P. 1967. (Hym., Ichneumonoidea) World Aphidiidae in Delucchi V. And Reumaudiere G. (Eds.): Index of entomophagous insects. *Le Françoise, Paris*, 195pp.
- Mossadegh MS, Starý P, Salehipour H. 2011. Aphid parasitoids in a dry lowland area of Khuzestan, Iran (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae). *Asian Journal of Biological Science* 4: 175–181.
- Mossadegh MS, Starý P, Salehipour H. 2011. Aphid parasitoids in a dry lowland area of Khuzestan, Iran (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae). *Asian Journal of Biological Science*, 4: 175-181.
- Nazari, Y, Zamani AA, Masoumi SM, Rakhshani E, Petrović-Obradović O, Tomanović S, Starý P, Tomanović Ž. 2012. Diversity and host associations of aphid parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) in the farmlands of western Iran. *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae*, 52: 559-584.
- Olmez S, Ulusoy MR. 2003. Asurvey of Aphid Parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) in Diyarbakir, Turkey. *Phytoparasitica* 31(5), p. 524-528.
- Rakhshani E, Talebil AA, Star P, Tamanovic Z, Manzari S. 2007. Aphid- parasitoid (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiidae) associations on willows and poplars in Iran. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 53 (3): 281-292.
- Rakhshani E, Talebi, AA, Starý P, Tomanović Ž, Manzari S, Kavallieratos NG. 2008. A review of *Aphidius* Nees (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) in Iran: host associations, distribution and taxonomic notes. *Zootaxa*, 1767: 37-54.
- Sauvion N. 1995. Effets et modes d'action de deux lectines à mannose sur le puceron du pois, Acyrthosiphon pisum (Harris).potentiel d'utilisation des lectines végétales dans une stratégie de création de plantes transgéniques résistantes aux pucerons. Thèse Doc., *l'Inst. Nati. Scie. Appl., Lyon*, 179p.
- Stary P, Remaudiere G, Leclant F. 1971. *Les Aphidiidae (Hym.) de France et leurs hôtes (Homo., Aphididae)*. Ed. le françois, Paris. 76p.
- Stary P. 1972. Host range of parasites and ecosystem relations, a new viewpoint in Multilateral control concept (Hom., Aphididae; Hym., Aphidiidae). *Ann. Soc. Ent. Fr., N.S.* 8:351/358.
- Stary P, Leclant F, Lyon JP. 1975. Aphidiides (Hym.) et aphides (Hom.) de Corse. I.: Les Aphidiides, *Annales de la Société Entomologique de France (N.S.)* 11(4), p. 765-762.
- Stary P. 1976. Aphid parasites /Hymenoptera, Aphidiidae/ of the Mediterranean area. Trans. Czechosl. Acad. Sci., Ser. Math. Nat. Sci.86/2/:1-95, and Dr.W.Junk bv., The Hague.
- Stary P. 1979. Aphid *parasitoid (Hymenoptera: Aphidiidae)* of the central Asian Area. *Ed. Dr, W, Junk, N, V, Publisher the Hague, Boston, London*, 114p.
- Stary P, Sekkat A. 1987. Parasitoids (Hymenoptera: Aphidiidae) of aphid pests in Marocco. *Annls.Soc.Ent.Fr.*23 (2): 145-149.
- Stary P, Lyon JP, Leclant F .1988. Biocontrol of aphids by the introduced *Lysiphlebus testaceipes* (Cress.) (Hym., Aphidiidae) in Mediterranean France. *J Appl Entomol* 105:74–87.
- Stary P, Gerding M, Norambuena H, Remaudière G. 1993. Environmental research on aphid parasitoid biocontrol agents in Chile (Hym., Aphidiidae; Hom., Aphidoidea). *Journal of Applied Entomology* 115: 292-306.
- Stary P, Remaudière G, González D, Shahrokhi S. 2000. A review and host associations of aphid parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) of Iran. *Parasitica*, 56: 15-41.
- Stary P, Sampio MV, Paes Bueno VH. 2007. Aphid parasitoids (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) and their associations related to biological control in Brazil. *Revista Brasillement de*

Entomologia 51(1), p. 107-108.
- Tahar Chaouch S. 2010. Etude bioécologique des Hyménoptères parasitoïdes des pucerons associés au milieu naturel dans la région de Biskra. *Mém. Mag. Inst. Agro*. Univ. Biskra, 55 p.
- Talebi AA, Rakhshani E, Fathipour Y, Starý P, Tomanović Ž, Rajabi-Mazhar N. 2009. Aphids and their parasitoids (Hym., Braconidae: Aphidiinae) associated with medicinal plants in Iran. *American- Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 3 (2): 205-219.
- Tomanovic Z, Kavallieratos NG, Stary P, Athanassiou CG, Zikic V, Petrovic–Obradovic O, Sarlis G. 2003. Aphidius (Nees) aphid parasitoids Hymenoptera : Braconidae , Aphidiinae) in Serbia and Montenegro: tritrophique associations and key. Acta. *Entomologia Serbia* 8(1/2) :15-39
- Tomanovic Z, Petrovic A, Mitrovic M, Kavallieratos NG, Popovic A, Shukshuk AH, Ivanovic A. 2014. Molecular and morphological variability within the *Aphidius colemani* group with redescription of *Aphidius platensis* Brethes (Hymenoptera; Braconidae: Aphidiinae). *Bull. ent. Res.* 104: 552-565.
- Waterhouse DF. 1998. Biological control of insect pests: Southeast Asian prospects.Ed. *ACIAR Monograpaph, Canberra, No*. 51, 548pp.
- Yaghubi P. 1997. Faunal study of Aphidiinae in Gilan provincr. *MSc thesis, Faculty of Science, University of Tehran*. 105 pp.

Restauration de l'équilibre écologique dans les palmeraies de la Saoura (Bechar, Algérie), techniques et méthodes de lutte intégrées contre les ravageurs à importance économique majeure

Ali Boulanouar[1], Mohamed Anouar Khelil[2], Moussaoui Abdellah[1], Benlarbi larbi[1], Makhloufi Ahmed[1]

[1]Valorisation des ressources végétales des zones semi arides et sécurité alimentaire UTM Béchar 08000, Algérie

[2]Valorisation des actions de l'homme pour la protection de l'environnement et application en santé publique.ABB Tlemcen 13000, Algérie.

Email: Boulanouar.ali7@gmail.com

RESUME

La Saoura est une région du Sud-ouest algérien, caractérisée par une forte densité de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.,*)*, où le nombre dépasse les 900 000 pieds répartit en plusieurs palmeraies (Taghit, Igli, Béni abbés...). Malgré cela, la production des dattes demeure insuffisante même pour couvrir les besoins du marché local et ceci pour des raisons multiples notamment la propagation de plusieurs maladies dues aux champignons et en particuliers le Bayoud, et les insectes ravageurs, dont trois restent dangereux: la cochenille blanche (*Parlatoria blanchardi* Targ.) Semm ou Djereb, Boufaroua (*Oligonychusafrasiaticus*), et le Doud dit vers de datte (*Ectomyeloisceratoniae* Zell.,). Les différentes techniques de piégeage ont permis d'identifier plus de 163 espèces à partir de 6128 individus des dix palmeraies recensées. L'inventaire a aussi permis de classer les insectes selon leur importance économique, de déterminer leur cycle biologique et leur adaptation au palmier dattier. La dynamique des populations étudiées met en relief une répartition spatio-temporelle, un classement des auxiliaires pour leur utilisation comme moyen de lutte biologique afin d'améliorer le rendement.

L'utilisation aléatoire des insecticides durant la dernière invasion du criquet causée un déséquilibre écologique, où approximativement la plupart des ennemis de la cochenille blanche sont disparus, par conséquence la pullulation de ce ravageur commence à s'aggraver de plus en plus.

Mots-clés : Auxiliaires, cochenille blanche, entomofaune, *Phoenix dactylifera L*.

SUMMARY

Saoura region is situated in the south west of Algeria characterized by a height density of date palm trees (*Phoenix dactylifera* L.,*)* where the number exceeded 900000, tree we note several oases (Igli, Béni Abbes, Taghit, among others). Despite this high density, the production of dates is still insufficient even for the local consumption, this is due to the increasing water salinity, the spread of many fungal diseases, where the most serious is the Bayoud (*Fusaruimoxysporum*), and insect pests, three of them remain the most serious: white scale locally named Semm (*Parlatoriablanchardi*Targ.,), Boufaroua (*Oligonychusafrasiaticus*), and Doud called dates worm (*Ectomyeloisceratoniae* Zell.,).

By using different trapping techniques, an inventory was realized which permits to identify 163 species from 6128 individuals collected in ten palm grove of Saoura. The inventory allowed to classify insects according to their economic importance, to determine their life cycle and their adaptation to the date palm. The dynamics of the populations studied highlight a spatio-temporal distribution, a classification of the auxiliaries for their use as means of biological control in order to improve the yield.

The random use of insecticides during the last invasions of locusts caused an ecological imbalance, where virtually the majority of the enemies of white scale are disappeared, as consequence the population of white scale expanded increasingly.

Key words: Auxiliaries, entomofauna,*P hoenix dactylifera* L, white scale

1. INTRODUCTION

Depuis plus de deux décennies et plus précisément depuis les années quatre vingt dix, la région de la Saoura a connu une période d'invasions transfrontalières d'acridiens qui ont causé de sérieux dégâts aux récoltes et de considérables pertes économiques aux phoeniciculteurs dans de nombreuses Oasis. Les stratégies de lutte ainsi que les méthodes de minimisation des dégâts agricoles demeurent toujours traditionnelles. Pour résoudre le problème, cerner les invasions et limiter les dégâts du ravageur, les services agricoles utilisent tous les moyens possibles dont la pulvérisation de milliers de litres d'insecticides antiacridiens était une méthode plus facile et plus efficace à la fois.

Au fil du temps, les conséquences de ce traitement commencent à flotter en surface. Ces procédés ont réussi à éradiquer le criquet mais en occasionnant des dégâts très lourds à l'écosystème oasien, d'où la pullulation de la cochenille blanche à titre exemple n'a jamais cessée d'aggraver la situation. Elle a réussi à atteindre quatre générations par an, avec émergence de nouvelles espèces déprédatrices telles que l'Oryctes, le Boufaroua… De même, les insectes utiles et l'apiculture connaissent le même destin où la plupart des ruches sont totalement neutralisées. Les antiacridiens occasionnent une rupture dans les maillons de la chaine trophique par l'élimination de certains insectiphages vertébrés ou invertébrés.

Un palmier sain, bien entretenu peut donner plus de sept régimes, chacun pèse plus de quinze kilogramme, où le calibre des dattes varie selon le cultivar. En revanche le pied infesté peut avoir une diminution du rendement qui peut aller jusqu'à 65% avec une dégradation qualitative remarquable. – En effet, la dégradation des palmeraies de la Saoura due aux ravageurs insectes est l'un des principaux problèmes qui nous a incités à mener cette étude. De ce fait une connaissance aussi complète de l'entomofaune fréquentant les palmeraies s'avère indispensable. Nous avons collecté des données concernant la plante hôte, dominant cet étage Saharien, (Munier, 1973; Bouguedoura, 1991; Bounaga, 1985; Djerbi, 1991). Actuellement la pratique d'autres moyens de lutte intégrée contre les ravageurs reste sans effets sur la faune. Pour des raisons écologiques et économiques, il est nécessaire de développer des méthodes de substitutions aux pesticides de synthèse dans la protection des cultures et des récoltes.

2. LA COCHENILLE BLANCHE

Cet insecte est le principal ennemi du palmier dattier dans la station, aussi bien par l'importance des dommages qu'il occasionne que par son extension géographique. Toutes les palmeraies de la Saoura sont infestées par cette espèce sans exception malgré la richesse variétale. Cette cochenille appartient à la famille des Diaspidinae. Elle a été découverte en 1868 par M.-E. Blanchard dans une Oasis de l'Oued Rhir, dans le Sahara algérien. Cette Diaspine est localement appelée Semm.

2.1. Répartition géographique

*Parlatoriablanchardi*Targ., est actuellement présente dans toutes les régions de culture du palmier, sauf aux U.S.A. où a été menée une campagne d'éradication (Broyden, 1941)

2.2. Description morphologique

2.2.1. Œufs

D'après SMIRNOFF (1954), l'œuf est allongé, de couleur rose pâle, à enveloppe externe très délicate, disposé sous le follicule maternel, groupés en nombre de onze en moyenne. Il mesure environ 0,04 mm de diamètre et la période d'incubation est de trois à cinq jours.

2.2.2. Larves

2.2.2.1. Larves mobiles

Elles sont de couleur rouge clair, elles ont des pattes bien développées, explorent le support végétal puis se fixent. Leur activité varie de quelques heures à trois jours, selon les conditions du milieu.

1.2.2.2. Larves fixes

Après deux à trois jours, les larves mobiles se fixent, elles se couvrent d'une sécrétion blanchâtre qui forme le follicule du premier âge (pseudo bouclier). Après la première mue, elles sécrètent un deuxième bouclier et deviennent apodes, d'où les larves du deuxième stade correspondant à la différenciation du mâle et de la femelle.

2.2.3. Femelle

La jeune femelle est rouge claire, elle rosit plus pour arriver à une teinte lilas au cours de sa croissance. La longueur de la femelle adulte est de 1,2 à 1,4 mm et le follicule mesure de 1,2 à 1,6 mm de long et 0,3 mm de large. Il est de forme ovale, très aplati (Balachowsky & Mesnil, 1935), de couleur brun, elle est recouverte par un bouclier cireux qui constitue la masse extérieure du follicule.

2.2.4. Mâle

Le mâle présente un follicule blanc, de forme allongée, mesure 0,8 à 0,9 mm de longueur. Le mâle adulte est de couleur roux jaunâtre, porte généralement une paire d'ailes transparentes, trois paires de pattes, une paires d'antenne bien développées et deux yeux globuleux (Smirnoff, 1954).

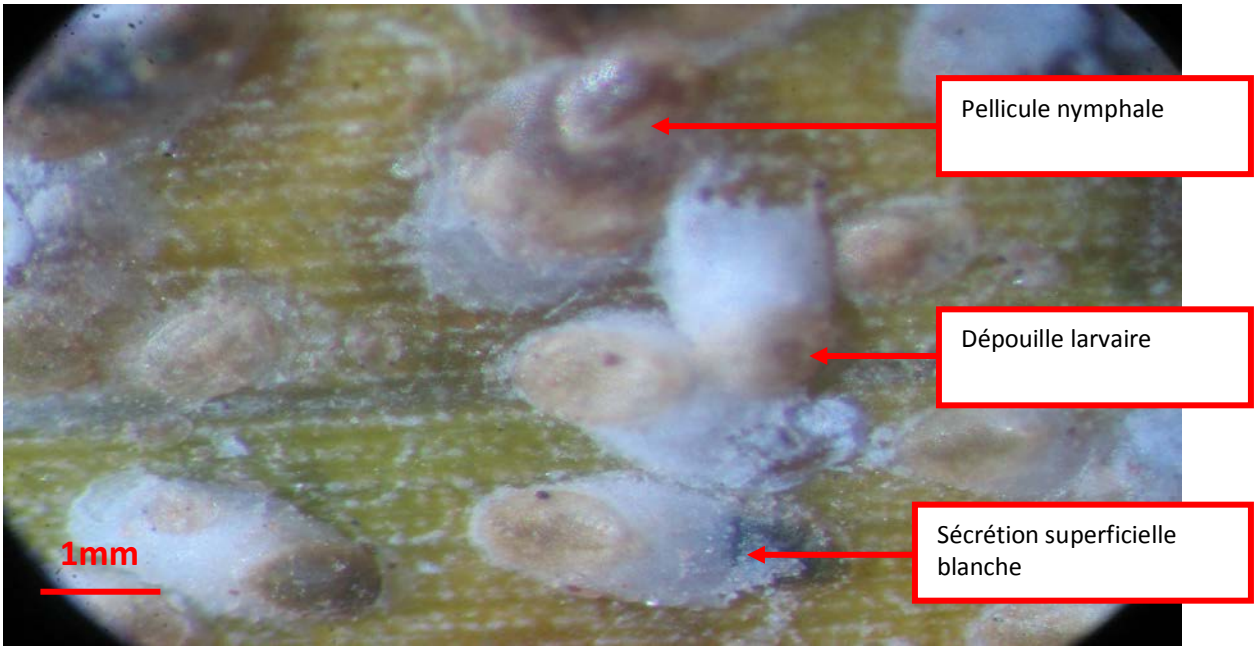


Photo 1: La morphologie de la cochenille blanche (X 10) (Originale 2015)

2.3. Cycle biologique de *Parlatoriablanchardi*Targ.,

Le cycle biologique du mâle diffère totalement de celui de la femelle (Tourneur & Hugues, 1975). D'après Smirnoff (1954), les mâles ailés fécondent généralement les femelles logées dans des jeunes folioles non encore épanouies, ils y pénètrent en venant d'ailleurs. Les œufs disposés sous le follicule maternel ou au contact du corps sont en nombre de sept à huit, onze pour SMIRNOFF (1954) et quinze pour Laudeho & Benassy (1969). Ils sont groupés et accolés entre eux par une pruinosité sécrétée par les glandes périvulaires. Leur période d'incubation est de trois à cinq jours (Smirnoff, 1957). Après fixation, la larve du premier stade (L1) s'élargit, s'aplatit et secrète un bouclier protecteur blanc qui devient graduellement brun puis presque noir (Smirnoff, 1954, 1957; Balachowsky & Kaussari, 1956 ; Balachowsky, 1951; Balachowsky, 1953). A ce stade, il est impossible de différencier les sexes.

Au bout d'environ une semaine, les larves du premier stade muent en larves de deuxième stade L2, celles-ci sont apodes, la différenciation des sexes apparaît nettement à ce stade. La larve L2 femelle

est semblable à la forme adulte, mais plus réduite. Elle diffère aussi par l'absence de vulve. La larve du deuxième stade mâle est allongée et possède des taches oculaires pourpres. Chez la larve du deuxième stade mâle et femelle, le pygidium glandifère apparaît, il contribue avec les différentes autres glandes à la confection du bouclier. Au bout d'une semaine environ, les larves du deuxième stade subissent une mue pour former le stade imaginal chez la femelle. En effet, celle-ci passe uniquement par deux mues. La troisième sécrétion dite " sécrétion adulte " termine la confection du bouclier qui acquiert sa taille et sa forme définitive.

Quant au mâle, il subit des transformations plus complexes, il passe par cinq stades pour acquérir la forme adulte. La larve du deuxième stade mâle subit une mue et devient prénymphe, celle-ci se distingue nettement du stade précédent. Elle est caractérisée par la formation des ébauches oculaires, des pattes et de l'allongement de l'extrémité abdominale. Cette nymphe jeune possède des antennes, des ailes et des pattes développées mais repliées contre le corps. Le stylet copulateur est parfaitement apparent. La nymphose se produit sous le bouclier, la nymphe toujours immobile se transforme en imago et quitte le bouclier par une fente médio-dorsale. Enfin, l'étude du cycle biologique de la cochenille blanche ne peut être significativement valable que s'il se poursuit sur plusieurs années (Madkouri, 1975).

2.4. Comportement biologique

La cochenille blanche du palmier dattier se développe dans des climats secs et chauds. Dans les zones septentrionales de culture où les températures hivernales ne permettent pas le développement de la cochenille, celle-ci entre en diapause. Toutes les parties du végétal sont colonisées par cette coccide des palmes depuis leur apparition jusqu'à leur mort, folioles face inférieure et supérieure, nervures des folioles et rachis jusqu'à sa partie la plus basse, régime aussi bien les fruits que la hampe et épillets (Munier,1973).

2.5. Evolution des attaques sur le palmier

La cochenille possède plusieurs générations par an. Les jeunes palmiers en pleine croissance constituent un lieu de prédilection pour la fixation des larves. Ces dernières s'installent tout à fait à la base sur la partie nouvellement dégradée sans chercher à coloniser les parties les plus hautes de la palme (Simirnoff, 1957). C'est à partir du foyer d'infestation primaire que se fait la colonisation de l'ensemble de la surface des folioles. L'infestation secondaire est lente et progressive. Ce n'est que sur les palmes d'un certain âge que les encroûtements sur le limbe deviennent importants.

L'infestation des inflorescences peut se faire par la hampe ou directement à partir des folioles en contact. Les infestations présentent des variations temporelles liées au climat selon les régions :

- Croissance importante d'octobre à février- mars ou fin février fin avril ;
- Décroissance pour être minimale en période de forte chaleur : juillet- août ; mai- octobre
- Léger ralentissement (période de froid) : janvier - février, (Munier, 1973).

Les températures relativement basses des hivers entraînent des arrêts complets du développement des insectes pendant environ un mois. C'est à l'état femelle immature ou larve du deuxième stade que l'insecte hiverne. La reprise de la ponte s'observe en début de printemps. La première génération apparaît en début été (soit après environ 3 mois). La deuxième évolue plus rapidement (2 à 2.5 mois) et la troisième génération apparait en fin août. Celle-ci donne une quatrième génération en novembre. Les larves de cette génération coïncident avec l'arrivé du froid et la majorité entre en diapause et ne reprend le développement qu'au printemps suivant.

Dés le mois de mars la maturité sexuelle est atteinte. Quatre générations par an, trois générations ont une durée de 75 jours, la quatrième de 150 jours. Dans les zones à hiver froid (T<14°C) la cochenille se multiplie du printemps à l'automne après une diapause hivernale plus ou moins longue. Dans les secteurs où la température estivale dépasse les 42°C, il y a une diapause estivale (fort ralentissement de prolifération) et un fort taux de mortalité, (Madkouri, 2000).

2. 6. Dégâts provoqués au dattier par la cochenille (*Parlatoriablanchardi*Targ.,)

Les Coccidea sont des insectes dont le régime alimentaire est strictement phytophage. Ils s'alimentent exclusivement aux dépens de la sève et plus particulièrement de la sève élaborée, (Balachowsky, 1932). Il semble qu'un peuplement intense de *Parlatoriablanchardi* déséquilibre la photosynthèse et empêche une respiration et une transpiration normales. Plus encore, la cochenille, en couche continue sur les jeunes tissus, empêche la croissance normale des bourgeons. En effet le peuplement intense de *Parlatoriablanchardi* n'entrave pas seulement le développement normal de la plante, mais il cause le dessèchement prématuré des Djerids et peut conduire à la perte totale d'un végétal aussi robuste et résistant que le palmier dattier (Smirnoff, 1954). Le palmier-dattier attaqué présente une croute continue de cochenilles sur la partie verte de la couronne (Dhouibi, 2000). Les dattes attaquées se rident, se déforment, se déprécient, s'arrêtent dans leur développement, se dessèchent sans atteindre leur complète maturité, leur aspect devient défectueux, impropre à la consommation et leur valeur marchande diminue considérablement. Il en résulte, par conséquent, des dégâts très importants qui se traduisent par une baisse considérable des rendements (Munier, 1973).

2.7. Les moyens de lutte

Pour lutter efficacement contre *Parlatoriablanchardi*, on peut utiliser séparément et conjointement diverses méthodes de lutte, physique, chimique et biologique (Idder, 2011).

- Lutte culturale et physique

L'ensemble des mesures préventives contre *Parlatoriablanchardi* consiste en un élagage approprié plus on moins total. Autrement dit, une taille sévère, avec rabattement presque complet du feuillage au ras du stipe donne des résultats très satisfaisants (Lepesme, 1947), sans qu'il semble en résulter un retard appréciable dans la végétation des sujets traités (Delassus & Pasquier, 1931). Il faut aussi éviter le transfert du matériel végétal contaminé vers les zones d'extension phoenicicoles. Cette lutte doit son caractère du paramètre physique (température) qui est mis en jeu par le biais du feu utilisé. Cependant, d'une manière curative, on peut recourir au brulage des palmiers tels qu'il est pratiqué depuis des temps très anciens par les arabes ou encore selon les méthodes mises en place par les américains (Lepesme, 1947), où le feu est actuellement utilisé aux U.S.A.

- La lutte chimique

En testant plusieurs produits chimiques sur la cochenille blanche, KEHAT en 1968 montre que la meilleure efficacité des produits testés est celle du Diméthoate d'une part et la présence d'effet secondaire de tous les produits testés sur la *Parlatoriablanchardi* d'autre part. Les pulvérisations d'insecticides peuvent être appliquées sur les jeunes dattiers dont le développement restreint permet une atteinte facile de toute la surface foliaire. Les produits utilisés sont les bouillies sulfocalciques à 7% et également les pulvérisations d'acide sulfurique et de sulfate de fer. Les huiles jaunes et blanches sont également utilisées (Delassus & Pasquier, 1931).

La méthode chimique consiste à appliquer un produit insecticide organophosphoré agissant par contact, le Folimat ou Ommétho ate à 50% par l'intermédiaire d'un pulvérisateur à dos (un seul traitement) où toutes les surfaces et l'ensemble des couronnes son parfaitement imbibées. Ce traitement dure environ 25 minutes par arbre, (Idder, 2011).

- Lutte biologique

La lutte biologique consiste à utiliser des auxiliaires naturels pour éliminer ou du moins réduire le nombre des diaspines. A Ouargla et sur trois biotopes différents ZENKHRI, en 1988 signale parmi les prédateurs locaux, une Coccinellidae *Pharoxymnus semiglobosus* qui détient le taux de prédation le plus important et c'est le seul qui répond aux conditions d'élevage. Après sa propagation et son acclimatation dans les différentes palmeraies mauritaniennes, *Chilocorusbipustulatus* L., (var. *iraniensis*) a pu réduire le niveau d'infestation de *Parlatoriablanchardi*, de la note 1 - 2 à 0,5 pour 90 % des palmiers (Iperti, 1970; Munier, 1973).

2.8. Les auxiliaires de *Parlatoriablanchardi*Targ.

Il existe deux prédateurs limitant considérablement le développement de la cochenille blanche, il s'agit de Coccinellidae *Pharoscymnus ancharago* Faim., et Nitudilidae *Cybocephalus seminulum* Baudi., Ces deux espèces ont été trouvées dans la région d'Ouargla. D'autres Coccinellidae soit *Chilocorus bipustulatus* L., elle a été signalée par Tourneur et Lecoustre (1975) en Mauritanie. Idder (1992) a inventorié quatre principales espèces d'auxiliaires au niveau de la région d'Ouargla. Il s'agit de *Chrysopavulgaris, Cybocephalus seminulum, Pharoscymnus semiglobosus* et *Aphytismytilaspidis.*

3. CONCLUSION

Dans la région saharienne Saoura, le palmier dattier domine très nettement les autres espèces végétales. La présence et la dominance de cette plante sont conditionnées par la température avec un optimum de 30 C° et par la pluviométrie allant jusqu'à 100 mm d'eau par an. La régression progressive du palmier résulte de plusieurs facteurs tels que les maladies et les invertébres. Il convient de situer avec précision l'impact des insectes phytophages pouvant entraver la croissance du palmier. Pour cela une étude a porté sur les insectes liés au palmier. Nous avons dénombré plus de 163 espèces en opérant dans les dix palmeraies de la Saoura.

Les actions déprédatrice animale et anthropique sur l'écosystème oasien ont perturbé le fonctionnement, la composition ainsi que la rupture des maillions de la chaine trophique. Ce déséquilibre a conduit à la disparition, l'émergence et aussi l'émigration des espèces d'insectes.

De par leurs objectifs et mode d'action, tout insecticide utilisé dans le milieu naturel a un impact écologique, plus ou moins important selon son efficacité et sa toxicité plus ou moins ciblée. La multiplicité des activités humaines impose des contraintes, parfois irréversibles, aux milieux naturels.

REFERENCES

- Tourneur J., LECOUSTRE D. 1975. Cycle de développement et tables de vie de *Parlatoriablanchardi*Targ. (Homoptera-Diaspididae) et de son prédateur exotique en
- Zenkhri S. 1988. Tentative d'une lutte biologique par l'utilisation de *Pharoscymnus semiglobosus* Kaesh (Coleoptera, Cochenillage) contre *Parlatoriablanchardi*Targ., (Homoptera, Diaspididae). Dans la région d'Ouargla. Mémoire Ing. Inst. Techniqued'agriculture saharienne. Ouargla, 68 p.
- Balachowsky A.S. 1951. Sur deux Diaspidinae (Hom. Coccoidae) nouveaux de Moyenne Guinée (A.O.F.) Contribution a l'étude des Coccoidea de la France d'outre-mer, 5e note. *Bull. Soc. ent. Fr.* (57), pp: 98-101.
- Balachowsky A.S. 1953- Les cochenilles de France d'Europe, du nord de l'Afrique et du bassin méditerranéen. Ed. Herman & Cie. Paris coll. Act. Sci. Ind. T. V, 392 p.
- Balachowsky A.S., Kaussari M. 1956. Contribution à l'étude de la faune primitive des arbres fruitiers dans le leur biotope ancestral. Sur un Coccoidea – Diaspidini nouveau nuisible à l'Abricotier cultive en Iran. *Bull. Lab. Ent. agr. Portici* (14) pp: 298 305.
- Balachowsky A.S., 1932. Étude biologique des coccidés du bassin occidental de la Méditerranée. In: Encyclopédie Entomologique, XVP. Lechevalier& Fils, Paris, 214p.
- Balachowsky A.S., Mesnil L., 1935. Les insectes nuisibles aux plantes cultivées. Ed. Busson. Paris, T. I, 627 p.
- Bouguedoura N. 1991. Connaissance de la morphogenèse du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) Etude in situ et in vitro du développement morphogénétique des appareils végétatif et reproducteur. Thèse doctorat d'Université USTHB. Alger, 261p.
- Bounaga N. 1985. Contribution à *l'étude FusariumOxysporum* F. spalbedinis (Killian et Maire) Gordon agent de la fusariose du palmier dattier. Thèse doctorat d'état. USTHB, Alger, 20-25.
- Broyden B.L. 1941. Eradication of the *Parlatoriablanchardi* date scale in United States US Dep. Agric. Misc. Pubh. pp 61-433.

- DELASSUS M., PASQUIER., 1931- Les ennemis du dattier et de la datte. Rapport Bn° 13. Biskra, pp : 1-15.
- Dhouibi 2000. Lutte intégrée pour la protection du palmier dattier en Tunisie. Centre de publication universitaire. 140 p.
- Djerbi M. 1991. Biotechnologie du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.):Voies de propagation des clones résistants au bayoud et de haute qualité dattière, Zaragoza (ESP) : CIHEAM-IAMZ, 1991. - n. 14, pp : 31-38.
- Idder M.A. 1992. Aperçu bioécologique sur *Parlatoriablanchardi*Targ. (Homoptera, Diaspididae) en palmeraies de Ouargla et utilisation de son ennemi *Pharoscymnus semiglobosus* Karsh. (Coleoptera, Coccinellidae) dans le cadre d'un essai de lutte biologique. Thèse de Magister en Sciences Agronomiques, INA, El-Harrach, Alger, 102 p.
- Idder M.A. 2011. Lutte biologique en palmiers à Ouargla: cas de la cochenille blanche *Parlatoriablanchardi*, de la pyrale des dattes *Ectomyelois ceratoniae* et du boufaroua *Oligonychus afrasiaticus*. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques, INA, El-Harrach, Alger, pp: 45-60.
- IPerti G., 1970. Les moyens de lutter contre la cochenille blanche du palmier dattier : *Parlatoriablanchardi*Targ. Rev. El-Awamia. N° 35, pp: 105 – 118.
- Laudeho Y., Benassy C. 1969. Contribution à l'étude de l'écologie de *Parlatoria blanchardi* Targ. en Adrar mauritanien. Fruits, 22 (5), pp :273-287.
- Lepesme P. 1947. Les insectes du palmier dattier édit. Ed. PAUL LECHEVALIER, Paris. 903 P.
- Madkouri M. 2000. Travaux préliminaire en vue d'une lutte biologique contre *Parlatoria blanchardi* (Hom., Diaspididae) au Maroc. CIHEAM - Options Mediterraneennes, (26), 82-85.
- Madkouri M. 1975. Travaux préliminaires en vue d'une lutte biologique contre *Parlatoriablanchardi*au Maroc. Options méditerranéennes, (26), pp: 82-85.
- Munier P. 1973. Le palmier dattier. G.P. Maisonneuve et Larose. Paris, 209 pp.
- Smirnoff W.A. 1954. Aperçu sur le développement de quelques cochenilles parasites des agrumes au Maroc. Ed. Service Défense des végétaux, Rabat, 29 p.
- Smirnoff W.A. 1957. La cochenille du palmier dattier (*Parlatoriablanchardi*Targ.) en Afrique du Nord. Comportement, importance économique, prédateurs et lutte biologique. Entomophaga, (2), pp: 1-98
- Tourneur J., HUGUES R . 1975. Évolution des infestations de *P. blanchardi*Targ au cours de l'année dans l'Adrar Mauritanien. Fruits, 681-685.

Etat de conscience sur le phénomène de désertification des populations de la région de Boussaâda (Wilaya de M'Sila), Algérie.

Tir Chafia[1], Tantone khadidja, Madani Djamila[1], Cherief Abd Elkader[1], Benniou Ramdhan[1], Hiouani Fatima[2].
[1]Département des Sciences agronomiques de l'Université de M'Sila, Algérie.
[2]Université Mohamed Kheider, Biskra, Algérie.
Email: tirtir2009@yahoo.fr

RESUME
La désertification est un problème mondial qui touche 40% de la planète et au moins deux millions de personnes. Ce phénomène est le résultat de combinaison des facteurs directs et indirects; certains liés au climat et d'autres liés aux activités anthropiques. En Algérie, ce phénomène touche l'écosystème steppique (dont la région d'étude fait partie) caractérisé par une longue période de sécheresse avec une dégradation de la végétation.
Cette étude a été réalisée dans le but de la connaissance du degré de conscience de la population de la région de Boussaâda sur ce grave phénomène ainsi que sur leurs connaissances des moyens de lutte. Il s'agit d'une série d'enquêtes portées sur 151 sujets au niveau des sites de Maader, Maiter, El Hamel et Oultem par un échantillonnage aléatoire. Les résultats ont montré que les populations interrogées ont participé positivement aux enquêtes due à l'importance du phénomène et le phénomène de désertification est vaincu dans l'âme et l'esprit des populations vivant à proximité des sites relativement sensible à la désertification.
Mots clés: Algérie, Boussaâda, désertification, population.

SAMMARY
Desertification is a global problem affecting 40% of the planet and at least two million people. This phenomenon is the result of a combination of direct and indirect factors.
In Algeria, this phenomenon affects the steppe ecosystem characterized by a long period of drought with a degradation of vegetation. This study was conducted with the aim of knowing the awareness of the population of the region of Boussaâda on this serious phenomenon as well as their knowledge of the means of struggle. This is a series of surveys carried out on 151 subjects at the sites of Maader, Maiter, El Hamel and Oultem by random sampling. The results showed that the surveyed populations participated positively in our surveys because of the importance of the phenomenon and the phenomenon of desertification is conquered in the soul and spirit of people living near the sites relatively sensitive to desertification.
Key words: Algeria, Boussaâda, desertification, population.

1. Introduction

Presque la moitié de la superficie de la terre est confrontée au problème de la désertification ce qui influe négativement sur la vie et au développement de plus de deux milliards de personnes (CNULCD, 1994). Ce phénomène résulte de certains facteurs que parmi les quelle on cite la sécheresse, le déboisement, le surpâturage, les incendies (FAO, 1992; Nedjraoui et Bedrani, 2008). Elle se manifeste par l'extension des paysages désertiques et un ensemble d'actions qui se traduisent par une réduction plus ou moins irréversible du couvert végétal. C'est l'un des aspects du déséquilibre de l'écosystème steppique en diminuant le potentiel biologique ou en le détruisant.
L'Afrique est le continent le plus atteint par la désertification, elle contient 73% des terres arides agricoles et la disparition de son couvert forestier (par exemple) est au rythme de 3,7 à 5 millions d'hectares par an (CITET, 2003; CCD, 1992; PNUE, 1991).

L'exploitation de la carte de sensibilité à la désertification de la steppe algérienne établie par la Direction Générale des Forêts en 1997, montre que 15% de la superficie est très sensible à la désertification, 25% est sensible; soit un total de 40% de terres dans lesquelles ce processus est assez avancé et souvent irréversible (Benguerai, 2011).
La région de Boussaâda fait partie de la zone steppique de l'Algérie, soufrant de ce grave problème ce qui nous amène à poser quelques questions sur la désertification et l'état de conscience des populations et d'essayer de les trouver des repenses à travers ce présent travail basé sur une série d'enquêtes et de questionnaires portées sur 151 sujets au niveau des sites de Maader, Maiter, El Hamel et Oultem par un échantillonnage aléatoire.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Choix de la zone enquêtée

Le choix des régions enquêtées est justifi2 par la situation géographique de cette région, son étage bioclimatique aride à hiver doux qui favorise l'accentuation de ce problème, la dégradation des terres de cette zone, l'érosion éolienne et hydrique, l'ensablement remarqué pendant pas mal de jours de l'année et l'existence des moyens de lutte contre ce phénomène dans notre zone d'étude.

2.2. Léthodologie

Plus de 50 questions ont été organisées dans une enquête dont les principaux éléments traités sont :
L'identification du phénomène de désertification dans la zone prospectée.
L'identification des effets négatifs de la désertification sur la productivité des terres.
Les effets de ce phénomène sur la population
L'état de conscience de la population vis avis du problème.
Les solutions techniques pour la lutte contre la désertification telles que la fixation mécanique et les principales espèces utilisées dans la fixation biologique.
L'étude est effectuée dans quatre sites appartenant à la zone de Bousaada (Maader, Maiter, El Hamel et Oultem). Nous avons désigné le nombre des enquêtés, puis collecter les informations tout en suivant les questionnaires, et certaines questions qui s'avèrent inexploitables ont été éliminées. Enfin, les données collectées ont été soumises à une analyse statistique.

3- Résultats

La région de Boussaâda, partie intégrante de la steppe algérienne est touchée par la désertification. Les enquêtes préliminaires conduites sur 151 sujets ont été menées auprès d'un échantillonnage aléatoire composé d'individus de sexe, d'âges et de niveaux d'instructions différentes. Les réponses aux questionnaires ont été traité par des analyses statistiques basées sur des tests de comparaison des différentes variables. Los résultats ont fait également l'objet d'une analyse multi variée appliquée aux différents paramètres étudiés à l'aide du logiciel statistique XL STAT 2014.
Les résultats ont indiqué que les populations ont participé positivement à nos enquêtes; 151 questionnaires réalisés comme suit: 31,78% au niveau de Maiter, 35,76% au Maader, 17,88 % à Oultem et 14,56% à El Hamel, dont 60,92% des hommes et 39,07% des femmes.
En ce qui concerne l'âge, la répartition était comme suit 65 jeunes (de 18 à 29ans) qui représente 43% du total des individus interrogés, 44 adultes (de 29 à 50ans) qui représente 29% du nombre totale, et 42 vieux plus que 50 ans (28% du total).
Pour le niveau de structuration des populations interrogées, 18,5% sont analphabétiques (hommes et femmes), 8% niveau primaire, 10% niveau moyen, 16% niveau secondaires et 47% universitaires.
Pour la connaissance des populations interrogées du phénomène de désertification, on a remarqué un état de connaissance de l'ordre de 100% pour les trois catégories d'âge (jeunes, adulte et vieux), ce qui prouve que la situation vis à vis du problème est alarmante.
La majorité des individus enquêtés connaissent le phénomène de désertification, et que l'apparition des signes ou indication observable de sa présence est relativement lent. L'indice de son reconnaissance le plus marqué est celui de l'apparition des couches de sable à la surface des sols,

puis la réduction du couvert végétal mais la majorité d'entre eux n'ont pas reconnue ou cité l'appauvrissement du sol.

En ce qui concerne la perception de la désertification chez les populations enquêtées, 45% des jeunes, 52% des adultes et 48% des vieux jugent que l'apparition claire des effets de désertification se manifeste après 20 ans. Alors que, 20% des jeunes, 23% des adultes et 26% des vieux considèrent que l'apparition à partir de 15 ans. Tandis que, 20% des jeunes, 11% des adultes et 14% des vieux signalent que l'apparition à partir de 10 ans. 9% des jeunes, 9%des adultes et 7% des vieux avouent que son apparition claire après plus que 20 ans. Seulement 6% des jeunes, 4% des adultes et 5% des vieux ne voient pas que la désertification peut se manifester avant 5 ans.

D'après les populations interrogées toujours, l'impact du phénomène de désertification contient trois types d'effets sur ces mêmes populations; premièrement la baisse du revenu agricole comme conséquence du diminution des rendements agricole ainsi que la dégradation des terres, la dégradation des conditions de vie par une mauvaise adaptation de la population touchée par ce phénomène et l'influence de cette dernière sur la santé et finalement par l'exode rural.

L'exode rural et le taux des individus orientés vers la ville selon l'avis des enquêtés sont causés par l'aggravement du phénomène de désertification car les individus ou les habitants locales qui vivent dans ces régions possèdent des terres qui sont à la base de leur activité et voir même de leur vies. La majorité des individus interrogés signalent que la désertification crée des conflits de mise en valeur et que l'exploitation de nouveaux espaces agricoles se fait dans des conditions difficile voir même très difficile dans certains cas.

Dans les 4 sites étudiés (Maader, Maitar, El Hamel et Oultem), les moyens de lutte biologiques sont plus utilisés que ceux mécaniques. La remarque la plus frappante dans les récences des populations interrogées c'est que celles dernières ne participe pas et n'interviennent pas dans la lutte contre la désertification .

L'analyse statistiques des résultats des réponses aux questions montre qu'il n y a pas de variation sur les réponses des populations échantillonnées vis-à-vis de leur connaissance de la désertification. D'après l'analyse en composantes principales (ACP), appliquée aux variables qui sont les régions et les observations, on a remarqué que 3 groupes se sont formés; il s'agit du premier groupe constitué par les variables Maader et Maiter qui s'est corrélées avec la classe C1, le deuxième groupe formé par la variable Oultem corrélée avec la classe C2 et le troisième groupe qui rapproche la variable El Hamel à la classe C3.

Les résultats du témoignage collectif des populations fait apparaitre des causes et des effets du phénomène de désertification comparables aux résultats expérimentaux signalés par Cornet (2000) et Nadjraoui et Bedrani (2008).

4. Conclusion

La dégradation des terres est un phénomène qui se produit à travers le monde entier mais particulièrement dans les zones arides et semi-arides. La désertification est l'un des aspects de cette dégradation qui réduit et même détruit le potentiel biologique. A travers cette étude et à l'aide d'un questionnaire, on a essayé de déterminer l'état de conscience des populations de 4 sites de la région de Boussaâda (Maader, Maiter, El Hamel et Oultem). Au terme de ce travail et à la lumière des résultats obtenus, on a constaté que les populations interrogées ont participé positivement aux enquêtes vue l'importance de la problématique évoquée dans los questionnaires.

A travers ces questionnaires, on a pu conclure que le problème de désertification est vécue dans l'âme et l'esprit des populations vivant à proximité des sites relativement sensibles à la désertification par les facteurs conjugués de ce phénomène à savoir, dégradation du couvert végétal, situation par rapport au cordon dunaire, appauvrissement des sols, baisse des rendement agricoles et déboisement des espaces agricoles.

REMERCIEMENTS

Nous exprimons nos vifs remerciements à tous ceux qui ont participé de prés ou de loin à la réalisation du présent travail.

REFERENCES

Benguerai A., 2011. Evolution du phénomène de désertification dans le Sud Oranais (Algérie). Thèse de doctorat en Science. Université Abou Bekr Belkaid Telemcen. 125p.

CCD, 1992. Qu'est ce que la convention des Nations Unies sur la lutte contre la désertification. Conférence des Nations Unies sur l'environnement et le développement. ONU, 5p.

CITET, 2003. La lutte contre la désertification. Ministère de l'environnement et du développement durable, Tunis. Tunisie.

CNULCD, 1994. Convention des nations unies sur la lutte contre la désertification, dans les pays gravement touchés par la sécheresse et/ou la désertification en particulier l'Afrique, texte avec annexes publier par le secrétariat de la convention, Bonn (Alemagne).

Cornet A., 2000. La désertification, un problème d'environnement, un problème de développement. Lalonde Les Maures, conférence.

FAO, 1992. Foresterie en zone aride. Guide à l'intention des techniciens. Rome, Italie.

Nadjraoui D., Bedrani S., 2008. La désertification dans les steppes Algériennes: causes impacts et actions de lutte. Vertigo- La revue électronique en sciences de l'environnement, vol 8, n°1 mise en ligne.

PNUD, 1991. Status of desertification and implementation of the United Nation plane of action to combate derertification. Nairobi report of the executive director.

Efficacité de quelques plantes sous-jacentes en palmeraie dans la lutte contre la cochenille blanche *Parlatoria blanchardi* dans la région d'Ouargla (Sud-est Algérien)

Saggou Hayet, Idder Mohamed Azzeddine, Gassou Insar
Laboratoire de recherche sur la phoeniciculture "Phoenix", Faculté des Sciences de la Nature et la Vie, Université de Ouargla, Algérie
Email: dhiaoumeima_gg@hotmail.fr

RESUME
Dans le cadre de la lutte biologique par l'utilisation des biopesticides en palmeraie, notre essai s'est basé sur des traitements par des extraits aqueux de quelques plantes cultivées comme cultures sous-jacentes au niveau de la palmeraie à savoir Poivre noir *Piper nigrum*, Argel *Solenostemma argel*, Ail *Allium sativum*, Menthe *Mentha viridis*, Romarin *Rosmarinus officnalis* et Basilic *Ocimum basilicum* contre un ravageur très redoutable; la cochenille blanche *Parlatoria blanchardi* . Cette tentative de lutte à donnée des résultats très satisfaisants. Les extraits du poivre noir et d'argel avec les doses 10% (solution mère) et 7.5% ont donné des taux de mortalité de cochenille blanche au laboratoire arrivant respectivement jusqu'à 91.35% et 85,46 % avec le poivre noir et de 85,46% et 71,99% avec l'Argel. Le basilic est le moins efficace avec un taux de mortalité de 37,69%.
Les traitements effectués au terrain sur le cultivar Deglet-Nour (dose 7,5%) montrent une diminution très importante des d'infestations. Elle a passé de 43,04 à 9,33% par l'utilisation d'argel. L'efficacité des traitements été très apparente sur la couronne externe dont le taux d'infestation à diminué jusqu'à 4,27%.
Mots-clés: Cochenille blanche, Extraits aqueux, Palmeraie, cultures sous-jacentes, Ouargla

SAMMARY
In the context of biological control through the use of biopesticides in palm groves, our test was based on treatments with aqueous extracts of some plants cultivated as underlying crops at the palm grove namely Black pepper *Piper nigrum*, Argel *Solenostemma argel*, Garlic *Allium sativum*, Mint *Mentha viridis*, Rosemary *Rosmarinus officnalis* and Basil *Ocimum basilicum* against a very formidable pest; the white scale *Parlatoria blanchardi*. This attempt to fight gave very satisfactory results. Extracts of black pepper and argel with doses of 10% (mother solution) and 7,5% gave mortality rates of white cochineal to the laboratory reaching respectively 91,35% and 85,46% with black pepper and 85,46% and 71,99% with Argel. Basil is the least effective with a mortality rate of 37,69%.
Field treatments on the Deglet-Nour cultivar (7.5% dose) show a very significant decrease in infestations. It went from 43.04 to 9.33% by the use of argel. The effectiveness of the treatments was very apparent on the outer crown whose infestation rate decreased to 4,27%.
Key words: White scale, Aqueous extracts, Palm grove, Underlying crops, Ouargla

1. INTRODUCTION

Les palmeraies algériennes et surtout celles de Sud –est présentent une diversité variétale assez importante. Elle compte entre 50 à 80 cultivars de palmier dattier (Idder-Ighili, 2015). De même, elles sont caractérisées par la présence d'une strate herbacée constituée de cultures sous-jacentes diversifiées présentant un potentiel de lutte biologique contre les ravageurs du palmier dattier.

Parmi les ravageurs les plus redoutables, la cochenille blanche *Parlatoria blanchardi* qui ne cesse à provoqué des dommages importants à notre production de dattes. Elle est la plus redoutée après le Bayoud, et est devenue un sérieux handicap, surtout pour les nouvelles zones de mise en valeur (Saharaoui et *al.*, 2010). Le peuplement intense de *Parlatoria blanchardi* déséquilibre la photosynthèse et perturbe la respiration ainsi que la transpiration normale. Il cause le dessèchement

prématuré des djerids et peut conduire à la perte totale d'un végétal aussi robuste et résistant que le palmier dattier (Smirnoff, 1954).
Plusieurs méthodes de lutte ont été utilisées contre ce ravageur, à savoir la lutte culturale, lutte physique, lutte chimique et lutte biologique. Cette dernière reste une alternative plus appropriée face aux insecticides qui provoque des dégâts irréversibles sur l'écosystème palmeraie aussi fragile et complexe. L'utilisation des biopesticides tels que les extraits végétaux contre les ravageurs du palmier dattier et la datte est une démarche qui ne cesse à s'améliorer dans nos palmeraies algériennes. C'est dans ce cadre que s'inscrit notre étude par l'utilisation des extraits aqueux de quelques plantes cultivées en palmeraies comme culture sous-jacentes et cela dans le but de leur valorisation dans le cadre de la lutte biologique.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel utilisé sur terrain

2.1.1. Présentation du site d'étude

L'exploitation de l'Université Kasdi-Merbah Ouargla est localisée au Sud - Ouest de la ville d'Ouargla (31°N et 5°E). Elle s'étend sur une superficie de 32 ha, dont 14,4 ha aménagés répartis en quatre secteurs A, B, C, et D occupant chacun une superficie de 3,6 ha. La phœniciculture représente la principale vocation de l'exploitation avec 1238 palmiers dattiers dont le cultivar dominant est Deglet-Nour. Ils sont plantés d'une manière régulière avec un écartement moyen de 9 m sur 9 m, soit 110 palmiers à l'hectare. L'irrigation à l'exploitation est faite par submersion. Notre essai s'est déroulé dans le secteur A dont aucun traitement phytosanitaire chimique est effectué.

2.1.2. Matériel biologique

2.1.2.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué d'un cultivar de palmier dattier ; Deglet-Nour; et 06 plantes cultivées en palmeraie à savoir Poivre noir *Piper nigrum*, Argel *Solenostemma argel*, Ail *Allium sativum*, Menthe *Mentha viridis*, Romarin *Rosmarinus officnalis* et Basilic *Ocimum basilicum* (*cf.* Photos 1, 2, 3, 4, 5 et 6).



Photo 1. Ail *Allium sativum*



Photo 2. Romarin *Rosmarinus officnalis*



Photo 3. Menthe *Mentha viridis*



Photo 4. Arghel *Solenostemma arghel*



Photo 5. Poivre noir *Piper nigrum*



Photo 6. Basilic *Ocimum basilicum*

2.1.2.2. Matériel animal

Le matériel animal utilisé est la cochenille blanche *Parlatoria blanchardi* infestant les folioles du cultivar Deglet-Nour.

2.2. Matériel utilisé au laboratoire

Pour le comptage des cochenilles blanches et les tests d'efficacité des extraits aqueux au niveau du laboratoire, nous avons utilisés le matériel suivant:

- Une loupe binoculaire
- Des épingles entomologiques
- Des boites de Pétrie
- Des fiches de comptages

Pour la préparation des extraits aqueux végétaux, nous avons utilisés le matériel suivant:

- Des flacons et des fioles
- Entonnoirs
- Balance électrique
- Papiers filtre Whatman.

2.3. Méthodologie de travail

2.3.1. Préparation des extraits aqueux

Les plantes ont été récoltées à partir des palmeraies de la région d'Ouargla. Le macéras de chaque plante a été préparé à partir de 1 Kg de plantes fraîches (feuilles, rameaux et gousses) macérer dans 10 litres d'eau froide pendant une semaine à une température supérieure ou égale 12 °C (ATTIA et *al.*, 2010). Après la macération, les solutions ont été filtrées. La solution mère à une dose de 10% alors que les dilutions utilisées sont de 7,5 %, 5% et 2,5%.

2.3.2. Comptage des cochenilles blanches

Le comptage et l'estimation du taux d'infestation de chaque foliole prélevée est établie par la méthode d'EUVERTE (1962). Les folioles sont ramenées au laboratoire pour effectuer les comptages des cochenilles blanches mortes et vivantes. Sur ces folioles, nous délimiterons trois carrés d'une surface de 1 cm^2 pour chacun. Leurs position au niveau de la foliole est en fonction de la densité de la cochenille blanche (faible, moyenne et forte densité).

A l'aide d'une loupe binoculaire, un comptage total de la population a été effectué à savoir les larves mobiles, les larves fixes (stade 1 et 2) et les adultes mâles et femelles. On obtient alors les valeurs des trois cm^2 sélectionnés, à savoir A1, A2 et A3 pour chaque face de la foliole (supérieure et inférieure) dont la moyenne des moyennes établit la densité de la population de la foliole. Des moyennes de densités ont été ensuite effectuées pour chaque mois d'étude sur l'ensemble de la parcelle.

2.3.3. Traitements au laboratoire

Dans une boite de Pétrie, 03 morceaux de folioles de cultivar Deglet-Nour de 3 cm^2 ont été mis sur un coton imbibé d'eau et cela après le comptage des cochenilles. Une pulvérisation de 5 ml d'extrait végétal a été effectuée sur les morceaux. Les boites sont mises dans un incubateur à une température de 30 °C et humidité de 46 %. 03 répétions sont utilisés pour chaque traitement avec un témoin.

Après 24 heures, un deuxième comptage est effectué pour calculer le taux de mortalité. Ce taux est calculé à partir de la formule suivante:

$$Taux\ de\ mortalité\ (\%) = \frac{Nombre\ \ de\ cochenille\ \ mortes}{Nombre\ \ de\ cochenilles\ \ total} x100$$

L'efficacité du traitement est calculée par la formule suivante:

$$Efficacité\ = \frac{Nombre\ d'ind.\ avant\ trait. - Nombre\ d'ind.\ aprés\ trait.}{Nombre\ d'individus\ avant\ traitement}$$

2.3.4. Traitements sur terrain

Les deux extraits végétaux qui ont donné des bons résultats au laboratoire sont appliqués sur terrain. Il s'agit du Poivre noir *Piper nigrum* et l'Argel *Solenostemma argel* avec une dose de 7,5%. Les traitements ont été effectués sur des pieds de Deglet-Nour dont l'estimation de leurs taux d'infestation par la cochenille blanche est effectuée avant les traitements. 03 pieds ont été retenus pour chaque traitement avec un témoin (sans traitement) présentant la même note d'infestation (note 3: 190 cochenilles/m^2). Les traitements ont été effectués le 26-04-2015 avec une quantité de 15L de produit par pieds.

Après 48 heures une autre estimation du taux d'infestation par la cochenille blanche des pieds traitées et du témoin a été effectuée

2.4. Traitement statistique

Les résultats obtenus ont été comparés et traités avec des ANOVA à deux facteurs (dose et extrait) à partir du logiciel XLSTAT 2009.1.02.

3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1. Efficacité des extraits végétaux aqueux au laboratoire

Les traitements réalisés sur les folioles infestées par la cochenille blanche avec l'utilisation des 6 extraits aqueux des plantes utilisées ont donnés les résultats suivants (Tableau 1).

Tableau 1. Effet des 4 doses des 6 extraits végétaux sur la mortalité de la cochenille blanche

	Taux de mortalité des cochenilles blanches (%)			
	Dose 1 (10%)	Dose 2 (7,5%)	Dose 3 (5%)	Dose 4 (2,5%)
Poivre noir	91,35±1,01	81,21±0,85	47,50±0,87	27,02±0,58
Ail	82,64±0,95	62,10±0,92	57,8±0,97	22,76±0,95
Basilic	66,14±0,63	37,70±1,25	21,18±0,68	4,36±1,01
Menthe	56,27±0,75	54,80±0,98	31,84±0,73	12,12±0,89
Romarin	61,15±1,50	57,90±1,18	34,71±1,02	14,31±0,73
Arghel	85,46±0,98	71,99±0,99	39,30±1,1	28,06±1,05

L'impact des extraits aqueux sur la cochenille blanche est évalué à partir du calcul de taux de mortalité de ce ravageur après 24 heures de l'application des traitements au laboratoire. Les résultats obtenus montrent que les taux de mortalité les plus élevés sont enregistrés avec la solution mère (10%) et cela pour tous les extrais utilisés. Cette mortalité diminue avec la diminution de la dose (dilution) malgré que la dose 7,5% donne toujours des bons pourcentages de mortalité de *Parlatoria blanchardi*. La différence entre le taux de mortalité en fonction des doses et des extraits est très hautement significative.

Le taux de mortalité le plus élevé est enregistré par l'utilisation de poivre noir et argel et cela avec les doses 10% et 7,5%. Ils ont donnés des taux de mortalité respectivement 91,35% et 81,21% pour le premier extrait et 85,46% et 71,99% pour le deuxième extrait. Plusieurs auteurs ont mentionnés l'effet antibactérien et insecticide de ces deux plantes contre d'autres ravageurs (Soulier, 1891; Kehail et *al*., 2004; Satti et *al*., 2004; Al-Doghairi et *al*., 2004 et Gheriani, 2013). Le taux de mortalité le plus faible est enregistré par le Basilic avec 4,36% à une dose de 2,5%.

3.2. Efficacité des deux extraits aqueux de poivre noir et d'argel sur terrain

A partir des résultats obtenus au laboratoire sur les différents taux de mortalité de la cochenille blanche enregistrés par les six extraits aqueux à différentes doses, nous avons constaté que les deux extraits de poivre noir et d'argel à une dose de 7,5% ont donnés des résultats très significatifs. Pour cela, nous les avons retenus pour les traitements sur terrain. Les résultats obtenus sont représentés au niveau du tableau 2 et la figure 1.

Tableau 2. Efficacité des deux extraits aqueux de poivre noir et d'argel sur le cultivar Deglet-Nour au terrain

Extrait végétal	Pieds	Taux d'infestation par la cochenille blanche		Efficacité
		Avant traitement	Après traitement	
Poivre noir	Témoin	44,48±0,70	48±0,5	- 0,073
	Traités	43,04±1,05	9,33±0,65	0,783
Argel	Témoin	45,99±0,85	46,49±1,12	- 0,010
	Traités	58,86±1,73	11,01±0.75	0,812

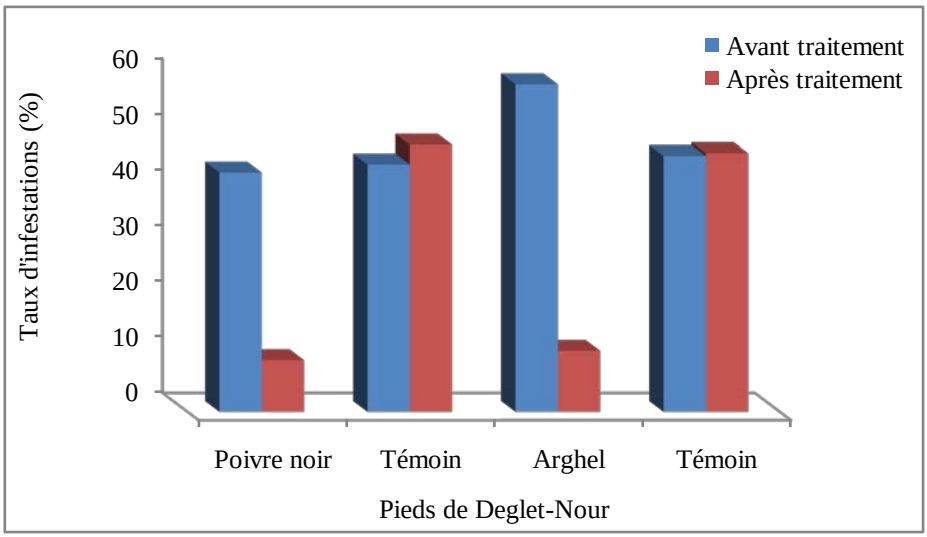


Figure 1. Taux de mortalité de la cochenille blanche après traitement par deux extraits aqueux de poivre noir et d'argel sur terrain

Les traitements effectués sur terrain avec les deux extraits d'Argel et de poivre noir ont donnés des taux de mortalité très importants par rapport au témoin. L'extrait d'argel à fait diminuer le taux d'infestation moyen des pieds de Deglet-Nour de 58,86% à 11,01% avec une efficacité de traitement de 0,812 (taux d'efficience de 82,12%). Alor que pour l'extrait préparé à base de poivre noir, l'efficacité de traitement été de 0, 783 (taux d'efficience de 78,30%). Sur le témoin, les taux d'infestation par la cochenille blanche ont augmentés d'où les valeurs négatives d'efficacité (-0,073 et - 0,010). Ces deux macérats ont prouvé leurs efficacités sur terrain malgré l'effet des facteurs physiques du climat (température, humidité, vents…).

3.3. Efficacité des traitements sur les différentes couronnes du palmier dattier

Les traitements effectués sur les pieds du cultivar Deglet-Nour ont donné des efficacités différentes par rapport aux 03 couronnes du palmier dattier (Figure 2).

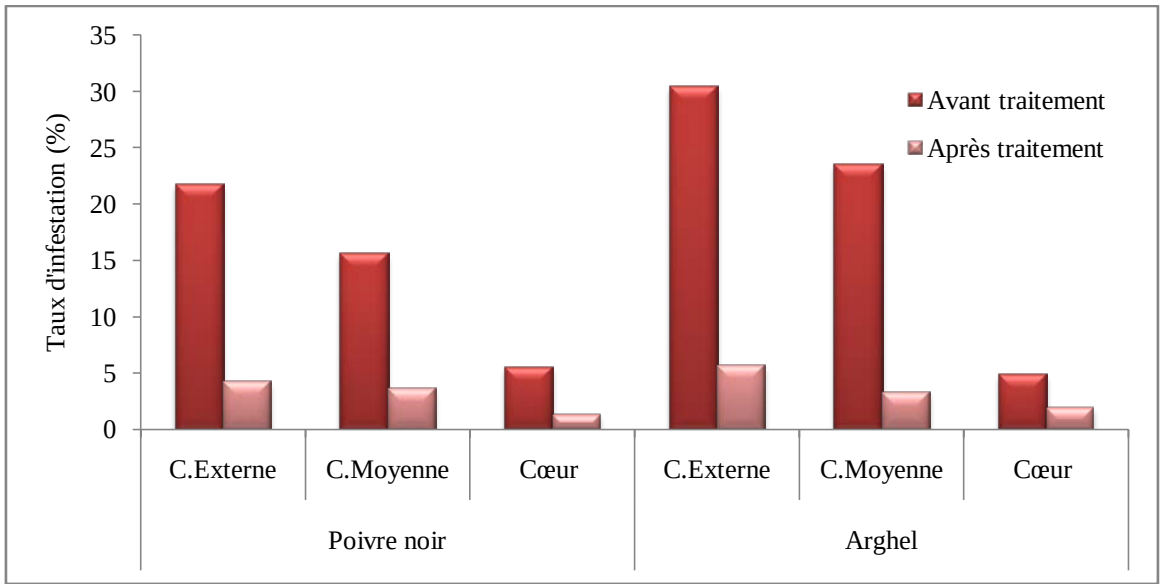


Figure 2. Taux de mortalité de la cochenille blanche infestant les trois couronnes de Deglet-Nour avant et après traitements par les deux extraits aqueux de poivre noir et d'argel

Le taux d'infestation par la cochenille blanche au niveau des 3 couronnes à diminué et cela par l'utilisation des deux extraits aqueux. Le taux de mortalité le plus important est enregistré sur la couronne externe. Il a passé de 21,81% à 4,27% par l'utilisation de l'extrait de poivre noir et de 30,44% à 5,71 avec l'extrait d'argel. Il faut noter que la couronne externe de la plupart des cultivars de palmier dattier présente les taux d'infestations les plus importants par la cochenille blanche (Bousaid et Maache, 2000; Boughezala-Hamad, 2011 et Idder-Ighili et *al*., 2013). Elle est la plus exposée aux traitements pesticides. Le cœur est toujours le moins infesté par la cochenille blanche, pour cela l'efficacité des traitements n'est pas très significative.

4. CONCLUSION

L'utilisation de six extraits aqueux de végétaux contre la cochenille blanche *Parlatoria blanchardi* a donné des résultats très encourageants. En plus de leurs efficacités, ce type de biopesticides préserve toujours l'environnement en général et plus particulièrement les palmeraies contre les effets indésirables irréversibles des insecticides chimiques. Le poivre noir et Argel sont deux plantes qui ont montré la plus grande efficacité au laboratoire et sur terrain. Leurs compositions chimiques semblent présentant plusieurs composés à mécanismes d'action multiples qui reste à déterminer dans des travaux ultérieurs.

REFERENCES

- Al-Doghairi M, EL-Nadi A, Elhag E, Al-Ayedh H., 2004. Effect of *Solenostemma argel* on oviposition, egg hatchability and viability of Culex pipiens L. larvae. *Phytother Res*., **18**, 335-338.
- Attia S., Lebdi Grissa K., Ghrabi-Gammar Z., Mailleux A.C, Lognay G., Le Goff G. et Hance T., 2011. Contrôle de Tetranychus urticae par les extraits de plantes en vergers d'agrumes. *Entomologie faunistique*, **63 (4)**, 229-235
- Boughezala hamad M., 2011. Etude bio-écologique de la cochenille blanche *Parlatoria blanchardi* Targioni-Tozzetti,1892 (Homoptera-Diaspididae) sur quelques variétés de dattes à de Ouargla. *Mémoire d'ing. Eco.Univ*., Ouargla, 92 p.
- Boussaid L.et Maache L., 2001. Données sur la bio-écologie et la dynamique des populations de *Parlatoria blanchardi* Targ. dans la cuvette d'Ouargla. *Mém. Ing. d'Etat Agr., I.A.S.*, Ouargla, 94 p.

- Euverte G., 1962. Programme d'étude de *Parlatoria blanchardi* Targ. et ses prédateurs sur la station de Kankossa. *Rapport I.F.A.C.*, 75 p.
- Gheriani M.A., 2013. Essais de quelques extrais de végétaux dans la lutte contre la pyrale des dattes *Ectomyelois ceratoniae* Zeller dans la région de Ouargla. *Mém. Masret académique*, Université Kasdi Merbah, Ouargla, 47 p.
- Idder-Ighili H., 2015. Interaction entre les cultivars des dattes et la faune associée dans la région de Ouargla (Sud-est algérien). *Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques*, Université de Ouargla, 151 p.
- Idder-Ighili H., Idder M.A., Boughezala Hamad M., Doumandji M., 2013. Relation entre la cochenille blanche *Parlatoria blanchardi*Targiono-Tozzetti (Homoptera-Diaspididae) et quelques variétés de dattes à Ouargla (Sud-Est Algerien). *Revue Bioressources*, 3, (1), 32-40.
- Kehail M.A.A., Bashir N.H.H., 2004. The larvicidal potentialities of powders of some plants and some household materials in controlling *Anopheles arabiensis*. *The Second National Pest Management Conference in the Sudan*, Faculty of Agricultural Sciences, University of Gezira, Sudan, 6-9.
- Saharaoui L., Biche M. et Hemptinne J.L., 2010. Dynamique des communautés des coccinelles et interaction avec leurs proies sur palmier dattier à Biskra. *Bulletin de la société zoologique de France*, 135 (3-4), 265-280
- Satti A.A., Nasr O.E., Bashir N.H.H., 2004. Technology of natural pesticiides: Production and uses in Sudan. The Second National Pest Management Conference in the Sudan, 2004, 6-9. Faculty of Agricultural Sciences, University of Gezira, Sudan, 6-9.
- Smirnoff W.A. 1954. La cochenille parasite du palmier dattier en Afrique du Nord. Ed. Dir. Agr. et des forêts, service de la végétation, 42 p.
- Soulier H., 1981. Traité de thérapeutique et de pharmacologie. Librairie F. Savy, Paris, France, 106 p.

Isolement et sélection de souches antagonistes à partir de différents milieux écologiques (Eau et Sol)

Almi Hiba[1], Balahouane Hadjer[1], Abdelaziz Ouided[2], Oufroukh Amar[3], Dehimat Laid [1]
[1]Laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et application Microbienne, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Universitédes Frères Mentouri Constantine 1 - Algérie.
[2]Laboratoire de Biochimie Appliqué, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri Constantine 1 - Algérie.
[3]Institut National de Recherche Agronomie INRA, Constantine - Algérie.
*Correspondance : email : hibabio27@gmail.com

RESUME
La recherche de nouvelles stratégies de lutte surtout biologiques, contre les champignons phytopathogènes est devenue un chalenge principal d'un grand nombre de laboratoires dans le monde entier. L'objectif de ce chalenge est de mettre en marché des produits biologiques efficaces en agriculture. Dans l'objectif de rechercher des souches antagonistes (Mycètes et bactéries), 49 isolats entre moisissures, levure et bactéries ont été obtenus d'échantillons d'eau et 46 isolats d'échantillons du sol. Les résultats de la mise en contact des différents isolats effectués par méthode de confrontation directe, ont permis d'obtenir des pourcentages d'inhibition supérieurs à 75% avec l'un des pathogènes suivant : *Aspergillus, Alternaria, Fusarium* ou *Penicillium*. Les quatre souches tenues pour leurs effets antagonistes ont été classées en deux genres fongiques : *Aspergillus* et *Mucor*. Par ailleurs, neuf isolats bactériens ont prouvés leurs efficacités dans l'inhibition de la croissance des agents pathogènes du blé avec des diamètres de lyse atteignant les 51 mm. Ces isolats semblent appartenir après identification aux cinq genres suivant : *Bacillus, Brucella, Citrobacter, Neisseri, Pseudomonas* et *Streptococcus.*
Mots-clés : antagonisme, bactéries, eau, mycètes, sol.

SAMMARY
The search for new, especially biological, control strategies against phytopathogenic fungi has become a major challenge in many laboratories around the world. The objective of this challenge is to market effective organic products in agriculture. In the objective of researching antagonistic strains (Mycetes and bacteria), 49 isolates between molds, yeast and bacteria were obtained from water samples and 46 isolates from soil samples. The results of the contacting of the different isolates obtained by direct confrontation method, made it possible to obtain inhibition percentages greater than 75% with one of the following pathogens: *Aspergillus, Alternaria, Fusarium or Penicillium*. The four strains considered for their antagonistic effects have been classified into two fungal genera: Aspergillus and Mucor.
In addition, nine bacterial isolates have proven their effectiveness in inhibiting the growth of wheat pathogens with lysis diameters of up to 51 mm. These isolates seem to belong after identification to the following five genera: *Bacillus, Brucella, Citrobacter, Neisseri, Pseudomonas and Streptococcus.*

1. INTRODUCTION

La lutte biologique se considère comme une alternative très prometteuse, à cause de l'ubiquité naturelle des agents microbiologiques dans les écosystèmes. Ces dernières se caractérisent par leur grande variété, leur dissémination facile, leur spécificité d'action ainsi leur persistance dans l'environnement **(**De Kouassi, 2001**).** Les micro-organismes utilisés en lutte microbiologique appartiennent à plusieurs taxons à savoir les virus, les bactéries, les microchampignons, les nématodes et les protozoaires. Les champignons et les bactéries sont les microorganismes les plus utilisés en lutte biologique. Ils ont un intérêt agronomique considérable dans la lutte biologique contre les ravageurs de cultures et sont donc l'objet d'études de plus en plus poussées.

La protection conférée par un microorganisme de lutte biologique s'appuie sur un ou plusieurs mécanismes d'action tels que la compétition (pour éléments nutritifs, oxygène, espace), l'antibiose, le parasitisme, la diminution de l'agressivité du pathogène et l'induction de la résistance chez la plante. L'étude de ces mécanismes d'action est une étape importante dans le développement de la lutte biologique (Jijkli, 2003). Ainsi, la contribution de ce travail est orientée vers l'isolement, l'identification de quelques souches antagonistes à partir de plusieurs écosystèmes naturels (Eau et Sol).

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Isolement des microorganismes

L'isolement des différents groupes de microorganismes (mycètes et bactéries) à partir du sol et eau (Tableau 1), a été réalisé selon la méthode de suspension dilution « Dilution plates » (Davet, 1996 ; Davet and Rouxel, 1997) sur l'un des milieux de culture Sabouraud, Sabouraud Sol ou Sabouraud Mer pour les mycètes, tandis que, les milieux : Gélose nutritive, Gélose Mer et Gélose Sol ont été choisis pour l'isolement des bactéries.

Tableau 1. Les différents échantillons utilisés (EST Algérie).

Nature d'échantillons	Types	Localités
Eau	Salin (Mer)	Skikda
	Thermale	Guelma
	Douce	El Merige
Sol	Extrême (Saharien)	Oued Souf
	Agricole	Ain Semara

2.2. Tests d'antagonismes

Les isolats pathogènes utilisées lors des différents tests antagonistes, sont des pathogènes isolés à partir des échantillons du Blé dur variétés CIRTA, ils sont : *Aspergillus sp, Aspergillus niger,Alternaria sp, Penicillum sp* et *Fusarium sp.*

En effet, les tests d'antagonismes avec les différents isolats fongiques obtenus ont été réalisé selon la méthode de confrontation directe (ou teste des métabolites diffusibles). Cette méthode est réalisée selon la technique décrite par Dennis et Webster (1980). Par ailleurs, les tests d'antagonismes avec les différents isolats bactériens ont été effectués par la méthode des disques.

Enfin, l'estimation du taux d''inhibition a été faite par mesure du diamètre dans le cas des bactéries et par le calcul du pourcentage d'inhibition dans le cas mes mycètes.

2.3. Identification d'isolats d'antagonistes

L'identification des isolats à effets antagoniste (effet positive) a été réalisée par deux sorte d'observation : une macroscopique et l'autre microscopique (cas des mycètes et bactéries avec une coloration Gram et une coloration des spores) et par des tests biochimiques (cas des bactéries) tels que : la recherche de la production d'indole, la réduction des nitrates, la production de fluorescéine, le test KIA et le test MEVAC.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1.Isolement des microorganismes

Trois échantillons d'eau et deux du sol ont été utilisés pour l'isolement des différents microorganismes : moisissures, bactéries et levures. La répartition du nombre des moisissures, des bactéries ainsi que celui des levures obtenues à partir des différents échantillons est mentionnée dans le tableau 2.

Tableau 2: Répartition du nombre d'isolats en fonction d'échantillons.

Origine	Nature	Moisissures	Bactéries	Levures
Eau	Thermale (E1)	2	8	0
	Lac (E2)	9	8	0
	Mer (E3)	6	10	6
Sol	Sol agricole (S1)	12	14	0
	Sol saharien (S2)	11	9	0

L'analyse des résultats mentionnés dans le tableau précédant montrent que, 10 isolats ont été obtenus avec l'échantillon d'eau thermale (E1). Ces isolats sont représentés par 2 et 8 colonies fongiques et bactériennes avec une absence de colonies levuriennes.

Par ailleurs, l'échantillon d'eau de lac (E2) a favorisé le développement de 17 isolats entre moisissures (08 isolats) et bactéries (09 isolats) avec une absence de levures.

L'échantillon d'eau de Mer (E3) a permis d'obtenir un totale de 22 isolats avec, 6 moisissures et 10 bactéries et 6 levures.

L'analyse statistique montre aussi que l'échantillon d'eau de Mer est le plus peuplé avec un pourcentage de 44. 9% de l'ensemble des isolats obtenus, suivi par l'eau de Lac 34.7% et enfin l'eau Thermale avec un pourcentage de 20.4% (Fig. 1).

En ce qui concerne les échantillons du sol, un total de 46 isolats a étés obtenu. En effet, 26 isolats ont été obtenus avec l'échantillon du sol agricole (S1). Ces isolats sont représentés par 12 colonies fongiques et 14 colonies bactériennes avec une absence de colonies levuriennes.

Par ailleurs, l'échantillon de sol saharien (S2) a favorisé le développement de 20 isolats entre moisissures (11 isolats) et bactéries (9 isolats) avec une absence de levures.

Aussi, l'analyse des différents résultats montre que l'échantillon du sol est le plus peuplé avec un pourcentage de 56.5% de l'ensemble des isolats obtenus, suivi par le sol saharien 43.5% (Fig. 1).

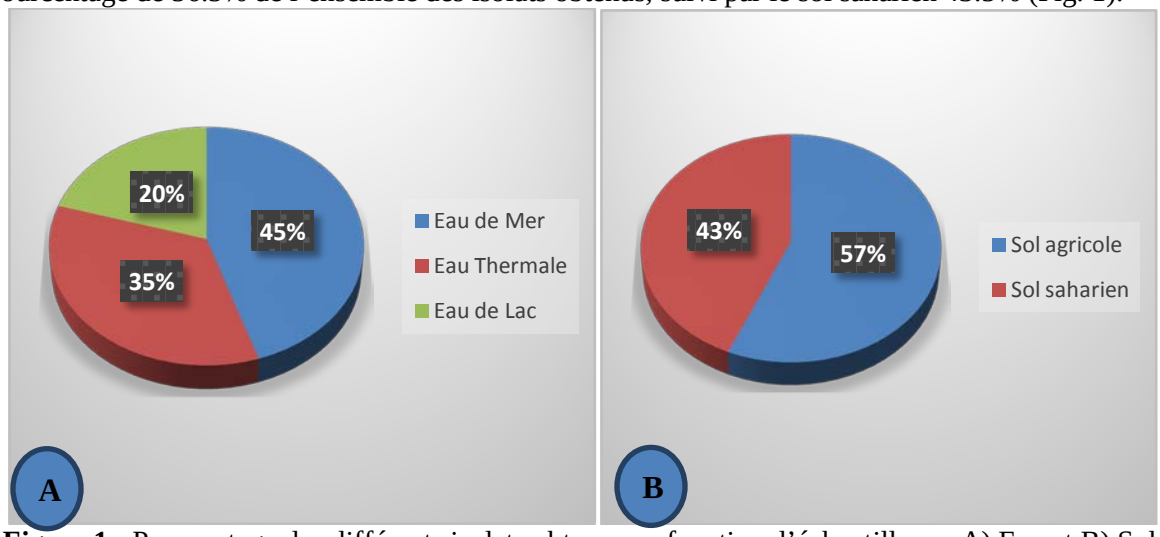


Figure 1 : Pourcentage des différents isolats obtenus en fonction d'échantillons : A) Eau et B) Sol.

La comparaison des pourcentages des différents groupes de microorganismes dans les échantillons d'eau, montre une dominance des bactéries (26 isolats) avec un pourcentage de 53%, suivi par les moisissures 17 isolats soit 34.7 % et en fin les levures (6 isolats) avec 12.24 % (Fig.2).

Par ailleurs, les résultats de pourcentage des groupes d'isolats dans l'échantillon du sol montre une absence de dominance (50 % de moisissures et 50% de bactéries) (Fig. 2).

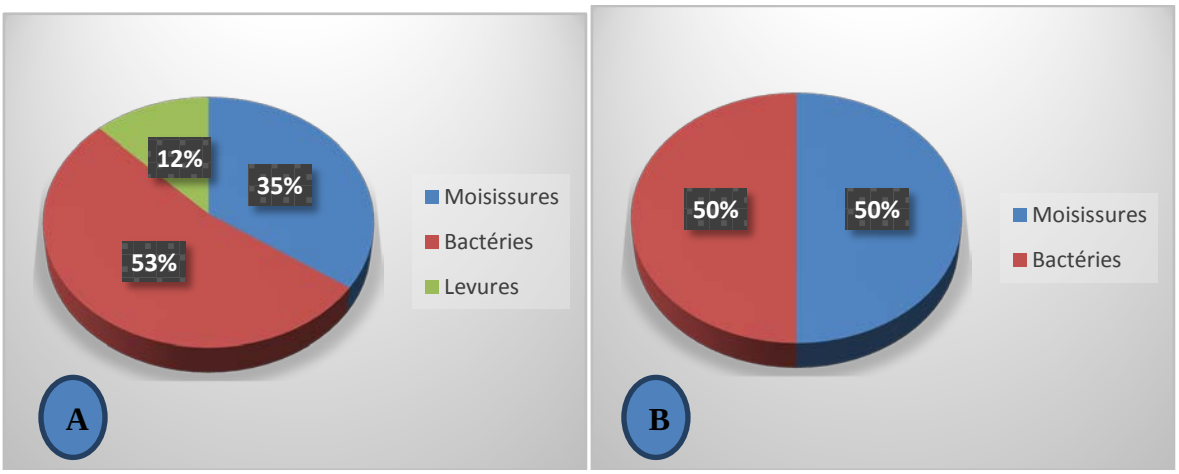


Figure 2 : Pourcentage des groupes d'isolats obtenus en fonction échantillons : A) Eau et B) sol.

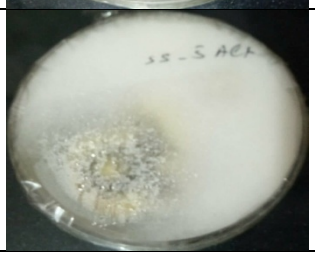
3. 2. Tests d'antagonismes

- Moisissures

Les tests d'antagonismes menés avec les souches de moisissures obtenus suite à l'isolement, ont été réalisés par le biais de la méthode de confrontation direct. Les résultats obtenus en confrontant les isolats d'eau supposés antagoniste vis -à-vis de quelques souches pathogènes pour le blé dur variété CIRTA (*Aspergillus sp*, *Fusarium sp* et *Penicillium sp*) montrent une efficacité importante de six isolats (Tableau 3). Les résultats d'inhibition sont indiqués en pourcentage dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3: Résultats des tests de confrontations positives. P : confrontation avec *Penicillium*, A : confrontation avec *Aspergillus*, F: confrontation avec *Fusarium* et Al: confrontation avec *Alternaria sp*.

Echantillons	Codes	Photos recto	Photos verso	% d'inhibition
Eau	MM3P			83
	MM4A			85
	MM4F			85

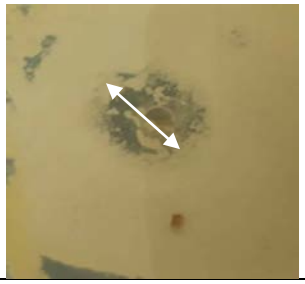
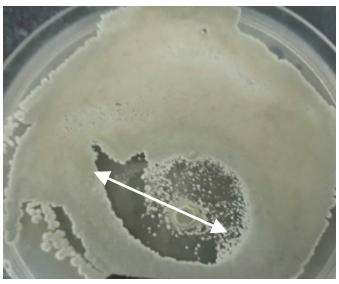
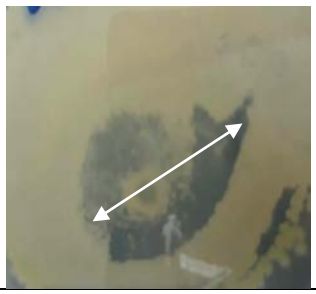
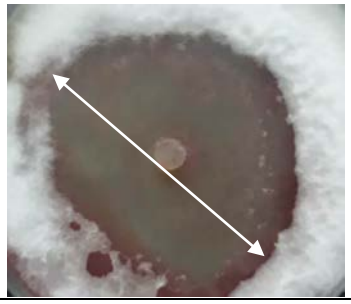
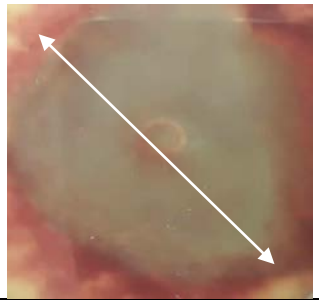
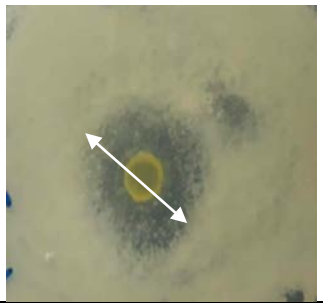
	MM5A			86
Sol	**SS5A**			84
	SS5Al			75

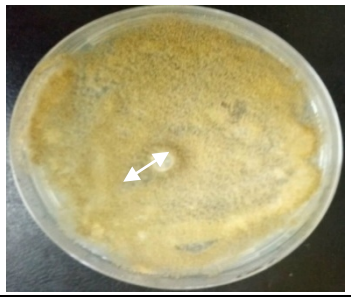
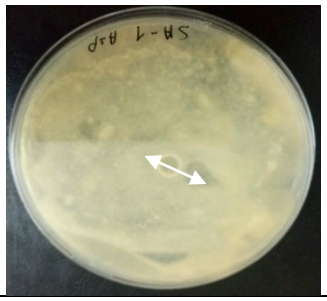
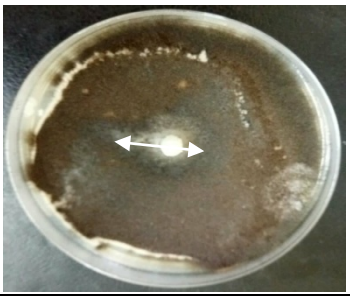
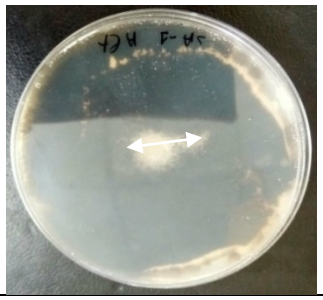
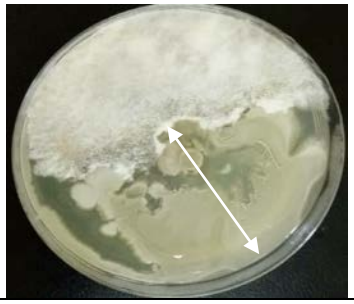
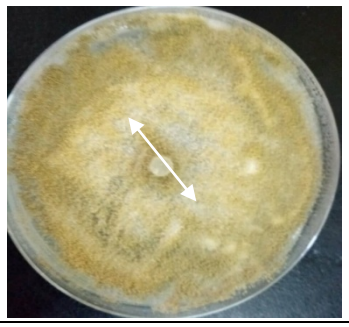
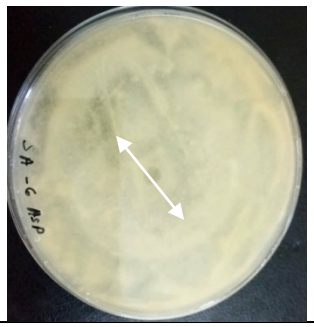
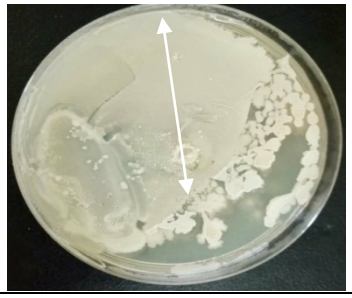
D'après le tableau 3, on remarque que les taux de croissances des pathogènes sont faibles en comparaison avec les souches antagonistes qui envahissent plus de la moitié des boites de Pétri. Le pourcentage d'inhibition exercé par les quatre isolats (eau) à résultats positive, dépasse les 80 %. En effet, le pourcentage d'inhibition de la croissance d'*Aspergillus niger* par les isolats MM4 et MM5 est estimé à 85% et 86%, respectivement. Tandis que, le pourcentage d'inhibition du pathogènes *Penicillium sp* par l'isolat MM3 a été révélé à 83%. Le pourcentage d'inhibition de la croissance de *Fusarium sp* avec l'isolat MM4 a atteint 85%.
Aussi, on remarque que les taux d'inhibition de l'isolat antagoniste issue d'échantillons du sol ont dépassés les 70%, un pourcentage de 84% a été obtenu dans la confrontation SS-5- Aspergillus *sp* et 75% dans la confrontation SS-5- *Alternaria sp.*

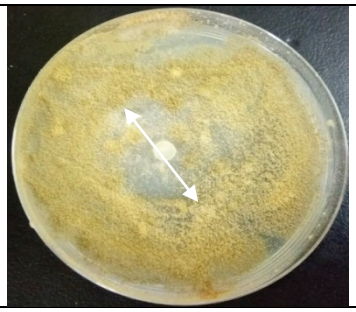
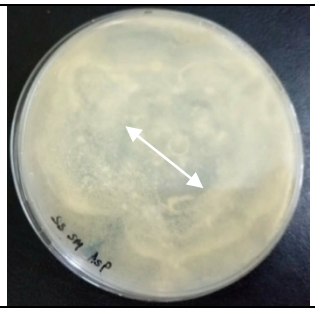
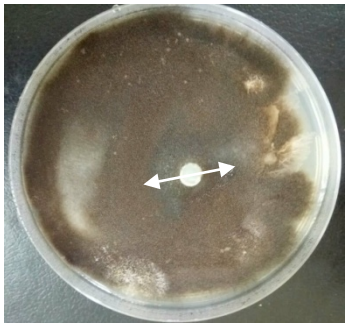
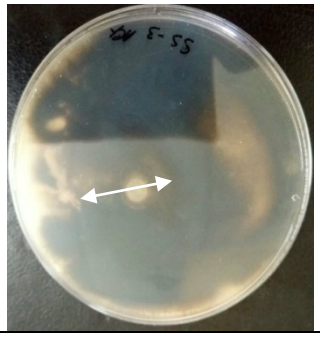
- Bactéries

La méthode des disques a été choisie pour mettre en évidence l'effet antagoniste des isolats bactériens obtenus suite aux séries d'isolement. Ces tests ont été réalisés par l'utilisation des souches pathogènes suivant : *Aspergillus sp, Alternaria sp, Fusarium sp* et *Penicillium sp*. Les résultats positifs (présence d'effet antagoniste) sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 4 : Résultats des tests de confrontations positives : P : confrontation avec *Penicillium*, F : confrontation avec *Fusarium*, Al : confrontation avec *Alternaria sp*.

Echantillons	Codes	Photos recto	Photos verso	Zone (mm)
Eau	**LB3P**			10
	LB4P			5
	LB1P			25
	TB1F			45
	TB3P			17.5

Sol	**SA1A**			4
	SA1Al			6
	SA4F			31
	SA6A			17
	SA6F			51

	SSsmA			14
	SS3Al			4

D'après le tableau 4, tous les isolats d'eau avait une activité positive vis-à-vis de *Penicillium sp* avec des zones de lyses supérieures à 5 mm. En effet, l'action de l'isolat LB4 a permis l'apparition d'une zone transparente d'un diamètre voisinant les 5 mm. Ce dernier est le diamètre le moins importants, tandis que, le diamètre le plus important est obtenu en testant l'isolat LB1 contre le même pathogène citez précédemment.

Le résultat de l'activité anti *Fusarium sp*, mené avec l'isolat TB1, a donné une importante zone de lyse estimé à 45 mm. Par ailleurs, les diamètres de lyses obtenus avec les isolats du sol été supérieur à 4 mm, obtenu avec les isolats SS3 (avec *Alternaria sp*) et SA1 (avec *Aspergillus sp*) ; tandis que, le diamètre le plus important est obtenu dans les tests menés avec l'isolat AS6.

3.3. Identification des souches antagonistes

- Moisissures : les données obtenus suite aux différentes caractérisations (macroscopique et microscopique) nous ont permis de classer les quatre isolats antagonistes en deux genres : trois isolats portant les caractéristiques du genre ***Mucor*** (MM3, MM4 et MM5) et un isolat portant ceux de l'espèce ***Aspergillus niger*** (SS5) et ceci en se référant au clés d'identification proposé par Chabasse et al. (2002).
- Bactéries : la comparaison des résultats de coloration de Gram ainsi que la coloration des spores et les tests biochimiques avec ceux des clés Prescott et al. (2003) et Joffin et al. (2006), montrent que les souches bactériennes antagonistes appartiennent aux genres suivants : *Bacillus, Brucella, Citrobacter, Neisseri, Pseudomonas* et *Streptococcus.*

4. CONCLUSION

La recherche des microorganismes (Mycètes et Bactéries) dans les différents échantillons d'Eau (Mer, Lac et Thermal) et du Sol (Agricole et Saharien), a permis d'isoler un totale de 95 souches entre moisissures, levure et bactéries.

Les tests de confrontations directes effectués contre des agents pathogènes du blé, on permis l'obtention de quatre moisissures à effet antagoniste. Le taux d'inhibition de la croissance d'*Aspergillus, Alternaria, Fusarium* ou *Penicillium* a dépassé les 75%. En effet, les différents isolats antagonistes ont envahi la totalité des boite de Pétri en provoquant une modification profonde au niveau du mycélium du pathogène (déformation du mycélium), une transformation en cordons des

filaments mycéliens et un enroulement du mycélium de l'agent antagoniste sur le mycélium de pathogène.

L'identification macroscopique et microscopique a permis de classer les quatre isolats antagonistes obtenus en deux genres : *Aspergillus* (avec un seul isolat : *Aspergillusniger*) et *Mucor* (avec trois isolats : *Mucor sp1, Mucor sp2* et *Mucor sp3*).

Par ailleurs, la mise en contact des bactéries isolées avec les différents pathogènes utilisés (*Aspergillus sp, Alternaria sp, Fusarium sp* ou *Penicillium s*), a favorisé l'obtention de neuf isolats antagonistes avec des zones d'inhibitions allant de 4 mm jusqu'à 45 mm.

Les différentes caractérisations macroscopiques, microscopiques et chimiques effectuées au niveau du laboratoire du LaMyBAM (Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne), ont permis d'identifier l'ensemble d'isolats à effet positive.

REFERENCES

- Chabasse D., Bouchara J.P., Degentdl L. (2002). Les moisissures d'intérêt médical. Paris : bioforma éd.230 bd Rspail 75014 Paris. Cahier de formation N= °25 biologie médicale.
- Davet P. (1996). Vie microbienne du sol et production végétale. INRA, Paris (FR).p:383.
- Davet P., Rouxel F. (1997). Detection Et Isolation Des Champignons Du Sol. , (Edn) Inra .Paris.
- Dennis C., Webster J. (1980). Antagonistic Properties Of Species-Groups Of *Trichoderma*. I. Production Of Non-Volatile Antibiotics. *Trans. Br.Mycol. Soc.*, 84:25-39, 1971a.
- Joffin J.N., Leyrol G. (2006). Microbiologie technique. Tome1. Dictionnaire des techniques. Bordeaux : CRDP d'aquitaine. 363 p.
- Jijakly M.H. (2003). La lutte biologique en phytopathologie, *In* : Phytopathology. Lepoivre P. (Eds). De Boeck, Bruxelles.
- Kouassi De. (2001). La lutte biologique : une alternative viable à l'utilisation des pesticides ?. Volume 2, Numéro 2.
- Prescott L.M., Harley I., Klein J. (2003). VIII Ecology and Symbiosis. In Microbiology. Fifth edition. The McGraw−Hill Companies, pp: 596-697.

La fusariose vasculaire chez le palmier dattier: agent pathogène, symptômes et moyens de lutte

Mebarki Lakhdar[1,3], Kaid Harche Meriem[2]
[1]Laboratoire de valorisation des ressources biologiques et de la sécurité alimentaire, Université de Béchar, Algérie.
[2]Laboratoire des productions, valorisations végétales et microbiennes,
Département de biotechnologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie,
USTOMB, Oran, Algérie.
[3]Département de biologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Tahri Mohamed de Béchar, Algérie.
Email: mebarki_lakhdar@yahoo.com

RESUME
La culture du palmier dattier est sujette à divers problèmes phytosanitaires qui entravent son développement et son extension. Le bayoud, fusariose vasculaire du Palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) due à *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* reste une menace permanente pour les régions phoenicicoles. La catastrophe causée par le Bayoud ne s'arrête pas à l'érosion génétique causée par la disparition de nombreuses variétés parmi les meilleures, mais conduit également à l'accentuation de la désertification et à l'appauvrissement des phoeniciculteurs qui finissent par émigrer. La seule stratégie de lutte utilisable qui permette la régénération des palmeraies est basée sur la sélection de cultivars à la fois résistant à la fusariose et produisant des dattes de bonne qualité.
Mots-clés: Fusariose, *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, Lutte, Palmier dattier.

SAMMARY
Date palm cultivation is subject to various phytosanitary problems that hinder its development and extension. The bayoud, vascular fusariosis of the date palm (Phoenix dactylifera L.) caused by Fusarium oxysporum f. sp. albedinis remains a permanent threat to the phoenicultural regions. The disaster caused by the Bayoud does not stop at the genetic erosion caused by the disappearance of many varieties among the best, but also leads to the accentuation of the desertification and the impoverishment of the phoeniculturists who end up emigrating. The only control strategy that can be used to regenerate palm groves is based on the selection of cultivars that are both resistant to Fusarium wilt and produce good quality dates.
Key words: fusariosis; *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*; Control; Date palm.

1. INTRODUCTION

Parmi les phytopathologies dues aux champignons du sol, la fusariose vasculaire représente l'une des catégories les plus importantes tants par leur fréquence que par leur gravité. Dans la région nord Africaine, le problème le plus préoccupant est la fusariose vasculaire du palmier dattier. Cette grave maladie infectieuse appelée Bayoud, détruit actuellement les palmeraies maroco-algériennes et risque de s'étendre à d'autres pays phoenicicoles. (Djerbi, 1988).

Le clone marocain Mejhoul, de très bonne qualité, a quasiment disparu et le clone algérien Deglet-Nour risque de subir le même sort si par malheur le champignon atteignait les zones de culture intensive de ce clone (Tolga et Biskra) (Ouinten, 1996). Cette décimation toute impressionnante qu'elle soit ne reflète pas à elle seule les dégâts car le Bayoud a détruit non seulement les meilleures variétés commerciales de renommée mondiale mais a contribué à accentuer le phénomène de désertification et à l'appauvrissement des phoeniciculteurs qui finissent par émigrer vers les grands centres urbains (Bulit et al.,1967).

L'objectif du présent document est de dresser un état des lieux des connaissances scientifiques sur la fusariose vasculaire du palmier dattier, notamment celles qui concernent les symptomes, l'agent pathogènes et les moyens de lutte contre cette maladie.

2. AGENT PATHOGENE DE LA FUSARIOSE VASCULAIRE DU PALMIER DATTIER

Le parasite responsable du Bayoud a été isolé pour la première fois en 1921, mais identifié seulement en 1934 par Malençon. II s'agit d'un champignon imparfait, Foa spécifique du dattier, forme spécialisée de l'espèce *F. oxysporum* très commune dans les sols sous tous les climats. En conditions naturelles, les racines de certaines plantes (henné, luzerne, orge) cultivées en association avec les dattiers peuvent héberger le pathogène sans montrer de symptômes externes. Ces plantes sont considérées comme des porteurs sains (Fernandez et *al*., 1995).

Selon Debourgogne (2013), La nouvelle classification taxonomique du genre *Fusarium* basée sur la phylogénie moléculaire est la suivante :

Règne : Fungi
Division : Ascomycota
Classe: Sordariomycetes
Sous-classe : Hypocreomycetidae
Ordre : Hypocreales
Famille : *Nectriaceae*
Genre : *Fusarium*

3. MORPHOLOGIE, BIOLOGIE ET EPIDEMIOLOGIE DE FOA

Les souches de Foa isolées du rachis de palmes infectées présentent une morphologie caractéristique : thalle de couleur rose saumon et mycélium frisé. (Djerbi et *al*., 1985, 1985a). La reproduction du Foa se fait exclusivement par voie asexuée qui se réalise par des microphialides et des macrophialides qui produisent respectivement des microconidies et des macroconidies (Figure 1 et *cf.* photo 1). Les microphialides, en forme de bouteille, sont implantées perpendiculairement sur le mycélium et produisent d'une manière endogène plusieurs microconidies, généralement unicellulaires, parfois bicellulaires, hyalines, globuleuses ou allongées avec des dimensions variables (3-15 x 3-5 µm). Les macrophialides, beaucoup plus grandes que les microphialides, forment des macroconidies qui sont falciformes, peu nombreuses, présentant 3 à 5 cloisons et mesurant 20-35 x 3-5 μm. Dans les cultures âgées et dans le sol, le Foa différencie sur le mycélium ou sur les macroconidies des chlamydospores qui sont sphériques, intercalaires ou terminales et dont le diamètre varie de 6 à 20 µm. (Djerbi, 1983 ; Sedra, 2006).

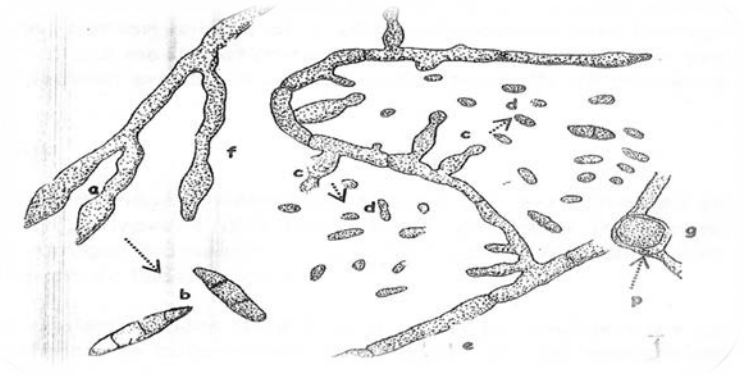


Figure 1 : Organisation morphologique du Foa (Boukaràa et Sissaoui, 1991).
a : macrophialides, b : macroconidies, c : microphialides, d: microconidies, e : mycélium hyalin et cloisonné, f : sporodochies, g : chlamydospore, p : paroi épaisse.

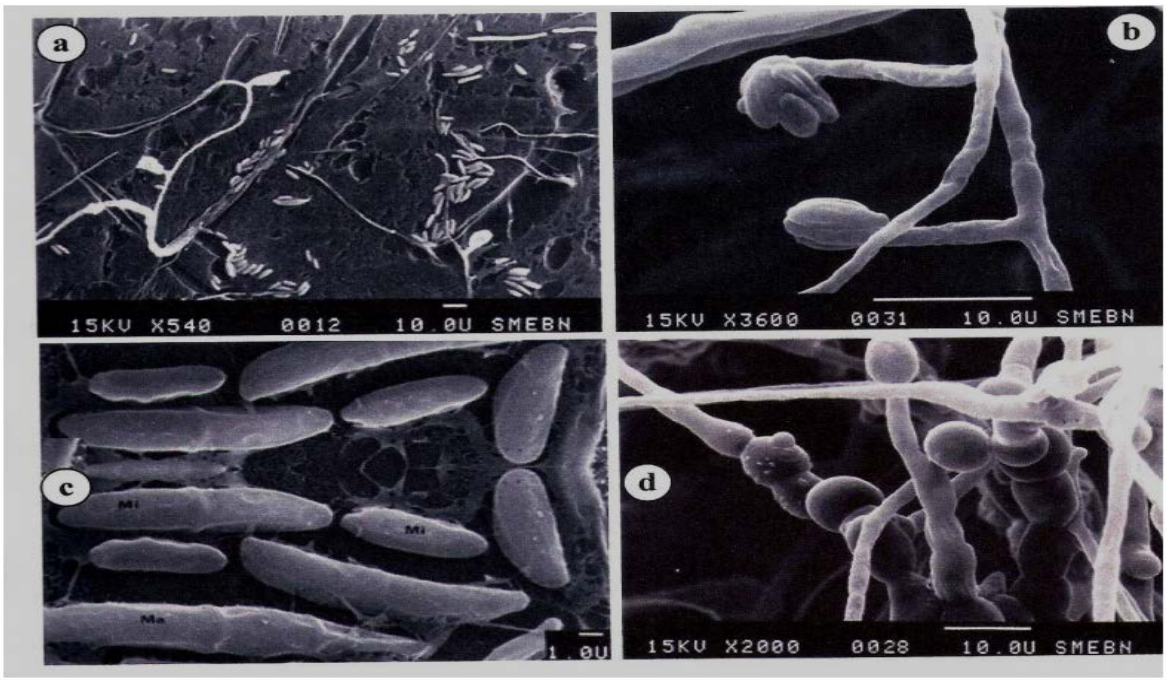


Photo 1 : Organes de reproduction asexuée de Foa au MEB (Rahmania, 2000).
a : mycélium et microconidies ; b : microphialides ; c : micro et macroconidies (Ma : macroconidies ; Mi : microconidies) ; d : chlamydospores formées à partir d'articles mycéliens.

Les chlamydospores se conservent dans le sol et sur des débris végétaux pendant plusieurs années même en l'absence de l'hôte. Dès que les conditions deviennent favorables, les chlamydospores germent et pénètrent dans les racines, une fois le mycélium pénétré dans la racine, il se croit de façon dirigée vers le cylindre central et le xylème, à partir desquels le mycélium atteint la tige. Dans les vaisseaux, le mycélium produit des microconidies qui sont transportées vers le haut par la sève. Quand ce mouvement est empêché par une paroi transversale, les microconidies germent, le tube germinatif pénètre dans la paroi et la formation de microconidies reprend de l'autre côté de la paroi. La mort de l'arbre intervient lorsque le champignon atteint avec ses toxines le bourgeon terminal. Au cours de sa progression, Foa s'échappe du xylème et colonise le parenchyme environnant par un mycélium inter et intracellulaire, c'est ce qui donne plus tard la coloration brun rougeâtre caractéristique des arbres malades. Après la mort de l'arbre, le mycélium continue à se développer dans les tissus morts et forme de nombreuses chlamydospores dans les cellules du sclérenchyme (Nelson, 1981).
Le Foa se dissémine par les rejets, les particules de terre ou par les porteurs sains contaminés provenant de régions infectées ainsi que par les morceaux de rachis infectés et par les eaux d'irrigation. Dans une palmeraie, la dissémination de la maladie s'effectue par contact entre les racines saines et celles infectées. L'étendue de cette dispersion dépend des pratiques culturales (fertilisation, irrigation, … etc.) et des conditions climatiques favorables au développement de la maladie. En général, les conditions favorables à une croissance rapide du palmier dattier favorisent aussi le développement de la maladie. Les semences et les fruits ne semblent pas intervenir dans la dissémination de ce pathogène (Sedra, 2003).

4. PRODUCTION DE TOXINES CHEZ FOA

Plusieurs études ont montré le pouvoir mycotoxinogène du Foa. Dans ce sens, a été montré que l'extrait brut du filtrat du Foa contient une quarantaine de produits différents (Moukhliss, 1987) tels que les dérivés des acides fusariques. De même, le filtrat de culture du parasite a permit la distinction

de trois fractions F1, F2 et F3 avec plus de 50 mg/l pour chacune (Sedra et *al*., 1993 ; El Fakhouri et *al*., 1996). Ces fractions sont thermostables et leur spécificité a été évaluée (Sedra et Lazrek, 2011). La fraction F2 s'est révélée la plus toxique sur le palmier (Sedra et *al*., 1993). Selon Sedra (2013), la présence de ces nouvelles toxines n'a jamais été signalée dans les filtrats des cultures du Foa. D'autres substances toxiques (sous-fractions H3, H4 et H5 dans la fraction F2) autres que l'acide fusarique ont été mises en évidence (Sedra et Lazrek, 2011). Ce pathogène produit également plusieurs phytotoxines peptidiques en plus de l'acide fusarique et ses dérivés (Sedra, 1995b; El Fakhouri et *al*., 1996). L'analyse chromatographique (HPLC) montre que les souches saprophytes du *F. oxysporum* ne produisent pas ces toxines produites par Foa (Sedra, 1997). Ces toxines peuvent être utilisées en sélection *In Vitro* pour distinguer le matériel résistant et sensible au Bayoud, utilisant les petites plantules issues de graines, ou de culture des tissus (vitroplants) ou fragments de jeunes feuilles détachées (Sedra et *al*., 1993, 1998b; El Fakhouri et *al*., 1996; Sedra et Lazrek, 2011).

5. SYMPTOMATOLOGIE DU BAYOUD

Le diagnostic symptomatologique du bayoud peut se faire selon les aspects externes et internes. Selon Zaid et *al*., (2002), Le Bayoud attaque aussi bien les jeunes palmiers que les sujets adultes de même que leurs rejets basaux. Les premiers symptômes de la fusariose du palmier dattier apparaissent sur une ou plusieurs palmes de la couronne moyenne. Leurs folioles prennent un aspect plombé, se dessèchent progressivement de la base vers l'apex et se replient vers le rachis (aspect de plume mouillée) (*cf.* Photo 2). Le dessèchement se poursuit de l'autre côté, en sens inverse, en progressant cette fois de haut en bas; la palme complètement desséchée prend alors une couleur blanchâtre d'où le nom arabe de "bayoud" (du mot arabe "abiad" qui signifie blanc et qui se réfère au blanchiment des palmes des arbres malades) donné à la maladie (Djerbi, 1990). Une longue nécrose brune longitudinale parcourt le rachis de la palme atteinte. Elle correspond au passage du mycélium dans les vaisseaux du rachis. Rapidement, d'autres palmes, souvent proches des premières présentent à leur tour les mêmes symptômes. A un stade avancé de la maladie, les palmes atteintes meurent et restent pendantes le long du stipe. La maladie progresse vers les palmes du centre pour atteindre le cœur de l'arbre qui meurt quand le mycélium atteint le bourgeon terminal (Djerbi, 1990). L'évolution de la maladie peut varier de quelques mois à plusieurs années et elle dépend essentiellement des conditions culturales et du cultivar (Djerbi, 1988; Fernandez et *al*., 1995).

Une coupe longitudinale du stipe d'un palmier malade montre une coloration brun rougeâtre des tissus conducteurs (Djerbi, 1990). Si on déracine un palmier malade, on ne voit qu'un petit nombre de racines malades, rougeâtres, il y a donc continuité des symptômes vasculaires qui existent depuis les racines jusqu'aux feuilles apicales du palmier. Les symptômes ne son pas signalés sur pédoncules, fleurs ou fruits (Djerbi, 1988; Fernandez et *al*., 1995; Sedra, 2003).



Photo 2 : Symptômes typiques fréquents (1) observés sur les palmes et d'autres atypiques moins fréquents (2) (pas de caractère d'hémiplégie) qui posent une difficulté et une confusion dans le diagnostic de la maladie (Sedra, 2013).

6. MECANISMES DE DEFENSE ET DE RESISTANCE DU PALMIER DATTIER

Dans leur environnement, les plantes sont confrontées à des micro-organismes pathogènes tels que des virus, des bactéries, des oomycètes ou encore des champignons. Toutefois, les plantes résistent efficacement à leurs agresseurs et développent rarement des symptômes sévères de maladies. En plus des barrières constitutives, les plantes ont su mettre en place des mécanismes complexes impliquant la reconnaissance et la réponse aux signaux émis suite à l'invasion des pathogènes. Cette reconnaissance déclenche des mécanismes de défense qui convergent généralement vers la réaction hypersensible (Mittler et *al*., 1996), le renforcement des parois cellulaires (Shmele et Kauss, 1990), la production des formes actives d'oxygène (Doke et *al*., 1996) et la synthèse des phytoalexines et des protéines PR (Durand Tardif et Pelletier, 2003). Ces réponses sont souvent associées à une résistance systémique acquise ou à une résistance systémique induite (Métraux et *al*., 2002).

Cependant, l'induction de la résistance systémique implique, dans la plupart des cas, le détournement du métabolisme de la plante vers la mise en place des réactions de défense « très fortes » et amplifiées par rapport à ce qui est réellement exigé en réponse à un premier contact avec un agent pathogène. Cet arsenal de défense développé, étant trop consommateur d'énergie, affecte inévitablement la croissance et la productivité de plusieurs plantes (Walters et Heil, 2007).

Les mécanismes impliqués dans la défense du palmier dattier contre Foa ne sont pas bien établis malgré les nombreux efforts investis dans ce sens. Ceci est en partie dû à la complexité de ce pathosystème mais aussi au fait que la plupart des travaux ont été réalisés sur des plantes provenant des graines ou « seedlings ». Ces seedlings présentent une forte hétérogénéité concernant leur comportement vis-à-vis du pathogène même si elles sont issues de plantes mères reconnues sensibles ou résistantes (Dihazi, 2012).

Malgré ces difficultés, différentes approches d'études ont été adoptées pour comprendre les mécanismes de défense et de résistance du palmier dattier contre Foa : La comparaison des palmiers dattier infectés avec des palmiers sains ; la comparaison des cultivars sensibles et résistants en absence de toute infection ; la comparaison des réactions de défense des deux types de cultivars, sensibles et résistants, après leur inoculation par l'agent pathogène (Dihazi, 2012).

Selon El Modafar (2010), la résistance du palmier dattier à la maladie du Bayoud est liée à des mécanismes de défense multifactorielle, dont certains sont constitutives et d'autres sont induites de novo. En fonction de leur rôle dans la stratégie de défense de la plante hôte, ces mécanismes peuvent être classés en deux types: Mécanismes mécaniques (renforcement des parois cellulaires par la lignine et les phénols pariétaux…) qui limitent l'action des enzymes secrétées par Foa et qui interviennent dans la dégradation de la paroi cellulaire chez le palmier dattier et mécanismes chimiques (protéines de défense et des phytoalexines, acides caféoylshikimiques, L'accumulation des dérivés de la coumarine notamment le propyl-7-aesculetin et l'hydroxy-5-propyl-7-aesculetin…) dont le rôle est d'inhiber la croissance du Foa et d'empêcher la synthèse de ses enzymes hydrolytiques (pectinolytiques, cellulolytiques et protéolytiques).

La résistance du palmier dattier à la maladie du Bayoud dépend aussi des facteurs de pathogénicité de Foa qui peuvent être distingués comme suit (El Modafar, 2010):

- Synthèse d'enzymes dégradant la paroi cellulaire et permettent la pénétration et la colonisation du Foa dans les tissus de la plante hôte;
- Sécrétion de protéine suppresseur qui supprime le déclenchement des mécanismes de défense chez les cultivars sensibles;
- Excrétion des toxines impliquées dans le développement des symptômes de la maladie.

7. STRATEGIES DE LUTTE CONTRE LE BAYOUD

La stratégie de lutte contre le Bayoud s'articule sur les approches complémentaires suivantes: l'arrêt ou du moins le ralentissement de la progression de la maladie, la sélection de cultivars et de clones résistants au Bayoud et de bonne qualité dattière et la multiplication rapide du matériel sélectionné par la culture "*in vitro*" et sa diffusion (Djerbi, 1982).

7.1. Mesures prophylactiques

Ce sont des moyens de lutte préventifs indispensables dont l'objectif vise principalement à empêcher ou à retarder l'introduction du Foa dans les régions saines par la sensibilisation des producteurs et par des contrôles phytosanitaires (Louvet, 1991). Ces mesures s'appliquent à des zones ou des pays encore indemnes de bayoud en vue d'assurer leur protection, elles n'ont par contre aucun intérêt pour les régions phœnicicoles déjà atteintes par cette maladie (Djerbi, 1988). En effet, elles consistent à surveiller de manière stricte le mouvement de tout échange de matériels (terre, rejets, machine ou outil de travail) au sein d'une même palmeraie et entre palmeraies distinctes (Ouinten, 1996). Si un foyer est détecté dans une région saine, une éradication par arrachage et une incinération des palmiers atteints ainsi qu'une désinfection du sol par fumigation ont été préconisés (CABI/OEPP, 1997). Les mesures prophylactiques accompagnées d'opérations d'éradication ne feront que ralentir la maladie mais ne pourront jamais l'arrêter (Djerbi, 1988).

7.2. Techniques culturales :

Les techniques culturales contre les fusarioses vasculaires, consistent à éviter les conditions favorisant la croissance de l'agent pathogène. La maladie est moins présente en conditions d'irrigation réduites, ainsi que dans les sols à pH alcalin, riches en calcium et potassium, pauvres en phosphore et magnésium et dont l'azote est sous forme nitrique plutôt qu'ammoniacal (Waltz et Johnes, 1981). Dans les parcelles contaminées, il faut éviter les cultures du henné et de la luzerne qui nécessitent une irrigation abondante favorable à la maladie, et qui sont des porteurs sains de l'agent pathogène (Foa) (Bulit et *al.*, 1967). Le contact souterrain entre les arbres voisins doit être évité, par l'application des méthodes modernes d'irrigation et de plantation des palmiers dattiers (Louvet, 1991).

7.3. Lutte chimique

L'objectif des techniques chimiques est surtout l'éradication des nouveaux foyers détectés dans les zones saines (Djerbi, 1988). Procédant à la fumigation (et/ou solarisation) du sol contaminé après la délimitation du foyer avec une marge de sécurité suffisante. Cette activité nécessite d'abord l'arrachage et l'incinération des arbres sur place. L'utilisation du bromure de méthyle et de la chloropicrine semble donner de bons résultats. Un essai a déjà été mené à El-Goléa, en 1978, avec succès puisque le bayoud n'y a pas été rencontré jusqu'à ce jour, et dans certaines palmeraies de Ghardaïa (Sedra, 2003). Cependant, cette méthode d'éradication se heurte à plusieurs problèmes. En effet elle est très coûteuse ainsi que l'utilisation répétée de ces produits de synthèse risque d'engendrer des problèmes d'environnement et de santé humaine et animale.

7.4. Lutte génétique

La lutte génétique par l'utilisation des variétés résistantes du palmier est jusqu'à présent le moyen le plus privilégié pour combattre le bayoud. La diffusion des variétés résistantes existantes a été très limitée à cause de la médiocre qualité des dattes qui n'a pas de valeur commerciale désirée par les producteurs. Des programmes d'amélioration, consistent à créer de nouveaux clones de Palmier dattier, résistants au Bayoud et de haute qualité par croisements contrôlés ont été développés. A partir des milliers de plantules issues de ces croisements, quelques centaines de plants femelles résistants et appartenant à une dizaine de variétés de bonne qualité fruitière ont été obtenus. Ces stratégies ont pu être développées notamment grâce à la mise au point, récente chez le palmier dattier, de la culture in vitro qui permet d'obtenir, à partir d'un individu, un grand nombre de plants génétiquement identiques. (Fernandez, 1995)

Cependant, l'introduction et la multiplication des cultivars résistants se heurtent à deux types de contraintes fréquemment rencontrées : la mauvaise adaptation aux conditions pédoclimatiques locales et la production d'une datte ne correspondant pas au standard du marché (Robert et Benkhalifa, 1991). Ainsi qu'au Maroc, des palmiers qui on été considérés résistants se sont avérés sensibles 8 à 10 ans après leur plantation (Bounaga et Djerbi, 1990). De même, malgré son intérêt, le cultivar

Takerbucht, confirmé pour sa résistance, ne pourra convenir partout ; très tardif, il n'arrive pas à maturité dans les palmeraies de la wilaya de Béchar, au nord de Béni-Abbès et sa datte ne peut se substituer à celles de Tinnaser ou Aghamu pour la commercialisation vers l'Afrique sub-saharienne (Robert et Benkhalifa, 1991).

7.5. Lutte biologique :

La lutte biologique par l'utilisation des antagonistes ou des substances naturelles connaît un regain d'intérêt grandissant en raison des risques potentiels de la lutte chimique sur l'environnement et sur la qualité et les perspectives nouvelles qu'offre cette approche pour la culture biologique.

En ce qui concerne le palmier dattier, la stratégie de lutte via l'utilisation des microorganismes est appuyée par l'existence de sols répressifs empêchant le développement de la maladie du Bayoud (Oihabi et *al*., 1992). Cette répression a été attribuée aux microorganismes antagonistes du Foa, notamment le genre *Pseudomonas* (Maslouhy, 1989) ou *Bacillus* (Chakroune et *al*., 2008) ou des champignons du genre *Aspergillus* ou *Penicellium* (Chakroune et *al*., 2008). Il a été aussi montré que l'inoculation des racines de palmier dattier par des souches hypoagressives de Foa (El Hassni et *al*., 2004) ou leur mycorhization (Jaiti et *al*., 2008) sembleraient améliorer la résistance du palmier contre son pathogène. Ces modalités de lutte sont susceptibles d'induire les réactions de défense du palmier dattier contre son pathogène et pourraient constituer une alternative efficace et non polluante de contrôle de la maladie de Bayoud.

D'autre part, la découverte des potentialités élicitrices des produits naturels à base de plantes contribuera davantage au développement de nouvelles stratégies de bio-contrôle qui pourraient être envisagée pour solutionner, pour le moins en partie, le problème du bayoud ; exemple, Le produit Stifénia est une poudre élaborée à partir des graines de fenugrec (*Trigonella foenumgraecum* L.), Ce produit naturel a été testé pour la première fois chez le pathosystème palmier dattier-Foa. L'apport du produit sous forme de poudre a conduit, après 60 jours de prétraitement, à une accumulation massive des isomères de position de l'acide caféoylshikimique accompagnée de la néosynthèse d'un dérivé de l'acide sinapique connu comme une phytoalexine caractéristique de la racine du dattier (El Hadrami et *al*., 1997). Le traitement des plantes par l'acide jasmonique aussi se traduit par la mise en place de zones de nécrose localisées (réaction d'hypersensibilité) similaires à celles observées chez des plantes résistantes au Foa. Cette réaction est associée à la stimulation de nombreuses réactions de défense notamment l'accumulation du peroxyde d'hydrogène, la peroxydation des lipides membranaires et l'activation des peroxydases et des polyphénoloxydases (Jaiti et *al*., 2004). Les produit naturels ont montré aussi un effet inhibiteur *In Vitro* sur la croissance radiale du Foa, sur la germination, sur la sporulation, ainsi que sur sa densité dans le sol (Mebarki et *al*., 2013).

Références

- Bounaga N et Djerbi M. 1990. Pathologie du palmier dattier. Options Méditerranéennes, Sér. A / n° 11, Les systèmes agricoles oasiens.
- Bulit J, Louvet J, Bouhot D et Toutain G. 1967. Travaux sur les Fusarioses. I : Travaux sur le Bayoud, Fusariose Vasculaire du Palmier Dattier en Afrique du Nord. Ann. Epiphytes. **18** : 213-239.
- CABI/OEPP. 1997. Ips duplicatus. In: Distribution Maps of Quarantine Pests for Europe. CAB International, Wallingford, Royaume Uni. 706 pp.
- Chakroune K, Bouakka M, Lahlali R, Hakkou A. 2008. Suppressive effect of mature compost of date palm by-products on *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. Plant Pathol. **7**: 148-54.
- Debourgogne A. 2013. Typage moléculaire du complexe d'espèces *Fusarium solani* et détermination de son mécanisme de résistance au voriconazole. Thèse du doctorat. Université de lorraine.
- Dihazi A. 2012. Interaction Palmier dattier - *Fusarium oxysporum f.* sp. *albedinis* : Induction des réactions de défense par l'acide salicylique et rôle de quelques microorganismes antagonistes de

l'agent pathogène dans le contrôle de la maladie du Bayoud. Thèse de doctorat, Universite Ibn Zohr, Agadir, Maroc.
- Djerbi M. 1982. Bayoud disease in North Africa: history, distribution, diagnosis and control. Date Palm Journal. **1(2):**153-197.
- Djerbi M. 1983. Diseases of the date palm (phoenix dactylifera L.).F.A.O. Regional Project for Palm and Dates Research Centre in the Near East and North Africa. 106 p.
- Djerbi M, Sedra MH Et El Idrissi Ammari MA. 1985. Caractéristiques culturales et identification du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, agent causal du bayoud. Annls. Inst. Natl. Rech. Agron. Tunisie, 58, Note de recherche. **1** : 1-8.
- Djerbi M, El Ghorfi MA Et El Idrissi Ammi M. 1985a. Etude du comportement du Henné (*Lawsonia inermis* L.) et de la Luzerne (*Medicago sativa* L.) et de quelques espèces de palmiers à l'égard du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, agent du bayoud. Annls. Insf. Natl. Rech. Agron. Tunisie, 5S, Note de recherche. **3** : 1-11.
- Djerbi M. 1988. Les maladies du palmier dattier. Projet régional de lutte contre le Bayoud. FAO, (Rab/84/0/8), Alger, Algérie.
- Djerbi M. 1990. Méthodes de diagnostic du bayoud. Bulletin OEPP/EPPO. **20**: 607-613.
- Doke N, Miura Y, Sanchez LM, Park HJ, Noritake T, Yoshioka H, Kawakita K. 1996. The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence. Gene. **179**: 45-51.
- Durand-Tardif M, Pelletier G. 2003. Apport de la biologie moléculaire et cellulaire et de la génétique à la protection des plantes. C.R. Biologies. **326** : 23-35.
- El-Fakhouri R, Lazrek, HB, Bahraoui E, Sedra MyH et Rochat H. 1996. Preliminary investigation on a peptidic toxins produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. Phytopath. Mediter. **35**:11-15.
- El Hadrami I, Ramos T, El Bellaj M, El Idrissi-Tourane A and Macheix JJ. 1997. A sinapic derivative as induced defense compound of date palm against *Fusarium oxysporum* f. sp. *abledinis*, the agent causing Bayoud disease. J Phytopathol. **145**:329-333.
- El Hassni M, J'Aiti F, Dihazi A, Ait Barka S, Daayf F, El Hadrami I. 2004. Enhancement of defense responses against Bayoud disease by treatment of date palm seedling with an hypoaggressive *Fusarium oxysporum* isolate. J. Phytopathol. **152**: 1-8.
- El Modafar C. 2010. Mechanisms of date palm resistance to bayoud disease: Current state of knowledge and research prospects. Physiol Mol Plant Pathol. **74**: 287- 294.
- Fernandez D, Lourd M, Ouinten M, Tantaoui A et Geiger JP. 1995. Le Bayoud du palmier dattier. Une maladie qui menace la phoeniciculture. Phytoma. La défense des végétaux. n° 469.
- Jaiti F, Meddich A, Kassami M and El Hadrami I. 2008. Effect of Arbuscular Mycorrhization on the accumulation of hydroxycinnamic acid derivatives in date palm seedlings challenged with *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. J. Phytopathol. **156**: 641-646.
- Louvet J. 1991. Que devons-nous faire pour lutter contre le Bayoud. In : Physiologie des Arbres et Arbustes en zones arides et semi–arides (Ed. by A. Riedaker, E. Dreyer, C. Pafadnam, H. Joly and G. Bory). Groupe d'étude de l'arbre. Jhon Libbey Eurotext, Paris, France. 337-346
- Maslouhy A. 1989. Contribution à l'étude in vitro et in situ des antagonistes de Fusarium oxysporum f. sp. albedinis, agent causal du Bayoud. Marrakech: Diplôme des Etudes Supérieures, Université Cadi Ayyad.
- Mebarki L, Kaid Harche M, Benlarbi L, Rahmani A and Sarhani A. 2013. Phytochemical Analysis and Antifungal Activity of *Anvillea Radiata*. World Applied Sciences Journal. **26 (2)**: 165-171.
- Métraux JP, Nawrath C and Genoud T. 2002. Systemic acquired resistance. Euphytica. **124**: 237-243.
- Mittler R and Lam E. 1996. Sacrifice in the face of foes: pathogen-induced programmed cell death in plants. Trends Microbiol. **4**:10-15.

- Moukhlisse N. 1987. Contribution à l'identification et étude de la toxicité des différents constituants de la toxine sécrétée par le Fusarium oxysporum f. sp. albedinis. Thèse de 3ème cycle, Fec. Sc. Sémlalia, Univ. Cadi Ayyad, Marrakech-Maroc.
- Nelson PE. 1981. Life cycle and epidemiology of Fusarium oxysporum. In: Fungal wilt diseases of plants. (Mace ME, Bell AA and C.H. Beckman, editors), Academic Press, New York. 51-80.
- Oihabi A, Hatimi A et Amir H. 1992. Etude de la réceptivité au Bayoud de deux sols de palmeraies marocaines. Phytopath Medit. **31**: 19-27.
- Ouinten M. 1996. Diversité et structure génétique des populations algériennes de Fusarium oxysporum f .sp. albedinis, agent de la fusariose vasculaire (bayoud) du palmier dattier. Thèse de Doctorat. Sciences et Technique du Languedoc. Université de Montpelier II.
- Rahmania F. 2000.- Contribution à la connaissance des relations histo-cyto-physiologiques des relations parasitaires entre le palmier dattier (Phoenix dactylifera L.) et Fusarium oxysporum f.sp.albedinis agent causal bayoud. Thèse de doctorat d'état. U.S.T.H.B., Alger.
- Robert A et Benkhalifa A. 1991. Progression de la fusariose du palmier dattier en Algérie. Sécheresse. **2(2)** : 119-128.
- Sedra, MH, El Fakhouri R et Lazrek, H.B. 1993. Recherche d'une méthode fiable pour l'évaluation de l'effet des toxines secrétées par *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* sur le palmier dattier. Al Awamia. **82**:89-104.
- Sedra MH. 1995a. Problèmes phytosanitaires du palmier dattier en Mauritanie et propositions de moyens de lutte. Rapport de mission d'expertise effectuée en Mauritanie du 8 au 16 juin 1995. Réseau de recherche & développement du palmier dattier (BI, FIAD, FADES, ACSAD /Syrie.
- Sedra MH. 1995b. Diversité et Agressivité des souches du Fusarium oxysporum f. sp. albedinis dans les pays magrébins sur différents cultivars du palmier dattier - Nature de la résistance à la maladie et facteurs influençant cette résistance. Proc. Sémin. Régional sur le Bayoud, fusariose du palmier dattier, organisé par l'OADA. Rencontre des experts, Dégache, Tunisie, 23-27 Octobre. 33-50.
- Sedra MH. 1996. Résultats de prospections effectuées dans la vallée Ait Mansour (Région de Tiznint-Tafraoute au sud du Maroc). Rapport de mission, INRA-Maroc.
- Sedra MH. 1997. Diversité et amélioration génétique du patrimoine phénicicole marocain. Proc. Sémin. National sur Ressources Phytogénétiques et éveloppement Durable. Rabat, Maroc. pp : 283-308.
- Sedra MH. 1999a. Identification et caractérisation des cultivars du palmier dattier en Mauritanie. Rapport de mission de consultation d'expert, 30/6/99-23/7/99, OADA.
- Sedra MH. 1999b. Prospection et importance du bayoud en Mauritanie et action urgentes à prendre pour lutter contre la maladie. Rapport de mission de consultation FAO effectuée du 19/10/99 au 18/11/99 en République Islamique de Mauritanie et proposition de projet de lutte contre le bayoud dans ce pays. Projet de Développement des oasis, phase II, FAO/UFT/MAU/020/MAU'.
- Sedra MH. 2003. Le Bayoud du palmier dattier en Afrique du Nord. FAO, RNE/SNEA-Tunis. Edit. FAO sur la protection des plantes. Tunisie.
- Sedra MH. 2006. La maladie du Bayoud du palmier dattier (*Phoenix dactilyfera* L.): apparition, extension, dégâts, conditions de développement, méthodes de diagnostic et de lutte, acquis, perspectives et recommandations pratiques. Broch. de vulgaris., Edit. OADA, Khartoum, Soudan.
- Sedra MH et Lazrek HB. 2011. *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* toxin characterization and use for selection of resistant date palm to Bayoud disease. 253-271 p. In: M. Jain et al. (eds), Date Palm Biotechnology, Springer, Dordrecht Heidelberg London New York.
- Sedra MH. 2013. The Bayoud (Vascular Wilt) of Date Palm in North Africa: Situation, Research Achievements and Applications. ISHS. Acta Hort. **994** : 59-76
- Schmele I and Kauss H. 1990. Enhanced activity of the plasma membrane localized callose synthase in cucumber leaves with induced resistance. Physiol. Mol. Plant. Pathol. **37**: 221–228.
- Walters D., Heil M. 2007. Costs and trade-offs associated with induced resistance. Physiol. Mol. Plant Pathol. **71**: 3-17.

- Waltz SS and Johnes JP. 1981. Nutritionale quirements of *Fusarium oxysporum*: Basis for a disease conrol system. In: Nelson. R.J. et al., 340-349.
- Zaid A, Arias E J and Taher F. 2002. Date Palm Global Network. Project Document.

Comparaison de deux parasitoïdes: *Bracon hebetor* Say. et *Phanerotoma flavitestacea* Fisch. dans la lutte contre l'*Ectomyelois cereatoniae* Zell. dans les Oasis des Zibans (Algérie)

Fateh Mimeche[1*], Hakim Drouai[2], Abdelghani Zedam[1]
[1]Département des Sciences Agronomiques, Université de M'Sila, BP 166 Echbilia, 28000, M'Sila, Algérie.
[2]Département d'Agronomie, Université Mohamed Khider Biskra, 07000, Biskra, Algérie
*Email : mimechefateh@gmail.com

RESUME
Le palmier dattier est la culture par excellence de l'écosystème oasien. Cet écosystème est un milieu très fragile et favorable pour la prolifération de bioagresseurs animaux. Il existe plusieurs ravageurs dont la pyrale des dattes (*Ectomyelois ceratoniae* Zeller) qui, est considérée comme l'un des ravageurs les plus redoutables de la production de dattes en Algérie. Cet état de fait nécessite de développer des méthodes de lutte alternatives, économiques, efficaces, saines et respectueuses de l'environnement, de la biodiversité et de la santé humaine. L'utilisation des auxiliaires est l'un des moyens naturels et efficaces de lutte. Dans le présent travail, nous proposons une étude comparative combinée entre deux auxiliaires naturels de la pyrale des dattes ; *Phanerotoma flavitestacae* Fisch *et Bracon hebetor* Say. Dans des conditions contrôlées *in vitro*, les résultats montrent que le *B.hebetor* semble le plus efficace pour lutter contre le ravageur. Ce parasitoïde a donné une durée moyenne de cycle de 13,83 jours avec un taux de parasitisme maximal au dernier stade larvaire avec 100% d'efficacité. Le cycle biologique du second parasitoïde *P.flavitestacea,* a présenté une durée de 47 jours.
Mots Clés : *Bracon hebetor* Say., Lutte biologique, Parasitisme, *Phanerotoma flavitestacea* Fisch., Pyrale de dattes.

1. INTRODUCTION
En Algérie, le palmier dattier est la culture clé de l'écosystème oasien. Il procure, grâce à la commercialisation aux échelles national et international de son fruit, des crédits importants et constitue le pivot agricole des régions sahariennes et arides. La zone des Zibans fait partie des régions phœnicicoles les plus importantes du pays du point de vue patrimoine et qualité de la production (Benziouche et Chehat, 2010). Elle fournit plus de 30 % de la production nationale et de 35 % de la datte Deglet Nour (Messak et *al.,* 2008). La phœniciculture algérienne souffre de plusieurs contraintes surtout d'ordre phytosanitaire qui réduisent la quantité de la production et altèrent la qualité des récoltes. D'une part, il y a la prolifération de certaines maladies causées par *Fusarium oxysporum, Mauginiella scaettae, Phytophtora sp*… et d'autre part c'est la prolifération de certains bioagresseurs animaux qui prospèrent et fragilisent l'écosystème oasien (Belguedj et *al*., 2008) où on cite: *Oligonychus afrasiaticus, Parlatoria blanchardi, Apate monachus*… et dont le plus important est la pyrale des dattes: *Ectomyelois ceratoniae* Zeller. Ce ravageur est considéré comme l'ennemi le plus redoutable du palmier dattier en Algérie où ses dégâts peuvent atteindre 20 à 30% de la production dattière dans le bassin méditerranéen (Abdelmoutaleb, 2008). Dans ce contexte, cette étude a pour objectif d'approfondir la connaissance de quelques paramètres biologiques des parasitoïdes autochtones de la pyrale des dattes qui sont *Bracon hebetor et Phanerotoma flavitestacea* en conditions contrôlées pour limiter les attaques de la pyrale des dattes dans les stocks.

2. MATERIEL ET METHODES
Notre étude fût menée au Laboratoire d'entomologie de la station régionale de la protection des végétaux (INPV–Biskra, située au Nord-Est d'Algérie) durant la période automnale de l'année 2016. Le matériel biologique est composé de souches de la pyrale de dattes (*E.ceratoniae*) issues de dattes

de Deglet-Nour infestées et des souches des deux parasitoïdes autochtones: *B. hebetor* et *P. flavitestacea*.

2.1. Elevage de la pyrale des dattes

L'élevage de la pyrale des dattes débute par la récupération des papillons issus des dattes véreuses collectées à partir des cages d'émergence, qui est tenu dans des conditions contrôlées (Température (T)= 27 ± 1 C°, Humidité (H) = 55% et une photopériode scindée en deux phases inégales : 16 h de lumière et 8 h d'obscurité). Après émergence, les papillons sont mis dans des bocaux d'accouplement pour favoriser la rencontre entre les deux sexes et la ponte. Les œufs pondus sont prélevés et mis dans les deux milieux d'élevage. Après l'éclosion les larves vont accomplir leur développement larvaire jusqu'au stade L_5 suffisant pour le sexage. D'après Dhouibi (1982), la différenciation entre les deux sexes est déterminée par la présence sur la face dorsale entre le 7eme et le 8eme segment abdominal d'une tâche noirâtre qui représente la gonade sexuelle mâle. Pour que la pyrale atteigne la nymphose, les larves âgées (L_5) sont placées dans des cartons ondulés sans alimentation où il y aura récupération des chrysalides mâles et femelles séparément dans des tubes à hémolyse fermés par du coton. Chaque chrysalide est mise dans un tube à hémolyse sur lequel on indique la date et le sexe. Les objectifs de cet élevage dans les conditions contrôlées ont pour plusieurs buts : (i) déterminer la durée moyenne du cycle biologique, (ii) assurer la présence perpétuelle de la pyrale des dattes en laboratoire, (iii) Les œufs issus servent à la multiplication de *P. flavitestacea* et (iv) Les larves de l'élevage sont utilisées pour l'étude de *B. hebetor*.

2.2. Elevage des parasitoïdes de la pyrale des dattes

L'élevage de *B. hebetor* est conduit selon les étapes suivantes : (a) on récupère les adultes de ce parasite à partir de la chambre de stockage à l'aide des tubes à hémolyse, (b) on met un couple de *B. hebetor* avec des larves de stade (L_4, L_5) de *E.ceratoniae* dans des boites de Pétri, pour réussir et multiplier les résultats il nous a paru convenable de mettre plusieurs nombres des chenilles de 10, 15 et 20 avec six répétitions pour chacune. Les boites sont bien fermées à l'aide du parafilm avec la mention de la date et (c) la vérification des boites se fait quotidiennement.

L'élevage de *P.flavitestacea* est conduit selon les étapes suivantes : (a) On récolte les œufs de *E. ceratoniae* âgés de 24 h des couples et on les pose sur des morceaux de dattes saines à l'aide d'un pinceau dans les boites de Pétri, puis on introduit les couples de *P.flavitestacea*, (b) deux ou trois jours après, on ajoute aux œufs exposés un peu du milieu naturel puis les boites sont recouvertes à l'aide d'un parafilm tendu pour éviter la sortie des larves et remises dans la chambre d'élevage et (c) pour réussir et multiplier les résultats il nous a paru convenable de mettre plusieurs nombres d'œufs de 10, 20 et 30 avec six répétitions pour chacune. Ces deux élevages ont pour but le suivi du cycle biologique des deux parasitoïdes et la connaissance du taux de leur parasitisme sur leur hôte.

2.3. Analyses statistiques

L'analyse de la variance (ANOVA) est utilisée pour comparer l'efficacité des deux parasitoïdes utilisés. Les valeurs de $P< 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives, permet le classement et la comparaison des différentes moyennes du taux de parasitisme pour chaque parasitoïde. Les calculs ont été réalisés à l'aide du programme Stat View.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Etude du cycle biologique de la pyrale des dattes

Le suivi du cycle biologique de la pyrale des dattes est suivi de la ponte jusqu'à l'émergence des adultes (Tableau 1). L'élevage du lépidoptère est réalisé sur une alimentation composé de farine de dattes de la variété Mech Degla desséchée et broyée.

Tableau 1. Durée moyenne (jours) des différents stades du cycle biologique d'*E.ceratoniae*.

Stades	Ponte - éclosion	Stades larvaires (L_1 - L_5)	Chrysalide (L_5)	Chrysalide - Adulte	Cycle biologique
Durée (jours)	03,00	26,10	04,50	08,00	41,50

La durée moyenne d'incubation des œufs est de 03 jours, tandis que la durée moyenne des stades larvaires (L_1-L_5) est de 26,10 jours. La durée moyenne du stade L_5 - chrysalide est de 04,50 jours et pour la phase imaginale, elle est de 08 jours. Pour ce qui est de la durée moyenne du cycle complet, elle est de 41,50 jours.

Durant l'incubation, les œufs changent de couleur allant de la coloration blanchâtre vers le jaune puis redeviennent rose juste avant leur éclosion, alors que Doumandji (1981), rapporte que les œufs fraîchement pondus sont blancs et virent vers le rose après 24 heures. La durée d'incubation des œufs (03 jours) est probablement influencée par les conditions d'élevage (T= 27±1 °C et H= 65 %), les résultats obtenus sont proches des résultats de Wertheimer (1958) et Lepigre (1963), avec une durée d'incubation de 3 à 7 jours. Le Berre (1978) et Dhouibi (1982), ont montré que sous une température de 27 °C et une humidité relative de 70 %, la durée d'incubation des œufs de *E.ceratoniae* varie de 3 à 4 jours. Egalement, Zouioueche (2012) rapporte que la durée moyenne d'incubation est de 3 jours en milieu artificiel ou naturel.

Toutefois, nous avons relevé une durée moyenne peu longue des stades larvaires (L_1à L_5), due probablement au comportement des larves qui tissent des cocons en se comportant comme si elles se trouveraient à l'intérieur de la datte, cela peut influer la vitesse de développement et le passage d'un stade à un autre. De même, Djeblahi et Serraye (2010), ont montré que la durée de développement des stades larvaires est de 27,84 jours chez la variété Deglet Nour. La durée moyenne du cycle biologique de *E.ceratoniae* semble être sous influence de la température de la chambre d'élevage (T= 27 ±1°C) et la qualité nutritive de l'alimentation ingérée (la farine de la Mech Degla). En effet, Tokmakoglu et *al.* (1967 in Doumandji, 1981), ont montré que la période nécessaire pour qu'un individu arrive au terme de son développement (pour boucler le cycle entier), varie le plus fréquemment entre 40 et 45 jours.

3.2. Cycle biologique et taux de parasitisme de *B. hebetor*

Le cycle biologique de *B. hebetor*, de la ponte jusqu'à l'émergence des adultes (Tableau 2) montre que la durée moyenne d'incubation des œufs de *B. hebetor* dure 02,11 jours, tandis que la durée moyenne des stades larvaires (L_1-L_3) est de 07,11jours. Enfin, concernant le stade chrysalide, sa durée moyenne est 03,38 jours. Le suivi du cycle de vie de *B. hebetor* dans les conditions contrôlées (T= 28 à 29 °C), nous a permis de trouver que la durée totale du cycle biologique du parasitoïde *B. hebetor*, variait entre 13 et 15 jours avec une moyenne de 13,83 jours. Il est vrai semblable que nos résultats concordent avec ceux de Djoghma et Meghezi bekhouche (2011) et Mezroua (2012).

Tableau 2. Durée moyenne des différents stades du cycle biologique de *B. hebetor*

Stade	Ponte-Eclosion	stades larvaires	Chrysalide	Cycle total
Durée (jours)	02,11	07,11	03,38	13,83

Le comportement parasitaire de *B.hebetor* sur les chenilles de la pyrale des dattes (Tableau 3), a montré que les larves exposées à un couple de *B.hebetor* ont été toutes éliminées pour les 3 essais de larves et quelque soit la répétition. Il ressort ainsi une efficacité importante du parasitoïde sur les chenilles âgées de L_4 et L_5.

Tableau 3. Taux de parasitisme de *B.hebetor* sur *E.ceratoniae*

Essais de larves de la pyrale des dattes	Répétition	Larves parasitées	Nombre de larves de *B.hebetor*	Nombre des émergences de *B.hebetor*	Nombre de larves mortes de la pyrale de dattes	Taux de parasitisme (%)
10	R1	3	10	10	10	100
	R2	3	15	15	10	100
	R3	5	12	10	10	100
	R4	2	20	20	10	100
	R5	3	21	21	10	100
	R6	5	17	17	10	100
15	R1	7	11	11	15	100
	R2	5	13	13	15	100
	R3	10	10	10	15	100
	R4	5	5	5	15	100
	R5	4	4	4	15	100
	R6	6	6	6	15	100
20	R1	7	29	28	20	100
	R2	11	44	43	20	100
	R3	10	20	20	20	100
	R4	0	0	0	20	100
	R5	9	35	34	20	100
	R6	11	37	37	20	100

Diéme (1986), révèle qu'une femelle de *B.hebetor* pouvait déposer ses pontes sur un nombre de chenilles variant de 1 à 21. Contrairement Hamadane (1979) rapporte que plus le nombre des larves de la pyrale des dattes est important, la fécondité et la fertilité de *B.hebetor* s'affaiblissent et le taux de parasitisme diminue. De même, Diéme (1986), indique que l'insecte règle le nombre d'œufs déposés en fonction de la quantité de nourriture disponible. D'autre part, Matallah (2011) rapporte que le niveau du parasitisme de *B.hebetor* dans les dattes véreuses varie de 1 à 2 larves, cette variation est influencée par la difficulté de la pénétration des femelles du parasitoïde à l'intérieur des dattes atteintes.

3.3. Cycle biologique et taux de parasitisme de *P. flavistastacea*

La durée des différents stades du cycle biologique de *P.flavistastacea* (Tableau 4), montre que la durée de vie endoparasite est de 32 jours, la durée de prénymphose est de 3 jours. Pour ce qui est de la durée du stade chrysalide, elle est de 12 jours et enfin la durée totale du cycle enregistre 47 jours.

Tableau 4. Cycle biologique de *P.flavistastacea*

Phase du cycle	Durée de vie endoparasite	Durée de prénymphose	Chrysalides	Durée totale des phases
Durée (jours)	32	3	12	47

Selon Djoghma et Meghezi bekhouche (2011), il est cité que la durée de vie endoparasite des *Phanerotoma* oscille entre 31 à 38 jours avec une moyenne de (33,16±1,54) jours, quant à la

prénymphose, elle est de 3 à 4 jours avec une moyenne de (3,33±0,44) jours. Les mêmes auteurs signalent que la durée de chrysalide est de 11 à 14 jours avec une moyenne de (12,16±1,14) jours et quant à la durée totale du cycle, elle est en moyenne de (48,83±2,47) jours. Cette durée parait assez longue ce qui peut inhiber l'activité de l'auxiliaire vis-à-vis de l'action du parasite.

L'étude du taux de parasitisme de *P.flavitestacea* sur les œufs de son hôte en l'occurrence *E.ceratoniae* (Tableau 5), montre que le taux moyen de parasitisme le plus faible est de 33,11% pour les essais de 30 œufs de *E.ceratoniae* bien que le taux moyen de parasitisme le plus élevé soit noté chez les essais de 10 œufs où il atteint son maximum avec 61%. Il est à signaler que plus le nombre d'œufs de la pyrale des dattes est augmenté pour un couple de *Phanerotoma* et plus le taux de parasitisme moyen des œufs devient faible. Tandis qu'il a été observé que les chenilles parasitées sur une seule répétition de l'essai de 20 œufs, dont le nombre des chenilles parasitées est de 05 par rapport à 14 œufs parasités. Cette diminution du taux de parasitisme de *P. flavitestacea* sur les œufs et la larve d'*E. ceratoniae,* fût mentionnée indirectement par Doumandji-Mitiche (1983) où il est mentionné que le parasitisme des dattes entreposées par *P. flavitestacea* parait inefficace.

Tableau 5. Taux de parasitisme de *P.flavitestacea* sur les œufs de son hôte

Essais d'œufs de la pyrale des dattes	Répétition	Nombre d'œufs parasités	Nombre de larves parasitées	Nombre des émergences	Nombre de larves vivantes de la pyrale de dattes	Taux de parasitisme (%)	Moyenne
10	R1	5	0	0	1	55,55	61,00
	R2	4	0	0	2	40	
	R3	7	0	0	0	70	
	R4	8	0	0	0	80	
	R5	9	0	0	0	90	
	R6	3	0	0	0	30	
20	R1	13	0	0	3	65	60,00
	R2	12	0	0	5	60	
	R3	14	5	4	2	70	
	R4	11	0	0	0	55	
	R5	12	0	0	3	60	
	R6	10	0	0	1	50	
30	R1	9	0	0	5	30	33,11
	R2	8	0	0	2	26	
	R3	12	0	0	1	40	
	R4	11	0	0	0	36	
	R5	10	0	0	6	33,33	
	R6	10	0	0	0	33,33	

3.4. Etude comparative entre les deux parasitoïdes

Les résultats de la comparaison de l'efficacité des deux parasitoïdes montrés par l'analyse de la variance (Tableau 6), ont révélé qu'il existe une différence hautement significative P=0,0001 entre le taux de parasitisme des deux auxiliaires. En effet, le classement des moyennes en fonction des parasitoïdes révèle que la plus importante moyenne de taux de parasitisme est enregistrée chez *B. hebetor*.

Tableau 6 : Analyse de variance de l'efficacité des deux parasitoïdes utilisés

Facteur : Parasitoïdes	Moyennes	Ecart type	Groupe homogène	Test Fisher	Probabilité	Signification
B. hebetor	100,000	0,000	A	119,222	0, 0001	Très hautement significatif
P. flavitestacea	51,345	18,905	B			

L'observation du taux de parasitisme élevé chez *B. hebetor* peut être expliqué par la spécificité de ce parasitoïde qui se rencontre dans les lieux des dattes entreposées et stockées, où Doumandji–Mitiche (1983), affirme que *B.hebetor* se multiplie habituellement dans les lieux de stockage. La présence des larves et des cocons de nymphose de *B.hebetor* sur les chenilles de pyralidés dans les dattes trouvées sur le sol met en évidence les grandes capacités d'adaptation de ce parasite et sa voracité distinguée aux chenilles de la pyrale des dattes. Concernant l'auxiliaire *P.flavitestacea*, Doumandji–Mitiche (1983) signale qu'il présente un taux de parasitisme très faible dans les lieux de stockage. Ce même auteur précise que le taux de chenilles parasitées par *P.flavitestacea* dans les dattes entreposées varie de 24,1 à 32,1% pour la variété Dgoul. Ces fruits étaient destinés pour l'alimentation du bétail et il est possible qu'ils contiennent un grand nombre des dattes tombées trop tôt au sol avant la récolte et avant l'installation du braconide ovo-larvaire sur les palmiers.

4. CONCLUSION

L'étude comparative des deux parasitoïdes (*B.hebetor* et *P.flavitestacea*) en conditions contrôlées, entreprise sur l'élevage de l'hôte: *E.ceratoniae*, qui a constitué un support de vie pour les deux parasitoïdes, a montré que *B. hebetor* semble le plus efficace pour lutter contre la pyrale des dattes. Il a donnée une durée du cycle de 13,83 jours en moyenne avec un taux de parasitisme maximal au dernier stade larvaire avec 100% d'efficacité. Par contre le cycle de vie de *P. flavitestacea* a présenté une durée de 47 jours et une moyenne du taux de parasitisme voisine des 50%. Ce ci laisse déduire que le premier parasitoïde parait le plus vorace et le plus performant pour les dattes entreposées dans les aires de stockage et les denrées stockées. Les résultats de ces essais vont permettre d'affiner la stratégie de lutte contre la pyrale des dattes et devraient permettre la réduction du niveau d'infestation tout en envisageant l'utilisation des auxiliaires autochtones pour une lutte biologique à grande échelle.

REFERENCES

- Belguedj M, Salhi A, Matallah S. 2008. Diagnostic rapide d'une région agricole dans le Sahara Algérien, Axes de recherche/développement prioritaires : cas de la région des Ziban (Biskra). INRAA, Alger, 8 p.
- Benzioueche SE, Chehat F. 2010. La conduite du palmier dattier dans les palmeraies des Ziban (Algérie) quelques éléments d'analyse. *European Journal of Scientific Research*, 42(4), 630-646.
- Dhouibi MH. 1982. Bio-écologie d'*Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera, Pyralidea). *INRAT, Tunis*, Vol 55, 48 p.
- Diéme E. 1986. Etude biologique au laboratoire de *Bracon hebetor* Say. Projet CILSS de Lutte Intégrée, Sénégal, 1-30 p.
- Djeblahi AH et Serraye N. 2010. Étude du niveau d'infestation par la pyrale des dattes *Ectomyelois ceratoniae* Zeller., 1839 (Lepidoptera, Pyralidae) sur trois variétés de datte (Deglet Nour, Mech Degla et Ghars), sa dynamique de population et essai de lutte intégrée dans la région de Biskra. Mémoire d'ingénieur en sciences agronomique, Université de Biskra, Biskra, 45 p.
- Djoghma A., Meghezi bekhouche N. 2011. Essai d'élevage de deux auxiliaires (*Bracon hebetor* Say.) et (*Phanerotoma flavitestacea* Fisch.) de la pyrale des dattes (*Ectomyelois ceratoniae* Zell.) dans les conditions controlées. Mémoire d'ingénieur en sciences agronomique, Université de Biskra, Biskra 70p.

- Doumandji S., 1981. Biologie et écologie de la pyrale des caroubes dans l'Algérie *Ectomyelois ceratonia* Zeller (Lepidoptera, pyralidae). Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie. Paris VI, 145 p.
- Doumandji-Mitiche B. 1983 - Contribution à l'étude bio-écologique des parasites et prédateurs de la pyrale des caroubes *Ectomyelois ceratoniae* en Algérie en vue d'une éventuelle lutte biologique contre ce ravageur. Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie. Paris VI.
- Hamadane S. 1979. Parasitisme des pyrales de denrées stockées par *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera, Braconidae). Mémoire d'ingénieur en sciences agronomique, INA, El harrach, Alger, 82 p.
- Le Berre M. 1978. Mise au point sur le problème du ver de la datte, *Myelois ceratoniae. Bull. Agr. Sahar.*, 1(4) : 1-35.
- Lepigre A. 1963. Essais de lutte sur l'arbre contre la pyrale des dattes (*Myelois ceratoniae* Zeller – (Pyralidae). *Annales Epiphyties*, 14 (2), 85-105.
- Matallah N. 2011. Etude des paramètres bioécologiques de la pyrale des dattes (*Apomyelois ceratoniae* Zeller, 1839) dans la région des Ziban et essai de lutte biologique dans les conditions contrôlée. Mémoire d'ingénieur en sciences agronomique, Université de Biskra, Biskra, 79p.
- Mezroua A. 2012. Tentative d'une lutte biologique contre la pyrale des dattes *Apomyelois ceratoniae* Zeller par l'utilisation des auxiliaires autochtones *Phanerotoma flavistestacae Fischer et Bracon hebetor Say*. Mémoire d'ingénieur en sciences agronomique, Université de Biskra, Biskra, 45p.
- Messak MR, Nezzar-kebaili N, Ababsa F. 2008. Compétitivité de la filière dattes en Algérie entre le potentiel avéré et l'impuissance constatée. *INRAA, Prospectives agricoles* N°3, Alger, 20p.
- Wertheimer M. 1958. Un des principaux parasites du palmier dattier Algérien : le *Myelois decolor*. *Revue Fruits*, 13(8), 109-123.
- Zouioueche FZ. 2012. Comportement de la pyrale des dattes *Ectomyelois ceratoniae* Zeller, vis-à-vis de trois variétés de palmier dattier dans la région de Biskra. Mémoire Magister en sciences agronomiques, Ecole nationale supérieure agronomique El-Harrach, Alger. 92p.

Rôle des sémiochimiques dans l'écologie comportementale chez Aphidius ervi

Sabrine Attia[1*], Hajer Sahraoui[2], Thierry Hance[3], Georges Lognay[4], KaoutharGrissa Lebdi[1]
[1]Département Santé Végétale et Environnement. Institut National Agronomique de Tunisie, (UR : Bio-agresseurs et lutte intégrée en agriculture). Tunis, Tunisia
[2]Centre Technique d'agrumes, Beni Khaled, Tunisia
[3]Earth and Life Institute, Biodiversity Research Centre, Université catholique de Louvain, 4-5, Place Croix du Sud, B- 1348 Louvain-la-Neuve, Belgium
[4] Université de Liège, Gembloux Agro-Bio Tech, Unité de Chimie Analytique, Passage des Déportés, 2, B-5030 Gembloux, Belgium
*EMail: sabine_bio5@yahoo.fr

RESUME
Les pucerons peuvent abriter une grande diversité de bactéries endosymbiotiques. Les endosymbiontes peuvent affecter le développement de l'hôte, sa nutrition, et peuvent induire une résistance aux parasitoïdes. Les endosymbiontes secondaires ne sont pas indispensables à la survie de l'hôte mais ils permettent d'accroître le fitness des pucerons dans des situations de stress. Tel est le cas de *Hamiltonelladefensa, Regiellainsecticola* et *Serratiasymbiotica*. Une attention toute particulière a été portée sur l'endosymbionte*S. symbiotica* en raison de son implication potentielle dans la résistance aux parasitoïdes. L'objectif de cette recherche est d'étudier la relation insectes-endosymbiontes, et plus précisément l'influence de *S. symbiotica* hébergée par le puceron *Acyrtosiphumpisum* Harris (Aphididae : Hémiptères) sur le taux de parasitisme.
Mots clés : *Acyrtosiphumpisum, Aphidius ervi, Serratiasymbiotica,* valeur adaptative, symbiontes.

1. INTRODUCTION

Les relations qu'entretiennent les insectes avec les bactéries endosymbiotiques constituent un élément clé dans l'explication de certains phénomènes écologiques, physiologiques et comportementaux. Chez les pucerons, les endosymbiontes primaires (Baumann 2005 ; Dale & Moran 2006; Moya*et al.* 2008 ; Moran *et al.* 2008; Clark *et al.*, 2010) sont des bactéries mutualistes indispensables à la survie de l'hôte et transmis de manière verticale (Moran *et al.* 2008), comme *Buchneraaphidicola*(Baumann *et al.* 1995). Cette bactérie subvient aux besoins de l'hôte en acides aminés essentiels que celui-ci est incapable de synthétiser à partir de la sève phloèmienne des plantes (Douglas, 1998; Bermingham& Wilkinson, 2010). Les endosymbiontes secondaires (Oliver *et al.* 2010) transmis à la fois de manière verticale et horizontale, ne sont pas indispensables à la survie de l'hôte mais ils permettent d'accroître l'aptitude phénotypique des pucerons dans des situations de stress (Baumann 2005, Moran *et al.* 2008). *Hamiltonelladefensa, Regiellainsecticola* confèrent aux pucerons une résistance aux parasitoïdes (Oliver *et al.* 2003 ; Oliver *et al.*, 2005 ; Guay *et al.*, 2009; Degnan*et al.*, 2009; Vorburger*et al.*, 2009; Vorburger*et al., 2010*; Oliver *et al.*,2010; Schmid *et al.*, 2012). *Serratiasymbiotica* semble quand à elle avoir un rôle dans la synthèse des acides aminés essentiels dans le cas ou *B. aphidicola* est incapable de le faire dans des situations de stress (Pérez-Brocal*et al.* 2006 ; Lamelas*et al.* 2008). Il a aussi été montré que *S. symbiotica*confère aux pucerons de pois *Acyrthosiphonpisum*Harris (une résistance aux parasitoïdes (Oliver *et al.*, 2003; Oliver 2005) une résistance au stress thermique (Montllor*et al.*, 2002 ; Russell & Moran, 2006; Oliver *et al.*, 2010).

Dans le cadre de cette étude, il s'agit d'étudier les relations insectes-endosymbiontes et plus particulièrement d'étudier le rôle de l'endosymbionte secondaire *Serratiasymbiotica* dans l'écologie comportementale chez le parasitoïde de pucerons *Aphidius ervi* en situation d'exploitation des agrégats d'hôtes.

2. RELATION INSECTES-ENDOSYMBIONTES

Bien que facultatifs, les endosymbiontes secondaires semblent avoir un rôle actif dans l'écologie comportementale chez les pucerons. Les pucerons étant intégrés au sein d'interactions multitrophiques complexes, il est donc attendu que la présence de bactéries endosymbiotiques influence aussi la dynamique des niveaux trophiques supérieurs. Par exemple, des études récentes ont montré que le comportement d'exploitation du parasitoïde est influencé par la présence de bactéries hébergées au sein des hôtes, comme *H. defensa* (Oliver *et al.*, 2012).

Attia *et al.* (2016) ont comparé le taux de parasitisme de deux souches d'*A. pisum* venant de deux régions différentes des Etats-Unis (Madison et Tucson) par rapport à un témoin de même génotype. Les femelles parasitoïdes utilisées pour les expériences ont été âgées de 3-4 jours et sont vraisemblablement accouplées après 24 heures après leur éclosion.

Chaque femelle a été placée dans la cage contenant un plant infesté durant 6 heures pour chaque traitement, de manière aléatoire (infecté par *S. symbiotica* et non infecté par *S. symbiotica*). Après 10 jours, le nombre de momies présents dans chacune des cages a été compté pour déterminer le taux de parasitisme. Les résultats ont montré que les pucerons symbiotiques (infectés par *S. symbiotica*) perturbent l'exploitation des colonies par les parasitoïdes. Ceci se traduit par un taux de parasitisme plus élevé chez les souches aposymbiotiques et que les parasitoïdes fuient les pucerons infectés par *S. symbiotica* et sont attirés beaucoup plus par les pucerons non infectés par *S. symbiotica*. Ceci peut être expliqué par la présence des molécules volatiles libérées par les pucerons. La couleur semble aussi être un autre indice physique auquel la femelle parasitoïde peut répondre étant donné que le taux de parasitisme est plus élevé sur les pucerons verts venant de Tucson que sur les pucerons rouges venant de Madison (Attia*et al.* 2016).Des études qui ont été menées par (Oliver *et al.* 2010) ont montré que le puceron du pois possède un système immunitaire limité, son principal moyen de protection contre les parasitoïdes est donc apporté par les symbiotes ce qui explique la différence du taux de parasitisme observée par d'autres résultats. En effet, pour éviter le parasitisme, *A. pisum* présente des moyens de défenses comportementaux et physiologiques (immunité innée et présence d'un symbiote secondaire *S. symbiotica*). Une interaction négative a été mise en évidence entre ces comportements de défense et la résistance apportée par les symbiotes : les pucerons porteurs de *S. symbiotica* pour les deux souches (Madison et Tucson) se défendent moins et donc ont un niveau de parasitisme moins élevé. Par ailleurs ce taux différent peut être aussi expliqué par les stratégies d'attaques qui peuvent être sélectionnées chez les parasitoïdes. Plusieurs traits peuvent être observés chez la femelle : la recherche et la détection des hôtes (des pucerons plus disperses entrainent des concentrations moindres de composés volatiles attirant le parasitoïde), l'inspection des hôtes avant la piqure (évaluation des conditions physiologiques et du statut parasitaire des hôtes), ou l'oviposition elle-même.

Il est possible que la différence du taux de parasitisme pour les deux souches de pucerons venant de Madison et Tucson soit affectée par la couleur. La couleur est donc un indice physique auquel la femelle parasitoïde peut répondre (vert = Tucson, et rouge = Madison) (Attia *et al.* 2016). A ce facteur physique, s'ajoute bien évidemment des indices chimiques qui apportent aux parasitoïdes des informations sur la qualité des hôtes.

Ces résultats sont en accord avec les travaux d'Oliver *et al.* (2003) et Dion *et al.* (2011, 2012)qui ont montré que le taux de parasitisme est plus élevé chez les pucerons non infectés que les pucerons infectés par *H. defensa*. Cependant, la bactérie *H. defensa* fournit à *A. pisum* une protection aux parasitoïdes *A.ervi* et *A. eadyi*, ce qui peut entrainer un niveau de résistance très élevé chez certains clones(Oliver *et al.*, 2003, 2005).

3. RÔLE DES SÉMIOCHIMIQUES DANS LA RELATION INSECTES-ENDOSYMBIONTES

La différence de taux de parasitisme observé, peut aussi être expliquée par des sémio-chimiques qui peuvent être libérés par *S. symbiotica* chez les pucerons symbiotiques et qui peuvent avoir un effet répulsif pour les parasitoïdes ou un effet négatif sur le développement des momies.

Par suite, les processus de reconnaissance chimique de l'hôte sont particulièrement mal compris chez les parasitoïdes de pucerons. Or plusieurs études suggèrent l'occurrence de facteurs chimiques à action kairomonale. Cependant, ces études n'apportent pas d'informations sur l'intervention des endosymbiontes secondaires présents chez les pucerons pour la reconnaissance de l'hôte chez le parasitoïde. D'autres études ont montré que le parasitoïde *A. ervi* à une capacité à identifier différents signaux phéromonaux et à produire un comportement d'attraction en olfactomètre (Attia *et al.* Travail non publié). Les résultats du comportement d'orientation olfactive montre que les pucerons aposymbiotiques (non infectés par *S. symbiotica*) attirent le parasitoïde *A. ervi* beaucoup plus que les pucerons symbiotiques (infectés par *S. symbiotica*). Ce qui permet de penser qu'il y a des odeurs qui sont mis en jeu assurant l'attraction (aposymbiotiques) ou la répulsion du parasitoïde (symbiotiques). L'expérience avec l'olfactomètre permet d'obtenir une attraction marquée. Les parasitoïdes femelles reconnaissent l'odeur des pucerons, qui peut agir comme un signal assurant l'orientation du parasitoïde. Ceci tend à démontrer qu'à faible distance, l'odeur d'un puceron que ce soit symbiotique ou aposymbiotique est un indice pertinent pour s'orienter.

Chez les insectes parasitoïdes, il existe un lien étroit entre comportements de recherche et de reconnaissance de l'hôte. D'autres travaux ont porté sur des aspects d'écologie comportementale s'attachant aux conséquences évolutives et aux mécanismes explicatifs.

4. CONCLUSION

Cet article a permis la mise en évidence d'aspects spécifiques de l'interaction *A. pisum-A ervi*, et a ouvert de nombreuses perspectives de recherches permettant d'identifier le fonctionnement des populations de parasitoïdes, en fonction des caractéristiques de leurs hôtes. Compte tenu de cette recherche bibliographique, une analyse chimique des extraits de pucerons doit être réalisée sur des pucerons d'âges déterminés (L3). Ce qui va nous permettre de comprendre le rôle de *S. symbiotica* dans l'écologie chimique et comportementale chez *A. pisum*.

REFERENCES

- Attia S., Louâpre P., Heuskin S., Foray V., Lognay G., Hanc T. (2016). Influence of the secondary endosymbiont *SerratiaSymbiotica* on the resistance to the parasitism in the aphid *AcyrthosiphonpisumJ. Entomol. Zool. Stud,* 4: 123-126.
- Baumann P. (2005). Biology of Bacteriocyte-Associated Endosymbionts of Plant Sap-Sucking Insects.*Annu. Rev. Microbiol*, 59:155-189.
- Baumann P., Baumann L., Lai C. Y., Rouhbakhsh D., Moran N. A., Clark M. A. (1995). Genetics, physiology, and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*: intracellular symbionts of aphids. *Annu Rev Microbiol.* 49:55-94.
- Clark E.L., J. K. Alison, Hubbard S.F. (2010). Insect endosymbionts: manipulators of insect herbivore trophic interactions? *Protoplasma*. 244: 25-51.
- Bermingham J., Wilkinson T.L., 2010. The role of intracellular symbiotic bacteria in the amino acid nutrition of embryos from the black bean aphid, *Aphis fabae*. *Entomol. Exp. Appl.,* 134, 272–279.
-Dale C., Moran N.A. (2006). Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts. *Cell.* 1:453-465.
- Degnan P.H., Yu Y., Sisneros, N., Wing R.A., Moran N.A. (2009). *Hamiltonelladefensa,* genome evolution of a protective bacterial endosymbiont from pathogenic ancestors*. Proc. Natl. Acad. Sci,*106, 9063–9068.

- Douglas A.E. (1998). Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera.Annu. Rev. Entomol*., 43, 17:37.
- Dion E., Zele F., Simon J.C. Outreman Y. (2011).Rapid evolution of parasitoids when faced with the symbiont-mediated resistance of their hosts. *J. Evol. Biol.*, 24, 741-750.
- Dion E., Polin S.E., Simon J.C., Outreman Y. (2012). Symbiont infection affects aphid defensive behaviours. *Biology Letters*. doi: 10.1098/rsbl.2011.0249
- Guay J.-F., Boudreault S., Michaud D., Cloutier C. (2009). Impact of environmental stress on aphid clonal resistance to parasitoids: Role of *Hamiltonelladefensa*bacterial symbiosis in association with a new facultative symbiont of the pea aphid. *J. Insect Physiol*, 55: 919–926.
- Lamelas A., Pérez-Brocal V., Gomez-Valero L., Gosalbes M.J., Moya A., Latorre A., (2008). Evolution of the Secondary Symbiont "*CandidatusSerratiaSymbiotica*" in Aphid Species of the Subfamily Lachninae. *App. Env. Microbiology*, 4236–4240;
- Montllor C.B., Maxmen A., Purcell A.H. (2002). Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrthosiphonpisum*under heat stress. *Ecological Entomology*, 27 (2), 189–195.
- Moran N.A., McCutcheon J.P. andNakabachi A. (2008) Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annu. Rev. Genet*., 42, 165-190.
- Moya A., Pereto J., Gil R., Latorre A. (2008). Learning how to live together: genomic insights into prokaryote-animal symbioses. *Nat. Rev. Genet*., 9, 218-229.
- Oliver K.M., Russell J.A., Moran N.A., Hunter M. S.(2003). Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. PNAS, 100, 1803–1807.
- Oliver K.M. (2005). The role of pea aphid bacterial symbionts in resistance to parasitism.For the Degree of Doctor of Philosophy In the graduate college the University of Arizona.152 p.
- Oliver K.M., Degnan P.H., Burke G.R., Moran N.A. (2010). Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits. *Ann. Rev. Entomol*, 55, 247-266.
- Oliver K. M., Noge K., Huang E. M., Campos J. M., Becerra J. X. and Hunter M.S.(2012). Parasitic wasp responses to symbiont-based defense in aphids. *BMC Biology*. http://www.biomedcentral.com/1741-7007/10/11.
- Schmid M., Sieber R., Zimmermann Y.S. Vorburger C. (2012).Development, specificity and sublethal effects of symbiont-conferred resistance to parasitoids in aphids. *Functional Ecology*, 26, 207–215.
- Pérez-Brocal V., GilR., Ramos S., Lamelas A., Postigo M., Michelena J. M., Silva F.J., Moya A., Latorre A. (2006). A Small Microbial Genome: The End of a Long Symbiotic Relationship? *Science*,13, 312-313.
- Russell J.A., Moran N.A. (2006). Costs and benefits of symbiont infection in aphids: variation among symbionts and across temperatures. *Proc. R. Soc*. B, 273, 603-610.
- Vorburger C., Sandrock C., Gouskov A., Castaneda L.E., Ferrari J. (2009).Genotypic variation and the role of defensive endosymbionts in an all-parthenogenetic host–parasitoid interaction.The Society for the Study of Evolution. *Evolution, 63-6, 1439-1450.*
- Vorburger C., Gehrer L., Rodriguez P. (2010). A strain of the bacterial symbiont *Regiellainsecticola* protects aphids against parasitoids. *Biology Letters*, 6, 109-111.

Bio-acaricidal activity of four extracts of *Salvia officinalis* against the two spotted spider mite *Tetranychus urticae* (Koch) (Acari: Tetranychidae)

Sahraoui Hajer1, Attia Sabrine[2], Othman Hafed[3], Rezgui Tarek[3], Jridi Mourad[3], Lebdi-Grissa Kaouther[2]

[1]Centre Technique des Agrumes, Beni Khalled, Tunisie

[2]Laboratoire de Recherche : Bio-agresseurs et lutte intégrée en agriculture, Institut National Agronomique de Tunisie, Université de Carthage, Tunisie

[3]Institut Supérieur de Biotechnologie de Béja, Tunisie

Email: hajersahraoui@yahoo.fr

SUMMARY

The intensive use of synthetic pesticides to control pests in Tunisia has led to the development of resistance and appearance of new key pests that were previously considered secondary, such as mites. To overcome this problem, specialists are constantly exploring new acaricides, specially based on plant extracts. The objective of this work is to evaluate the acaricidal contact properties of four different extracts of the Lamiaceae plant *Salvia officinalis* such as: essential oil, hydrosol and ethanoic and aqueous extracts against the two spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch, one of the key pests of many crops in Tunisia. Our results showed acaricidal activity of the different extracts used in this study. Hydrosol showed 100% mortality of the *T. urticae* females when applied in its raw state. No significant difference between aqueous and ethanoic extracts was observed, with 91% and 85% of mortality observed respectively at the dose 5%. The essential oil of *S. officinalis* caused 83% of mortality at the dose of 2%.

Key words: *Salvia officinalis,* essential oil, hydrosol, ethanoic extract, aqueous extract, *Tetranychus urticae.*

RESUME

L'utilisation intensive des pesticides de synthèse pour lutter contre les ravageurs en Tunisie a conduit au développement de résistances et à l'apparition de nouveaux ravageurs primaires auparavant considérés comme secondaires, tels que les acariens. Pour surmonter ce problème, les chercheurs explorent en permanence de nouveaux acaricides, basés notamment sur des extraits de plantes. L'objectif de ce travail est d'évaluer les propriétés acaricide de quatre différents extraits de la plante *Salvia officinalis* (Lamiaceae): l'huile essentielle, l'eau florale et les extraits éthanoïques et aqueux, contre l'acarien tétranyque *Tetranychus urticae* Koch, un des principaux ravageurs inféodés à de nombreuses cultures en Tunisie. Nos résultats ont montré une activité acaricide significative des différents extraits testés. L'eau florale a causée une mortalité de 100% chez les femelles de *T. urticae* lorsqu'elle était appliquée à l'état brut. Aucune différence significative entre les extraits aqueux et éthanoïques n'a été observée avec les doses testées, avec respectivement 91% et 85% de mortalité observée à la dose de 5%. L'huile essentielle de *S. officinalis* a causé 83% de mortalité à la dose de 2%.

Mots-clés: *Salvia officinalis,* Huile essentielle, eau florale, extrait éthanoïque, extrait aqueux, *Tetranychus urticae.*

1. INTRODUCTION

The two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) is a worldwide pest, causing important damages on many greenhouse and open field crops (Bolland *et al.,* 1998; Attia *et al.*, 2013; Migeon & Dorkeld, 2019). This pest is characterized by its ability to rapidly develop resistance to pesticides (Van Leeuwen et *al.*, 2010; Vassiliou & Kitsis, 2013; Xu et *al.*, 2018). In this

respect, it is important to develop new sustainable control strategies against spider mites populations with minimum use of synthetic insecticides. Research efforts have focused on the use of plant extracts with pest population suppressing properties as an alternative approach.

Plants of the Lamiaceae family have been described to be rich in essential oil. Extracts of many species belonging to this family have been tested to control spider mites especially essential oils (Calmasur et *al.*, 2006; Miresmailli & Isman, 2006; Mozaffari et *al.*, 2012; Attia et *al.*, 2013; Laborda et *al.*, 2013, 2018). At lesser extent, acarcidal effects of other extracts, such as ethanoic or aqueous extracts were tested most of them with encouraging results (Rasikari et *al.*, 2005; Mozaffari et *al.*, 2012; Salman et *al.*, 2014).

Economically, the availability and cost of natural extracts should be considered. Currently, essential oils can be used only for high value products (Regnault-Roger, 2012).

Hydrosols or "floral water" are produced as by-product after the essential oils extraction process. Hydrosols are produced in a high amount and at very low cost. Their effects on crop pests have been little studied, although recent studies have shown their insecticidal and acaricidal properties against aphids and mites (Traka et *al.*, 2018; Petrakis et *al.*, 2015; Zekri et *al.*, 2015). The possible use of hydrosols in pest control can be promising due to their low cost.

The objective of the study is to evaluate the acaricidal properties of four different extracts such as essential oil, hydrosol, ethanoic and aqueous extracts of *Salvia officinalis*: against the two spotted spider mite *T. urticae*, one of the most important enemies of various crops in Tunisia.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Extraction

Dried sample of *S. officinalis* (200g) was subjected to hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus. The hydrosol and essential oil produced were collected and kept in sterile bottles at 4°C until further use. Ethanoic extract is obtained by agitation of powdered aerial parts (20g) in Shaker for 24 h in 100 ml of ethanol, filtration then exposure to a temperature of 70°C. Aqueous extract is obtained by agitation of powdered aerial parts (50g) in Shaker for 24h in 500 ml of distilled water then filtation. A 1:100 stock solution was used for the essential oil and the aqueous and ethanoic extracts.

2.2. Mite rearing

T. urticae population was reared on citrus plants and maintained under controlled conditions at 27 ± 1°C, 65 ± 5% RH and 16:8 hr (L:D) photoperiod in the insectary of the Citrus Technical Center. The host plants were grown without the use of chemicals inside an air-conditioned glasshouse, under natural daylight.

The effect of the four extracts on the survival of *T. urticae* adult females was investigated in the laboratory conditions with the following doses: [10%, 17%, 33%, 67% and 100% (raw state)] for the hydrosols; [0.2%, 0.3%, 0.5%, 1% and 2%] for the essential oil and [0.5%, 1%, 2% and 5%] for the ethanoic and aqueous extracts.

2.3. *In vitro* tests

Fertilized females of *T. urticae* were transferred to inverted citrus leaves in Petri dishes (14 cm diameter). Underneath each leaf, water-imbued cotton was used so as to sustain the leaf's turgidity. The dishes containing the adults were kept in a chamber under controlled conditions with 27± 1°C, 65 ± 5% RH and 16:8 hr (L:D) photoperiod.

For each dose and extract, 100 age-synchronized 1-day- old fertilized females were sprayed till run-off using an atomizer and mortality was observed after 72h. Distilled water was used as control. The leaves are examined under a binocular loupe, the reading is performed after 24, 48 and 72 hours and the number of dead mites was recorded and the mortality rates were calculated compared with the control.

2.4. Statistical analysis

For each concentration, we calculated the corrected mortality rate (mean number of deaths post-treatment minus the mean number of deaths in the control) divided by the total number of females (100 females). Each treatment was repeated 4 times (25 females for each repetition) and the mean of the number of deaths was calculated from the 4 repetitions. Probit analysis was used to determine the LC50 and LC90 values using the Stat plus program version 2009, Analyst Soft Inc.

ANOVA tests with the level of statistical significance level, test $p < 0.50$ were carried out to compare the effects of ethanoic and aqueous extracts at the same doses using the statistical STATGRAPHICS Centurion XV version 15.1.02.

3. RESULTS AND DISCUSSION

After 72 hours, a few mortalities in the control group were observed; the corrected mortality rates of females treated with the *S. officinalis* essential oil are shown in Figure 1. Mortality rates increased with increasing concentrations of *S. officinalis* essential oil. At the concentrations of 0.57% (LC50) and 2.139% (LC90), 50% and 90% of *T. urticae* adults were killed after 72 hours respectively. Comparing the present results with some of those reported in the literature for the same pest and extract, Laborda et *al.* (2013) showed that the *S. officinalis* essential oil at the doses 0.1% and 0.25% caused 90% and 100% of mortality of *T. urticae* females, respectively.

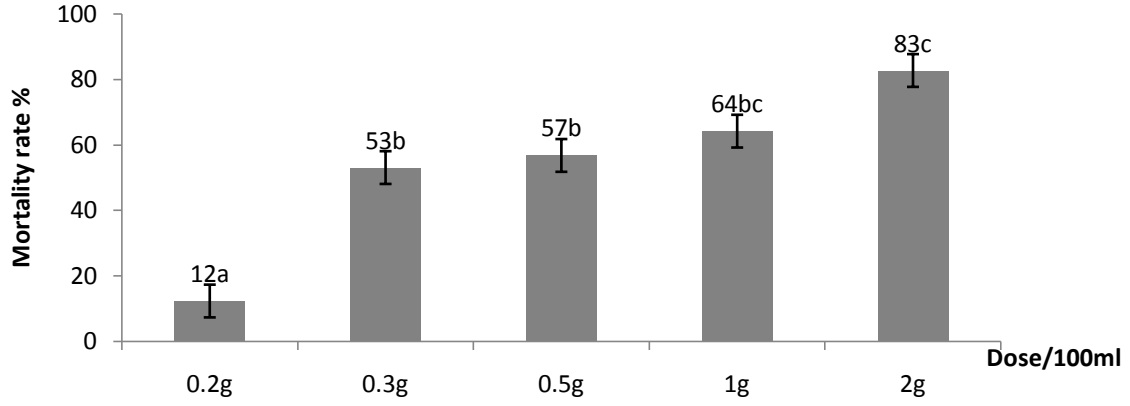


Figure 1. Mortality rates of *T. urticae* reported 72 hours after essential oil treatment. (Different letters indicate significant differences)

The effect the aqueous and the ethanoic extracts of *S. officinalis* on the mortality rates of *T. urticae* are demonstrated in Figure 2. No significant difference occurred between the mortality rates of the two extracts for the same doses (p >0.05). The LC50 and LC90 were 1.81% and 5.52 % respectively for the ethanoic extract; and 2.21% and 4.89% for the aqueous extract respectively. The acaricidal effect of different concentrations of methanolic extracts of *S. officinalis* on *T. urticae* females was tested by Salman et *al.* (2014). Results showed that at the dose 12%, mortality rate was 65.4% after 3 days.

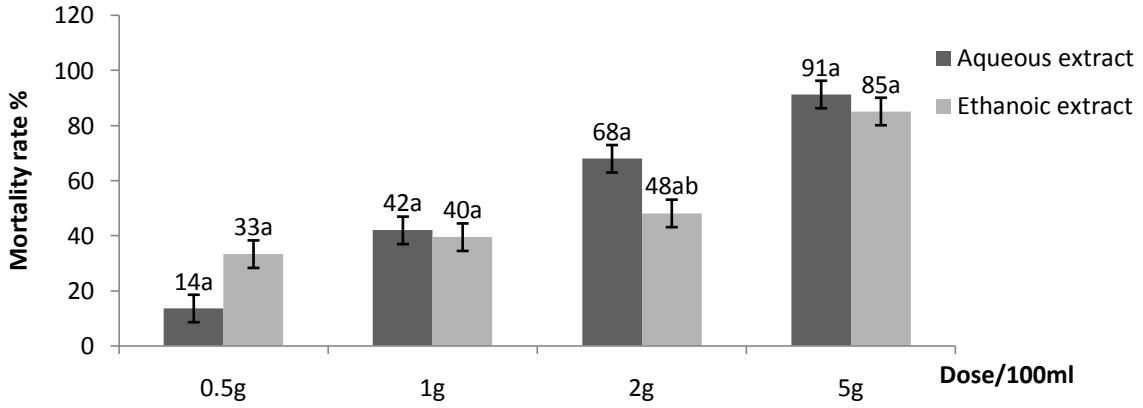


Figure 2. Mortality rates of *T. urticae* reported 72 hours after ethanoic and aqueous extracts treatments. (Different letters indicate significant differences)

The mortality of *T. urticae* females after treated with hydrosol is shown in figure 3. The hydrosol caused 100% mortality at its row state; the control with distilled water did not cause any mortality. Hydrosols of **Mentha pulegium** L. and **Mentha suaveolens** Ehrh. were tested on citrus aphid **Toxoptera aurantii** (Aphididae) by Zekri et *al.* (2015), results showed a high insecticidal effect of the two hydrosols. Traka et *al.* (2018) found that the hydrosol of *Ocimum basilicum* and *Ruta chalepensis* caused significant mortality rates, which fluctuated between 46.0% and 64.0%.
All extracts tested were toxic to *T. uticae*. Toxicity varied depending on the doses applied and the extract. The essential oil was highly toxic to the *T. urticae* females as demonstrated by the lowest concentration required for 50% population mortality (LC50 = 0.57%), followed by ethanoic and aqueous extracts with the LC50 of 1.81% and 2.21% respectively.

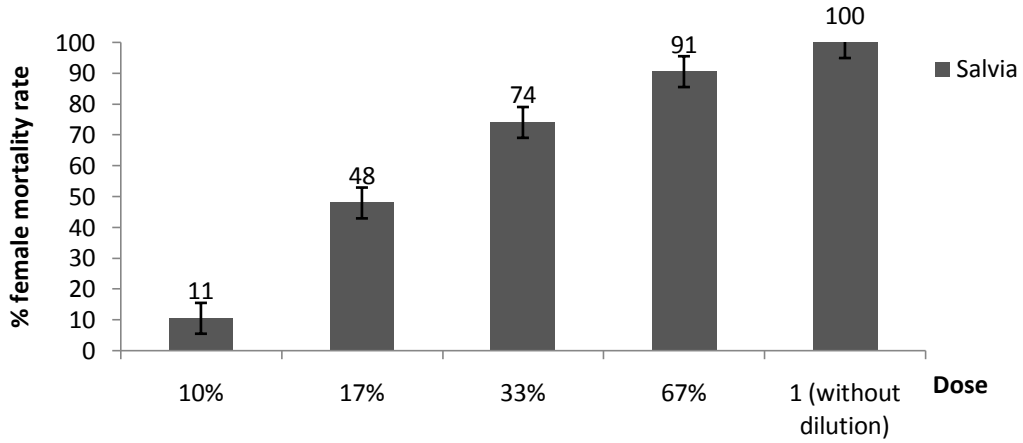


Figure 3. Mortality rates of *T. urticae* reported 72 hours after the hydrosol treatment.

4. CONCLUSION

All extracts tested were toxic to *T. urticae* females. Results showed that there is no significant difference between the toxicity of aqueous and ethanoic extracts at the same doses. The hydosol was toxic toward *T. urticae* females, with 100 % of mortality caused when applied in its raw state. The results suggest that the four extracts of *S. officinalis* have the potential to be employed in the pest management programs designed for a control of *T. urticae*. The potential of hydrosols as inexpensive and harmless alternatives to synthetic pesticides is worth further evaluation.

REFERENCES

- Attia S, Lebdi Grissa K, Lognay G, Bitume E, Hance T, Mailleux AC. (2013). A review of the major biological approaches to control the worldwide pest *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) with special reference to natural pesticides. Biological approaches to control *Tetranychus urticae. Journal of Pest Science*, 86 (3), 361–386.
- Bolland H, Gutierrez J, Fletchmann C. (1998). World catalogue of the spider mite family (Acari: Tetranychidae). Koninklijke Brill NV, Leiden. 380pp
- Calmasur O, Aslan I, Sahin F. (2006). Insecticidal and acaricidal effect of three Lamiaceae plant essential oils against *Tetranychus urticae* Koch and *Bemisia tabaci* Genn, *Industrial Crops and Products*, 23,140-146. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2005.05.003
- Laborda R, Manzano I, Gamon M, Gavidia I, Perez-Bermudez P, Boluda R. (2013). Effects of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* essential oils on *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Industrial Crops and Products*, 48, 106-110, doi: 10.1016/j.indcrop.2013.04.011
- Laborda R, Manzano I, Gamon M, Gavidia I, Boluda R, Perez-Bermudez P. (2018). Spike Lavender essential oil reduces the survival rate and fecundity of Two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Agricultural Science and Technology*, 20(5), 1013-1023
- Mozaffari F, Abbasipour H, Garjan AS, Saboori AR, Mahmoudvand M. (2012). Various effects of ethanolic extract of *Mentha pulegiumon* the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Tetranychidae). *Archives of phytopathology and plant protection*, 45(11), 1347–1355. doi:10.1080/03235408.2012.674708
- Migeon A., Dorkeld F. (2019). Spider Mites Web: a comprehensive database for the Tetranychidae. Availabe from http://www.montpellier.inra.fr/CBGP/spmweb (Accessed 05/04/2019)
- Miresmailli S., Isman MB. (2006). Efficacy and persistence of Rosmary oil as an acaricide against two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae) on greenhouse tomato, *Ecotoxicology*, 99 (6), 2015-2023.
- Petrakis EA, Kimbaris AC, Lykouressis DP, Polissiou MG, Perdikis DC. (2015). Hydrosols evaluation in pest control: Insecticidal and settling inhibition potential against *Myzus persicae* (Sulzer). *Journal of Applied Entomology*, 139, 260–267. https://doi.org/10.1111/jen.12176
- Rasikari HL, Leach DN, Waterman PG, Spooner-hart RN, Basta AH, Banbury LK, Forster P.I. (2005). Acaricidal and cytotoxic activities of extracts from selected genera of Australian Lamiaceae. **Journal of Economic Entomology**, 98(4), 1259–1266, https://doi.org/10.1603/0022-0493-98.4.1259
- Regnault-Roger C. (2012). Essential Oils in Insect Control: Low-Risk Products in a High-Stakes World. *Ann. Rev. . Entomo.*, 57, 405-424. http://dx.doi.org/10.1146/annurev-ento-120710-100554.
- Salman SY, Saritas S, Kara N, Recep AY. (2014). Acaricidal and ovicidal effects of Sage (*Salvia officinalis* L.) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) (Lamiaceae) extracts on *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Journal of Agricultural Sciences*, 20, 358-367.
- Traka Ch K, Petrakis EA, Kimbaris AC, Polissiou MG, Perdikis DCh. (2017). Effects of *Ocimum basilicum* and *Ruta chalepensis* hydrosols on *Aphis gossypii* and *Tetranychus urticae*. *Journal of Applied Entomology*, 142(4): 413-420. doi: 10.1111/jen.12486
- Van Leeuwen T, Vontas J, Tsagkarakou A, Dermauw W, Tirry L. (2010). Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite **Tetranychus urticae** and other important Acari: A review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(8), 563-572. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2010.05.008
- Vassiliou VA, Kitsis A. (2013). Acaricide resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) populations from Cyprus. *Journal of Economic Entomology*, 106(4), 1848-1854. doi: http://dx.doi.org/10.1603/EC12369

- Xu D, He Y, Zhang Y, Xie W, Wu Q, Wang S. (2018). Status of pesticide resistance and associated mutations in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*, in China. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 150, 89-96. doi: 10.1016/j.pestbp.2018.07.008
- Zekri N, Handaq N, El Caidi A, Zair T, El Belghiti MA. (2016). Insecticidal effect of *Mentha pulegium* L., *Mentha suaveolens* Ehrh. hydrosols against a pest of citrus, *Toxoptera aurantii* (Aphididae). *Research on Chemical Intermediates*, 42, 1639–1649. https://doi.org/10.1007/s11164-015-2108-0

Analyse physicochimique de cladodes de Cactus : *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.var. *inermis* cultivé en Tunisie

Sondes Stambouli-Essassi[1*], Ichrak Samoud-Ben Rejeb[1], Samiha Kahleoui[1], Sadok Bouzid[1], Fathia Harzallah-Skhiri[2]

[1]Laboratoire de Biodiversité, Biotechnologies et Changements Climatiques. Faculté des Sciences de Tunis, Université Tunis El Manar

[2]Laboratoire de Génétique, Biodiversité et Valorisation des Bioressources. Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir, Université de Monastir

*Email : sondesessassi@topnet.tn

RESUME

La présente étude met en évidence la valeur nutritive et fourragère de jeunes cladodes inermes d'*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. cultivé dans la région de Sanhaja-Oued Ellil (Tunisie). En effet, l'analyse des propriétés physicochimiques a révélé leur richesse en eau (80%), en matières organiques (68%) et en matières minérales (22%). La cellulose brute et la matière azotée totale représentent respectivement 8,6% et 5,5% de la matière sèche. Tandis que les pourcentages de matières grasses et de phosphore sont faibles (2,4 et 0,14%, respectivement). Ainsi, ces cladodes présentent une importance considérable dans l'élaboration d'une ration alimentaire équilibrée pour le bétail en les incorporant comme matière première.

Mots-clés : *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill., cladode, matière organique, matière minérale, cellulose brute, matière azotée

SUMMAY- Physicochemical analysis of Cactus cladodes : *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. var. *inermis* cultivated in Tunisia. This study highlights the nutritive and forage value of inermis young cladodes of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. grown in the region of Sanhaja-Oued Ellil (Tunisia). Indeed, the physicochemical properties analysis revealed their richness in water (80%), organic matter (68%) and mineral matter (22%). Cellulose and total nitrogen account for 8.6% and 5.5% respectively, of the dry matter. While the percentages of fatty matter and phosphorus are low (2.4 and 0.14%, respectively). Thus, these cladodes are of considerable importance in the development of a balanced diet for livestock by incorporating them as raw material.

Key words : *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill., cladode, organic matter, mineral matter, cellulose, total nitrogen

1. INTRODUCTION

Opuntia ficus-indica (L.) Mill. (Cactaceae, Opuntioideae) a été longuement domestiqué dans les régions arides et semi-arides du monde et constitue désormais une culture importante dans l'économie agricole de nombreux pays (Griffith, 2004). Intensivement cultivé dans des plantations commerciales, il représente l'une des ressources naturelles les plus précieuses par sa haute valeur nutritionnelle (Rocchetti *et al.*, 2018). En outre, *Opuntia* L. est utilisé, à grande échelle, dans les principales stratégies de lutte contre la désertification et la valorisation des terres dégradées (Mulas et Mulas, 2004). Sa présence dans la végétation, garantit la couverture du sol en offrant une protection contre l'érosion (FAO, 2012). C'est une source de fruits (Vigueras et Portillo 2001, Stintzing *et al.*, 2012) et de cladodes, contenant des composants bioactifs qui ont des effets bénéfiques sur la santé humaine (Boutakiout, 2015). En outre, l'utilisation d'*Opuntia*, comme plante fourragère, est connue depuis l'antiquité dans les pays du Maghreb (Nefzaoui *et al.*, 2000, El Karrassi, 2015). Ses cladodes, tendres et fibreux (Arba, 2006), sont utilisés principalement pour la fabrication d'aliments fourragers, en les incorporant comme matière première (Sepulveda *et al.*, 2007). Il devient une alternative intéressante en tant que plante fourragère durant les périodes de sécheresse, marquées par une pénurie

de plantes herbacées (Cruz-Hernández et Paredes-López, 2010). En Tunisie, *Opuntia* couvre actuellement une superficie de 600 000 ha, dont 400 000 ha de Cactus inerme et 200 000 ha de Cactus spinescent (Ministère de l'Agriculture, 2015). La variété *inermis* Weber., présente l'avantage d'être facilement utilisée comme fourrage par rapport à la variété épineuse. Elle peut constituer près de 40% de la ration alimentaire du bétail (Nefzaoui, 1996). En outre, afin d'évaluer la valeur potentielle des cladodes d'*Opuntia* comme ressource fourragère, il est important de connaître leur valeur nutritionnelle (Mokoboki et Sebola, 2017). Dans ce contexte, le but de la présente étude, est de mettre en évidence et confirmer la valeur nutritive et fourragère de la poudre de cladodes d'*Opuntia ficus-indica* var. *inermis* à travers une analyse physicochimique. Il s'agit de déterminer les pourcentages de matières sèches, organiques, minérales, grasses et azotées totales, de cellulose brute et de phosphore.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel végétal

Un total de 400 cladodes inermes d'*Opuntia ficus-indica* âgés de deux ans et dans un très bon état physiologique et sanitaire a été récolté (avril 2017) sur des pieds-mères de la variété inerme, plantés dans une parcelle privée, dans la région de Sanhaja-Oued Ellil (36°48'N, 10°6'E), située à 20 km au Nord-Ouest de Tunis. Chaque cladode d'environ 450 cm^2 de superficie et d'un poids moyen de 500 g, a été d'abord coupé en petits morceaux, d'environ 40 cm^2 de superficie chacun. Ensuite, chaque morceau a été coupé longitudinalement en deux parties, à l'aide d'un couteau tranchant et toutes les portions obtenues ont été mises à sécher, sous abri-serre pendant 15 jours (températures jour/nuit 23 °C/18 °C), avant d'être finement broyées. La poudre obtenue a été analysée au Laboratoire de recherche « Nutrition et Alimentation » de l'Ecole Nationale de Médecine Vétérinaire de Sidi Thabet (Tunis).

2.2. Analyse physicochimique

2.2.1. Teneur en matière sèche (MS)

Afin de déterminer la teneur en matière sèche, 5 g de la poudre de cladodes ont été placés dans une étuve (103 °C), pendant 24 h. Le pourcentage de la matière sèche a été calculé par la formule suivante: MS (%) = masse de l'échantillon séché * 100/masse de l'échantillon frais.

2.2.2. Teneur en matières minérale (Mm) et organique (Mo)

Une masse de 5 g de matière sèche a été soumise à une incinération. D'abord, elle a été placée dans un four à moufle (550 °C, 4 h), puis dans un dessiccateur (1/2 h). Le résidu obtenu représente la fraction minérale (cendres). Ainsi, la teneur en cendres et en matières organiques ont été calculées par les formules suivantes : Cendres (%) = (P3-P0)/(P2-P0) *100 ; Mo (%) = % MS - % cendres. (P0 : poids du creuset vide (g); P2 : poids du creuset avec la matière sèche (g); P3 : poids du creuset après incinération (tare+cendre) (g))

2.2.3. Teneur en matière grasse (Mg)

L'extraction de la matière grasse brute a été réalisée à l'aide d'un Soxhlet. D'abord, on procède à l'ajout de 100 ml de chlorure d'hydrogène (HCl) sur 5 g de poudre, suivi par la filtration et le séchage du filtrat (étuve à 103 °C/4 h), auquel on ajoute 1 g de sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) au filtrat ainsi obtenu dans une cartouche cellulosique. Un flacon vide, pesé au préalable et rempli avec 30 ml d'éther de pétrole, est fixé (3 h) sous la cartouche et sur une plaque chauffante (100 °C). Par la suite, le flacon est placé dans une étuve (103 °C/ 3 h), et une deuxième pesée du flacon a été réalisée. Ainsi, la teneur en matière grasse est calculée par la formule suivante : Mg (%) = (P2-P0)/PE*100

(PE: prise d'essai (g); P0: poids du flacon vide (g); P2: poids du flacon avec la prise d'essai en matière sèche (g)).

2.2.4. Teneur en cellulose brute (CB)

La méthode de référence utilisée est la méthode de Weende (1865). La cellulose brute est le résidu qui subsiste après une hydrolyse acide de l'échantillon par une solution d'acide sulfurique diluée (150 ml de H_2SO_4 dans 1 g d'un échantillon séché et broyé) dans un creuset qu'on laisse bouillir (30 min), puis on le filtre, sous vide. Ensuite, on procède à une hydrolyse alcaline avec une solution d'hydroxyde de potassium diluée (150 ml de KOH) suivie par les mêmes étapes précédentes. Puis, chaque creuset est rincé successivement trois fois avec de l'eau distillée chaude, séché à l'étuve (103 °C, 4 h), refroidi au dessiccateur, puis pesé. Ensuite, on procède à la calcination des creusets dans un four à moufle (550 °C/3 h), afin de déterminer les cendres après refroidissement au dessiccateur. La teneur en cellulose brute des échantillons est calculée comme suit : CB (%) = (P1- P2)/ PE*100 (P_1 : cellulose brute + cendres + poids du creuset vide (g); P_2 : cendres + poids du creuset vide (g); PE= prise d'essai (g))

2.2.5. Teneur en matières azotées totales (MAT)

La méthode de Kjeldahl (1883) avec ses trois étapes principales; la minéralisation, la distillation et la titration, a été utilisée. D'abord, 1 g d'échantillon a été oxydé à ébullition (370 °C/3 h), avec 12,5 ml de H_2SO_4 concentré, en présence d'un catalyseur. Le carbone s'élimine sous forme de CO_2, l'hydrogène sous forme d'eau et l'azote reste en solution (NH_4^+). La distillation consiste, par la suite, à l'ajout de 75 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH 33%) et son entrainement par la vapeur pour la recueillir, quantitativement, dans une solution de réception (50 ml d'acide borique et de colorants). Enfin, la titration de cette solution, à l'aide de l'acide sulfurique (0,1 N) est basée sur le virement du milieu vers sa couleur rose violet. La teneur en matières azotées totales est calculée par la formule suivante: MAT (%) = Vt × 0,875 (Vt: volume d'acide sulfurique (0,1 N) utilisé pour la titration (g/kg MS))

2.2.6. Dosage du phosphore

On procède à l'incinération de 2,5 g d'échantillon mélangé avec 1 g de carbonate de calcium ($CaCO_3$) (four à moufle 550 °C/4 h). Puis, on ajoute 10 ml de HCl (6 N) et on chauffe. Ensuite, on filtre et on rince le creuset jusqu'à obtention de 250 ml de solution. Enfin, la lecture du résultat est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre UV (430 nm).

2.3. Analyse statistique

Les données recueillies ont été soumises à une analyse de variance (ANOVA) en utilisant SPSS 13.0 de Windows (SPSS Inc Chicago, Il, USA). Les moyennes de 3 répétitions ont été séparées au niveau de signification de 5% (Student's test).

3. RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de l'analyse physicochimique des cladodes adultes d'*Opuntia ficus-indica* var. *inermis* sont représentés dans la Figure 1. Sadok et al. (2008), le confirment avec des pourcentages en eau des cladodes jeunes d'*Opuntia*, atteignant 91 à 93%. **Belbahri et al. (2000) expliquent, que** du fait de sa teneur élevée en eau (90%), le Cactus a permis de conserver, au Maroc, des moutons pendant 525 jours sans les faire boire. Toute l'eau dont ils avaient besoin leur était fournie par les raquettes fraîches.

En outre, la matière sèche est principalement constituée de matière organique, c'est-à-dire des fibres (68%) et de matière minérale (22,9%) (Fig. 1). En effet, Malainine *et al.* (2001), ont montré que les cladodes du Cactus inerme contiennent des teneurs élevées en éléments minéraux (19,6%). Selon

Hadj Sadok *et al.* (2008), la fraction minérale représente plus de 13% de la matière sèche des cladodes. D'après Rodrigues *et al.* (2016), 25,7% de la matière sèche sont constitués de cendres. Notons également, que le contenu en fibres augmente nettement, lorsque les raquettes passent de 1 à 5 ans (Nefzaoui et Ben Salem, 2001). Selon Bhira (2012), le pourcentage de cendres varie de 16 à 18. Quant aux autres éléments dosés, la cellulose brute représente 8,6% (Fig. 1). Cette valeur est légèrement inférieure à celles enregistrées dans la littérature. Selon Louacini *et al.* (2015) et Malainine *et al.* (2001), la cellulose brute représente respectivement 11,7% et 17,5% de la matière sèche des cladodes.

Les résultats de notre étude montrent que les cladodes frais, âgés de deux ans, de la variété *inermis* de la région de Sanhaja-Oued Ellil sont très riches en eau (80%). En effet, Nefzaoui *et al.* (1995) et Hadj Les matières azotées totales représentent 5,5% de la matière sèche (Fig. 1). Cette valeur est proche de celle fournie par Bhira (2012) (5-7% de la matière sèche). Selon Louacini *et al.* (2015) et **Belbahri et al.** (**2000), les** matières azotées totales représentent **respectivement** 6,03% et 4%. En effet, D'après Rodrigues *et al.* (2016), les cladodes d'*Opuntia* sont pauvres en protéines brutes (8,91% de la matière sèche). Nefzaoui et Ben Salem (2001) précisent que le pourcentage en protéines brutes diminue de 5 à 3%, lorsque les raquettes deviennent âgées. Ce déficit en matières azotées totales des cladodes d'*Opuntia* nécessite cependant, une complémentation par d'autres sources azotées (Nefzaoui, 1996). En effet, ce fourrage pourrait être compensé en mélangeant les raquettes avec un autre type d'aliment fourrager comme le foin de luzerne ou les feuilles d'*Atriplex* (Nefzaoui *et al.*, 1995), afin d'élaborer pour le bétail, des rations alimentaires équilibrées à base de Cactus (Sepulveda *et al.*, 2007).

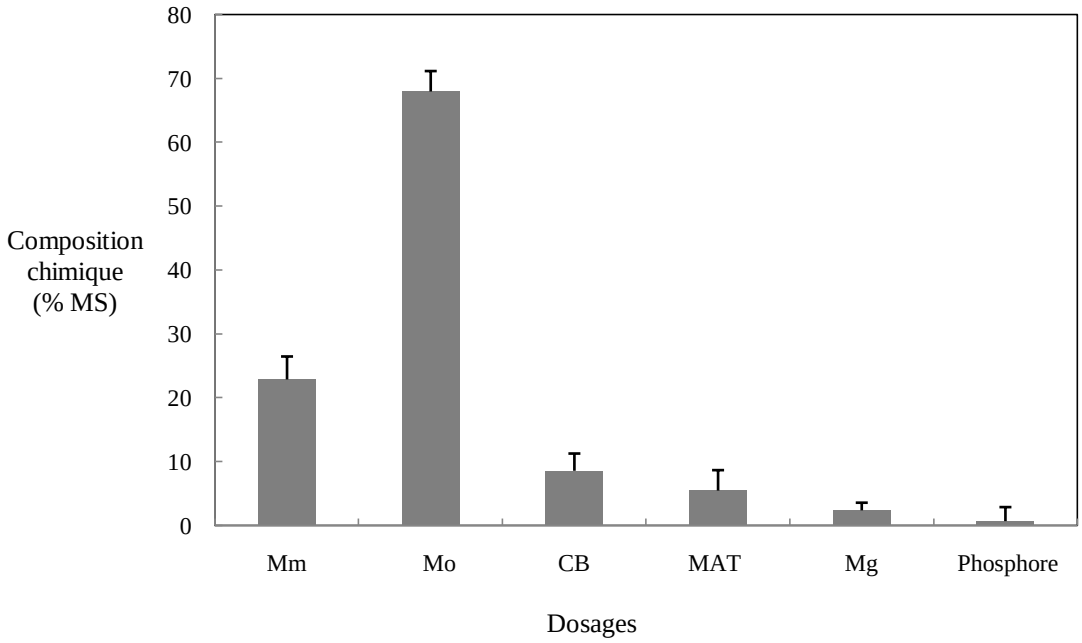


Figure 1. Composition chimique de la poudre de cladodes d'*Opuntia ficus-indica* var. *inermis*. Moyennes de 3 répétitions et intervalles de sécurité au seuil de 5%. (MS: matière sèche ; Mm: matière minérale ; Mo: matière organique (fibres) ; CB: cellulose brute ; MAT: matière azotée totale ; Mg: matière grasse)

Egalement, les résultats de notre analyse physicochimique des cladodes montrent qu'ils sont pauvres en matière grasse et en phosphore (respectivement 2,4% et 0,14%) (Fig. 1). En effet, selon **Belbahri et al. (2000)** et Bhira (2012), les cladodes inermes d'*Opuntia* cultivé au Maroc, contiennent une faible teneur en phosphore (0,2%). D'après Rodrigues *et al.* (2016), la matière grasse représente 1,6% de la matière sèche des cladodes d'*Opuntia* cultivé au Portugal.

En outre, il est reporté dans la littérature que la matière minérale des cladodes d'*Opuntia* est également constituée d'oxalate de calcium, de graisses et de cires (7,2%) (Malainine *et al.*, 2001), ainsi que de magnésium, potassium, sodium et cuivre (Hadj Sadok *et al.*, 2008). En effet, selon **Belbahri et al. (2000),** la matière sèche d'une raquette contient 3% de calcium et 0,1% de sodium. **Ce fourrage contient aussi de la** vitamine A (Nefzaoui *et al.*, 1995), **de la** vitamine C (9 à 15 mg), des polyphénols totaux (41,6 à 23,4 mg), des tanins condensés (6,45 à 6,93 mg) et des caroténoïdes (77µg à 47µg) par 100 g de cladodes frais (Haj Sadok *et al.*, 2008).
Ainsi, les cladodes inermes d'*Opuntia* constituent une ressource alimentaire potentielle. En effet, ils sont appréciés par le bétail car ils sont riches en eau, en fibres et en éléments minéraux en comparaison avec d'autres fourrages. Leur valeur nutritive est proche de celle de la luzerne (Nefzaoui et Ben salem 2001, Le Houérou 2002). Il est important de noter également, que le contenu en substances nutritives, varie suivant l'âge des raquettes (Malainine *et al.*, 2001). Les cladodes âgés de 2 et de 3 ans récoltés en été et contenant une faible teneur en eau, présentent la meilleure valeur alimentaire. En effet, leur valeur énergétique peut atteindre 0,12 unité fourragère par Kg (**Belbahri et al., 2000).** Hadj Sadok et al. (2008) affirment qu'il existe des similitudes de composition entre des jeunes cladodes d'*Opuntia ficus-indica* et des légumes de large utilisation tels que l'épinard, la tomate et la laitue.

4. CONCLUSION

Les résultats obtenus des dosages réalisés mettent en évidence que la consommation de cladodes d'*Opuntia ficus-indica* apporte des quantités non négligeables en nutriments de base et en minéraux. Ces cladodes présentent une importance considérable dans l'élaboration d'une ration alimentaire équilibrée pour le bétail en les incorporant comme matière première.
En outre, d'autres travaux en cours rentrent dans le cadre de nos futures perspectives de recherche, en collaboration avec le Service des « Consultations Externes » de l'Institut National de Nutrition et de Technologie Alimentaire (Tunis), sur l'introduction de la poudre de cladodes d'*Opuntia ficus-indica*, comme additif alimentaire, dans le régime de patients diabétiques.

RÉFÉRENCES

- Arba M. 2006. Dellahia a cactus pear cultivar from the Mediterranean coast of northern Morocco: *Acta horticulturae*, 728, 37–41.
- **Belbahri L, Boubkraoui A, Ait HA. 2000. Conduite technique de la culture du Cactus: *Transfert de Technologie en Agriculture*, 68, 1–4.**

- Bhira O. 2012. Potentialités thérapeutiques d'*Opuntia ficus-indica* au Maroc et en Tunisie. Dissertation, Faculté de pharmacie et de médecine, Rabat, Maroc, 171 p.
- Boutakiout A. 2015. Etude physico-chimique, biochimique et stabilité d'un nouveau produit: jus de cladode du figuier de Barbarie marocain (*Opuntia ficus-indica* et *Opuntia megacantha*). Dissertation, École Supérieure d'Agriculture d'Angers, Université d'Angers, Maroc, 212 p.
- Cruz-Hernández A, Paredes-López O. 2010. Enhancement of economical value of nopal and its fruits through biotechnology: *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 12, 110–126.
- El Karrassi Y. 2015. Mise en évidence de la diversité des populations de Cactus (*Opuntia* spp.) au Maroc et de la modulation du métabolisme lipidique par des extraits naturels et de phytostérols issus de Cactus ou d'huile d'Argan dans les cellules microgliales. Dissertation, Université Hassen I, Maroc, 212 p.
- FAO. 2012. Bonnes pratiques de gestion durable des terres et des eaux en Afrique du nord. Projet grande muraille verte, 15 p.
- Griffith MP. 2004. The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae) new molecular evidence: *American Journal of* **Botany**, 91, 915–1921.

- Hadj Sadok T, Aid F, Bellal M, Abdulhussain MS. 2008. Composition chimique des jeunes cladodes d'*Opuntia ficus-indica* et possibilités de valorisation alimentaire: *Agricultura*, 65, 39–48.
- Le Houérou HN. 2002. Cacti (*Opuntia spp*) a fodder crop for marginal land in the mediterranean basin: **Acta Horticulturae**, 581, 21–46.
- Louacini BK, Dellal A, Halbouche M, Bourahla SM. 2015. Régimes de brebis à l'entretien, à base de Cactus: digestibilité, niveau d'alimentation, glycémie et urémie: *Archivos de Zootecnia*, 64, 441–447.
- Malainine ME, Dufresne A, Dupeyre D, Mahrouz M, Vuong R, Vignon MR. 2001. Structure et morphologie des raquettes et des épines du Figuier de Barbarie: *Physical and Chemical News*, 4, 126–130.
- Ministère de l'Agriculture. 2015. Formulation du programme de gestion des ressources naturelles dans les territoires ruraux vulnérables de Tunisie. Document de travail: fiches filière Figue de Barbarie, 12 p.
- Mokoboki K, Sebola N. 2017. Chemical composition and feed intake of *Opuntia* cladodes varieties offered to goats: *Journal of Animal and Plant Sciences*, 32, 5096–5103.
- Mulas M, Mulas G. 2004. Potentialités d'utilisation stratégique des plantes des genres Atriplex et Opuntia dans la lutte contre la désertification. Université des études de SASSARI-Groupe de recherche sur la désertification, 112 p.
- Nefzaoui A. 1996. Valeur alimentaire de régimes à base de Cactus inerme (*Opuntia ficus-indica* var. *inermis*) et d'*Atriplex* (*Atriplex nummularia*)**:** **Annales** de *Zootechnie*, 45, 54–54.
- Nefzaoui A, Ben Salem H. 2001. *Opuntia* a strategic fodder and efficient tool to combat desertification in the WANA Region: *FAO plant production and protection*, 169, 73–89.

Nefzaoui A, Ben Salem H, Abdouli H, Ferchichi H. 1995. Palatability for goat of some Mediterranean shrubs. Comparison between browsing time and cafeteria technique: **Annales** de *Zootechnie*, 44, 117.

- Nefzaoui A, Ben Salem H, Zaafouri M, Chouki S. 2000. Tunisian experience with fodder shrubs. Fodder Shrub Development in Arid and Semi-arid Zones. Proceedings of the Workshop on Native and Exotic Fodder Shrubs in Arid and Semi-arid Zones, G. Gintzburger, M. Bounejmate et A. Nefzaoui Eds. Actes des journées ICARDA, 27 october-2 november 1996, Hammamet, Tunisie, 1, pp. 210–228.
- Rocchetti G, Pellizzoni M, Montesano D, Lucini L. 2018. Italian *Opuntia ficus-indica* cladodes as rich source of bioactive compounds with health-promoting properties: *Foods*, 7, 112.
- Rodrigues AM, Pitacas FI, Reis MG, Blasco M. 2016. Nutritional value of *Opuntia ficus-indica* cladodes from Portuguese ecotypes: **Bulgarian Journal** of **Agricultural Science**, 22(1), 40–45.
- Sepulveda E, Saenz CH, Aliaga E, Aceituno C. 2007. Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia* spp: **Journal of Arid** *Environments*, 68, 534–545.
- Stintzing FC, Schieber A, Carle R. 2012. Phytochemical and nutritional significance of cactus pear: **European Food Research** and **Technology**, 212, 396–407.
- Vigueras GA, Portillo L. 2001. Uses of *Opuntia* species and the potential impact of *Cactoblastis cactorum* (*Lepidoptera pyralidae*) in Mexico: **Florida** *Entomologist*, 84, 493–498.

Differential defense responses of new olive cultivars to Verticillium Wilt of Olive in Tunisia

MA. Triki[1], Y. Gharbi[1], F. ben Amar[1], E, Bouazizi[1], M. Cheffi[1], R. Gdoura[2]
[1]Laboratoire de Recherche Ressources Génétiques de l'Olivier : Caractérisation, Valorisation et Protection Phytosanitaire Institut de l'Olivier, Université de Sfax, Tunisie
[2]Unité de Recherche Toxicologie - Microbiologie Environnementale et Santé (UR11ES70), Faculté des Sciences de Sfax, Université de Sfax, Tunisie

SAMMARY
New olive cultivars adapted to Tunisia's growing conditions were examined for their resistance to verticillium wilt (VWO) in order to determine whether differences in susceptibility among currently grown cultivars might contribute to the management of this disease. Based on a preliminary evaluation of 14 cultivars, ten were classified as susceptible or extremely susceptible (Chetoui, Chemlali, Rkhami, Jarboui, Zalmati, Jarboui, Oueslati, Manzanille, Picholine and Frangivento), two as moderately susceptible (Koroneiki and Coratina) and two as resistant (Meski and Sayali) to VWO. Six cultivars with different susceptibility level were selected to examine the levels of hydrogen peroxide (H_2O_2), proline, soluble sugars (SS), soluble proteins (SP), total polyphenols (TP), lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes, and fungal biomass *in planta*. *V. dahliae* DNA occurred early in the roots at 15 dpi and reached a maximum of 3.507 and 2.52 ng/100 ng of plant DNA, respectively in the extremely susceptible and resistant cultivars. Fungal DNA in the stems occurred at 30 dpi and increased slowly to reach a maximum of 0.23 ng/100 ng of total DNA in the extremely susceptible cultivars. We showed that the amount of fungal DNA *in planta* was roughly correlated with the susceptibility to VWO ($P < 0.0001$; $r^2 = 0.95$). The comparison of cultivars at the physiological level indicated that olive resistance is roughly correlated with the antioxidant enzymes activity, H_2O_2 concentration, TP and SP contents. The results of this study open new perspectives for olive genetic improvement programs aiming at developing new cultivars resistant to this wilt.
Key words: Cultivar susceptibility, Antioxidant enzymes, Real-time PCR, Polyphenols, Hydrogen peroxide, soluble sugars, soluble proteins

1. INTRODUCTION
Like in many Mediterranean countries, the olive (*Olea europaea*) is the most important cultivated tree species in Tunisia. However, olive trees are constantly threatened by many pest and disease problems. Verticillium wilt of olive (VWO), incited by the soil borne pathogen *Verticillium dahliae*, is the most destructive disease affecting olive orchards in the world (Morello *et al.* 2015; Jiménez-Díaz *et al*. 2012). This disease was first detected in Italy, and then in other Mediterranean countries where olive is extensively cultivated (Gharbi *et al.* 2015b).
The spread of this disease is related to the establishment of new olive orchards in soils previously cultivated with susceptible hosts to *V. dahliae*. Nevertheless, the use of infected plant materials as well as the changes in olive cultivation practices may also have increased the severity of this wilt. The severity of VWO usually depends on the cultivar susceptibility. In Tunisia, severe VWO epidemics occur in regions where 'Chemlali' cultivar is grown, such as Sfax, Monastir, Sousse, Sidi-Bouzid and Kairouan. Unfortunately, this cultivar is the most common in Tunisia and his susceptibility to VWO is not yet studied. Consequently, studying the response of local olive cultivars to VWO may provide useful information to the growers and thus contribute to the foundation of an appropriate integrated management strategy for this disease. In fact, the use of resistant cultivars is one of the most economically effective and environmentally friendly measures. Olive cultivars susceptibility is usually tested using an artificial infection model (Mercado-Blanco *et al.* 2003; Sesli *et al.* 2010). For instance, more than 6017 genotypes have been screened in Spain for their resistance to VWO using artificial infection (Trapero *et al.* 2015). However, in order to understand the source of

a given resistance as well as the accurate evaluation of resistance to VWO, we need not only disease severity assessment but also further molecular and physiological analyses.

Pathogen attacks bring about the generation of reactive oxygen species (ROS) in plants, which are highly toxic for cells. In order to dissipate the toxic effects of ROS, plants have developed a set of highly regulated enzymatic and non-enzymatic mechanisms, such as polyphenols, glutathione, ascorbate and enzymes such as superoxide dismutase (SOD), polyphenol oxidase (PPO), glutathione peroxidase (GPX), ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT). In fact, SOD is considered as crucial for plant stress tolerance and provides the first barrier of defense against the toxic effects of ROS. It has been reported that the deficiency of CAT enzyme triggers growth retardation and high sensitivity to ozone and high light stress (Vandenabeele *et al.* 2004). In addition, the amino acid proline, which is a well-known indicator of abiotic stress, is also considered as one of the non-enzymatic antioxidants that plants need in order to suppress the toxic effects of ROS (Chen and Dickman 2005).

To shed more light on the physiological and molecular differences among olive cultivars differing by their susceptibility to *V. dahliae*, this study aimed to (i) determine the response of local and foreign olive cultivars to VWO using artificial infection method. (ii) Evaluate their physiological response through assay of total phenolic content, soluble proteins, soluble sugars, H_2O_2, and antioxidant enzymes activities (iii) test whether resistance to the disease is correlated with the amount of fungal DNA in plant tissue. To achieve this, we carried out a real time PCR to monitor the pathogen colonization in root and stem tissues.

2. Materials and Methods

2.1. Plant material

Two-years-old olive rooted cuttings of 14 major olive cultivars from Tunisia and other Mediterranean countries were assessed for their resistance to VWO under controlled conditions in a greenhouse (Table 1). All cuttings were obtained from genetically authenticated mother plants from the national office of oil (ONH). All the plants were potted in plastic bags containing (50% peat; 50% sand) and the latter were placed in a greenhouse and irrigated weekly until subsequent use.

2.2. Plant inoculation

The infection bioassay was conducted with 32 plants of each olive cultivar, including, 29 inoculated plants and 3 control plants. Of the 29 inoculated plants, 20 were used for the physiological and molecular analyses at each of times 1, 2, 4, 8, 15, 30, 45, 60, 75 and 90 days after infection (dpi). The remaining nine plants were used for disease severity assessment. Plant inoculation was performed according to the protocol described by Gharbi et al. (2015b). After inoculation, olive plants were transplanted into new polyethylene pots containing a sterile substrate (peat: sand, 1:1 v/v). The experiment was conducted in a growth chamber in a randomized complete block and repeated twice. The temperature during the trial was 23 ± 2°C and the plants remained under high relative humidity and a 16/8 h photoperiod.

2.3. Disease assessment and plant sampling

The disease severity was assessed 15 days after inoculation. A scale from 0 to 4 was used according to the percentage of affected plants tissues (0 = healthy plant; 1 = ≤ 33% affected tissue; 2 = 34-66% affected tissue; 3 = 67-99%; 4 = dead plant). The estimated area under disease progress curve (AUDPC) was calculated as described previously (Gharbi *et al.* 2015b). The final average severity of symptoms and the percentage of dead plants (PDP) were also calculated. Vascular colonization by *V. dahliae* was noticed in each of the sampled olive plants by isolating the fungus on PDA. The remaining stem and root tissues of each sampled plant were kept for real-time PCR quantification.

2.4. Classification of cultivars

The resistance of each cultivar was determined according to the criteria established previously by Lopez-Escudero *et al*. (2004). Indeed, cultivars were classified into five categories according to their AUDPC average: Highly resistant (HR) – 0% to 10%; resistant (R) – 11% to 30%; moderately susceptible (MS) - 31% to 50%; susceptible (S) – 51% to 70%; extremely susceptible (E) – 71% to 100%. The final average severity and the percentage of dead plants were also considered.

2.5. Genomic DNA extraction

Fungal DNA was extracted from two weeks-old cultures of *V. dahliae* grown on PDA medium. The mycelium was harvested by scraping the surface of the medium. Then, 100 mg of mycelium were resuspended in 200 µL sterile water and was ground with a pestle. The total volume was extracted by ZR Fungal/Bacterial DNA mini prep D6005 Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) as recommended by the manufacturer. The extracted DNA was re-suspended in 50 µL of elution buffer and stored at 20°C until subsequent analysis. Fungal DNA was used as control and standard curves for real time PCR.

2.6. Real time quantitative PCR

Real time PCR assays were conducted using the primers VertB-F and VertB-R derived from the house-keeping gene Beta-Tubulin (Attalah *et al*. 2007). The real-time PCR assay was performed on a CFX96^{TM} real-time PCR cycler (Biorad). Real-time amplifications were carried out in a total reaction volume of 25 µL containing 12.5 µL Premix (TAKARA), 0.2 µM of each primer, and 5 µL of purified DNA. The final volume was adjusted to 25 µL using nuclease-free water. The optimal PCR efficacy was obtained using a cycling profile that included an initial denaturation step at 95 °C for 3 min, then 45 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. Samples were run in triplicate in all the experiments.

2.7. Hydrogen peroxide (H_2O_2) measurement

H_2O_2 assay was performed separately from leaf and root tissues representing the plants of each cultivar. 0.1 g of each sample was ground in liquid nitrogen with a mortar and pestle then was extracted with 2 mL of 5% (g/cm^3) trichloroacetic acid (TCA). After centrifugation at 13,000 rpm for 15 min, the supernatant was used to determine H_2O_2 concentration, as described by Cho and Seo (2005).

2.8. Enzyme activities measurements

Enzymatic activity was determined from total crude extracts freshly prepared from five fully expanded leaves. Samples representing each cultivar were ground using a precooled mortar and pestle, in presence of 5% (w/w) PVPP to avoid enzyme activity degradation. The ground samples were immediately placed in an ice bath and used for enzyme extraction. SOD activity assay was performed according to the method described by Sofo et al (2004). The absorbance was determined by a spectrophotometer at 560 nm after 10 min of exposure to a fluorescent light. SOD activity was expressed as U mg^{-1} of FW. Catalase activity (CAT) was assayed from the same extract according to the protocol described by Anderson et al (1995) and expressed as U mg^{-1} of FW using the absorption coefficient (ε= 36 M^{-1} cm^{-1}). Ascorbate peroxidase (APX) activity was assayed by measuring the decrease in ascorbate content at 290 nm as described by Sofo et al (2004). APX activity was expressed as U/mg of FW using the absorption coefficient of 2.47 mM^{-1} cm^{-1}. Guaiacol peroxidase (GPX) activity was measured according to Sofo et al (2004). Its activity in the mixture was determined by the spectrophotometer at 470 nm and expressed as U mg^{-1} of FW. Finally, the polyphenol oxidase (PPO) activity was measured by the spectrophotometer at 420 nm and expressed as U mg^{-1} of FW as described by Sofo et al (2004).

2.9. Lipid peroxidation, soluble proteins (SP) and soluble sugars (SS) contents

The degree of lipid peroxidation was measured from leaf samples as described by Sofo *et al.* (2004). The absorbance of the supernatant was measured at 532 nm. The value for the non-specific absorption at 600 nm was subtracted. Finally, the total thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) concentration was expressed in terms of mg g^{-1}FW, using the absorption coefficient of 155,000 M^{-1} cm^{-1}. The total SP content was determined from five fully expanded leaves according to the protocol described by Bradford (1976). A standard curve was prepared using the serum bovine albumin and then used for the quantification of SP. The estimation of the total SS content was performed from fresh leaves according to the protocol described by Sofo *et al.* (2004). The reaction mixture contained 200 µL of the alcoholic extract and 3 mL of fresh anthrone. The mixture was then placed in a boiling water bath for 10 min. After cooling, the absorbance at 625 nm was determined. SP and SS contents were expressed as mg g^{-1} of FW.

2.10. Total phenolic content

Polyphenol compounds were extracted from leaves and roots using the Folin-Ciocalteu method according to the protocol described by Sofo *et al.* (2004). The total phenolic content was determined by measuring the absorbance of the mixture at 760 nm. A standard curve was prepared with different concentrations of gallic acid (GA) (Sigma) ranging from one to 200 mg/L. The mean of three measures was calculated and the total phenolic content was expressed in mg of GA equivalents (GAE)/100 g of FW.

2.11. Statistical analyses

Analysis of variance was performed with a least significant difference (LSD) with SPSS software (IBM Software) to classify the cultivars tested based on their AUDPC values. The relationships between the different parameters (fungal biomass in planta, antioxidant enzymes activity, SS, SP and PP contents) and the disease severity progress over time were determined by correlation analyses using graph Pad Prism software. Thus, a Pearson coefficient (r^2) was calculated for each parameter.

3. RESULTS

3.1. Disease symptoms and virulence of isolates

Symptoms of wilt were first observed in almost all the cultivars tested in the first month following infection, except for the cultivars Meski, Sayali, Koroneiki and Coratina, whose symptoms occurred after two months of inoculation (Fig. 1). Overall, symptoms of the disease were easily identified and developed over time, from chlorosis, which is the most common symptom, to necrosis and wilting. In addition, leaves became necrotic and remained attached to the twigs. Two months after inoculation, the disease severity increased significantly and stunting was noticed on the inoculated plants. Thereafter, symptoms of the disease continued developing slowly until the end of the experiment. However, sudden wilt or apoplexy, characterized by the progressive rolling inward and rapid chlorosis of leaves, was also observed in some cultivars such as “Chemlali”, “Manzanille” and “Picholine”. Defoliation was very rare and only occurred in some branches of cultivars early affected by the infection such as Chemlali, Oueslati, Manzanille and Picholine. The defoliation was high during the first month of infection and then stopped until the end of the experiment. Interestingly, at two months of inoculation, some cultivars such as Koroneiki and Coratina were recovered from the disease, resulting in a reduction of disease severity. Vms 2 isolate caused from 33.33% to 70% of dead plants in 10 out of the 14 cultivars tested (Table 1).

Cultivars were classified into six resistance groups as shown in Table 1. However, 11 cultivars tested were susceptible or extremely susceptible to *V. dahliae* (Table 1). This group includes the most important Tunisian cultivars, such as ‘Oueslati’, ‘Chemlali’, ‘Rkhami’ and ‘Chetoui’. ‘Arbequina’, ‘Manzanille’, and ‘Picholine’ were the most susceptible foreign cultivars. The second group, whose disease severity ranges from 30 to 51%, has included the foreign cultivars Koroneiki, Coratina and Frangivento. Finally, the two Tunisian cultivars ‘Meski’, ‘Sayali’ were considered as resistant to

VWO. At the end of the experiment, the pathogen was recovered from nearly all the affected shoots which fulfill the Koch's postulate. All isolates taken from symptomatic plants were identified as *V. dahliae* based on colony morphology and microscopic characteristics of microsclerotia production (Triki *et al.,* 2006).

Table 1: AUDPC, PDP and classification of olive cultivars inoculated with highly pathogenic *V. dahliae* isolate (Vms2). Cultivars indicated by different letters are significantly different at $P < 0.05$.

Variétés	Moyenne AUDPC ± SD	PDP(%)	Classification
Picholine	51.86 ± 1.95^{e}	44.40	S
Coratina	32.01 ± 1.47^{i}	13.00	MS
Manzanille	52.30 ± 2.02^{f}	33.33	S
Koroneiki	34.66 ± 1.44^{h}	16.66	MS
Frangivento	51.36 ± 1.88^{g}	11.11	S
Arbequina	53.48 ± 1.56^{d}	41.60	S
Zalmati	67.59 ± 1.37^{b}	44.40	S
Jarboui	67.65 ± 1.23^{b}	55.55	S
Oueslati	62.00 ± 1.35^{c}	55.55	S
Rkhami	62.11 ± 1.09^{c}	66.66	S
Meski	27.12 ± 2.11^{k}	00.00	R
Sayali	26.13 ± 1.89^{j}	00.00	R
Chetoui	71.26 ± 1.82^{f}	33.33	E
Chemlali	73.51 ± 1.96^{a}	88.00	E

3.2. Quantification of fungal DNA *in planta*

The real-time PCR assay was employed to quantify *V. dahliae* colonizing the xylem of the selected cultivars. The primers VertBt-F and VertBt-R generated a well-defined band of 115 bp with no artifacts such as non-specific amplification products or primer dimers (Attalah *et al.,* 2007). The specificity of amplification was further confirmed by melt curve analysis indicating the presence of a single melt peak at 87°C (Supporting Information 4). Overall, *V. dahliae* DNA was detected after four days of inoculation at the roots level. The highest levels of fungal DNA in the roots of inoculated plants were recorded 15 days after inoculation. At that time, fungal DNA quantities ranged from 2.567 ± 0.167 to 3.507 ±.0.342 ng/100 ng of total DNA, depending on the cultivar tested. After one month of inoculation, the amount of fungal DNA in the roots was significantly decreased to about three times when compared to that recorded 15 days after inoculation. The fungal DNA in the roots was no longer detectable after 45 dpi (Fig 1A). The comparison of the Q-PCR results obtained for each cultivar demonstrated that fungal DNA contents were significantly lower in the two resistant cultivars Meski and Sayali when compared to those recorded in the extremely susceptible ones ($P < 0.005$). In contrast, fungal DNA contents in the two moderately susceptible cultivars were not significantly different from those recorded in the two resistant cultivars Meski and Sayali ($P > 0.05$).

The quantification of fungal DNA in the stems of infected plants indicated that *V. dahliae* was absent at this part during the first month of infection. After 30 dpi, fungal DNA quantities ranged from 0.050 ± 0.0012 to 0.028 ±.0.014 ng/100 ng of total DNA. At 45 dpi, the amount of fungal DNA increased importantly to reach a peak of 0.230 ± 0.014 and 0.114 ± 0.015 ng/100 ng. Subsequently, the amount of fungal DNA notably decreased after 75 dpi. At that time point, fungal DNA quantities were between 0.0013 ± 0.000147 and 0.00041 ± 0.000241 ng/100 ng of total DNA. Thereafter, fungal DNA in the stems was no longer detectable in all the tested cultivars (Fig 1B). The correlation of the fungal biomass *in planta* with the disease severity progress over the time course demonstrated that high fungal DNA concentrations were constantly accompanied by high disease severity in the extremely susceptible cultivars ($P < 0.0001$; $r^2 = 0.95$).

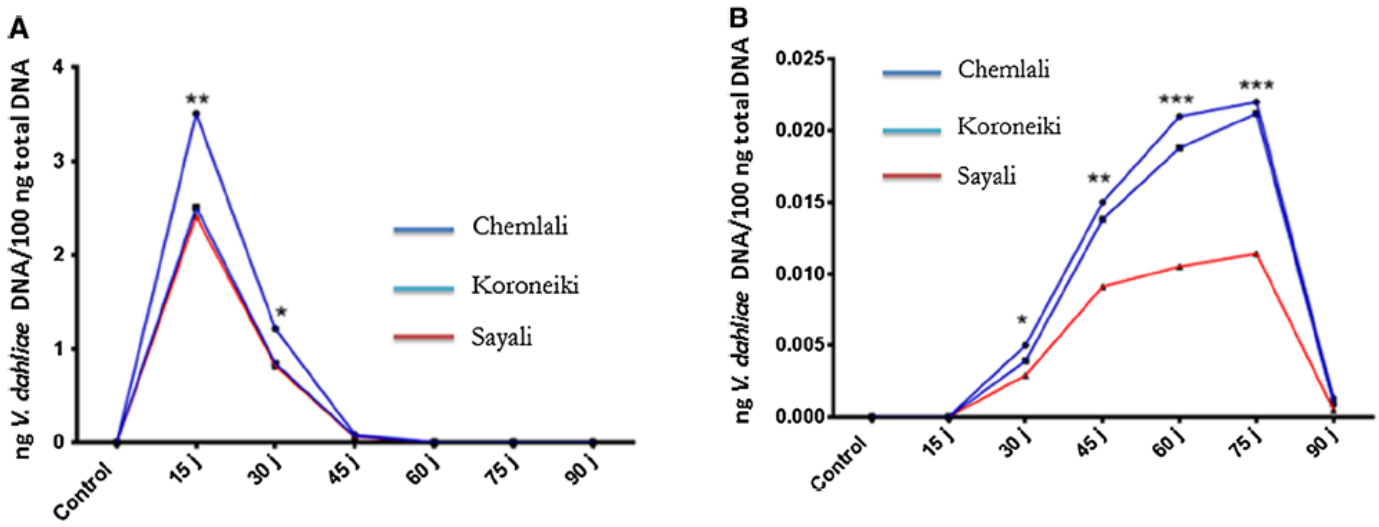


Figure 1: Monitoring of fungal DNA in planta over time. (A): evolution of fungal DNA concentration in the roots of cultivars Chemlali, Koroneiki and Sayali. (B): evolution of fungal DNA concentration in the stems of cultivars Chemlali, Koroneiki and Sayali. Asterisks indicate significant change in DNA concentration among the different cultivars (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$). Data were compared using Tukey HSD test.

3.3. H_2O_2 assay

The levels of H_2O_2 in the roots followed a similar trend in the plants representing the resistant, moderately susceptible and susceptible cultivars under inoculation condition (Fig. 2A). Compared with the control plants, inoculated plants had a significant H_2O_2 burst at 2 dpi, and then they increased rapidly to achieve a peak of 5.75, 5.15 and 4.27 mmol g^{-1} FW at 4 dpi, respectively, in the resistant, moderately susceptible and extremely susceptible cultivars. Thereafter, the resistant and moderately susceptible cultivars maintained that high level until 15 dpi. By contrast, the plants belonging to the susceptible cultivars had significantly lower H_2O_2 concentrations at 4, 8, and 15 dpi when compared with the non-inoculated plants as control. Similarly, H_2O_2 concentration in the leaves followed a similar trend to that observed at roots level. Nevertheless, its concentration was relatively low in the leaves at 1, 2 and 4 dpi. Thus, the H_2O_2 concentration significantly increased at 15 dpi to reach a peak of, 5.29 mmol g^{-1} FW and then decreased to a concentration of 2.67 mmol g^{-1} FW until the end of the experiment (Fig. 2B). The correlation of the H_2O_2 concentration with the disease severity progress over the time course indicated that high H_2O_2 concentration was constantly accompanied by low disease severity in the resistant cultivars Meski and Sayali ($P < 0.0001$; $r^2 = 0.95$).

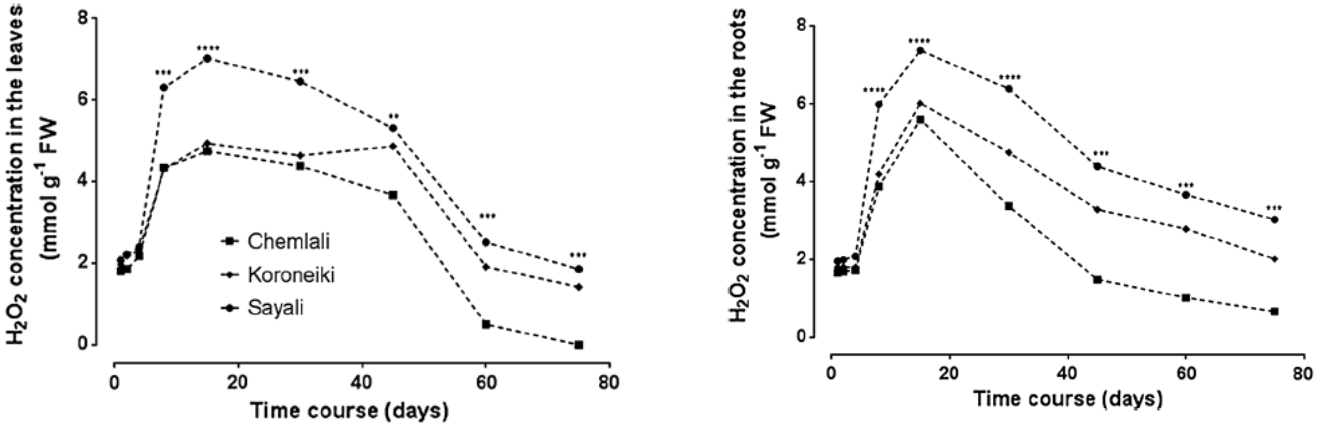


Figure 2: Monitoring of H_2O_2 concentration in the roots (A) and in the leaves (B) of the cultivars Chemlali, Koroneiki and Sayali after *V. dahliae* inoculation. Asterisks indicate significant change in H2O2 concentration among the different cultivars (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$). Data were compared using Tukey HSD test.

3.4. Enzyme activities measurements

Levels of SOD activity followed a similar trend in all the cultivars tested after inoculation. Compared to the control plants, SOD activity increased significantly from 2 dpi in all the tested cultivars (Table 2). Its activity continued to increase over time until it reached a peak of 27.13 ± 0.47 U mg^{-1} of proteins at 15 dpi in the resistant cultivar Sayali. Thus, levels of SOD activity were maintained significantly high in the resistant and moderately susceptible cultivars until 45 dpi, and then decreased to reach values close to those recorded in the control plants. In contrast, SOD activity in the extremely susceptible cultivars declined to values significantly lower than those recorded in the control plants after 45 dpi before it became undetectable after 75 dpi (Table 2). Significant differences were evident when the cultivars were compared at each time point of the experiment ($P < 0.05$). In addition, SOD activity was highly correlated with the resistance level of each cultivar ($P < 0.001$; $r^2 = 0.94$). In line with SOD activity, resistant cultivars (Meski and Sayali) showed higher CAT activity. In fact, throughout all the experiment, CAT activity in these two cultivars was significantly higher than that observed in the moderately and extremely susceptible cultivars. Compared to the control plants, its activity in the resistant cultivars reached a peak of 23.42 ± 0.74 U mg^{-1} of proteins at 15 dpi, maintained that high level at 30 dpi, and decreased to 20.25 ± 0.53 U mg^{-1} of proteins at 45 dpi before dropping to values close to those noted in the control plants after 60 dpi (Table 2). The patterns of APX, GPX and PPO activities were roughly similar in all the tested cultivars, showing a significant increase at 15 dpi, yet at different levels among the cultivars. For instance, GPX activity in the resistant cultivars increased slowly but not significantly from 4 dpi, reached a peak of 7.85 ± 0.38 U mg^{-1} of proteins at 15 dpi, maintained that high level at 30 dpi, and decreased to 2.95 ± 0.41 U mg^{-1} of proteins at 60 dpi (Table 2). APX activity also increased significantly in all the tested cultivars. Nevertheless, significant changes in APX activity were recorded throughout the experiment among the cultivars differing by their susceptibility to VWO (Table 2). PPO enzyme activity remained stable until 15 dpi then increased rapidly to reach a peak of 25.23 ± 0.69, 27.36 ± 0.66, and 28.58 ± 0.39 U mg^{-1} of proteins at 15 dpi, respectively, in the extremely susceptible, moderately susceptible, and resistant cultivars. Its activity kept high until 45 dpi before it decreased slightly to 00.00, 18.74 ± 47, and 22.48 ± 0.74 U mg^{-1} of proteins at 60 dpi, respectively, in the susceptible, moderately susceptible, and resistant cultivars. Hence, the variation of PPO activity over time was significantly correlated with the resistance level of each of the tested cultivars (Table 2). Finally, POD activity was in line with PPO activity. Its activity remained relatively stable until 15 dpi then increased rapidly to attain 23.65 ± 0.74, 26.91 ± 0.78 and 28.43 ± 0.47 U mg^{-1} of proteins at 30 dpi, respectively, in the extremely susceptible, moderately susceptible, and resistant cultivars. Thereafter, its activity decreased slowly and became nil in the case of the susceptible cultivars while it remained relatively high in the moderately susceptible and the tolerant ones (Table 2). Correlation analyses indicates that APX, GPX, POD and PPO activities were roughly correlated with the resistance level of each cultivar, with a Pearson correlation coefficient (r^2) of, 0.89, 0.88, 0.95, and 0.93, respectively ($P < 0.0001$).

Table 2: Superoxyde dismutase, catalase, Glutathione peroxidase, ascorbate peroxidase, Peroxidase and polyphenol oxidase activities (U mg^{-1}, *FW*) in the leaves of three olive cultivars differing by their susceptibility to *V. dahliae.* Values with different alphabetical letters are significantly different at $P < 0.05$

Cultivar	Time (dpi)	Enzyme activity (U mg^{-1} FW)					
		SOD	CAT	GPX	APX	POD	PPO

Extremely susceptible cultivar Chemlali	Control	11.35 ± 0.23^{e}	06.41 ± 0.23^{ef}	03.35 ± 0.23^{e}	02.78 ± 0.15^{ef}	15.45 ± 0.63^{c}	15.89 ± 0.23^{c}
	1	11.71 ± 0.19^{e}	07.13 ± 0.22^{e}	03.41 ± 0.19^{e}	02.91 ± 0.11^{ef}	15.56 ± 0.66^{c}	16.12 ± 0.32^{c}
	2	13.78 ± 0.32^{d}	09.52 ± 0.36^{d}	03.71 ± 0.22^{ce}	03.15 ± 0.13^{e}	15.89 ± 0.33^{c}	16.45 ± 0.54^{c}
	4	17.13 ± 0.29^{c}	12.23 ± 0.31^{c}	3.92 ± 0.18^{c}	03.45 ± 0.19^{ce}	16.05 ± 0.51^{c}	16.78 ± 0.47^{c}
	8	19.25 ± 0.25^{b}	15.11 ± 0.43^{b}	4.11 ± 0.24^{c}	03.82 ± 0.23^{c}	16.56 ± 0.56^{c}	19.93 ± 0.66^{b}
	15	21.65 ± 0.44^{a}	17.26 ± 0.63^{a}	6.56 ± 0.32^{a}	05.51 ± 0.27^{a}	17.65 ± 0.74^{b}	25.23 ± 0.69^{a}
	30	13.46 ± 0.41^{d}	15.25 ± 0.21^{b}	5.52 ± 0.36^{b}	04.46 ± 0.35^{b}	23.65 ± 0.74^{a}	24.86 ± 0.45^{a}
	45	06.87 ± 0.36^{f}	09.36 ± 0.22^{d}	2.83 ± 0.33^{f}	01.89 ± 0.18^{f}	11.26 ± 0.66^{d}	12.45 ± 0.43^{d}
	60	00.00^{g}	00.00^{g}	00.00^{g}	00.00^{g}	00.00^{e}	00.00^{e}
Moderately susceptible cultivar Koroneiki	Control	12.87 ± 0.53^{fg}	06.71 ± 0.15^{gh}	03.61 ± 0.15^{e}	02.93 ± 0.16^{f}	15.16 ± 0.57^{d}	15.65 ± 0.57^{e}
	1	13.68 ± 0.43^{f}	07.26 ± 0.34^{g}	03.69 ± 0.21^{e}	03.10 ± 0.21^{e}	15.29 ± 0.47^{d}	15.95 ± 0.45^{e}
	2	16.86 ± 0.51^{e}	10.12 ± 0.33^{f}	03.81 ± 0.23^{de}	03.26 ± 0.23^{e}	15.49 ± 0.36^{d}	16.15 ± 0.39^{e}
	4	19.25 ± 0.78^{d}	13.74 ± 0.47^{de}	04.22 ± 0.35^{d}	03.53 ± 0.31^{de}	15.89 ± 0.71^{d}	16.45 ± 0.47^{e}
	8	24.26 ± 0.89^{ab}	17.23 ± 0.45^{c}	04.82 ± 0.31^{c}	03.89 ± 0.29^{d}	16.55 ± 0.66^{d}	21.15 ± 0.42^{c}
	15	25.91 ± 0.79^{a}	21.26 ± 0.74^{a}	07.89 ± 0.36^{a}	07.23 ± 0.34^{a}	18.26 ± 0.61^{c}	27.36 ± 0.66^{a}
	30	21.46 ± 0.65^{c}	19.10 ± 0.54^{b}	05.92 ± 0.33^{b}	05.49 ± 0.32^{b}	26.91 ± 0.78^{a}	24.84 ± 0.43^{b}
	45	12.78 ± 0.77^{fg}	14.23 ± 0.66^{d}	04.14 ± 0.24^{d}	04.79 ± 0.30^{c}	23.35 ± 0.65^{b}	21.68 ± 0.38^{c}
	60	09.55 ± 0.56^{h}	07.45 ± 0.29^{g}	02.46 ± 0.17^{f}	02.23 ± 0.19^{g}	18.74 ± 0.77^{c}	19.89 ± 0.58^{d}
Resistant cultivar Sayali	Control	12.75 ± 0.59^{fg}	07.09 ± 0.23^{hi}	03.49 ± 0.17^{f}	03.12 ± 0.13^{f}	16.25 ± 0.59^{e}	16.44 ± 0.59^{de}
	1	13.29 ± 0.42^{f}	07.78 ± 0.33^{h}	03.69 ± 0.21^{e}	03.45 ± 0.21^{ef}	16.43 ± 0.48^{e}	16.65 ± 0.52^{de}
	2	17.25 ± 0.39^{d}	10.56 ± 0.42^{f}	03.82 ± 0.23^{de}	03.71 ± 0.19^{e}	16.55 ± 0.39^{e}	16.97 ± 0.66^{d}
	4	20.78 ± 0.59^{c}	14.11 ± 0.35^{e}	04.45 ± 0.31^{d}	04.23 ± 0.28^{c}	16.82 ± 0.52^{e}	17.82 ± 0.47^{d}
	8	26.15 ± 0.72^{ab}	18.22 ± 0.44^{c}	05.51 ± 0.43^{c}	05.12 ± 0.36^{bc}	18.18 ± 0.56^{d}	22.45 ± 0.41^{c}
	15	27.13 ± 0.47^{a}	23.42 ± 0.74^{a}	07.85 ± 0.38^{a}	07.42 ± 0.33^{a}	22.89 ± 0.78^{c}	28.58 ± 0.39^{a}
	30	25.21 ± 0.69^{b}	20.25 ± 0.53^{b}	06.13 ± 0.32^{b}	05.76 ± 0.28^{b}	28.43 ± 0.47^{a}	27.13 ± 0.58^{a}
	45	16.45 ±	15.96 ±	04.89 ±	04.33 ±	25.47 ±	25.17 ±

	60	0.63^{de} 13.11 ± 0.38^{f}	0.74^{d} 08.88 ± 0.65^{g}	0.39^{ce} 02.95 ± 0.41^{g}	0.23^{c} 02.12 ± 0.23g	0.39^{b} 22.48 ± 0.74^{c}	0.47^{b} 23.25 ± 0.68^{c}

3.5. SP, SS and PP contents

Significant changes in the soluble sugars and soluble proteins contents have been found among the cultivars tested. Under the no inoculation condition, SS content followed the same way in all the tested cultivars. After inoculation, low variations in SS content were recorded until 30 dpi, but not statistically different from those recorded in the control plants. Thereafter, SS content increased rapidly to reach a peak of, 74.16, 80.66 and 87.34 mg g^{-1} FW at 45 dpi, respectively in the susceptible, moderately susceptible and resistant cultivars. Subsequently, SS contents were maintained significantly high in the resistant and moderately susceptible cultivars while it decreased in the susceptible ones, to values lower than those recorded in the control plants. Correlation of the disease severity progress in each cultivar with the SS content indicated the existence of moderate correlation between the two parameters. This result suggested the implication of SS in the defense of olive plants against *V. dahliae*.

In line with SS, inoculated olive plants tend to accumulate more SP. The highest accumulation was recorded in the resistant cultivars Meski and Sayali plants, and differences between them were not statistically significant. The lowest accumulation of SP was observed in plants with high susceptibility level to VWO. Similarly, to the SS accumulation pattern, a high positive correlation was found between the PS content and the disease severity progress in the resistant cultivars ($P < 0.0003$; $r^2 = 0.81$) when compared to the extremely susceptible ones. Polyphenols contents followed a similar accumulation patterns as the PS and SS. In fact, its content showed low but non-significant changes, until 15 dpi. Thereafter, PP contents increased rapidly in the highly resistant cultivars to attain 86.52 mg g^{-1} FW at 45 dpi, while it remained significantly lower in the moderately and susceptible cultivars. Polyphenols contents were roughly correlated with the resistance level of each cultivar ($P < 0.001$; $r^2 = 0.84$). In contrast, a low correlation coefficient was reported with the extremely susceptible cultivars ($r^2 = 0.72$).

3.6. Lipid membrane peroxidation

The concentration of TBARS has significantly increased in the leaves of olive plant cultivars inoculated with *V. dahliae*. Overall, *V. dahliae* infection induced increased in TBARS concentration in all the tested cultivars. Nevertheless, the increase of TBARS concentration was significantly higher in the susceptible cultivars than that observed in the resistant ones. In fact, at 45 dpi, TBARS concentration increased by 26% in the susceptible cultivars against 10% only in the resistant ones. Its concentration increased slightly at 60 dpi to reach 35% and 14%, in the susceptible and resistant cultivars respectively, when compared to the control plants.

4. DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Verticillium wilt could be a real threat to olive growers. In fact, the lack of an effective treatment makes it necessary to establish an integrated pest management program, involving in part the use of resistant cultivars, which could be useful in controlling this disease. This work reports for the first time the classification of the most known Tunisian olive cultivars based on their susceptibility to VWO. Subsequently, the behavior of these cultivars under inoculation condition was studied at physiological and molecular levels. Overall, the results obtained here indicate that most of the Tunisian cultivars were extremely susceptible to VWO. However, the cultivars Chemlali and Chetoui, which represent approximately 60% of the orchards, were classified as highly susceptible to the pathogen. In fact, the change in olive cultivation practices such as the transition from the rainfall regime to olive intensification, which requires the introduction of the irrigation system, has created a favorable ecosystem for the development of many olive pathogens. In addition, the use of olive orchards for solanaceous production is another interesting factor, which is frequently encountered in

many olive growing regions. However, the expansion of olive crops to occupy orchards previously cropped for potatoes, watermelons and tomatoes, which are susceptible to *V. dahliae*, could explain the dramatical increase in the severity of this wilt and its dissemination over a wide distance in a short period of time. This hypothesis is supported by the results of genetic diversity studies of *V. dahliae* infecting olive trees in Tunisia, which have shown that *V. dahliae* population in Tunisia is predominated by VCG2A and 4B groups, known by their high pathogenicity towards solanaceous crops (Gharbi *et al.* 2015b). Therefore, it is strongly recommended to select the most tolerant cultivars to *V. dahliae* to be planted in regions with high risk of infection. In addition, Chemlali and Chetoui cultivars are broadly cropped for a period that exceeds a century, without any genetic improvement programs. This may have provided favorable conditions for pathogen selection and thus led to the emergence of highly aggressive pathotypes, which is in agreement with previous reports supporting the hypothesis of host adaptation (Alkher *et al*. 2009). Hence, the results reported here open interesting perspectives for the establishment of genetic improvement programs for these two cultivars (López-Escudero and Blanco-López 2005). Unlike the cultivars Chemlali and Chetoui, the two Tunisian cultivars Meski and Sayali have been identified as tolerant to VWO. In fact, these two cultivars are rarely cultivated and therefore very little challenged with *V. dahliae*, which would decrease the ability of the pathogen to drive the evolution of its virulence towards a successful infection over these two cultivars. In the present study, most of the foreign cultivars such as Arbequina, Manzanille and Picholine were classified as susceptible to *V. dahliae*. In fact, these cultivars, which are imported from neighboring countries, are long time exposed to the same clonal lineages of *V. dahliae* in their native locality, which may lead to a breakdown of their resistance. The results obtained in this study indicate the existence of a positive correlation between the susceptibility level and fungal biomass *in planta*. In fact, the first signs in the extremely susceptible cultivars were generally accompanied by high fungal DNA concentration in stems and roots. The significant difference observed between the cultivars differing by their susceptibility to *V. dahliae* could be the result of early activation of several defense mechanisms by the resistant cultivars at the time of infection. Indeed, the installation of a structural defense barrier by the deposition of lignin and suberin, at the primary cell wall, is often the first defense mechanism limiting the attack of the intracellular level by the pathogen. In this study, the H_2O_2 concentration and the fungal biomass *in planta* were roughly correlated. In fact, the relatively low fungal biomass observed in the roots of the resistant and moderately susceptible cultivars could be explained by the quantitative effect of H_2O_2 in slowing the fungal growth *in planta*. Similar results were reported in previous plant-pathogen interaction studies. For instance, study of the pathosystem potato–*V. dahliae* indicated the existence of positive correlation between the symptom's severity and the DNA concentration *in planta* (Pasche *et al.* 2013). Likewise, real-time PCR was successfully employed to identify susceptible and olive cultivars based on fungal DNA quantification results and the disease severity rating (Attalah *et al.* 2007; Mercado Blanco *et al.* 2003). The results reported here confirm the reliability of fungal biomass quantification in the true classification of cultivars based on their susceptibility levels. However, based on the visual assessment of wilt symptoms cannot accurately distinguish between resistance and tolerance phenomena, given that the absence of symptoms does not deny the possibility that the host is sheltered by a high pathogen inoculum, which would be returned to the soil and subsequently infect other susceptible plants. Hence, the visual assessment should not be employed alone for the evaluation of cultivars and hybrids susceptibility to *V. dahliae*. This molecular approach should be useful for the evaluation of hybrids derived from genetic improvement programs aiming at developing cultivars with high resistance to VWO. In fact, it allows the identification of the true resistance while eliminating the clones without consistent resistance at the beginning of the screening process, and therefore reducing the time needed to select the most performant clones.

In order to elucidate the physiological mechanisms that drive the response of olive cultivars to *V. dahliae* infection, we investigated the role of biochemical factors and the antioxidant system in olive defense. In this study, genotypic variation in response to VWO was obvious in the set of the tested

olive cultivars, and significant variations in the proline, SS, SP and PP contents as well as the antioxidant enzyme activity were recorded throughout all the experiment. As expected, the activity of antioxidant enzymes in olive plants was differentially regulated under inoculation condition. The increases in SOD, GPX, and CAT activities may have been caused by an energy excess intercepted by photosynthetic pigments. Nevertheless, this increase could be considered as an important protection mechanism for olive plants against oxidative damage induced after the pathogen attack. The significant increase in SOD activity in the tolerant cultivars provides an evidence of the importance of this enzyme in the antioxidative defense mechanism of the olive plant against *V. dahliae* infection. Indeed, the SOD enzyme is crucial for olive defense since it participates in the synthesis of H_2O_2, which has several functions during the plant defense, such as its antimicrobial effect leading to the inhibition of fungal spore germination and mycelium production. Therefore, the high and stable SOD activity could explain the relatively low fungal biomass in the stems and the roots of the tolerant cultivars. Previous studies have shown that moderate concentrations of H_2O_2 can be directly toxic to the pathogen. Moreover, the early accumulation of H_2O_2 at the site of infection was frequently observed in many fungal plant interactions, which prevents the host from pathogen colonization (Stintzi *et al.* 1993). Previous studies have confirmed the involvement of SOD in several host-pathogen interactions. For instance, the SOD activity was significantly increased during the interaction between potatoes and *Phytophthora infestans* (Hammond-Kosack and Jones 1996). Similar results were also observed in the interaction of tobacco plants infected with "PVY" virus (Montalbini *et al.* 1991). CAT activity was also correlated with the resistance level of the cultivars ($P < 0.0001$; $r^2 = 0.95$), which suggests that high CAT activity is essential for the plant to efficiently defend itself at the early stages of infection. This enzyme partakes in the hydrolysis and the regulation of H_2O_2 content in plant cells which prevents the membrane from denaturation and therefore reduces the possibility of the cell death. In fact, the dramatically decreased CAT activity after 45 dpi, in the susceptible cultivars, could be explained by the continuous accumulation of H_2O_2 until reaching a high concentration that inhibits CAT activity. This result suggests that CAT prevent the host cell through reducing H_2O_2 toxicity. The regulation of H_2O_2 cellular content is also driven by the enzymes GPX and APX. During the experiment, the activity of these two enzymes was roughly correlated with the resistance level of each cultivar, which suggests a crucial role for these enzymes in the olive defense against pathogens. In fact, peroxidases are involved in several defense mechanisms such as, the polymerization of lignin and suberin monomers involved in the structural defense, synthesis of phenolic compounds effective against pathogens and synthesis of ethylene (Nicholson and Hammerschmidt 1992; Tudzynski 1997). In this study, Low CAT, GPX and APX activities in the susceptible cultivars were accompanied by an increase of 26% of the TBARS concentration against only 16% in the resistant cultivars (Fig. 5). The effect of the lipid peroxidation generally results in an increase in membrane permeability to substances which should not normally cross to the intracellular level, such as fungal spores and toxins. It also causes damage to the membrane proteins and enzymes inactivation (Rinalducci *et al.* 2008). Similarly, the POD and PPO activities were also significantly up-regulated under pathogen inoculation condition, which indicates a positive correlation between their activities and the resistance level of each cultivar. In fact, when the trend of POD and PPO activities during the time course was compared with H_2O_2 concentration, PP content, and antioxidant enzymes activities, a positive correlation was found between their activities and the maximum PP content in each cultivar. This result suggests that POD and PPO enzymes play a central role in the synthesis and accumulation of phenolics compounds in olive plants after pathogen attacks (Fuerst *et al.* 2014). Here, we reported the importance of POD and PPO enzymes in the defense mechanisms of olive against *V. dahliae*. These results are in agreement with those reported in previous studies. For instance, it was reported that the inhibition of POD activity by NaN_3 decreased phenolics contents in tomato and increased its susceptibility to the pathogen, which suggests the involvement of this enzyme in phenolics production during plant – pathogen interaction (Nikraftar *et al.* 2013). It was also demonstrated that the polyphenols oxidation process, which is activated by PPO and POD enzymes is a potential defense mechanism of plants against pathogens

attack, through the accumulation of toxic molecules such as quinones (War *et al.* 2012). Polyphenols could have a direct effect on fungal biomass *in planta* since they play an important role in the structural defense against pathogens. In addition, polyphenols could indirectly affect the fungal biomass *in planta* by the cyclic reduction of ROS, which in turn trigger a set of reactions leading to the activation of the antioxidant enzymes SOD, CAT, GPX and APX.

Although the proline was significantly induced after inoculation, no positive relationship was found between its concentration and the resistance level of each cultivar. Nevertheless, this result suggests that the proline could play an essential role in the response of the olive to *V. dahliae* infection. Indeed, the accumulation of high levels of this amino acid in the cells is generally associated with the prevention of enzymes activity as well as the protection of the cell wall against damage caused by ROS (Samuel *et al.* 2000). Nevertheless, few studies have advocated the crucial role of the proline in plant defense against biological pests (fungi, bacteria, and insects) (Claussen, 2005). The results obtained here confirm the involvement of SP in the olive defense against *V. dahliae*. In fact, the SP content significantly increased under the inoculation condition. This study also shows the presence of a positive correlation between the content of SP and the resistance of olive plants to *V. dahliae*. This result suggests that the high SP concentration greatly enhances the performance of olive plants under *V. dahliae* infection. Indeed, the SP participates in the structural defense system by the repair and strengthening of the cell wall, which significantly reduces the fungal biomass colonizing the plant (Stintzi *et al.* 1993). For instance, the hydroxyproline-rich protein extensin plays a central role in the organization of the primary plant cell wall. In addition, it was also demonstrated that SP participates in the biochemical defense reaction either through direct antimicrobial effect or through activating the synthesis of antimicrobial compounds, such as the leucin-rich proteins. The latter act as pathogenicity related proteins (PR), especially those of enzymatic activity, such as β-1,3 glucanase and chitinase (Punja and Zhang 1993). Indeed, they act together for the hydrolysis of cell walls of the phytopathogenic fungi and therefore reduce the fungal biomass *in planta* (Wang *et al.* 2010). In the current study, SS content was positively correlated with the resistance level of each cultivar, which suggests that SS is one of the key factors determining the resistance of the olive tree. Several hypotheses have discussed several roles of SS during the plant-pathogen interaction, such as cell wall lignification, synthesis of flavonoids and induction of the secretion of some PR proteins (Gómez-Ariza *et al.* 2007; Bolouri Moghaddam and Van den Eden 2012).

To conclude, the results described here indicate that ‘Meski’ and ‘Sayali’ are resistant to *V. dahliae*, so they could be used for replanting or tried as rootstocks for other susceptible cultivars. Further evaluations of many additional olive hybrids from the collection of the Olive Tree Institute would continue. In addition, test crossings with the resistant genotypes Meski and Sayali have already been initiated in order to study the inheritance of the resistance trait. These encouraging results open new perspectives for the biological control of VWO.

ACKNOWLEDGMENT

This study was supported in part by a grant from the PESTOLIVE project in Tunisia to M.A. Triki, and Research Laboratory APREGO, and the research unit of toxicology- environmental microbiology and health to R. Gdoura.

REFERENCES

- Alkher HA, El-Hadrami A, Adam LR, Rashid KY, Daayf F (2009) Cross pathogenicity of *Verticillium dahliae* isolates on potato and sunflower. Eur. J. Plant. Pathol 124: 505-519.
- Anderson D, Prasad K, Stewart R (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase and Glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. Plant Physiol 109: 1247-1257.
- Arias-Calderon R, Rodríguez-Jurado D, Bejarano-Alcázar J, Raul de la Rosa AB, Léon L (2015) Evaluation of *Verticillium* wilt resistance in selections from olive breeding crosses. Euphytica 206 (3): 619-629.

- Atallah ZK, Bae J, Jansky SH, Rouse DI, Stevenson WR (2007) Multiplex real-time quantitative PCR to detect and quantify *Verticillium dahliae* colonization in potato lines that differ in response to Verticillium wilt. Phytopathol 97: 865–872.
- Ben Mansour A, Porter EA, Kite GC, Simmonds MSJ, Abdelhedi R, Bouaziz M (2015) Phenolic Profile Characterization of Chemlali Olive Stones by Liquid Chromatography-Ion Trap Mass Spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry 63 (7): 1990-1995.
- Bilodeau GJ, Koike ST, Uribe P, Martin FN (2012) Development of an assay for rapid detection and quantification of *Verticillium dahliae* in soil. Phytopathol 102: 331-343.
- Bolouri Moghaddam MR, Van den Ende W (2012) Sugars and plant innate immunity. J. Exp. Bot 63: 3989-3998.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. Ann. Biochem 72: 248-254.
- Chaari Rkhis A, Gharbi Y, Cheffi M, Baccari S, Chatti H, Triki MA (2016) Exploitation des techniques de cultures in vitro pour la sélection contre *Verticillium dahliae* chez l'olivier. Journal of New Sciences IABC (27) : 1394-1401.
- Chen C, Dickman MB (2005) Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 102: 3459–3464.
- Cho UH, Seo NH (2005) Oxidative stress in Arabidopsis thaliana exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. Plant Sci 168 (1): 113-120.
- Claussen W (2005) Proline as a measure of stress in tomato plants. Plant Sci 168: 241-248.
- Fuerst EP, Okubara PA, Anderson JV, Morris CF (2014) Polyphenol oxidase as a biochemical seed defense mechanism. Front. Plant. Sci 5: 689.
- Gharbi Y, Triki MA, Trabelsi R, Fendri I, Daayf F, Gdoura R (2015a) Genetic structure of *Verticillium dahliae* isolates infecting olive tree in Tunisia using AFLP, Pathogenicity and PCR Markers. Plant Pathol 64: 871-879.
- Gharbi Y, Alkher H, Triki MA, Barkallah M, Bouazizi E, Trabelsi R, Fendri I, Gdoura R, Daayf F (2015b) Comparative expression of genes controlling cell wall-degrading enzymes in *Verticillium dahliae* isolates from olive, potato and sunflower. Physiol. Mol. Plant. Pathol 91: 56-65.
- Gomez-Ariza J, Campo S, Rufat M, Estopa M, Messeguer J, San Segundo B, Coca M (2007) Sucrose-mediated priming of plant defense responses and broad-spectrum disease resistance by overexpression of the maize pathogenesis-related PR protein in rice plants. Mol. Plant. Microbe. In 20: 832-842.
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. Plant Cell 8: 1773-1791.
- Hartman H, Schnathorst WC, Whisler J (1971) Oblonga clonal olive rootstock resistant to Verticillium wilt. Cal. Agri 25: 12–15.
- Jiménez-Díaz RM, Cirulli M, Bubici G, Jiménez-Gasco MM, Antoniou PP (2012) Verticillium wilt, a major threat to olive production: Current status and future prospects for its management. Plant Dis 96: 304-329.
- López-Escudero FJ, Blanco-López MA (2005a) Recovery of young olive trees from *Verticillium dahliae*. Eur. J. Plant. Pathol 113: 367–375.
- López-Escudero FJ, del Río C, Caballero JM, Blanco-López MA (2004) Evaluation of olive cultivars for resistance to *Verticillium dahliae*. Eur. J. Plant. Pathol 110: 79–85.
- Markakis EA, Tjamos SE, Antoniou PP, Roussos PA, Paplomatas EJ, Tjamos EC (2010) Phenolic responses of resistant and susceptible olive cultivars induced by defoliating and non-defoliating *Verticillium dahliae* pathotypes. Plant. Dis 94: 1156-1162.
- Mercado-Blanco J, Collado-Romero M, Parrilla-Araujo S, Rodríguez-Jurado D, Jiménez-Díaz RM (2003a) Quantitative monitoring of colonization of olive genotypes by *Verticillium dahliae* pathotypes with real-time polymerase chain reaction. Physiol. Mol. Plant. Pathol 63: 91–105.

Montalbini P, Buonaurio R, Passeri S (1991) Effect of Potato virus Y infection on levels of soluble Superoxide dismutases, peroxidase and catalase in tobacco leaves. Phytopathol. Mediterr 30 (1): 30–40.

- Morello P, Díez CM, Codes M, Rallo L, Barranco D, Trapero A, Moral J (2015) Sanitation of olive plants infected by *Verticillium dahliae* using heat treatments. Plant. Pathol. doi: 10.1111/ppa.12432.
- National Olive Office, 2015. Positionnement de la Tunisie sur le Marché Mondial d'Huile d'Olive. [http://www.onh.com.tn/index.php/fr/positionnement-de-la-tunisie-sur-le-marche-mondial-d-huile-d-olive]. Accessed 20 November 2015.
- Nicholson RL, Hammerschmidt R (1992) Phenolic compounds and their role in disease resistance. Annu. Rev. Phytopathol 30: 369-389.
- Nikraftar F, Taheri P, Rastegar MF, Tarighi S (2013) Tomato partial resistance to Rhizoctonia solani involves antioxidative defense mechanisms. Physiol. Mol. Plant. Pathol 81: 74-83.
- Pasche JS, Thompson AL, Gudmestad NC (2013) Quantification of Field Resistance to *Verticillium dahliae* in Eight Russet-Skinned Potato Cultivars Using Real-Time PCR. Amer. J. Potato. Res 90: 158-170.
- Punja ZK, Zhang YY (1993) Plant chitinases and their roles in resistance to fungal disease. J. Nematol 25: 526-540.
- Rinalducci S, Murgiano L, Zolla L (2008) Redox proteomics: basic principles and future perspectives for the detection of protein oxidation in plants. J. Exp. Bot 59: 3781–3801.
- Samuel D, Kumar TK, Ganesh G, Jayaraman GP, Yang W, Chang MM, Trivedi VD, Wang SL, Hwang KC, Chang DK, Yu C (2000) Proline inhibits aggregation during proteins refolding. Prot. Sci 9: 344-352.
- Sesli M, Onan E, Oden S, Yener H, Yegenoglu ED (2010) Resistance of olive cultivars to *Verticillium dahliae*. Sci. Res. Essays. **5**, 1561–1565.
- Sofo A, Dichio B, Xiloyannis C, Masia A (2004) Effects of different irradiance levels on some antioxidant enzymes and on malondialdehyde content during rewatering in olive tree. Plant Sci 166: 293-302.
- Stintzi A, Heitz T, Prasad V, Wiedemann-Merdinoglu S, Kauffmann S, Geoffroy P, Legrand M, Fritig B (1993) Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. Biochimie 75: 87-706.
- Pennisi AM, Cacciola SO, Magnano di San Lio G, Perrotta G (1993) Evaluation of the susceptibility of olive cultivars to Verticillium wilt. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 23: 537-541.
- Trapero C, Rallo L, López-Escudero FJ, Barranco D, Díez CM (2015) Variability and selection of verticillium wilt resistant genotypes in cultivated olive and in the *Olea* genus. Plant Pathol 64: 890–900.
- Trapero C, Serrano N, Arquero O, Del Río C, Trapero A, López-Escudero FJ (2013) Field resistance to Verticillium wilt in selected olive cultivars grown in two naturally infested soils. Plant Dis 97: 668-674.
- Triki M, Kdiri S, Hsairi H, Hammedi I, Ioos R, Gdoura R, Rhouma A (2011) Occurrence of *Verticillium dahliae* defoliating pathotypes on olive trees in Tunisia. Phytopathol Mediterr 50: 267−272.
- Triki MA, Hassairi A, Mahjoub M (2006) Premières observations de *Verticillium dahliae* sur olivier en Tunisie. EPPO Bull 36: 69–71.
- Vandenabeele S, Vanderauwera S, Vuylsteke M, Rombauts S, Langebartels C, Seidlitz HK, Zabeau M, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F (2004) Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. Plant. J 39: 45–58.
- Wang F, Brown EC, Mak G, Zhuang J, Denic V (2010) A chaperone cascade sorts proteins for post translational membrane insertion into the endoplasmic reticulum. Mol. Cell 40: 159–171.
- War AR, Paulraj MG, Ahmad T, Buhroo AA, Hussain B, Ignacimuthu S, Sharma HC. 2012. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. Plant. Signal. Behav **7** (10): 1306–1320.

New specific real time PCR for the quantification of *Verticillium dahliae* affecting olive trees in Tunisia

Y. Gharbi[1], MA. Triki[1], E, Bouazizi[1], R. Gdoura[2]
[1]Laboratoire d'Amélioration et Protection des Ressources Génétiques de l'Olivier, institut de l'Olivier, Université de Sfax, Tunisia
[2]Unité de Recherche Toxicologie - Microbiologie Environnementale et Santé (UR11ES70), Faculté des Sciences de Sfax, Université de Sfax, Tunisia

SUMMARY
Verticillium wilt of olive, caused by the soil borne fungus *Verticillium dahliae*, is one of the most serious diseases of olive tree. In this study, a SYBR Green based quantitative PCR assay (Q-PCR) targeting the IGS region of the ribosomal DNA (r-DNA) was developed to quantify *V. dahliae* microsclerotia (MS) in soils cropped with olive tree. In order to make the assay quantitative, the number of r-DNA units in the genome was estimated using Q- PCR and fixed at 25 copies/genome. The assay was highly specific for *V. dahliae* with no cross amplification with other soil borne pathogens. The sensitivity analysis showed similar slopes and efficiency both, from fungal DNA (slope = - 3.405, r^2 = 0.976, E = 96.64%) and the positive recombinant plasmid (y = - 3.36, r^2 = 0.989, E =98.43%), indicating thus a high accuracy of the assay. The assay exhibits a high intra- and inter-run reproducibility at very low concentration of 10^2 copy/µl (CV% ≈ 1%). When the real-time PCR assay was applied to quantify MS in five naturally infested soil samples, it was able to detect *V. dahliae* as few as two MS g^{-1} of soil. Q-PCR estimates of pathogen DNA were significantly correlated with disease severity (r^2 = 0·944) and with soil plating method (r^2= 0·845). This new assay will be a valuable tool and can be applied for disease risk prediction before installing new plantations and provides a more complete and rapid examination for soils subjected to such treatment program.
Key words: recombinant plasmid; intergenic spacer; soil plating

1. INTRODUCTION

Verticillium wilt of Olive (VWO) caused by the soil borne fungus *Verticillium dahliae* is the most destructive disease and a major yield-limiting factor for olive tree cultivation in Tunisia and other Mediterranean countries (Jiménez-Díaz et al., 2012). This pathogen is able to survive for a long period, either in soil or within plant debris as microsclerotia (MS), which represents a real challenge for the management of this wilt (Gharbi et al., 2015b). Chemical control, cultural practices and resistant cultivars have currently been used to reduce VWO losses; but these control measures have been insufficient when applied individually. Indeed, a disease control usually requires the implementation of an integrated disease management strategy, which takes into consideration the phytosanitary status of olive orchard soils (Tjamos and Jiménez-Díaz, 1998; Lopèz-Escudero and Mercado-Blanco, 2011).

V. dahliae populations in soils and plant roots have been assessed based on the number of CFU formed after soil plating on selective media. Unfortunately, this method is poor reproducible, time-consuming, and do not allow a distinction between morphologically similar species (Termorshuizen et al., 1998; Kabir et al., 2004; Goud et al., 2003; Fradin and Thomma, 2006). Actually, Q-PCR is used for the fast, accurate and culture-independent quantification of various pathogens from different target samples (soil or plant tissue) (Schena et al., 2004). Although many fluorescence technologies have been developed, the Syber Green dye system is considered the most flexible system as it has the advantage of being easy to design with relatively low start-up and running costs. This method is now being applied to detect and quantify *V. dahliae* in different host plants such as tomatoes and potatoes (Lievens et al., 2006; Atallah et al., 2007; Debode et al., 2011). Likewise, the Syber green technology was employed to develop a real time PCR assay for rapid detection and quantification of *V. dahliae* in soil (Bilodeau et al., 2012). This assay consists of a multiplexed TaqMan real-time PCR based on

the IGS region. An excellent correlation was observed in regression analysis (r^2 = 0.96) between real-time PCR results and inoculum densities determined by soil plating method in a collection of field soils.

In this study, we describe the development of a similar molecular method based on Q-PCR for species-specific quantification of *V. dahliae* from infected soil samples. To achieve that, a species-specific primer designed from the IGS region, were employed to quantify *V. dahliae* in field samples by using a recombinant plasmid, containing the IGS region as standard curve. Moreover, the reliability of the Q-PCR assay was validated by comparison with the soil plating method.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Soil samples collection

In order to assess the diagnostic performance, the assay was validated on naturally infested soil samples. Five soil samples were collected from two sites in the center of Tunisia. A disease severity scale, in which zero = healthy plant, one = ≤ 33% affected tissue, two = 34-66% affected tissue, three = 67-99% and four = dead plant, was used to determine the number of plants at each stage of infection (Gharbi et al., 2015a). Soil samples from within each site were pooled, air dried at room temperature and passed through a 1 mm sieve, which was sterilized with sodium hypochlorite solution (5%) between soil samples. Soil samples were then placed in plastic bags and stored at 4 °C until use.

2.2. Estimation of V. dahliae inoculum in naturally infected soils

Fungal cultures were made by pouring an aliquot (1 mL) of soil suspension prepared as previously described by Harris et al. (1993) onto five plates containing the semi-selective medium Ethanol Phosphate Amoxicillin Agar (EPAA) and incubated in the dark at 22°C (Mansouri et al., 2012). After 15 days of incubation, plates were checked for the presence of MS and then gently washed to remove the excess of soil. Plates were subjected to another incubation period of 15 days and germinated MS were counted under stereo microscope. Fungal inoculum density was expressed as MS g^{-1} of soil.

2.3. Primer design

A specific primer pair targeting the IGS region of *V. dahliae* was designed using Oligo 7 software (DBA Oligo, Colorado, USA) on the basis of an alignment of over 100 *Verticillium* and other microorganism IGS sequences from GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). The predicted PCR product size was 92 bp. PCR primers were designed to exhibit optimal biophysical properties and with no dimer formation with Oligo analyzer 3.1 (IDT, California, USA). Primers were also blasted against the nucleotide database of the NCBI website (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) to ensure the absence of significant homology with other microorganism sequences.

2.4. DNA extraction from fungal strains and soil samples

Total genomic DNA was extracted from soil samples (0.25 g) by ZR Soil Microbe DNA MiniPrep D6001 Kit (Zymo Research, California, USA) as recommended by the manufacturer. Extracted DNA was re-suspended in 50 µL of elution buffer and stored at - 20°C until subsequent analysis. To analyze all soil samples by real time PCR, we used 2 µL of each DNA. All samples were tested in triplicate for three different assays.

2.5. Real time PCR assay development

The quantification of *V. dahliae* was performed on a CFX96™ real-time PCR cycler (Biorad, Ontario, Canada). The optimal Q-PCR efficacy was obtained using a cycling profile which included an initial denaturation at 95 °C for 3 min, then 40 cycles of 15 s at 95 °C and 30 s at 61.5 °C. Control reactions contained the same mixtures with 5 µL diethylpyrocarbonate-treated H_2O instead of a DNA extract to detect any possible contaminating DNA. All reactions were analyzed by gel electrophoresis

to confirm the specificity of the PCR product amplified from the samples containing the genomic DNA of *V. dahliae* and to show that no amplification product was obtained in the negative controls.

2.6. Determination of the IGS copy number in the genome of V. dahliae

An accurate quantification of *V. dahliae* in the soil can only be performed if there is no considerable variation of r-DNA copy number in the genome of *V. dahliae*. To define whether there was an intraspecific variation that could influence the accuracy of pathogen quantification, two single copy genes (β-tubulin and actin) were selected from the genome sequence of *V. dahliae* published in the Broad Institute Database (http://genome.jgi.doe.gov/Verda1/Verda1.home.html). These genes were used as standards to define the number of IGS repeats in the genome of seven *V. dahliae* isolates collected from different hosts and locations and belonging to different VCG groups (Bilodeau et al., 2012).

2.7. Analytical specificity, sensibility, and reproducibility of the Q-PCR

The detection limit for the Q-PCR assay was examined using a 10-fold dilution series (10^6 to1 copy/µL) of the recombinant plasmid prepared in molecular grade water. Standard curves were also generated using different concentrations of nuclear DNA ranging from 10^6 to 1 copy/µL. To estimate the analytical sensibility of the primer pair, the plasmid and the nuclear DNA standard curves were generated by plotting the IGS copy number against the corresponding Ct values. The amplification efficiency was calculated from the slopes of the standard curves using the equation $AE = 10^{(1/slope)} - 1$ (Ruijter et al., 2006). The reproducibility of the Q-PCR was assessed on duplicates with 10-fold dilutions in five independent runs. These dilutions were used to generate a standard curve through which we can assess the number of IGS copies/µL in the different samples tested. Intra-run reproducibility was assessed on 60 duplicates for each standard by plotting the Ct values of both duplicates against each other on a graph, by plotting the Ct differences between both duplicates against the mean of each duplicate and by calculating the 95% confidence interval using the Bland-Altman algorithm. To assess the inter-run reproducibility, the mean Ct of duplicates obtained in the five independent runs were compared in each concentration of a plasmid DNA. Mean, standard deviation (SD), and coefficient of variation (CV) were calculated using Graph Pad Prism v 6.0 (Graph Pad Inc., California, USA).

2.8. Q-PCR quantification of V. dahliae in naturally infected soils

The suitability of the developed Q-PCR protocol for quantifying *V. dahliae* DNA in olive orchards was evaluated. Prior to Q-PCR assays, the total DNA extracted from each soil sample was quantified in triplicate using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer. Real-time PCR reactions were conducted in a total volume of 25 µL containing 5 µL of total DNA. The amplification of the target from samples and the plasmid standard curve was performed following the optimized Q-PCR protocol described above. The amount of *V. dahliae* DNA in each soil sample was multiplied by four to obtain the concentration of DNA per gram of soil. All samples were tested in duplicates and the experiment was repeated twice.

The relationships between the data obtained in the different assays of fungal populations (Q-PCR and soil plating method) were determined by correlation analyses. Coefficients of determination (r^2) for the three standard curves were obtained for each regression line. The correlation between the real time PCR assay and the disease severity indexes was determined by Tukey test using the Graph Pad Prism v 6.0.

4. RESULTS AND DISCUSSION

Soil borne fungi such as *V. dahliae* can be extremely persistent for more than 10 years in infested soils, which increase the risks of losses for decades after olive tree plantation (López-Escudero and Blanco-López, 2007). However, the identification of high-risk soils before plantation as well as the monitoring of the pathogen population during soil remediation usually requires the application of

rapid and accurate quantification methods. In this study, we reported a new Q-PCR Syber Green-based method targeting a 92 bp specific fragment from the IGS region. We demonstrate that the Q-PCR data expressed, either on DNA concentrations or on IGS copy number, has the potential to predict the disease risk. Therefore, it can deliver valuable information about the phytosanitary status of soils intended for new olive plantations.

The primer specificity test was first conducted in silico by running the sequences of the designed specific primers against the non-redundant GenBank database for the identification of DNA sequences that could potentially cross-amplify using the designed primers. In fact, none of the IGS sequences published in the GenBank showed high homology with VDIGS-F/VDIGS-R primers in GenBank (*V. albo-atrum*: KF510002, *V. longisporum*: HE972048; *V. tricorpus*: KF510007). After ensuring the PCR specificity, the Q-PCR protocol was implemented to be quantitative. For this purpose, the copy number of the IGS region was estimated by comparing the mean Ct values of the housekeeping genes actin and β-tubulin with that of the IGS region (Fig. 1). The housekeeping genes had a Ct value of 22.13 to 24.9, depending on the isolate used. Ct differences between the IGS region and each of the housekeeping genes were between 3.94 and 5.39, with a mean Ct value close to 4.68. The mean IGS copy number was estimated using the mean Ct difference and was about ≈ 25 copies of the r-DNA per haploid genome of *V. dahliae* (Fig. 1).

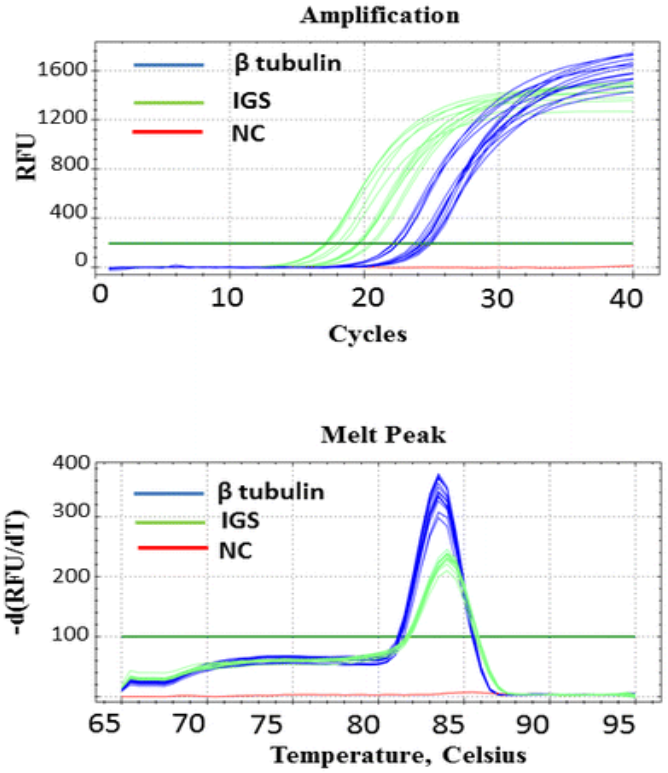


Figure 1: Determination of the number of rDNA repeats in the genome of *V. dahliae*. **A** Fluorescent signal obtained from seven *V. dahliae* DNA extracts, after amplification by the primers VDIGS-F/VDIGS-R (*green signal*) and the primers Tub-F/Tub-R (*blue signal*)

After determining the IGS copy number, the recombinant plasmid and *V. dahliae* genomic DNA were used to assess the analytical sensitivity, linearity, efficiency, and reproducibility of the real time PCR. Indeed, the 92 bp specific fragment was successfully amplified with Ct values of 10.20 ± 0.25 and 09.12 ± 0.22 respectively when 10^6 DNA copies/µL from the plasmid or genomic DNA were tested in duplicate (Fig. 2). The analytical sensitivity of the Q-PCR was about one copy/µL either for

the plasmid or for genomic DNA standards (Fig. 2). Indeed, when testing the ten-fold dilutions of the plasmid, all ten replicates were positive at a concentration of one copy/µL (Ct = 30.35 ± 1.25) (Fig. 2). Similarly, when the ten-fold dilutions of genomic DNA were used, all the dilutions were positive at a concentration of 2.4 fg/µL (≈ one copy/µL) (Ct = 29.78 ± 1.33). The sensitivity of this assay allowed the accurate quantification of 1 to 2 MS g^{-1} of soil, which is less than in other PCR assays for *V. dahliae* (Attalah et al., 2007; Banno et al., 2011). Compared with other *V. dahliae* studies conducted using PCR, we observed high sensitivity and specificity levels. In fact, the conventional PCR showed a maximum detection limit of 5 MS g^{-1} of soil (Mahuku and Platt, 2002). The present assay is significantly more sensitive than the Premix SYBR-Green-based assay developed by Lievens et al. (2006), which had a detection limit of 8 MS g^{-1} of soil. As far as the DNA concentration is concerned, the current protocol allowed the detection of 2.4 fg of fungal DNA, which is significantly lower than those reported in other studies (Attalah et al., 2007). Compared with these techniques, the addition of a positive recombinant plasmid and the expression of MS density as IGS copy number in the assay potentially improved the accuracy of quantification by generating a highly reproducible standard curve. The linearity and efficiency of the developed Q-PCR were investigated by generating a standard curve in which serial 10-fold dilutions of recombinant plasmid and genomic DNA were tested. The standard curve was obtained by plotting the real-time PCR Ct numbers of each dilution against the known IGS copy numbers, either from the plasmid or from the purified genomic DNA (Fig. 2). Usually, for an accurate quantification using Q-PCR, the slope of the standard curve obtained with 10-fold dilutions should be close to 3.3 in theory, but a slope from 3.1 to 3.6 is acceptable in practice (Svec et al., 2015). In addition, the corresponding correlation coefficient should be > 0.95. In this study, when the recombinant plasmid was used, the slope was 3.36 with a coefficient of correlation (r^2) > 0.989 and a reaction efficiency (E) of 98.43% calculated from the slope (S) using $E = 10^{(-1/S)} - 1$. Likewise, when the genomic DNA dilutions were used as standard, the slope was about 3.405 with a coefficient of correlation (r^2) > 0.976 and reaction efficiency (E) of 96.64%. The reaction specificity was confirmed by a melting temperature of 87 °C for the plasmid and genomic DNA dilutions, indicating the amplification of a single PCR product with no artifacts, such as nonspecific amplification products or primer dimers (Fig. 2).

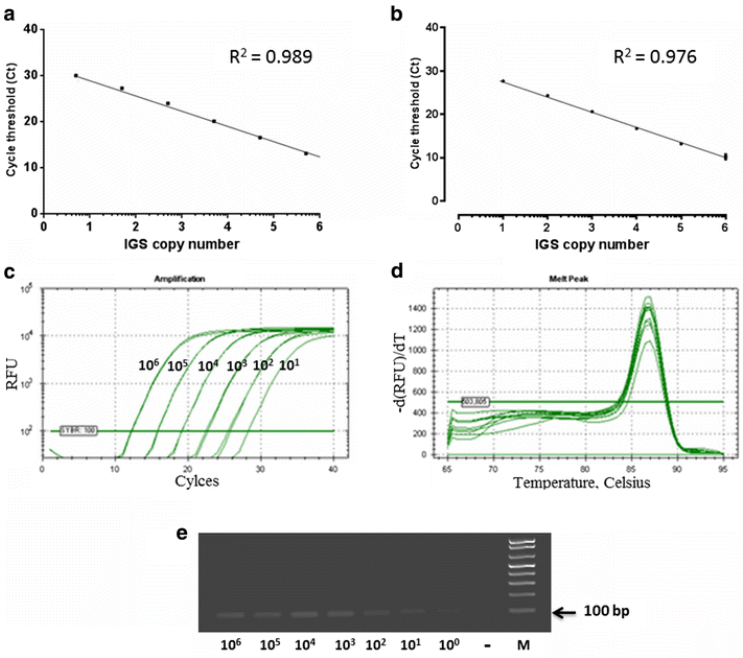


Figure 2: Amplification, standard, and melting curves of the real-time PCR assay. **a** Genomic DNA standard curve. **b** Recombinant plasmid standard curve. **c** Amplification curves generated by fluorescence data collected at each cycle during the final phase of the PCR assay. **d** Conventional

melt curves of serial dilutions of control plasmid DNA; shown in green are the different signals obtained from the standard plasmid dilutions. **E** Real-time PCR reaction products checked on 2 % agarose gel

The recombinant plasmid and genomic DNA dilutions were both used to assess the reproducibility of the developed assay. In fact, intra-run reproducibility was confirmed, with Ct of both duplicates being relatively similar with a correlation coefficient (r^2) of 0.993. Nonetheless, intra-run variability was slightly higher at very low concentration (1 copy/µL), both from the recombinant plasmid (30.35 ± 1.32) and from the genomic DNA (29.78 ± 1.33) (Table 1). In addition, the Bland-Altman analysis indicated that the 95% confidence interval was about 1426 cycles, which attests the good intra run reproducibility of the developed assay. Similar results were observed when testing the inter-run reproducibility, which was relatively low, at very low concentration of 10^1 copy/µL. In fact, the standard deviation values reflect a small deviation from the mean and indicate a good reproducibility among different runs. Thus, the quantification was highly reliable between 10^1 and 10^6 copies/µL with an average difference of 3.23 cycles per ten-fold dilution. The linear relationship of the Ct with IGS copy numbers/µL suggests that this Q-PCR is a valuable and accurate tool for quantitative monitoring of *V. dahliae* inoculum in the soil (Table 1). The data provided from CV were reported to range around the value of 1%. This percentage was cited in most of the literature dealing with pathogen quantification methods and could be considered satisfactory (Demes et al., 2012; Barkallah et al., 2013). The effect of soil background DNA on the sensitivity of the optimized Q-PCR was investigated by using a standard curve containing 10^6 copies /µL to 1 copy/µL prepared in total DNA soil extracts. The analysis of the Ct values obtained with the different DNA dilutions showed that the sensitivity of real-time PCR assays was slightly but not significantly affected by interactions between soil extracts and fungal DNA concentration (r^2 = 0.943) ($P < 0.0001$). Although no significant differences were observed in the Ct values for the DNA at high concentrations of 10^6, 10^5, 10^4 or 10^3 copies/µL, considerable variability was observed among the Ct values at low concentrations of 10^2 and 10^1 copies/µL. At 10^2 copies/µL of the IGS region, the Ct value for the DNA soil extract was the highest (32.89 ± 1.12) and the Ct for the recombinant plasmid was the lowest (30.35 ± 1.32) ($P < 0.0001$). At 10^1 copies/µL, the fungus was no longer detectable in DNA soil extract. Overall, the amplification efficiency, sensitivity, and reproducibility of the newly developed Q-PCR assay were not influenced by the presence of non-target DNA from soil DNA extracts. The protocol described in this study showed strong qualities in terms of sensitivity, specificity, and reproducibility compared with those reported with other Q-PCR methods (Banno et al., 2011; Bilodeau et al., 2012). Thus, this real-time PCR allows detection of *V. dahliae* DNA at levels that would not be detected by conventional PCR.

Table 1: Ct mean, standard deviation (SD) and covariance (CV) defined from inter and intra-run reproducibility tests, performed on five replicates of genomic DNA standard in a single run or five different runs.

Reproducibility settings	Dilution	Mean Ct	Ct min	Ct max	SD (±)	CV (%)
Inter run	1. 10^6	09.12	08.72	09.39	0.44	1.13
	1. 10^5	12.54	12.34	12.93	0.51	1.23
	1. 10^4	15.13	14.78	15.74	0.62	1.36
	1. 10^3	18.41	18.11	18.93	0.63	1.36
	1. 10^2	22.12	21.70	22.66	0.71	1.43
	1. 10^1	25.91	25.55	26.76	0.85	1.59
	1	29.88	29.15	30.78	1.16	2.16
Intra run						
	1. 10^6	09.23	08.92	09.56	0.49	1.18
	1. 10^5	12.37	12.27	12.58	0.61	1.36

$1.\ 10^4$	15.26	14.82	15.50	0.66	1.39
$1.\ 10^3$	18.27	17.89	18.63	0.74	1.48
$1.\ 10^2$	21.89	21.58	22.40	0.80	1.53
$1.\ 10^1$	25.84	25.42	26.32	0.89	1.67
1	29.78	29.28	30.56	1.33	2.41

In the present study, we demonstrate that the *V. dahliae* DNA can be accurately quantified over a large range of concentration using real-time PCR in naturally infested samples from diverse origins, where many different organisms coexist with the target species. In the case of naturally infested soil samples, it is difficult to distinguish accurately the target fungi, *V. dahliae*, from the other soil-borne fungi such *V. albo-atrum* and *V. tricorpus*, by the use of poor discriminative methods like soil plating (Attalah et al., 2007; Bilodeau et al., 2012). Such procedures are time-consuming and delay the identification of *V. dahliae* MS. Consequently, the availability of this new Q-PCR protocol for the quantification of *V. dahliae* may be a useful tool for the studies of this pathogen population dynamics in naturally infected soils.

High positive correlation was found between disease severity and the quantified amount of *V. dahliae* DNA in naturally infested soils. The statistical analysis using a Tukey test indicates that the developed Q-PCR assay was reliable for the detection of significant differences between different disease severity stages. As shown in Figure 3, significant differences were recorded between each two consecutive disease severity stages, except for the disease severity stages 0 and 1, which were not significantly different (Fig. 3). In fact, *V. dahliae* incidence and severity increase as inoculum density of the pathogen in soil increases. Several plant hosts of *V. dahliae* have been shown to exhibit a direct relationship between the inoculum density in soil and progression of the disease. The effect of inoculum density on *V. dahliae* incidence in olive orchards was recently confirmed. Thus, the percentage of affected olive trees belong to the cultivar 'Arbequina' increased linearly with the inoculum density in the soil (Fernando Roca et al. 2016). These results demonstrate the reliability of the present assay in the prediction of the disease risk level before installing new olive plantations (Harris et al., 1996; Xiao and Subbarao, 1998; Berbegal et al., 2007; Peters et al., 2009).

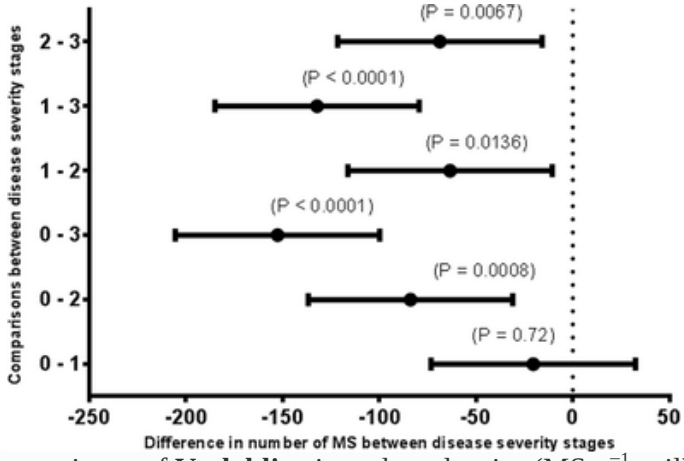


Figure 3: Multiple comparisons of **V. dahliae** inoculum density (MS g^{-1} soil) determined by real-time PCR at different disease severity stages. The **x**-axis represents the difference in inoculum density between different disease severity stages. Differences were considered significant at a **p**-value <0.05. Data were compared using Tukey's honest significant difference (HSD) test.

5. CONCLUSIONS

The current assay should give more accuracy and specificity for *V. dahliae* quantification in agricultural soils. In fact, the application of a highly sensitive Q-PCR system, combined with an efficient commercial DNA extraction kit and well reproducible standard curves such as the positive

plasmid control used in this study, will facilitate the reproducibility of the quantification results and thus allow the detection of very low inoculum levels in olive orchards or in soils designated for new olive plantations. This assay is thus important for the management of this wilt threatening the Tunisian olive industry, given that more than 60% of olive plantations belong to the cultivar Chemlali, which is extremely susceptible to VWO. Although this protocol has been useful for the quantification of *V. dahliae* in naturally infected soil samples, it is necessary to evaluate its reliability in different soil types. In addition, the persistence of nonviable MS DNA in the soil could affect the accuracy of the assay. Therefore, validation of the assay should be completed by comparing the quantitative results obtained by Q-PCR and the soil plating method for soil samples subjected to fungicide treatment against *V. dahliae*. Nevertheless, the existence of a strong positive correlation between the Q-PCR assay and the plating method in this study suggests that nonviable MS do not influence the final quantification result. Our results indicate that the development of the *V. dahliae*-specific protocol and its application to this pathogen quantification in the soil, and even in plant tissues, would be of great value for the studies aimed to design an efficient management program for this wilt, which actually causes severe yield losses in young olive orchards.

ACKNOWLEDGMENT

This study was supported in part by a grant from the PESTOLIVE project in Tunisia to M.A. Triki, and Research Laboratory APREGO, and the research unit of toxicology- environmental microbiology and health to R. Gdoura.

REFERENCES

- Atallah ZK, Bae J, Jansky SH, Rouse DI, Stevenson WR (2007) Multiplex real-time quantitative PCR to detect and quantify *Verticillium dahliae* colonization in potato lines that differ in response to Verticillium wilt. Phytopathology 97: 865–872.
- Banno S, Saito H, Sakai H, Urushibara T, Ikeda K, Kabe T, Kemmochi I, Fujimura M (2011) Quantitative nested real-time PCR detection of *Verticillium longisporum* and *Verticillium dahliae* in the soil of cabbage fields. J. Gen. Plant. Pathol 77: 282–291.
- Barkallah M, Fendri I, Dhieb A, Gharbi Y, Greub G, Gdoura R (2013) First detection of *Waddlia chondrophila* in Africa using SYBR Green real-time PCR on veterinary samples. Vet Microbiol 164: 101–107.
- Berbegal M, Ortega A, García-Jiménez J, Armengol J (2007) Inoculum density-disease development relationship in Verticillium Wilt of artichoke caused by *Verticillium dahliae.* Plant Dis 9: 1131-1136.
- Bilodeau GJ, Koike ST, Uribe P, Martin FN (2012) Development of an assay for rapid detection and quantification of *Verticillium dahliae* in soil. Phytopathology 102: 331-343.
- Debode J, Van Poucke K, França SC, Maes M, Höfte M, Heungens K (2011) Detection of multiple *Verticillium* species in soil using density flotation and real-time polymerase chain reaction. Plant Dis 95: 1571-1580.
- Demes M, Bartsch H, Scheil-Bertram S, Mucke R, Fisseler-Eckhoff A (2012) Real-Time PCR Data Processing Shown by the Analysis of Colorectal Specific Candidate Genes, ERCC1, RRM1 and TS in Relation to β2M as Endogenous Control. Appl. Sci 2: 139-159.
- Fradin EF, Thomma BPHJ (2006) Physiology and molecular aspects of Verticillium wilt diseases caused by *Verticillium dahliae* and *Verticillium albo-atrum*. Mol Plant Pathol 7: 71-86.
- Gharbi Y, Alkher H, Triki MA, Barkallah M, Trabelsi R, Fendri I, Gdoura R, Daayf F (2015b) Comparative expression of genes controlling cell wall-degrading enzymes in *Verticillium dahliae* isolates from olive, potato and sunflower. Physiol. Mol. Plant. Pathol 91: 56-65.
- Gharbi Y, Triki MA, Trabelsi R, Fendri I, Daayf F, Gdoura R (2015a) Genetic structure of *Verticillium dahliae* isolates infecting olive tree in Tunisia using AFLP, Pathogenicity and PCR Markers. Plant Pathol 64: 871-879.

- Goud JC, Termorshuizen AJ (2003). Quality of methods to quantify microsclerotia of *Verticillium dahliae* in soil. Eur. J. Plant. Pathol. 109, 523–534.
- Goud JC, Termorshuizen AJ, Gams W (2003) Morphology of *Verticillium dahliae* and *Verticillium tricorpus* on semi-selective media used for detection of *V. dahliae* in soil. Mycol Res 101: 822–838.
- Harris DC, Yang JR (1996) The relationship between the amount of *Verticillium dahliae* in soil and the incidence of strawberry wilt as a basis for disease risk prediction. Plant. Pathol 45: 106-114.
- Harris DC, Yang YR, Ridout MS (1993) The detection and estimation of *Verticillium dahliae* in naturally infested soil. Plant Pathol 42: 238–250.
- Jiménez-Díaz RM, Cirulli M, Bubici G, Jiménez-Gasco MM, Antoniou PP (2012) Verticillium wilt, a major threat to olive production: Current status and future prospects for its management. Plant Dis 96: 304-329.
- Kabir Z, Bhat RG, Subbarao KV (2004) Comparison of media for recovery of *Verticillium dahliae* from soil. Plant Dis 88: 49-55.
- Lievens B, Brouwer M, Vanachter ACRC, Cammue BPA, Thomma BPHJ (2006) Real-time PCR for detection and quantification of fungal and oomycete tomato pathogens in plant and soil samples. Plant Sci 171: 155-165.
- López-Escudero FJ, Blanco-López MA (2007) The relationship between the inoculum density of *Verticillium dahliae* and the progress of Verticillium wilt of olive. Plant Dis 91:1372–1378.
- Mahuku GS, Platt HW (2002) Quantifying *Verticillium dahliae* in soils collected from potato fields using a competitive PCR assay. Am. J. Potato. Res 79: 107-117.
- Mansouri B (2012) An improved ethanol medium for efficient recovery and estimation of *Verticillium dahliae* populations in soil. Can. J. Plant. Pathol 33(1): 88-93.
- Peters J, O'Neill T, Green K, Woodhall J, Barnes A, Lane C (2009) Detection and quantification of *Verticillium dahliae* and *Verticillium albo-atrum* in soils to determine risk of Verticillium wilt in strawberry. 10th International Verticillium Symposium. Book of Abstracts. Corfu Island, Greece, pp 95
- Roca LF, Moral J, Trapero C, Blanco-López MA, López-Escudero FJ (2016) Effect of Inoculum Density on Verticillium Wilt Incidence in Commercial Olive Orchards. J. Phytopathol 164: 61–64
- Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, Van den Hoff MJ, Moorman AF (2009) Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. Nucleic Acids Res 37 (6): e45.
- Schena L, Nigro F, Ippolito A, Gallitelli D (2004) Real-time quantitative PCR: A new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. Eur. J. Plant Pathol. 110: 893-908.
- Svec D, Tichopad A, Novosadova V, Pfaffl MW, Kubista M (2015) How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. Biomolecular Detection and Quantification 3: 9-16.
- Termorshuizen AJ, Davis JR, Gort G, Harris DC, Huisman OC, Lazarovits G, Locke T, Vara JMM, Mol L, Paplomatas EJ, Platt HW, Powelson M, Rouse DI, Rowe RC, Tsror L (1998) Interlaboratory comparison of methods to quantify microsclerotia of *Verticillium dahliae* in soil. Appl. Environ. Microb 64: 3846-3853.
- Tjamos EC, Jiménez-Díaz RM (1998) Management of disease. In: Hiemstra JA, Harris DC (eds) A compendium of Verticillium wilts in tree species. Ponsen and Looijen, Wageningen, pp 55–57
- Xiao CL, Subbarao KV (1998) Relationships between *Verticillium dahliae* inoculum density and wilt incidence, severity, and growth of cauliflower. Phytopathology 88: 1108-1115.

Contribution à l'étude bioécologique du psylle de l'olivier *Euphyllura olivina (Hémiptera Psyllidae)* en conditions semi-arides dans une oliveraie à Ain Errich, Wilaya de M'sila, Algérie

Hamdani M[1]., Hoceini F[1]., Sellami M[2]., Cherief A[1]., Chaima KH[1]., Salem H[1].
[1]Département des Sciences Agronomiques, Faculté des Sciences, Université de Msila Algérie.
[2] : Département de Zoologie Agricole et Forestière, Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El Harrach Alger - Algérie.
E-mail : hamdani2579@yahoo.com

RESUME
L'étude menée sur la bioécologie du psylle de l'olivier *Euphyllura olivina (Hémiptera :Psyllidae)*, dans la daïra de Ain rich, située à l'extrême sud de la wilaya de M'sila, de décembre 2016 à Mai 2017, a révélée que les pontes ont eu lieu, au début du mois d'avril, avec un pic maximal à la fin du mois avec 164 œufs.
Toutes les directions cardinales de l'arbre sont infestées par le ravageur, les directions Sud et Nord sont plus attaqués par les larves du premier et deuxième stade, par contre la direction Ouest est plus attaquée par le quatrième stade larvaire ; pour les adultes, les premiers effectifs sont enregistrés au début du mois de Mai avec 64 individus. La mortalité des larves, a eu lieu en fin Mai avec un taux avoisinant les 90%, causée par les conditions climatiques extrêmes ainsi que les auxiliaires existantes sur les lieux.
Mots clés : adulte, Ain rich, Msila, Psylle, ravageur, stade.

1. INTRODUCTION

La culture de l'olivier occupe une place privilégiée dans l'agriculture Algérienne au niveau de la production agricole, elle est placée au 7éme rang avec une production qui dépasse 400 000 tonnes. Les Oliveraies couvrent une superficie de 412 000 hectares avec 47 million d'arbres, soit plus de 50% du patrimoine Oléicole national (MADR, 2017).
L'Olivier présente une remarquable rusticité et une plasticité lui permettant de produire dans des conditions difficiles (adaptation à une large gamme de sol et une insuffisance en eau), mais sa productivité reste toujours limitée par plusieurs facteurs biotiques et abiotiques. Les problèmes phytosanitaires de l'olivier constituent le facteur principal de la faible productivité de cette culture, elle peut être fortement attaqué par la mouche de l'Olivier (*Bactrocera oleae*) qui est son principal ravageur, et la Teigne de l'Olivier (*Prays oleae*), le Psylle (*Euphyllura olivina*) et la Cochenille noire (*Saissetia oleae*). Ces ravageurs animaux s'attaquent à tous les organes de l'Olivier (feuilles, fleurs, rameaux et fruits).
Il faut souligner que la culture de l'olivier en Algérie est ancestrale. Une entomofaune des ravageurs de l'olivier est installée depuis longtemps dans cet agros système. La richesse et l'abondance de ces entomophage sont favorisées par le mode de conduite de l'oléiculture Algérienne basé sur l'utilisation limitée des pesticides.
Afin d'étudier le rôle que les ravageurs exercent sur les Oliviers et leurs effets, que notre étude est menée sur l'un des ravageurs important telque le psylle de l'olivier *Euphyllura olivina* en condition arides, ou on a effectuée une étude bioécologique de ce ravageur.
Plusieurs travaux ont été effectués sur les ravageurs de l'Olivier sont très importantes comme ceux d'Al Ahmed et Al Hamidi (1984), d'Alford (1994), de Guario et La Notte (1997), d'Alvarado (1999), de Coutin (2003) et Duriez (2001).
Dans la région de M'sila, pas des travaux effectués sur la bioécologie d'*E. olivina*. Ainsi, l'étude de ce ravageur a été menée dans le but de connaitre les conditions favorables et celles qui limitent son développement.

2. MATERIEL ET METHODES

L'étude menée sur la bioécologie du psylle de l'olivier *Euphyllura olivina* dans un verger d'olivier situé dans la Daira d'Ain Errich, distante de 142 Km au sud Ouest de la wilaya de M'sila.

Le verger est d'une superficie de 2 ha, avec 180 arbres, âgés de 12 ans. Notre travail, effectué au cours de sept mois a partir du Mois de Décembre 2016 jusqu'au mois de mai 2017, consiste a faire des sorties hebdomadaires sur le terrain, afin de réaliser des échantillonnages, en prélevant un rameau de chaque direction de l'arbre, sur les 10 arbres choisies aléatoirement, ainsi que des frappages au sein des arbres sont effectués pour récupérer les adultes ; ensuite les échantillons sont mis dans des sachets en plastique étiquetés, portant la date et la direction de l'arbre.

Au laboratoire, des observations sous loupe binoculaire sont effectuées, afin de dénombrer les différents stades biologiques de l'insecte, œufs et larves et adultes.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Répartition des différents stades biologiques d'*Euphyllura olivina* en fonction du temps

- Répartition des œufs en fonction du temps

La figure 1 montre que les premiers œufs *d'Euphyllura olivina* sont émis au mi Avril avec un effectif de 121 œufs, qui progresse pour atteindre 194 œufs au début Mai (06/05/2017) ; puis régresse à 125 œufs à la mi Mai pour disparaitre à la fin Mai. Cette période coïncide avec les progressions des températures et la diminution de l'Humidité, donc le dernier mois de la période printanière.

En effet, Coutin (2003), note que les adultes d'*E. olivina* hivernent et les pontes printanières sont déposées en mars-avril à la face inférieure des feuilles des pousses terminales.

Selon Hmimina (2009), des températures supérieur à 27°C ou inférieur à 12°C, accompagnées d'une faible hygrométrie (50%) peuvent réduire 2/3 le potentiel de reproduction d'une femelle, d'ailleurs en hiver la ponte est très réduite et les adultes sont immobiles.

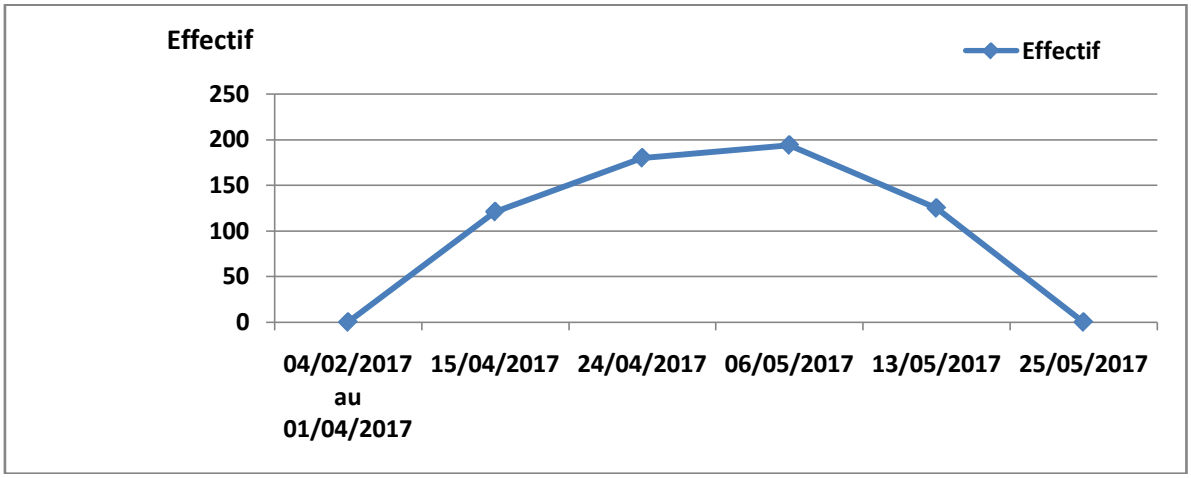


Figure 1 : Effectif des œufs d'*Euphyllura olivina* en fonction du temps

- Répartition des larves en fonction du temps

La figure 2 portant sur la distribution des larves dans le temps montre que les deux derniers stades larvaires (4ème et 5ème stade larvaire), présent avec des effectifs élevés allant jusqu'à un pic maximal de 150 larve pour le 5ème stade et 83 larve pour le 4ème stade, qui coïncide avec une masse importante en matière cotonneuse secrétée par ces derniers, ainsi que notre échantillonnage est basé sur la collecte des rameaux portant cette substance blanche cotonneuse signe de présence de l'insecte étudié.

Hmimina (2009) a noté que les larves d'*E olivina* du 4ème et 5ème stade secrètent, en abondance, une substance blanche cotonneuse

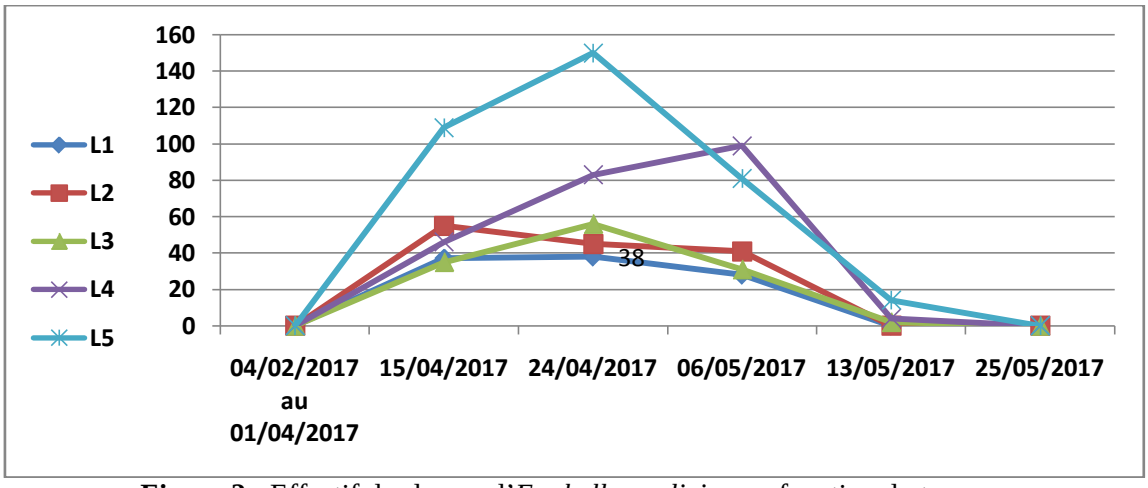


Figure 2 : Effectif des larves d'*Euphyllura olivina* en fonction du temps

- Répartition des adultes en fonction du temps

La figure 3 montre que les premiers individus d'adultes sont enregistrés au début du mois de Mai, avec un effectif de 64 puis régresse pour atteindre uniquement 4 individus à la mi Mai.

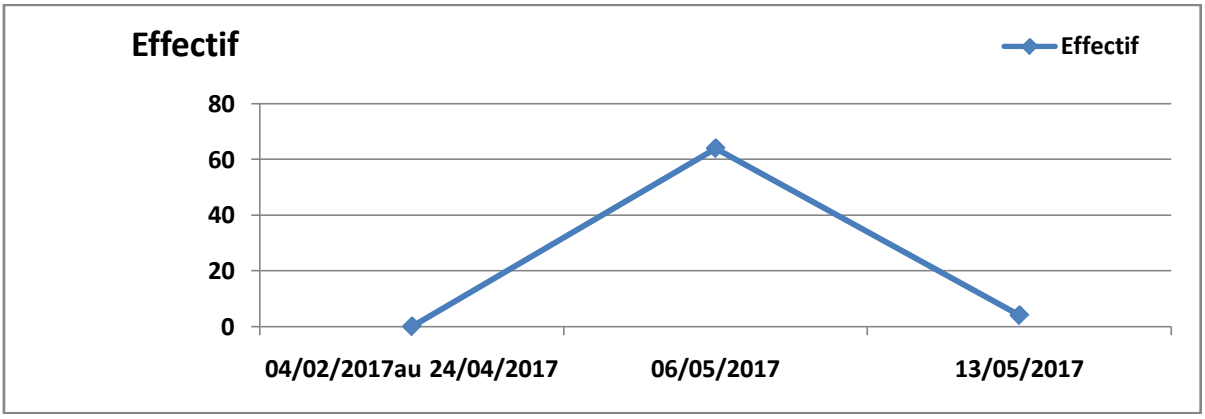


Figure 3 : Répartition des adultes d'*Euphyllura olivina* en fonction du temps

3.2. Répartition des différents stades biologique d'*Euphyllura olivina* en fonction des directions de l'arbre

- Répartition des œufs en fonction des directions de l'arbre

D'après la figure 4, on remarque que les œufs sont présent sur toutes les directions de l'arbre, avec un taux élevé de 50,41% à la mi Avril du coté Sud, suivi de la direction Nord avec un taux de 23,96%, ainsi qu'à la fin avril cette dernière est avec un taux important de 36,66% ; alors que vers le début du mois de Mai les taux sont presque voisines ; à la mi Mai, la direction Sud enregistre un Taux très élevé avoisinant 51,20%, alors que la direction Nord enregistre un faible taux qui est de 9,60% , puis les effectifs sont nulles à la fin du mois de Mai.

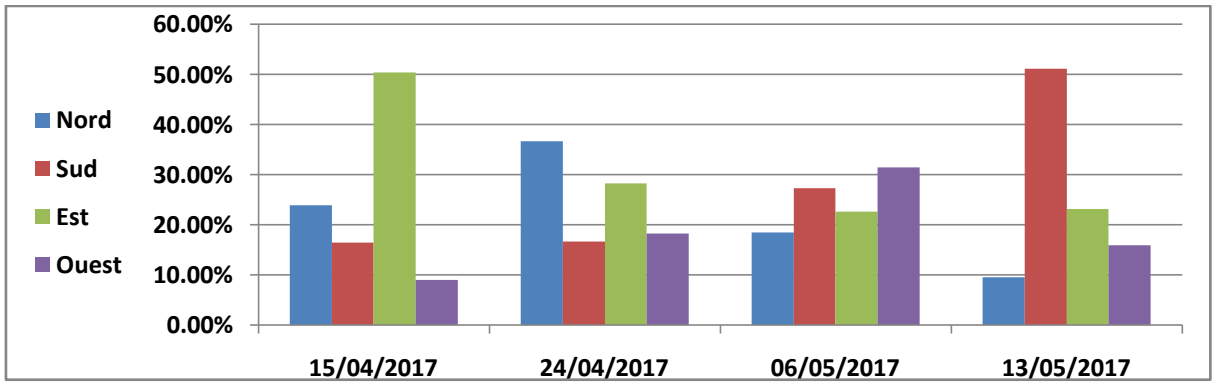


Figure 4 : Répartition des œufs d'*E. olivina* en fonction des directions cardinales de l'arbre.

- Répartition des larves en fonction des directions de l'arbre

D'après les figures 5, 6, 7, 8 et 9, il ressort que toutes les directions de l'arbre (Nord, Sud, Est et Ouest) sont touchées par E. olivina, cependant les directions Nord et sud enregistrent des taux élevés pour le premier et le deuxième stade larvaire à la mi Mai avec des taux de 37,83% pour le premier stade en direction Sud, et de 32,43% en direction Nord ; pour le deuxièmes stade larvaire, la direction Nord enregistre un taux élevé de 47,27% , suivie de la direction Est avec 23,64% ; alors que les taux à la fin du mois d'avril sont important à la direction Sud avec des taux de 26,31% pour le premier stade et de 44,44% pour le deuxième stade.

A la mi Mai, aucun effectif n'est enregistré des larves du premier et du deuxième stade ; alors que à cette période on enregistre des taux élevés des larves du troisième stade avec 50% aux directions Nord et Ouest , pour le quatrième stade la direction Ouest qui représente un taux élevé de 50%, alors que le cinquième stade larvaire est enregistré avec un taux de 71,43% sur la direction Sud.

Sur ceux, on peut dire que les premiers stades larvaires sont enregistrés avec des taux élevés au début du printemps puis ces larves se développent pour atteindre leurs cycle de vie en mois de Mai pour se nymphoser et donner des adultes.

- 1er stade larvaire

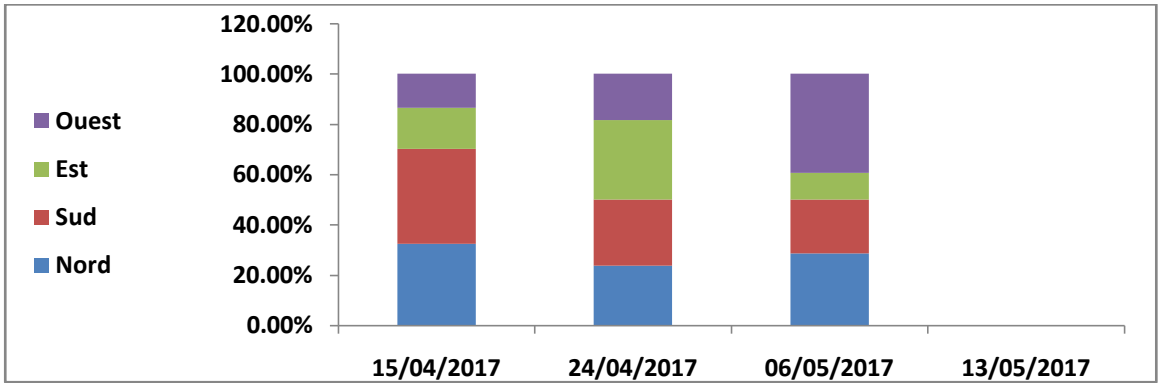


Figure 5 : Taux des larves du 1er stade d'*Euphyllura olivina* en fonction des directions de l'arbre

- 2ème stade larvaire

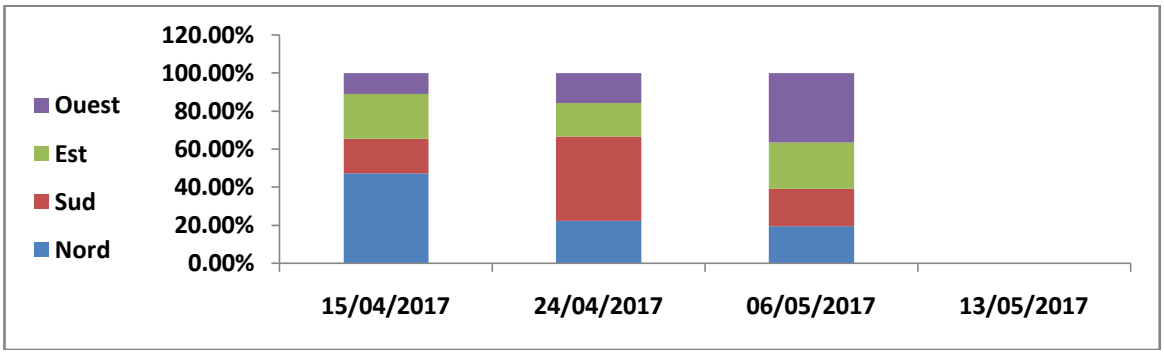


Figure 6 : Taux des larves du 2eme stade d'*Euphyllura olivina* en fonction des directions de l'arbre.

- 3ème stade larvaire

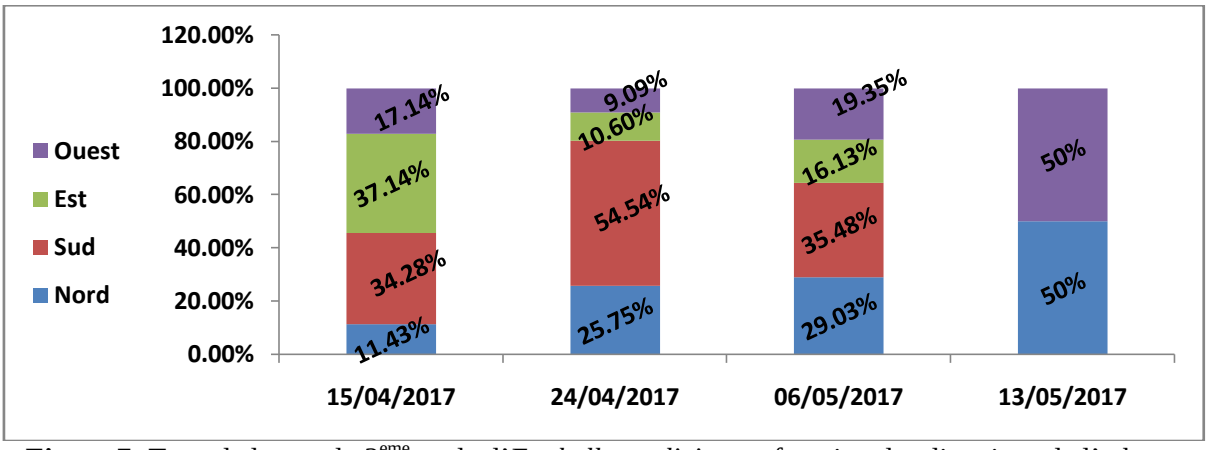


Figure 7: Taux de larves du 3eme stade d'*Euphyllura olivina* en fonction des directions de l'arbre.

- 4ème stade larvaire

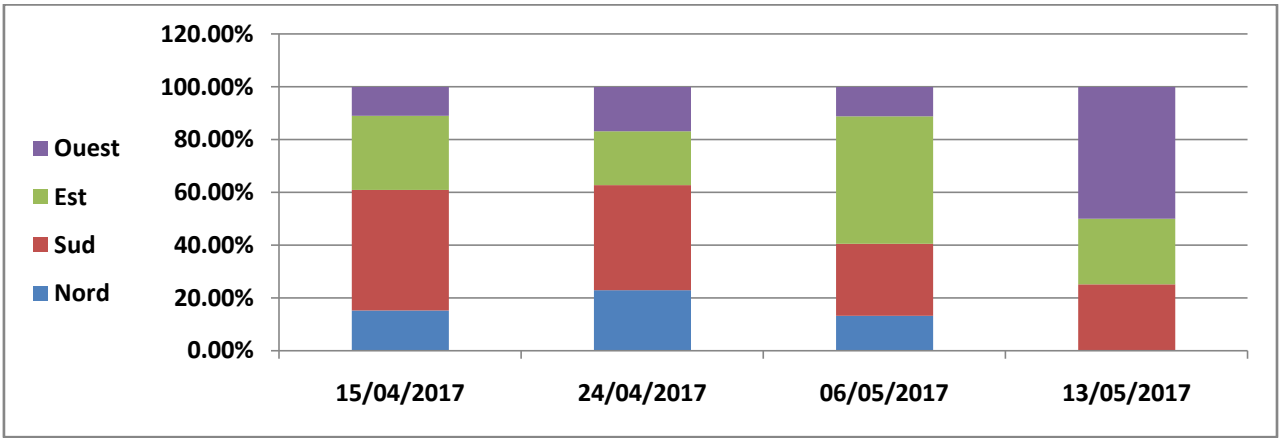


Figure 8: Taux des larves du 4ème stade d'Euphyllura olivina en fonction des directions de l'arbre.

- 5ème stade larvaire

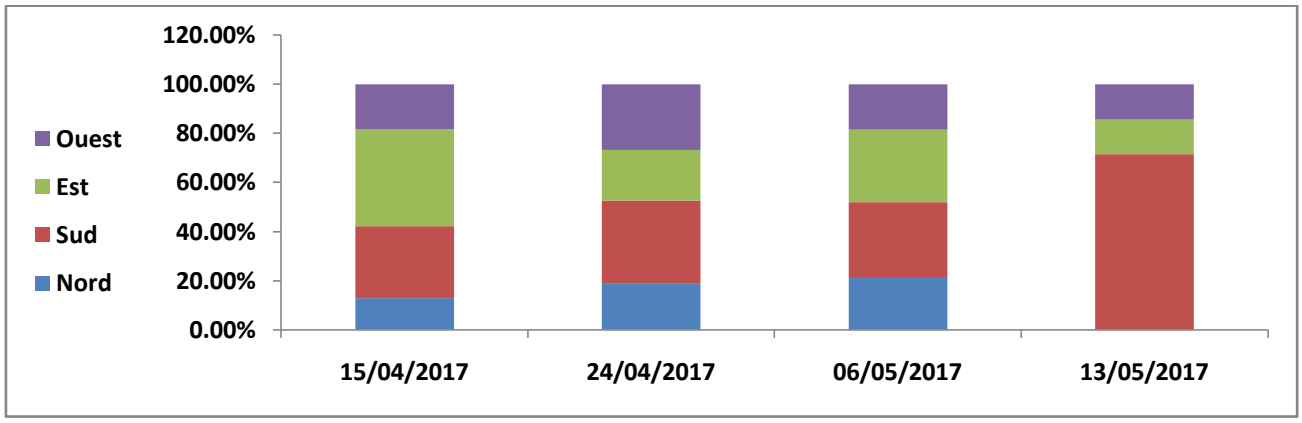


Figure 9: Taux des larves du 5eme stade d'Euphyllura olivina en fonction des directions de l'arbre.

- Répartition des adultes en fonction des directions de l'arbre

Concernant la répartition des adultes en fonction des directions cardinales de l'arbre, la figure 10 montre que, au mois d'Avril aucun effectif n'est enregistré, par contre au mois de Mai on a enregistré des taux important sur les directions Sud avec 35,94%, suivie de la direction Nord avec 28,12% (Début Mai), à la mi Mai, la direction Sud enregistre un taux de 50%.

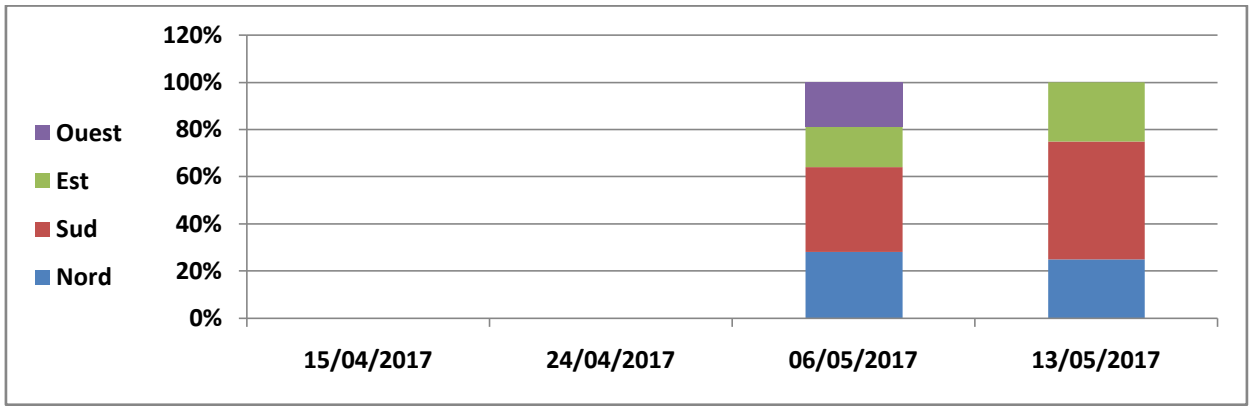


Figure 10 : Répartition des adultes d'*E. olivina* en fonction des directions de l'arbre.

3.3. Taux de mortalité

- En fonction du temps

La figue 11 montre que, la mortalité n'est enregistrée qu'au mi Mai avec un taux de 90%, ce phénomène n'est justifié que par les conditions du climats qui caractérise la région d'étude ou bien la présence des ennemis naturels en cette période ce nous mène a réaliser des inventaires des auxiliaires dans les prochaines études.

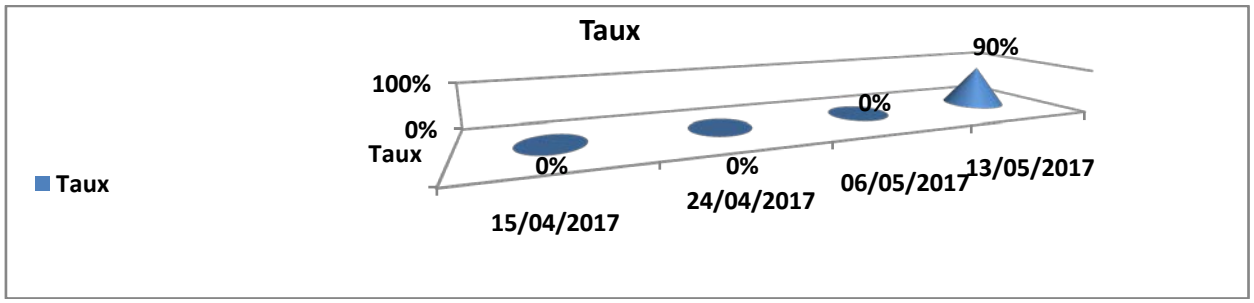


Figure 11 : Taux de mortalité des larves d'*Euphyllura olivina* en fonction du temps.

- En fonction des directions de l'arbre

Concernant la mortalité, en fonction des directions de l'arbre, la figure 12 montre que, la direction Sud enregistre un taux de mortalité élevé avoisinant les 55%, suivie de la direction Ouest avec environ 27% ; ces taux montre que, les vents chauds venant du coté Sud ainsi que du Sud Ouest, tel que Djelfa et Biskra entraine ce phénomène de mortalité des larves dans le verger d'olivier suivi. Hmimina (2009) a signalé que les conditions climatiques et, dans une certaines mesures, la diversité des variétés d'olivier paraissent être les principaux facteurs agissant sur le développement d'*E. olivina* et sur son cycle évolutif.

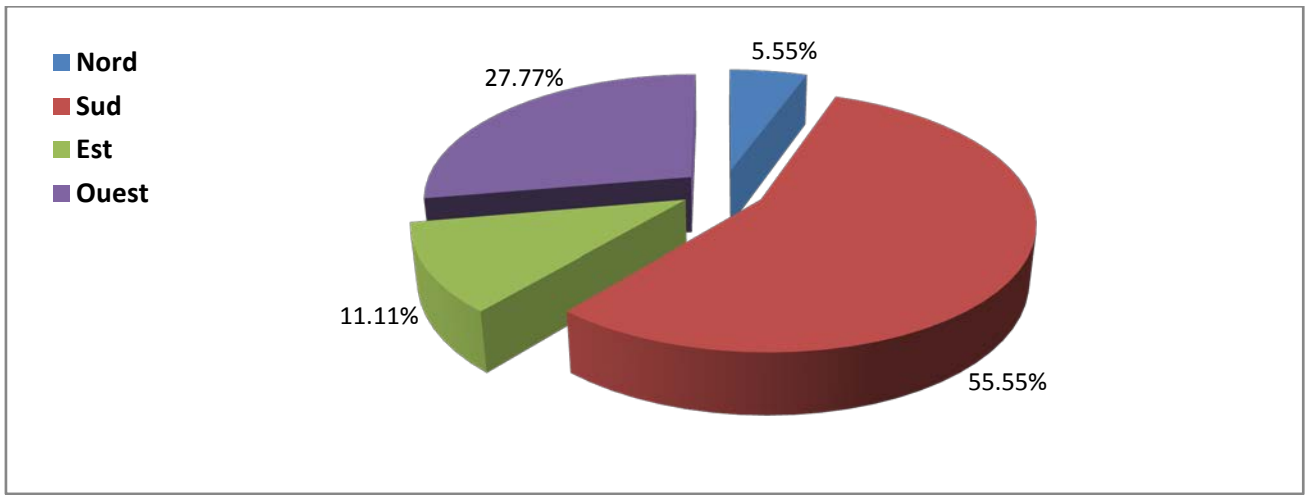


Figure12 : Taux de mortalité des larves d'Euphyllura olivina en fonction des directions de l'arbre.

4. CONCLUSION

L'étude menée sur la bioécologie du psylle de l'olivier *Euphyllura olivina* , dans un verger d'olivier à Ain rich, Wilaya de M'sila, nous a permis d'établir les notes suivantes :

- Les premiers œufs émis par *E. olivina* sur l'olivier sont enregistrés au début du mois d'Avril 2017, avec un pic en fin Avril.
- Les directions Sud et Ouest sont les directions préférentielles de ponte pour les femelles de l'insecte.
- Les trois premiers stades larvaires sont avec des effectifs élevés au début du printemps (début Avril), puis régressent en fin Mai ; alors que le quatrième et cinquième stade larvaire est avec des taux élevés en fin Mai.
- Les adultes sont enregistrés en mi Mai aven un pic de 64 individus, puis régressent à un faible effectif en fin Mai ce qui justifie l'absence des œufs en fin Mai.
- Toutes les directions de l'arbre sont infestées par les larves de l'insecte, avec des taux qui se rapprochent pour le troisième stade.

- Le taux de mortalité est enregistré en fin Mai, période de progression des températures, et diminution de l'humidité, ainsi que les vents chauds du sur qui entraine le dessèchement des larves et des œufs.
- Le taux de mortalité est enregistré, avec un taux élevé sur la direction Ouest de l'arbre de l'olivier.

A travers cette étude, nous constatons que l'établissement d'un programme de lutte contre *E. olivina* dépend de plusieurs paramètres. Avant de proposer une méthode de lutte il faudrait tenir compte les différents facteurs relatifs aux fluctuations d'*E. olivina* entre autre les facteurs climatiques, la phénologie de l'arbre et le complexe parasitaire, à ceci s'ajoute la nécessité :

D'une approche et de l'adhésion de tous les organismes de recherche tel que l'université, l'INRA, l'INPV, les Instituts techniques de production des plants pour mieux suivre l'apparition de l'insecte.

Un contrôle des plants importés en exigeant un certificat phytosanitaire à la rentrée des douanes.

De bien entretenir les vergers, à savoir des soins culturaux adéquats particulièrement la taille. Il serait intéressant d'élargir notre étude à la physiologie digestive de l'insecte pour mieux connaitre son mode d'alimentation, et aussi une lutte biologique reste la seule à envisager en procédant à des élevages de parasites et des lâchers qui renforcent l'activité des auxiliaires existantes. Il serait intéressant aussi de poursuivre le travail que nous avons commencé, concernant le piégeage des adultes d'*E. olivina* en utilisant un attractif spécifique tel que le Phosphate d'ammonium afin d'élaborer la courbe de vol des adultes.

REFERENCES

- Al Ahmed M. et Al Hamidi M., 1984. Le dépérissement de l'olivier dans le Sud Syrien. Revue de la protection des végétaux, 70, 323-333.
- Alford D. V., 1994. Ravageurs des végétaux d'Ornement.Version française. Ed. INRA, 464 p.
- Beck J.S., Danks F., 1983 . Determinación del umbral de tratamientos para la mosca del olivo (*Bactrocera oleae* Gmel, Diptera, Tephritidae) en olivar destinado a la producción de aceite. Bol.Sanid. Vegetal Plagas Vol. 21 n° 4, pp 577 - 588.
- Coutin R., 2003. Les insectes de l'olivier. Insectes, 19 (3), 1 30p.
- Duriez J.M. 2001. Agriculture raisonnée : l'oléiculture française tournée vers la protection sanitaire raisonnée. Olivæ, n° 86, 16p.
- Guario A.et La Notte F.1997.La mouche de l'olivier en zone méditerranéenne connaissances actuelles et stratégies de lutte. Phytoma, la défense des végétaux n°493, 11p.
- Hmimina M. 2009. les principaux ravageurs de l'olivier, la mouche, la teigne, le psylle et la cochenille noire. Bull. Men. Inf. et Liaison du PNTTA, 4 p.
- MADR , 2017 : Bulletin statistiques, Ministère de l'Agriculture et du développement rural, 4p.

Répartition spatio-temporelle des populations de Xiphenema spp. dans les vergers de vigne en Algérie.

Hoceini F.[1], Bounaceur F.[2], Nebih D.[3], Hamdani M.[1], Berrabah D.[4]
[1]Université Mohamed Boudiaf, Faculté des sciences, Dép. sciences agronomiques, M'Sila, Algérie.
[2]Université Ibn Khaldoun, Faculté des Sciences Agronomiques et Vétérinaires, Tiaret, Algérie.
[3]Université Saad Dahleb, Faculté des Sciences Agronomiques et Vétérinaires, Blida, Algérie.
[4]Centre de recherche scientifique et technique sur les régions arides, Biskra, Algérie.
Email : hoceinifa@gmail.com

RESUME
La connaissance de la dynamique des populations bioagresseurs sont indispensables de nos jours en vu d'une meilleure gestion des ravageurs potentiels des vignobles comme les nématodes phytoparasites afin d'adopter une bonne stratégie de lutte. Dans ce contexte et devant le manque des travaux sur les nématodes de la vigne en Algérie, notre objectif s'inscrit à cette étude préliminaire qui consiste à établir la dynamique spatiotemporelle du *Xiphenema spp.* sur le genre *Vitis*, établir la cartographie au niveau régional. La présence de ce phytophage spécifique à la vigne le genre *Xiphinema* a été signalé dans 08 stations à raison de 19 stations inventoriées dans l'Ouest d'Algérie. Tandis que, la dynamique des populations de ce bioagresseur a été suivie dans deux stations d'étude situées dans le centre algérien dans deux différents bioclimats (humide et semi aride). Nos résultats révèlent également que dans les deux stations les densités moyennes sont plus élevées en période pluvieuse: printanière mars- avril et hivernale Janvier-Décembre.
Mots-clés : Algérie ; Bioagresseur; Bioclimat; Dynamique; Vigne; Xiphenema.

1. INTRODUCTION

En agriculture, les nématodes phytopharasites induisent des dommages aux plantes cultivées; toutefois ces derniers ne représentent qu'une partie des nématodes du sol, la plupart étant dit « libres » (Anonyme., 2008). Néanmoins, ces bioagrsseurs phytophages sont longtemps passés inaperçus du fait de leur taille microscopique et de la non spécificité des symptômes qu'ils engendrent. En effet, on n'observe souvent qu'un dépérissement des parties aériennes alors que ce symptôme est commun à de nombreux stress pathologiques et physiologiques. On a donc couvert l'ignorance de leur présence par le terme général de « fatigue des sols » (Bertrand et *al*., 2001).

Chez la vigne, les nématodes actuellement identifiés ne s'attaquent qu'aux racines. En effet les nématodes sont parmi les plus redoutables bioagresseurs sur vigne et qui font l'objet de plusieurs recherches et publications (Galet., 1982). Cependant, il est obligatoire d'avoir des informations sur la dynamique, la distribution et la composition des populations de nématodes en vue de bien comprendre le rôle des nématodes phytoparasites dans les écosystèmes culturaux (Bird et Ramsdeli., 1985). Parmi ces nématodes redoutables *Xiphinema sp.* (principal vecteur du court–noué) qui se répartie dans les principaux régions viticoles de l'Algérie et cause des dégâts considérables sur vigne ont aussi importants et peuvent être la cause de l'affaiblissement des sols de certains vignobles du pays. Dans ce contexte et devant le manque des travaux sur les nématodes de la vigne en Algérie, notre objectif s'inscrit à étudier la dynamique des populations de nématode du court noué et établir la répartition géographique de ce dernier en vue d'établir une base de données sur ces bioagrésseurs dans le cadre d'une gestion durable de nos vignobles.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Méthodologie

L'inventaire des nématodes associés à la viticulture en Algérie a été réalisé dans 24 stations viticoles au nord du pays. Les stations retenues lors de cette étude sont les suivantes :

- Stations viticoles de l'Ouest représentées par les régions de : Ain Temouchent (El Maleh, El Amria, Aghlal et Oubelil), Mascara (Mamounia), Mostaganem (Fornaka et Stidia), Sidi Bel Abbes (Hasi Zahana et Sidi Dahou), Oran (Boutelilis) et Relizane (Sidi Khatab).
- Stations viticoles du Centre représentées par Blida (Meftah et Mouzaia), Alger (Chebli et Birtouta), Ain Defla (Oued Zeboudj), Tipaza (Bourkika et Meurad), Médéa (Ben Chicao et Oued Harbil).

Les échantillons de sol prélevés dans les différents vignobles prospectés sont effectués sur l'ensemble des vergers sans répétitions. Ils sont prélevés sur une profondeur d'environ 50 à 70 cm. Des prélèvements élémentaires sont récoltés au hasard dans le verger à raison de 10 prélèvements de 200 à 300 g chacun. Un seul échantillon de 3 à 4 kg par site est prélevé dans la rhizosphère des plantes à l'aide d'une binette. Ils sont placés ensuite ensemble dans un sac plastique fermé hermétiquement de façon à éviter le dessèchement. Chaque sac porte les références du prélèvement (la variété, l'âge, porte greffe, région …).

Au laboratoire, Les individus de *Xiphenema* sont extraits du sol par la méthode d'extraction des seaux de Dalmasso (1966) dite méthodes de flottaison et de sédimentation, puis dénombrés sous le loupe binoculaire en prélevant 5 ml après homogénéisation des tubes. Ils sont déposés dans la cellule de comptage pour le dénombrement. Avec un canal à pêche, on peut prélever les nématodes et faire un montage temporaire entre lame et lamelle sous microscope optique pour une meilleure observation sous microscope optique. Les populations de nématodes du sol sont exprimées en nombre de nématode par dm^3 (N/dm^3), (Merny & Luc, 1996).

2.2. Traitement des données

L'analyse de données et les représentations graphiques ont été réalisées à l'aide du logiciel «SYSTAT vers. 12, SPSS 2009 et Excel TM». Dans les cas ou plusieurs facteurs sont en jeu, il peut arriver que toutes les interactions entre facteurs ne soient pas pertinentes à tester. Nous avons alors utilisé le modèle linéaire global (G.L.M).

3. Résultats et discussion

3.1. Répartition spatiale des populations de *Xiphenema spp*. dans les vignobles de l'ouest algérien:

La présence de phytophages spécifiques à la vigne du genre *Xiphinema* a été signalée dans 8 stations à raison de 19 stations inventoriées dans l'Ouest et le centre d'Algérie. L'abondance du nématode du court noué Xiphenema varie de 12 individus/dm^3 à 160 individus/dm^3 respectivement pour les stations d'Alger (Chebli) et de Sidi Belabbes.

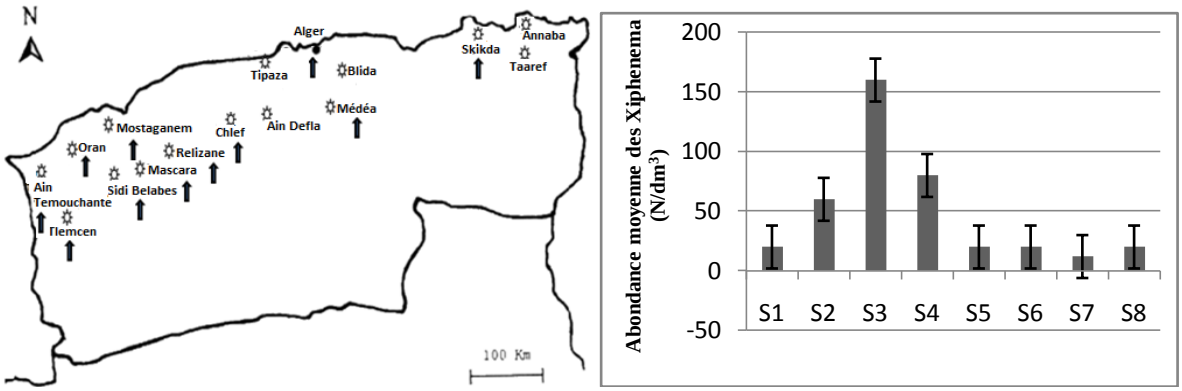


Figure 1 : Répartition géographique avec densité moyenne de nématode du court noué *Xiphenema sp*. dans les régions prospectées. S1: Relizene; S2: Ain Temouchent; S3: Sidi Belabbes; S4: Mascara; S5: Alger1; S6: Medéa3; S7:Alger2; S8: Chlef.

3.2. Variations temporelles des abondances moyennes (N/dm^3) des populations de *Xiphenema spp*.:

Afin de déterminer les variations temporelles des nématodes les plus redoutables à cette culture ; nous avons choisi deux stations du centre du pays à savoir la station expérimentale (ITAFV) de Benchicao (Médéa) et celle de Birtouta (Alger).

3.2.1. Variations mensuelles des abondances moyennes (N/dm^3) des populations de *Xiphenema spp*:

Au niveau de la station expérimentale de Birtouta, nous constatons de fortes densités des populations de *Xiphenema spp*. par rapport à ceux enregistrées dans la station expérimentale de Benchicao, notamment dans les prélèvements du mois de Janvier, mars et avril de l'année 2014. Quant à la station expérimentale de Benchicao, quatre pics sont observés respectivement en mars, mai, novembre et décembre durant l'année 2014.Toutefois, les échantillons des mois de «Juillet, Août et Septembre» s'avèrent des effectifs moyens nuls de ce phytophage durant notre période d'étude pour les deux stations d'étude.

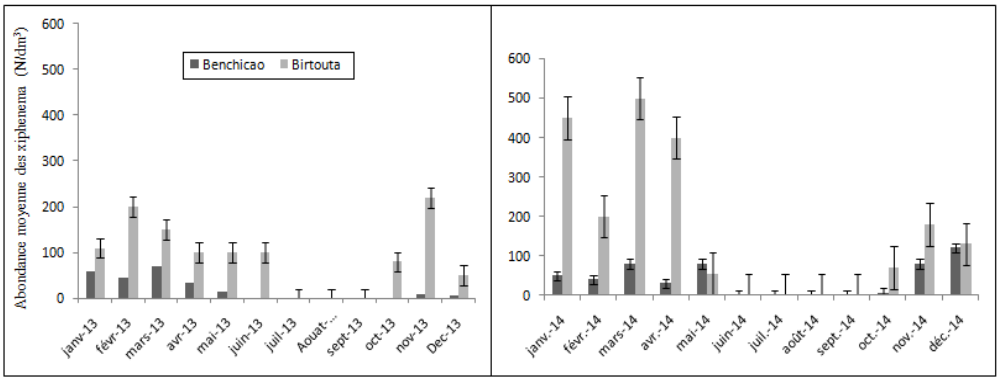


Figure 2: Variations mensuelles des abondances moyennes (N/dm^3) globales des populations de *Xiphenema spp*. au niveau des deux stations d'étude.

3.2.2. Variations saisonnières des abondances moyennes (N/dm^3) des populations de *Xiphenema spp.:*

Au niveau de la station expérimentale de Birtouta, les abondances moyennes globales des populations de *Xiphenema spp*. sont plus élevés qu'au niveau de la station expérimentale de Benchicao. La répartition des abondances moyennes des populations de *Xiphenema spp*. varient progressivement de l'été, Automne et hiver pour attendre son maximum au printemps : 360 N/dm^3 et 955 N/dm^3 respectivement au niveau de la station expérimentale de Benchicao et celle de Birtouta.

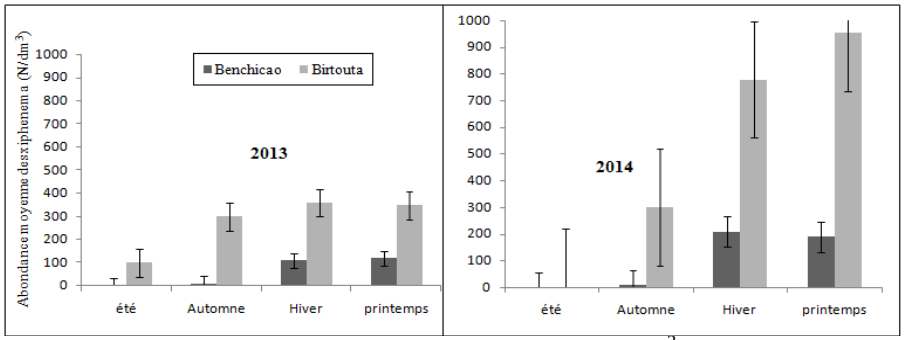


Figure 3: Variations saisonnières des abondances moyennes (N/dm^3) globales des populations de *Xiphenema* spp.au niveau des deux stations d'étude.

3.2.3. Variations temporelles des abondances moyennes (N/dm^3) des populations de *Xiphenema spp.* à travers l'analyse de la variance (GLM) :

Le modèle G.L.M. appliqué aux variations temporelles des abondances moyennes des populations de *Xiphenema spp.* au niveau des deux stations expérimentales de Birtouta (Alger) et de Benchicao (Médéa) montre des différences très hautement significatives entre la répartition des populations de *Xiphenema spp* dans les deux stations d'étude (Birtouta et Benchicao) en fonction des années ($p=0,000$; $p<0,05$). Cependant, les différences sont non significatives entre les mois et les saisons.

Cette analyse nous permet également de déduire que les abondances moyennes des *Xiphenema spp.* les plus importantes sont signalées au niveau de la station expérimentale de Birtouta (Alger). Toutefois, ces abondances varient sensiblement en fonctions des années dont les plus fortes densités représentent le cumul des prélèvements de l'année 2014 suivi par celui de l'année 2013.

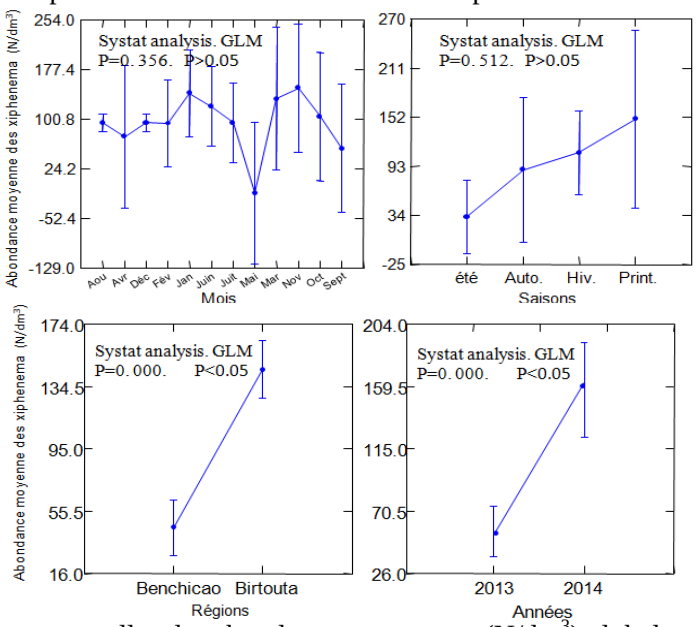


Figure 4: Variations temporelles des abondances moyennes (N/dm^3) globales des populations de *Xiphenema spp.* à travers l'analyse de la variance (GLM).

4. DISCUSSION

Parmi les phytophages spécifiques à la vigne le genre *Xiphinema* et *Longidorus*, ont été inventorié dans les stations de l'Ouest d'Algérie dans la wilaya de Ain Temouchent, de Chlef, Sidi Bel Abbes, Mostaganem et Tlemcen; de même le genre *Xiphinema* a été signalé sur plusieurs parcelles à Alger (Birtouta).

La répartition géographique des populations de *Xiphenema spp.* au niveau des stations d'étude concentrées dans l'ouest et le centre d'Algérie connus par une ancienne vocation viticole. Cette inventaire fait apparaitre la présence de nématode du court noué *Xiphenema* dans huit stations viticoles : Relizene; Ain Temouchent; Sidi Belabbes; Mascara; Alger1; Medéa3; Alger2 et Chlef. Nos résultats sont comparables à ceux de Tabouche (2007), qui a signalée la présence de quatre espèces de *Xiphinema* au Nord de l'Algérie, Blida et Médéa sur vignobles atteints du court noué avec de faibles densités et à des profondeurs comprises entre 0,90 à 1,5m, ces espèces sont : *Xiphenema index*, *X. diversicaudatum* et *X. americanum.* Les effectifs sont en moyenne d'une dizaine d'individus par dm^3 de sol ce qui est faible et rend sa détection très délicate. Par ailleurs l'étude de Esmenjaud et *al.* (1992) et Ivzic (1985) sur la distribution verticale du nématode du genre *Xiphinema index* a permis de montrer que les effectifs sont souvent plus élevés au-delà des premières profondeurs allant de 30 à 40 cm et que le nématode suit l'enracinement de la vigne, il est présent à la profondeur de 1.5m et au-delà.

Une des particularités rencontrée est la culture de proximité, en effet, au niveau de ces stations prospectées, on a noté l'importance de plantations de Figuiers en périphérie des parcelles de vigne.Toutefois, ces plantations peuvent jouer un rôle important dans multiplication de ce nématode, ceux ci est en concordance avec les travaux de Arias et Navacerrada (1973) portant sur la distribution géographique du genre *Xiphinema* en Espagne. De même, Coiro et Agostinelli (1991), ont démontré que *Xiphinema index* se multiple plus rapidement sur figuier que sur vigne.

L'étude des variations temporelles des densités moyennes des populations de *Xiphenema spp*, rencontrées au niveau des deux stations expérimentales montre que les abondances moyennes globales de ce nématode sont plus élevées dans la station expérimentale de Birtouta. Alors que les abondances moyennes des populations de *Xiphenema spp.* sont moins importantes dans la station expérimentale de BenChicao malgré les taux d'humidité du sol qui sont presque similaires dans les deux stations expérimentales. On peut penser que le type du sol lourds de la station expérimentale de Birtouta est due en fait que ces sols subissent moins de dessiccation à laquelle certains genres de *Xiphinema* sont sensibles particulièrement *X. index.* Nos résultats sont en concordance avec les travaux de Dalmasso et Veuitenez (1977) et Esmendjaud (2000) qui affirment que les sols de type plus au moins lourds favorise en général les conditions de développement de certains nématodes rencontrés sur vigne plus particulièrement le genre *Xiphinema*. Nos résultats révèlent également que dans les deux stations d'étude (Birtouta et Ben Chicao) les densités moyennes sont plus élevées en période printanière mars et avril et en période hivernale Janvier-Décembre, ceci serait probablement lié au taux d'humidité du sol pendant ces mois. Cette hypothèse rejoigne les investigations de Sarah (1995) qui a démontré que la grande saison sèche entraîne une forte baisse des niveaux de populations qui remontent fortement après la reprise des pluies.

Le Modèle Linéaire Général (G.L.M.) appliqué à la répartition temporelle des densités globales des populations de *Xiphenema spp*. rencontrées dans les stations expérimentales de Médéa (BenChicao) et Alger (Birtouta) en fonction des années, des saisons et des mois révèle des différences très hautement significatives ($p= 0.000$; $p<0,05$) entre la répartition des populations dans les deux stations d'étude (Birtouta et Ben Chicao) et en fonction des années. Les fortes densités de *Xiphenema spp.* sont signalées dans la station expérimentale de Birtouta (Alger). Toutefois, ces abondances varient sensiblement en fonctions des années dont les abondances moyennes des *Xiphenema spp ;* les plus importantes sont enregistrées dans le cumul des prélèvements de l'année 2014. Ces variations peuvent être attribuées à plusieurs facteurs notamment, la texture et structure du sol, d'un autre coté les travaux d'entretien et les techniques culturales peuvent être impliqués dans cette distribution. Les travaux de Norton (1979), rapportent que l'apport de compost, ainsi que Norton et Niblack (1991) qui ont affirmé que la température du sol et l'humidité sont considérées les facteurs les plus importants affectant la dynamique saisonnière des populations des nématodes. En 1960, Ward signale à son tour que l'humidité du substrat est un facteur prépondérant pour la multiplication de *Xiphenema americanum.*

REFERENCES

- Anonyme., 2008. Qualité du sol : Prélèvement des invertébrés du sol – Partie 4: Prélèvement, extraction et identification des nématodes du sol, Norme NF ISO, 236 :11-4.
- Arias M. et Navacerrada G., 1973. Geographical distribution of *Xiphinema* coob in Spanich Vineyards nematologia mediteranea, Vol I, 1:28-35
- Arias M.; Navas A. et Bello A., 1985. Nematodos ectoparasitos y transmisores de virus la familia Longidoridae. Su distribución en España continental. Bol. Serv. Plagas, 11: 275-337.
- Bertrand C., Lizot J. et Mazollier C., 2001. Lutter contre les nématodes à galles en Agriculture biologique, Rev. GRAB AVINON, France, pp: 25-29.
- Bird G-W. and Ramsdelld C., 1985 - Population trends and vertical distribution of plant parasitic nematodes associated. *in* Esmenjaud (D.), 2000 : Nématodes de la vigne in Stockel (J.E.D.),- Ravageurs de la vigne. Ed Féret. Bordeaux (France).214 pages.

- Cadet P., 1998. Gestion écologique des nématodes phytoparasites tropicaux. Cahiers agricultures, n°7, Dakar, Sénégal, pp: 9-187.
- Coiro M.I. et Agostinelli A., 1999. The developpement of juvenil stages of X. index on vitis vinifer. Rev. Nematol. 14, (1), 181-182.1991.
- Dalmasso A., 1966. Méthodes simple d'extraction des nématodes du sol. Rev. Ecol. Biol., vol. 3, pp: 473-478.
- Dalmasso A. et Vuittenez A., 1977 - Probleme de la replantation de la vigne et désinfection du sol. 1er rapport XVème congréé nationalde la vigne et du vin (Nyon-Suisse-25-30.07.1997.
- Esmenjaud D., Walter B., Valentin G., Guo Z.T., and Ciuzeau D., 1992 - Vertical distribution and infectious potential of *Xiphinema index*. (Thorne et Allen, 1950) Nematoda:Longidoridae) in fieleds affected by grapevine fanleaf virus in vineyards in the Champagne region of France. Agronomie 12:395-399.
- Esmenjaud D., 2000 - *Les nématodes de la vigne*. 17-34. In *Les ravageurs de la vigne*. J.Stockel, ed. Editions Féret. Bordeaux, France, 231p.
- Galet P., 1982. Les maladies et les parasites de la vigne. Tome II. Montpellier, France.240.
- Galet P., 1988. Cépages et vignobles de France. Ministères de l'Education nationale et de la recherche et la technologie. Tome I, Montpellie, France.
- Georgieva S.S., McGrath S.P., Hooper D.J. et Chambers B.S., 2002. Nematode communities under stress: the long-term effects of heavy metals in soil treated with sewage sludge. Applied. Soil Ecology, 20: 27-42.
- Jaccob JJ, Middepiaats WCT. 1988. Fascicule de détermination des principaux nématodes phvtoparasites au stéréoscope. Cours de nématologie. TSP, Vol.2, Niamey, Niger, 175p.
- Norton D.C., 1979 - Relationship of physical and chemical factors to populations of plant parasitic nematodes. Annual Review of Phytopatology 17, 279-299.
- Norton DC, Niblack TL. 1991. Biology and ecology of nematodes. In: Nickle WR editor. Manual of agricultural nematology. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 47–72.
- Sarah JL. 1995. Les nématodes phytoparasites, une composante de la fertilité du milieu. *Ed. Pichot J, Sibelet N, Lacoeuilhe JJ, Fertilité du milieu et stratégies paysannes : colloque CIRAD, Montpellier, France,* pp. 180-188.
- Tabouche A., 2007- Etudes du virus du court noué de la vigne (GRAPEVINE FANLEAF VIRUS, NEPOVIRUS (GFLV) en Algérie, Bio et sero detection, efficacité de la transmission par différents vecteurs inventorier.Mém. Mag. Prot. Opt. Zoo. Fac. Scien. Agro. Véter. Biol. Univ. Saad Dahleb, Blida.
- Villenave C, Bongers T, Ekschmitt K, Djigal D, Chotte J L, 2001. Influence of tillage and compost on communities of phytoparasitic nematodes. *Applied Soil Ecol.*, 17, 43–52.
- Ward CH. 1960. Dagger nematodes associated with forage crops in News York. *Phytopathology*, 50, 658 p.
- Yeates GW, Bongers T, de Goede RGM, Freckman DW, Georgieva SS, 1993. Feeding habits in soil nematodes families and genera-an outline for soil ecologists. Journal of Nematology, 25, 315 - 331.

Structure trophique des nématodes du sol dans les agro-écosystèmes oléicoles algériens

Hoceini Faiza[1], Nebih Hadj-Saddouk Dhaouia[2], Bounaceur Farid[3], Hamdani Mourad[1], Berrabah Djamal Eddine[4], Aiche Messaouda[1], Saidi Souad [1]
[1]Université Mohamed Boudiaf, Faculté des sciences, Dép. sciences agronomiques, M'Sila, Algérie
[2]Université Saad Dahleb, Faculté des Sciences Agronomiques et Vétérinaires, Blida, Algérie
[3]Université Ibn Khaldoun, Faculté des Sciences Agronomiques et Vétérinaires, Tiaret, Algérie
[4]Centre de recherche scientifique et technique sur les régions arides, Biskra, Algérie
Email : hoceinifa@gmail.com

RESUME
Globalement l'ensemble des nématodes du sol répond à la pluviométrie et à la disponibilité des ressources différemment. Tandis que, les conditions édaphiques, la flore et les relations entre nématodes apparaissent comme les principaux facteurs déterminant l'abondance et la répartition spécifiques de la nématofaune. Cette nématofaune qui est composée de différents groupes trophiques peuvent participer la décomposition de la matière organique du sol et la minéralisation des éléments nutritifs des plantes. Ces organismes microscopiques peuvent être utilisés comme des indicateurs d'enrichissement et de déséquilibre. Dans ce contexte, notre étude vise à évaluer la variation des peuplements de nématode rencontrés dans les Agro-écosystèmes oléicole afin d'évaluer leur diversité nématologique dans trois stations, du nord algérien, caractérisées par différents bioclimats. L'analyse nématologique a révélé la présente de 20 genres de nématodes répartis en fonction de leurs régimes alimentaires en trois groupes trophiques : les phytophages, les bactériovores et les prédateurs- omnivores dont les densités de ces derniers varient en fonctions des stations d'étude. Cette étude illustre également l'effet des fluctuations physico-chimiques du sol sur l'activité et l'abondance des nématodes, de l'autre part les interactions existants entre les différents groupes trophiques de nématode rencontrés dans ces milieux agricoles.
Mots-clés : Agro-écosystème; Algérie; groupe trophique; oléicole; nématode.

1. INTRODUCTION

Dans le monde méditerranéen, l'olivier est considéré comme l'espèce la plus emblématique en raison de son importance écologique, économique et culturelle (Zohary *et al.*, 2012 ; Kaniewski *et al.*, 2012). L'olivier demeure le témoin de l'émergence des premières civilisations méditerranéennes (Kaniewski *et al.*, 2012) puisqu'il fait partie des cultures les plus anciennes dans cette région (Zohary et Spiegal-Roy, 1975). Cette culture arboricole au delà de son importance économique a pu garder une stabilité sociale pour de nombreux peuples a qui elle assure un niveau de vie digne.

En Algérie, il existe sur presque la totalité du territoire et depuis très longtemps, ceci grâce à sa rusticité, sa capacité d'adaptation aux différents types de sols et des conditions climatiques. Ce qui explique son extension aux zones sub arides et arides. D'après l'institut technique des arbres fruitiers (ITAF), il existe plus de 160 variétés d'olivier. Les variétés nationales les plus connues sont représentées par « *Sigoise, Chemlal, Azradj, Ferkani* et *Bouchouk*».

Actuellement, l'olivier est considéré comme un élément majeur de l'économie agricole dans certains pays surtout dans notre pays (Ahmim, 2006). Néanmoins, il reste comme d'autres arbres fruitiers, plantes décoratives et vigne exposé aux attaques de divers parasites et maladies qui limitent à la fois la production et la croissance de chaque sujet. Parmi ces parasites les nématodes qui peuvent parasiter les racines de l'olivier et provoquer leur affaiblissement. Ces derniers pénètrent dans les vaisseaux conducteurs des végétaux par les racines et obstruent et nécrosent ceux-ci en coupant toute ou une partie de l'alimentation de la plante. Au terme, leur action se traduit par le jaunissement et le dépérissement pouvant aller jusqu'à la mort (Ritter, 1971).

2. MATERIELS ET METHODES

Notre expérimentation s'est déroulée dans trois stations oléicoles situées dans le nord algérien (Alger, Médéa et M'sila), caractérisées par des bioclimats différents (respectivement biotope sub-humide, semi-aride et aride) (Figure 1), de classe d'âge allant de 5 à 15 ans. Dans chaque station, les prélèvements ont été effectués sur une surface d'un hectare divisés en quatre parcelles. Au niveau de chaque parcelle, nous avons prélevé un échantillon mixte composé de sous échantillons élémentaires d'environ 200 g chacun récolté dans la rhizosphère des arbres à l'aide d'une tarière à une profondeur allant jusqu'à 50 cm. Ces deniers sont réunis en un seul échantillon dans un sac référencie (la date, le lieu, la culture et la culture précédente).

Au laboratoire, Les nématodes sont extraits du sol par la méthode d'extraction des seaux de Dalmasso (1966) dite méthodes de flottaison et de sédimentation, puis identifiés et dénombrés sous le loupe binoculaire à l'aide des clés d'identification de Jaccob et Middepiaats (1988) et de Yeates et al. (1993) qui se basent sur l'identification morphologique par observation de certains caractères discriminants : la longueur et la forme du stylet, la forme de la tête et la queue, la longueur du corps, recouvrement (la disposition de la glande œsophagienne par rapport à l'intestin) et position de la vulve. Avec un canal à pêche, on peut prélever les nématodes et faire un montage temporaire entre lame et lamelle sous microscope optique pour une meilleure observation sous microscope optique.

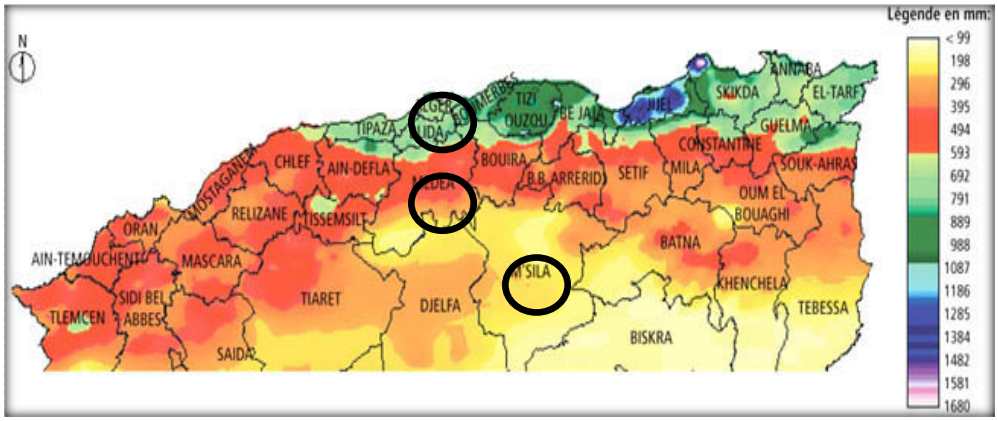


Figure 1 : Position des stations d'étude sur la carte pluviométrique du nord algérien (www.fao.org).

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Inventaire des nématodes du sol rencontrés dans les trois oliveraies :

L'analyse nématologique a révèle la présence de 20 genres de nématodes repartis en fonction de leurs régimes alimentaires en :

-Nématodes phytoparasites facultatifs et obligatoires (*Paratylenchus, Tylenchorhynchus, Xiphinema, Helichotylenchus, Pratylenchus, Scutellonema, Nothotylenchus, Aphelenchoides, Aphelenchus., Ditylenchus, Psilenchus et Tylenchus);*

- Nématodes bactériovores (*Rhabditis, Cephalobus, Acrobeles, Monhystera* et *Chiloplacus)*;

- Nématodes prédateurs-omnivores (*Mononchus* et *Dorylaimus)*.

Nos résultats sur l'inventaire des nématodes sur olivier rejoignent d'un point de vue taxons rencontrées les travaux accomplis sur l'oléiculture dans différent pays du monde de plusieurs auteurs notamment celle de Lamberti et *al*. (1975) en Algérie qui a démontré la présence de *pratylenchus vulnus* et *Helicotylenchus spp* sur olivier ainsi que les travaux de Scognamiglio et *al*. (168) en Italie pour *Aphelenchoides* spp., *Ditylenchus spp. et Paratylenchus sp.,* les travaux de Hirschmann et *al*. (1966) et Vlachopoulus (1991) en Grèce pour *Aphelenchus avenae, Psilenchus* sp. et *Xiphenema index* aussi bien les investigations de Peña-Santiago (1990) en Espagne pour *Tylenchus arcuatus.* Selon Graniti (1995), plusieurs nématodes peuvent parasiter l'olivier à savoir plusieurs espèces de

Meloidogyne (*M.incognita*, *M.arenaria* et *M.javanica*), *Pratylenchus vulnus*, *Tylenchulus semipenetrans*, *Helicotylenchus dihystera* et *Xiphinema americanum.*
La présence de certaines espèces de nématodes phytoparasites non spécifique à l'olivier peut être expliquée par la présence d'un couvert végétal assez dense de graminées spontanées. Ces résultats sont confirmés par les travaux de Tikyani et Khera (1969) en Inde qui ont démontré la présence de *Nothotylenchus sp*. dans la rhizosphère de *Sorghum vulgare*.

3.2. Densité moyenne globale (N/dm^3) des nématodes du sol rencontrés dans les stations d'études:

Les résultats dévoilent l'abondance des nématodes du sol dans la station de Médéa suivi par la station d'Alger caractérisée respectivement par les bioclimats semi aride et sub humide. Toutefois, l'abondance de ces derniers est faiblement marquée dans la station de M'Sila classée dans l'étage bioclimatique aride (Figure 2).

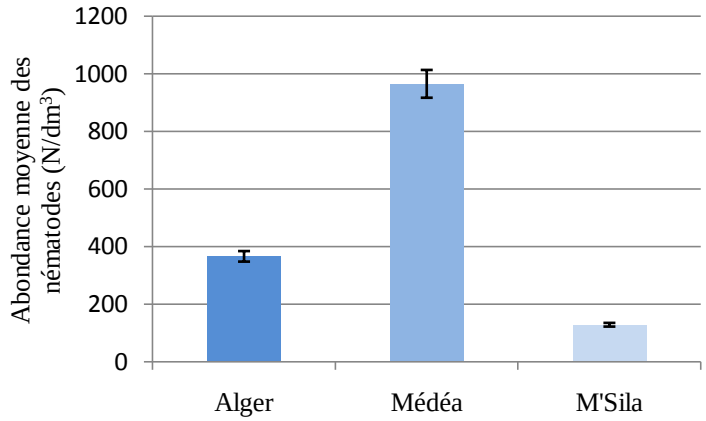


Figure 2 : Abondance moyenne globale des nématodes du sol dans les trois stations d'étude.

Ces variations peuvent être attribuées à plusieurs facteurs notamment, la texture et structure du sol, hygrométrie et l'aération du sol. La microporosité du sol est un paramètre très important qui affecte les déplacements du nématode. Les sables fins ou les sols sablo-limoneux sont les plus favorables. Les sols lourds ou à structure grossière sont généralement moins favorables au développement des populations de la plupart des espèces phytophages (Seinhorst, 1956). Dans l'autre coté, Norton (1959) montre que le niveau de population de trois espèces fréquentes (*Aphelenchus avenae*, *Paratylenchus projectus* et *Tylenchorhynchus brevidens*) est en étroite corrélation avec le régime pluviométrique. De même, Ward (1960) signale à son tour que l'humidité du substrat est un facteur prépondérant pour la multiplication de *Xiphenema americanum.*

3.3. Densité moyenne globale (N/dm^3) des groupes trophiques de nématodes rencontrés dans les stations d'études:

Les résultats obtenus montrent que le groupe des nématodes phytophages est le plus fréquent. Il est présent dans toutes les stations prospectées, suivi par le groupe des Bactériovores et en dernière position les nématodes omnivores-Prédateurs (Figure 3).

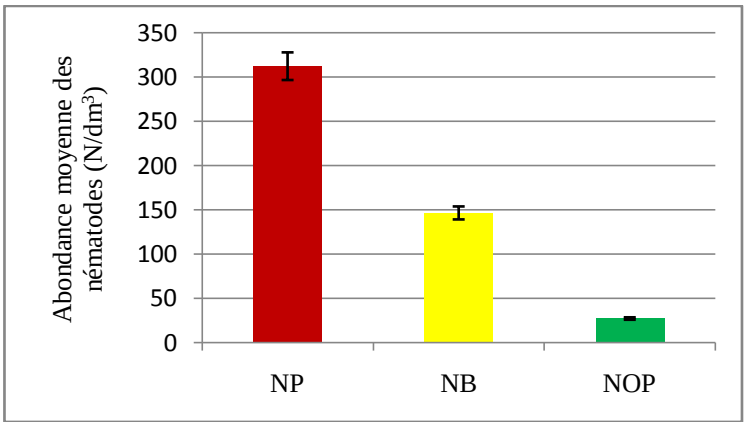


Figure 3 : Abondance moyenne globale des différents groupes trophiques de nématode dans les stations d'étude. NP : nématodes phytoparasites ; NB : nématodes bactériovores ; NOP : nématodes omnivores- prédateurs

Nos résultats sur l'abondance trophique des nématodes sont comparables à plusieurs travaux de recherches qui montrent que les nématodes prédateurs et omnivore sont plus abondant dans les zones naturels que dans les champs agricoles ceci est du à leur grande sensibilité aux modifications des sols (Neher, 2001), alors que les bactériovores sont toujours abondants dans les sols cultivés (Wardle et *al*., 1995) et pullulent toujours dans les sols très riches en matière organique (Yeates et King, 1997). En plus de la présence d'une végétation spontanée dans ces stations qui rend le milieu riche en nourriture permettant la pullulation des nématodes. Ceci confirme les travaux de Villenave et *al*. (2001) qui prouve que le simple fait de nettoyer de sol des adventices diminue le nombre de racines sur lesquelles peuvent se nourrir les nématodes phytoparasites.

3.4. Variation des Densités moyenne (N/dm^3) des groupes trophiques de nématode rencontrés dans les sols des stations d'études:

Les résultats obtenus sur la répartition de la densité moyenne des groupes trophiques dans les stations d'étude montrent que le groupe des phytophages est dominant dans toutes les stations d'étude suivi par le groupe des bactériovores. Tandis que les nématodes omnivores prédateurs sont les moins représentés dans les trois stations d'étude (Figure 4).

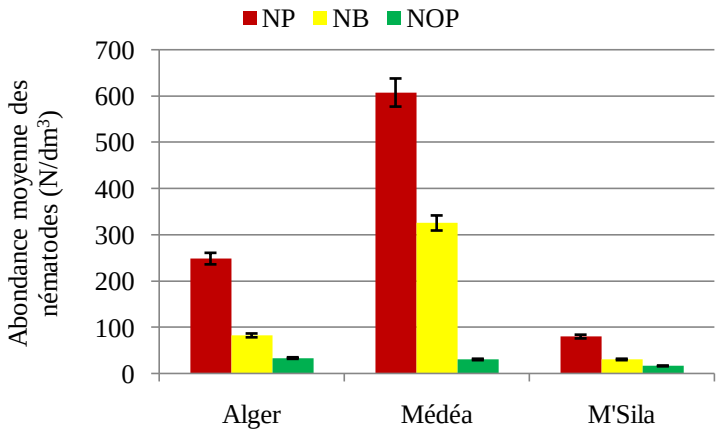


Figure 4 : Densité moyenne des trois groupes trophiques de nématode en fonction des stations d'étude.

La répartition des abondances des groupes trophiques varie en fonction des stations prospectées. Selon Norton et Niblack (1991), la variabilité des abondances des nématodes est en relation avec les différences dans leurs cycles de vie, la qualité et la disponibilité des ressources alimentaires, les relations biotiques avec les microorganismes du sol et les facteurs physico chimiques du milieu. De même Hânel (1995) déclare que les modifications de la structure trophique des peuplements des nématodes sont en relation avec des changements de leurs ressources alimentaires.

3.5. Effet facteurs biotique et abiotique sur la structure trophique des nématodes du sol :

Pour évaluer l'influence des caractéristiques physico-chimiques du sol sur les groupes trophiques, nous avons choisi l'analyse de corrélation qui fait ressortir les données enregistrées dans le tableau 1. Sur ce tableau, les valeurs du coefficient de Pearson sont au dessous de la diagonale, les probabilités associées sont positionnées au dessus de la diagonale.

En ce qui concerne les groupes trophiques, le tableau révèle une corrélation positive entre les nématodes phytophages - les bactériovores (p=0,046) et entre ces derniers avec les prédateurs Omnivores (p=9,37 E-3). Quand aux corrélations groupes trophiques / caractéristiques physico-chimique, le tableau dévoile que les nématodes bactériovores sont corrélés positivement à la teneur en matière organique (p=8,85 E-3).

Tableau 1 : Corrélations entre les caractéristiques physicochimique du sol et les groupes trophiques

	C.e	PH	M.O	NP	NB	NOP
C.e	0	0,10663	0,10936	0,91031	0,46843	0,24574
PH	-0,71999	0	0,14523	0,73254	0,56598	0,37669
M.O	0,71623	-0,67018	0	0,46139	0,00885	0,90439
NP	-0,059863	0,18026	0,37692	0	0,04659	0,10589
NB	-0,37146	0,29818	0,26712	0,81816	0	0,0093762
NOP	-0,56201	0,44489	-0,063824	0,72102	0,91986	0

L'effet des caractéristiques Physico-chimiques du sol sur les groupes trophiques révèle une corrélation positives entre les nématodes bactériovores et le taux en la matière organique dans la mesure où ils se développent au détriment des bactéries associés à la présence de la matière organique (Sarah, 1995). Par contre, aucun effet n'a été enregistré pour les autres caractéristiques (PH et C.e) sur les nématodes. Nos résultats sont en accord avec Steiner (1924) qui a indiqué que le PH du sol est un facteur écologique sans importance pour les nématodes. Cependant, les travaux de Kandji et *al*. (2001) ont montré que *Helicotylenchus* et *Pratylenchus* sont corrélés positivement au pH, alors que cette corrélation est négative pour les *Xiphinema*.

De même les résultats dévoilent que les bactériovores sont corrélés positivement aux phytoparasites et aux Prédateurs Omnivores. Selon Tylor (1968) et Hopper et Southey (1978) certains espèces de nématodes comme *Aphelenchus sp.*, *Aphelenchoides sp.* et *Ditylenchus sp.* qui sont phytophages deviennent mycophages dans certaines conditions**.** De ce fait, ces derniers et les bactériovores sont de bons indicateurs de fertilité, dans la mesure où ils se développent au détriment des bactéries ou des champignons associés à la présence de la matière organique (Sarah, 1995).

4. CONCLUSION

Les conditions de milieu, la plante hôte et les relations biotiques dans l'écosystème sont très importantes pour mieux déterminer les variations observées dans les peuplements nématologiques. Dans ce présent travail, nous avons étudié la composition de la nématofaune du sol dans trois stations oléicoles à fin de déterminer la diversité générique et trophiques de ces bioagresseurs telluriques et

d'expliquer l'influence de quelques facteurs physico-chimiques du milieu édaphique sur ces fluctuations nématologiques.

L'inventaire du peuplement nématologique associé à cette culture nous a permis de recenser vingt genres de nématode dans les sols oléicoles répartis en fonction de leur régime alimentaire en trois groupes trophiques :Phytoparasites (*Aphelenchus sp., Aphelenchoides sp., Ditylenchus sp.* et *Psilenchus sp., Paratylenchus sp., Pratylenchus sp.,Tylenchus sp., Tylenchorhynchus sp., Helichotylenchus sp., Scutellonema sp.* et *Xiphinema sp.),* Bactériovores *(Cephalobus sp., Chiloplacus sp., Acrobeles sp., Mohystera sp.* et *Rhabditis sp.)* et Omnivores-Prédateurs *(Discolaimus sp., Dorylaimus sp.* et *Mononchus sp.).*

Les résultats obtenus sur la répartition de la nématofaune dans les stations d'étude montrent l'abondance des nématodes dans la station de Médéa caractérisée par un bioclimat semi aride suivi par les stations d'Alger et de M'sila appartiennent respectivement aux étages bioclimatiques sub humide et aride. Concernant les groupes trophiques, le groupe des phytophages abonde dans les stations d'étude, suivi par celui des bactériovores puis les Omnivores prédateurs.

L'analyse du milieu édaphique fait démontrer l'étroite relation des nématodes avec son milieu et entre eux dont les corrélations entre les propriétés physico-chimiques du sol et les groupes trophiques dévoilent une corrélation positive entre les nématodes bactériovores et la teneur en matière organique. D'autre part, les bactériovores sont corrélés positivement aux phytoparasites et aux prédateurs omnivores.

REFERENCES

- Dalmasso A. 1966. Méthodes simple d'extraction des nématodes du sol. *Rev. Ecol. Biol.*, Vol. 3, 473-478.
- Estioko RV, Reyes lT. 1984. Population dynamics of plant-parasitic nematodes associated with sugarcane. In: Negros Occidental in relation to soil type and weather pattern. Proc. Philippine Sugar. *Technol*. *Ass*., 31, pp. 235-52.
- Graniti A. 1955. A dieback of olive in Sicily associated with two nematode species. *Olearia*, 9, 114-120.
- Hânel L. 1995. Secondary succesional stages of soil nematodes in cambisols of south Bohemia. *Nematologica*, 41, 197–218.
- Hirschmann H, Paschalaki-Kourzi N, Triantaphyllou AC. 1966. A survey of plant-parasitic nematodes in Greece. *Annales de l'Institut Phytopathologique Benaki*, 5, 144-156.
- Hopper DJ, Southey JF. 1978. *Ditylenchus, Anguina* and related genera. In: plant nématologie, Ed. Southey J.F., Vol. 1, pp. 78-79.
- Jaccob JJ, Middepiaats WCT. 1988. Fascicule de détermination des principaux nématodes phvtoparasites au stéréoscope. Cours de nématologie. TSP, Vol.2, Niamey, Niger, 175p.
- Kandji ST, Ogol Callistus KPO , Albrecht A. 2001. With some soil physico-chemical characteristics in improved fallows in western Kenya. Applied Soil Ecology, 18, 143–157.
- Kaniewski, D, Van Campo E, Boiy T, Terral JF, Khadari B, Besnard G. 2012. Primary domestication and early uses of the emblematic olive tree: palaeobotanical, historical and molecular evidence from the Middle East. *Biological Reviews*, 87, 885-899.
- Lamberti F, Greco N, Zauchi H. 1975. A nematological survey of date palms and other major crops. in Algeria. *FAO Plant Protection Bulletin*, 23, 156-160.
- Neher D. 2001. Role of nematodes in soil health and their use as indicators. J. Nematol., 33, 161–168

Norton DC. 1959. Relationship of nematodes to small grains and native grasses in north and central Texas. *Pl. dis. reptr.*, 43, 227-235.

- Norton DC, Niblack TL. 1991. Biology and ecology of nematodes. In: Nickle WR editor. Manual of agricultural nematology. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 47–72.
- Peña-Santiago R. 1990. Plant-parasitic nematodes associated with olive (*Olea europaea* L.) in the province of Jaen, *Revue de Nématologie*, 13, 113-115.

- Reddy P. 1983. Plant nématology. *Ed. Agr. Publ. Acad*., New Delhi, 287 p.
- Ritter M. 1971. Les nématodes et l'agriculture ''les nématodes des cultures''. Journées d'études et d'information, A. C. T. A. FNGPC, Paris, pp. 9-65.
- Sarah JL. 1995. Les nématodes phytoparasites, une composante de la fertilité du milieu. *Ed. Pichot J, Sibelet N, Lacoeuilhe JJ, Fertilité du milieu et stratégies paysannes : colloque CIRAD, Montpellier, France*, pp. 180-188.
- Scognamiglio A, Talamè M, Giandomenico N. 1968. Data on nematodes living in the rhizosphere of olive (1st paper). *Bollettino del Laboratorio di Entomologia Agraria Filippo Silvestri*, Italie, 26, 205-226.
Seinhorst JW. 1956. Population studies on stem eelworms (*Ditylenchus dipsaci)*. *Nematologica 1*, Dakar, Sénégal, 159-164.
- Tylor DP. 1968. Introduction à la recherche sur les nématodes phytophages Manuel F.A.O., 135 p.
- Villenave C, Bongers T, Ekschmitt K, Djigal D, Chotte J L, 2001. Influence of tillage and compost on communities of phytoparasitic nematodes. *Applied Soil Ecol*., 17, 43–52.
- Vlachopoulos E. 1991. Nematode species in nurseries of Greece. *Annales de l'Institut Phytopathologique Benaki*, 16, 115-122.
- Ward CH. 1960. Dagger nematodes associated with forage crops in News York. *Phytopathology*, 50, 658 p.
- Wardle DA, Yeates GW, Watson RN, Nicholson KS, 1995. Impacts of disturbance on detritus food-webs in agroecosystems of contrasting tillage weed management strategies. Adv. Ecol. Res., 26, 105–185.
- Yeates GW, King KL. 1997. Soil nematodes as indicators of the effect of management on grasslands in the New England Tablelands (NSW): Comparison of native and improved grasslands. Pedobiologia, 41, 526–536.
- Yeates GW, Bongers T, de Goede RGM, Freckman DW, Georgieva SS, 1993. Feeding habits in soil nematodes families and genera-an outline for soil ecologists. Journal of Nematology, 25, 315 - 331.
- Zohary D, Spiegel-Roy P. 1975. Beginnings of fruit growing in the Old World. *Science*, 187, 319-327.
- Zohary D, Hopf M, Weiss E. 2012. *Domestication of Plants in the Old World: The origin and spread of domesticated plants in Southwest Asia, Europe and the Mediterranean Basin*. Oxford University Press.

Evaluation of the contribution of crop residues in growth and yield of onion plant

Djilani Ghemam Amara[1,2*], Abdelkrim rebiai[2], Zaid Alia[1], Saoud Djihad[1], Khaled Kherraz[1,2], Mohammed Adel Mesbahi[2], Ahmed Elkhalifa chemsa[1,2], Mohammad Mourad Senoussi[3]
[1]Department of biology, Faculty of Nature and Life Sciences, University Echahid Hamma lakhdar, El Oued, Algérie.
[2]Laboratory of VTRS, University Echahid Hamma lakhdar, El Oued, Algérie.
[3]Department of biology, Laboratory of Biomolecules and Plant Amelioration, Larbi Ben Mhidi University، Oum El Bouaghi, Algeria
*Email: djilani-ghemamamara@univ-eloued.dz, saiddji@gmail.com

SUMMARY
The study was conducted at the primary school farm in Rabbah zone during in 2016/2017 season to evaluate the contribution of farm residues (palm residues, Peanut Peels, cooked tea leaves) in vegetative growth and the bulb onion in addition to the total onion yield. The results showed that application of fertilizer by cooked tea leaves had significant effects on plant height and leaves area with an increase of about 47.15% and 93.4%, respectively, than control treatment, followed by palm residues and Peanut Peels. Peanut Peels treatment gave the largest number of tubular blades in the plant (12.33), the diameter of the bulb neck (13.48 mm) and bulb length (7.35 cm) than other treatments. However, cooked tea leaves plants gave the highest diameter of bulb (5.42 cm), the highest bulb weight (66 g) and yield (20.85 t/ha) in the season.
Keywords: onion, farm residues, vegetative growth, yield.

1. INTRODUCTION

The large expansion of agriculture increased the accumulation of waste of cultivated crops, which cause environmental problems. The Souf region is one of the most important areas of the greens production (tomatoes and potatoes) in addition to peanuts and the date palm cultivation, where the production, respectively, during 2016 is about 1785, 11180, 50.4 thousands quintals. In that year, the palms number is 3704300 palms and the production of dates is about 2533.1 thousand quintals (DPSB, 2017). Also, The region is characterized by the high consumption of green tea. Therefore, the agricultural activity leaves many quantities of waste that are destined to burn or accumulate in the soil, making it the seat of the insects as well as the plastic bags causing environmental pollution.
The Agriculture Clean and Health aims to increase crops environmentally friendly with developing the physical and chemical soil characteristics using organic residues as a fertilizer. The fertilizers differ in the decomposition speed, the chemical composition and availability of plant nutrients (NOSB, 1995).
Onion is one of important horticulture crops in Algeria at economic and medical (ARAB., 2015). (Shrestha, 2007). The Onion bulb contains high nutriment and medical composition proportions (antioxidants) such as quercetin (Patil et al., 1995). Using the organic fertilizers (animal and plant remnants) is not harmful to humans and the environment, and environments protection is one of the most important research field. In this context, this study has been conducted aiming to study the remnants plant effect on the growth and yield of onion plant (Allium cépa L).

2. MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted in Robbah in El Oued city (33°16′47″ N, 6°54′35″ E, 87 m altitude) in a randomized complete block design (RCBD). The experiment consisted of four treatments of manure (To: control, T1: Palm waste, T2: Peanut Peels, T3: Post-cooked tea leaves) with three replications at a spacing of 50 cm between blocks and treatments, respectively. The distance between seedlings was 15 cm.
Observations were taken from 4 randomly selected plants from each sub-treatment to measure vegetative traits during the growing periods and yield traits of Onion (Allium cepa L. local cv.) in

terms of leaves area, plant height, stem number, mean bulb weight, yield, bulb diameter and length. Statistical analysis were performed using Least Significant Difference test at the 5% significance level.

3. RESULTS AND DISCUSSION

- The plants height

Generally, the plant growth is expressed by leaves and stems characteristics. The result indicates that the onion plant length varies according to fertilizer (Figure 1). Plant height was significantly higher in peanut peels, post-cooked tea leaves and palm waste treatments compared to the control, 80 days after transplantation. Post-cooked tea leaves treatment gave a highest length (43.17 cm) then followed by the peanut peel (42.17 cm) then the Palm waste treatment (30.53 cm).

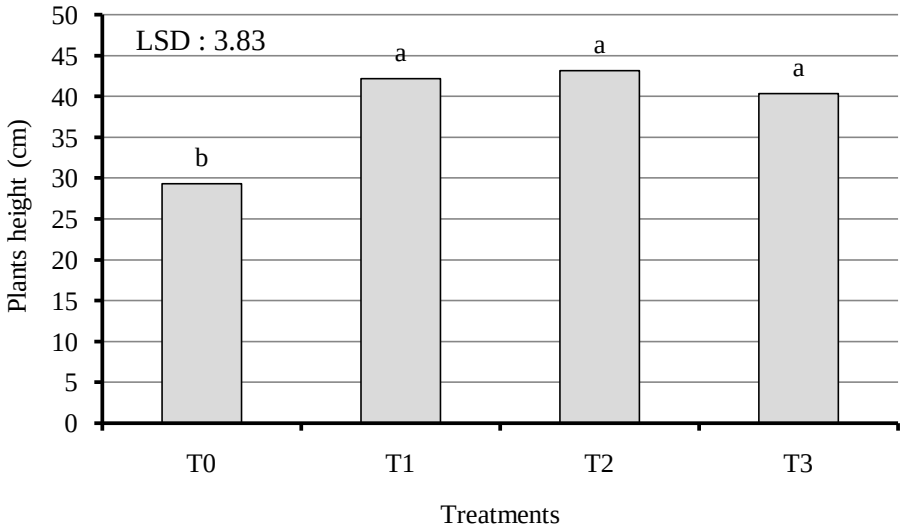


Figure 1. Effect of organic manure on the height of Onion plant (*Allium cepa* L).

- The leaves area

The results showed a difference in term of leaf area and its rate growth at 80 days after planting seedlings process. The treatments T1 and T2 showed significant variation in the area leaf when compared to respective control treatment. There was also no significant difference between T1, T2 and T3 treatments. This finding is in accordance with that obtained by Alam et al. (2007) whose indicated that the vermicompost and chemical fertilizers has increased vegetative characteristics of the potato plant. Ghemam et Senossi (2013) have reported that manure organic casts increases the rate growth, as well as the results of both Sun et al. (2009) and Gebory and klhafagy (2011).

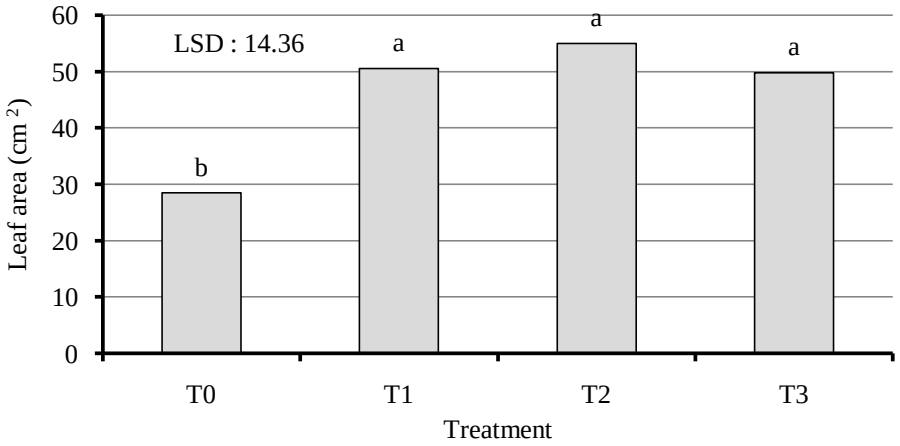


Figure 2. Effect of organic manure on the leaf area and rate growth on (*Allium cepa* L).

- The number tubular blades / plant

The results showed a difference in the number tubular blades in onion plant under different types of plant waste (Figure 3). The number of tubular blades increased in all treatments manures which was significant compared to respective control (To). After 60 days, the treatment T1 showed significant variation in the number of tubular blades compared to other treatments. The number of tubular blades increased up to 12.33 and 10.92 blade/plant in T2 and T3, respectively, however the lowest value was recorded in the control treatment (To).

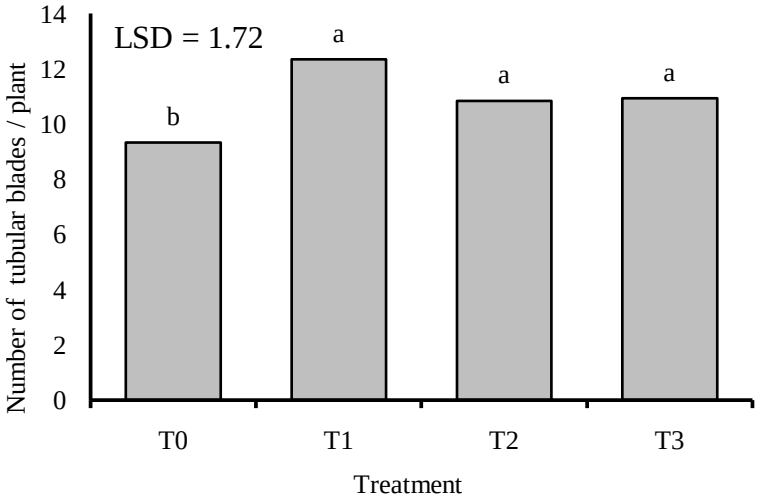


Figure 4. Effect of organic manure on the number tubular blades and its rate increase.

- The diameter of bulb neck

The results shown in figure 4 revealed that the exploitation of the various plant waste resulted in variation in the diameter of bulb neck in the onion plant. The results indicate a significant increase in the diameter of the bulb neck with T1 and T2 treatments as compared with the control. The largest diameter of the bulb neck was recorded in T1 treatment (13.4 mm). There were a difference in the

rate of increase diameter of the bulb neck between fertilize treatments and control one. The highest increase was observed for T1 followed by both Palm waste and peel peanut treatments.

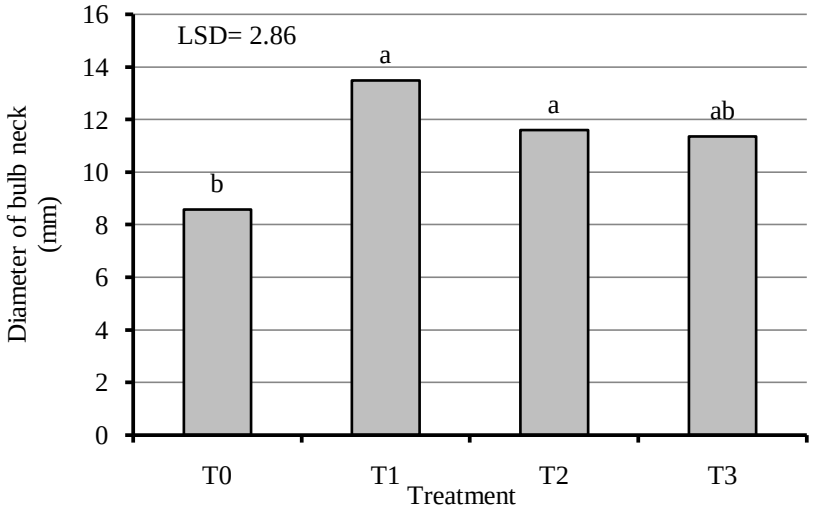


Figure 4. Effect organic manure on diameter of bulb neck (mm) in onion plant (*Allium cepa* L.)

- Yield

Figure 5 shows a significant increase in bulb weight and total yield under T1 and T2 treatments compared to control. The results showed a significant increase in T1 and T2 for total productivity compared to T3 treatments. The results also showed a significant increase in bulb weight with T2 treatment compared to the treatment of waste in the brain (T3).

The percentage of bulb weight in fertilization treatments is estimated at 156.4, 175.3 and 123.9%, respectively, for T1, T2 and T3 treatments. The overall yield ratios were in the same order (169.7, 192.7 and, 124.8%). A similar result was also found by Yoldas et al. (2011) whose found a better result with organic fertilizer. The root of the plant activation system and the living roots that stimulate plant growth and nutrient uptake (Arisha et al., 2003; oueda et mahedeen, 2008) increase onion productivity. A similar result was also reported by Jayatilake et al. (2003), Sankar et al. (2009), Mandal et al. (2013) , Brinjh et al. (2014) and (Donald et al., 2001). This increase has a positive effect on photosynthesis rates, metabolic processes of plant organic compounds, elongation of cells and division (Fatideh), which is a source of many micronutrients (Fatideh and Asil, 2012; Soleymani and Shahrajabian, 2012). Thus, increasing the bulb's onion and bulb height in the best cure for tea leaves.

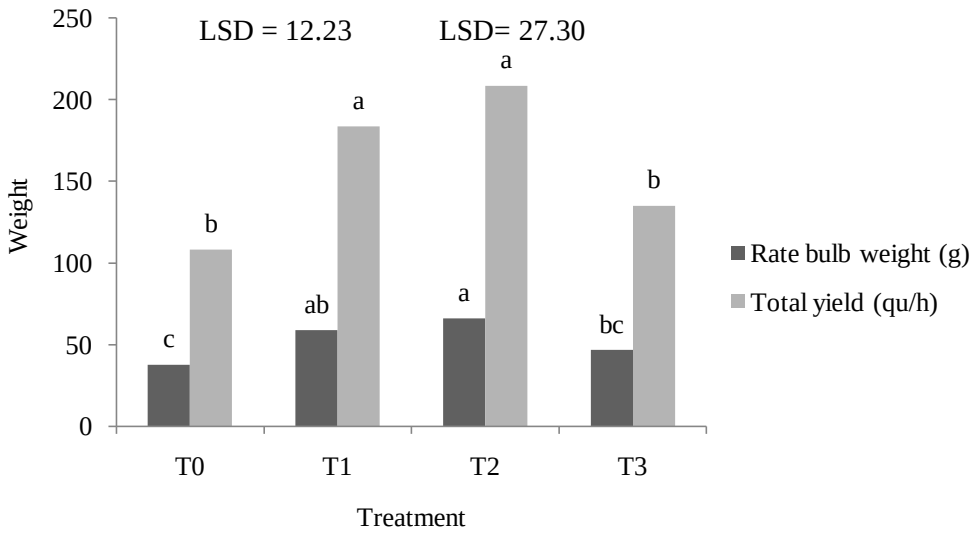


Figure 5. Effect organic manure on bulb weight and yield of onion crop (*Allium cepa* L.)

4. CONCLUSIONS

This study shows that the addition of plant residues as fertilizer improve the qualities of growth and production. Cooked tea leaves had a significant effect on the leaves area, the plants height, the bulb weight and the total yield..

REFERENCES

- Alam MN , Jahan MS , Ali MK , Ashraf MA, Islam MK. 2007. Effect of vermicomposting and chemical fertilizers on growth, yield and yield components of potato in Barind soils of Bangladesh. J. Appl. Sci. Res. 3: 1879-1888.
- Al-Gebory KDH, Al-Khafagy AMH. 2011. Effects of Some Organic Fertilizerson Growth, Productivity and Leaf Content from N, P, K Elements of Onion Plant. K. J. gric. Sci. 3(1): 47-55.
- ARAB. 2015. Agricultural Statistics Year Book. Vol. No. (35).
- Arisha HME, Gad AA, Younes SE. 2003. Response of some pepper cultivars to organic and mineral nitrogen fertilizer under sandy soil conditions. Zagazig Journal of Agricultural Research. 30: 1875-1899.
- Brinjh S, Kumar S, Kumar D, Kumar M. 2014. Effect of integrated nutrient management on growth, yield and qulity in onion, cv. PusaMadhavi, Plant Archives. 14(1) : 557-559.
- Direction de la Programmation et du Suivi Budgétaires (DPSB). 2015. Monographie de la wilaya d'El-Oued 2014.
- Donald DH, Essington E, Joanne L, Roland K, Wyveta M. 2001. Phosphorus and Potassium Fertilization of Disk-Till and No-Till Cotto, the Journal of Cotton Science. 5(3): 144-155.
- Fatideh MM and Asil MH. 2012. Onion yield, quality and storability as affected with different soil moisture and nitrogen regimes. South-Western J. Horti. Biology and Environment. 3(2): 145-165.
- Geonames. 2017. www. Geonames.org.
- Ghemam AD , Senoussi MM. 2013. Influence of organic manure on the vegetable growth and tuber production of potato (*Solanum Tuberosum*. L Varspunta) in a sahara desert region. Inte. J. Agri. Crop Sci. 5(22): 2724-2731.
- Mandal J, Ghosh C, Chattopadhyay G.N. 2013. Proportional Substitution of Chemical Fertilizers with Vermicompost on Growth and Production Potential of Onion (*Allium cepa* L.) Int. J. Bio-res. and Str. Man. 4(2): 356-357.
- National Organic Standards Board (NOSB). 1995. Definition of organic. Drafted and passed at April 1995 meeting in Orlando, Florida.

- Ouda BA, Mahadeen AY. 2008. Effect of fertilizers on growth, yield, yield components, quality and certain nutrient contents in broccoli (*Brassica oleracea*). International Journal of Agriculture and Biology. 10(6): 627-632.
- Patil BS., Pike L.M, Yoo K.S. 1995. Variation in the quercetin content in different colored onions (*Allium cepa* L.). J. Amer. Soc. Hort. Science. 120(6): 909-913.
- Sankar V, Veeraragavathatham D, Kannan M. 2009. Studies on organic farming in onion (*Allium cepa* L.) for the production of export quality bulbs. The Asian Journal of Horticulture. 4(1): 65-69.
- Shrestha H. 2007. A Plant monograph of Onion (*Allium cepa*). The School of Pharmaceutical and Biomedical Sciences Pokhara University, Simalchaur, Pokara, Roll No. 11/2004.
- Soleymani A, Shahrajabian MH. 2012. Effects of different levels of nitrogen on yield and nitrate content of four spring onion genotypes. Inter. J. of Agric. Crop Sci. 4(4): 179-182.
- Sun YP, Zhang Z.P, Wang LJ. 2009. Promotion of 5- aminolevulinic acid treatment on leaf synthesis is related with increase of antioxidant enzymes activity in watermelon seedlings grown under shad condition. Ph. Synth. 47(3): 347-354.
- Voisin AR. 2004. Le Souf monographie. Ed. EL-WALID. p. 319.
- Yoldas F, Ceylan S, Mordogan N, Esetlili BC. 2011. Effect of organic and inorganic fertilizers on yield and mineral content of onion (*Allium cepa* L.). Afr. J. Biotec. 10(55): 11488-114

Biological effect of the bark Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil on *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi in vitro* and as epiphyte populations on olive plants

Nadia Ghanney[1,2], Leila Ben Yahia[1], Belgacem Lachiheb[1], Ali Ferchichi[1,2]
[1]Institut des Régions Arides (IRA), Medenine, Tunisia
[2]Institut National Agronomique de Tunisie (INAT), Tunis, Tunisia
Corresponding Author : nadia.ghanney@gmail.com

SAMMARY
Essential oils of cinnamon species have a lot of biological activities including antimicrobial, antioxidant and antifungal properties. The aims of the present work were to evaluate the antibacterial effect essential oil (EO) obtained by hydro distillation of *Cinnamomum zeylanicum* (*Lauraceae*) bark against *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strain KT11, which was isolated from knots on natural infected olive plants in the Southeast of Tunisia. The assay was performed *in vitro* and on phylloplane olive plants aiming the epiphyte population artificially spread. Furthermore, *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil was analyzed by GC-MS to identify its active compounds.
Results showed a potential antibacterial activity of *C. zeylanicum* bark EO against *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strain KT11 *in vitro* and as epiphytic populations on olive plants phylloplane. Cinnamaldehyde (90.39%), α-terpineol (2.82%), Benzopyranone (1.68%) and Eucalyptol (1.51%) were the main prevalent compounds in the EO.
Keywords: Olive knot disease, Biological control, Cinnamon essential oil, Cinnamaldehyde

1. Introduction

Essential oils have a very broad spectrum of inhibition of Gram-positive and Gram-negative bacteria (Remmal *et al.,* 1993). They are considered as a potential source of natural bioactive molecules. Several studies have been interested in their possible use as an alternative for the treatment of infectious diseases (Bouhdid *et al.,* 2006). They are interesting for their potential as sources of natural bioactive molecules.
Cinnamomum zeylanicum tree belongs to the family, Lauraceae. The bark and the leaves of *Cinnamomum* spp. are commonly used as spices and their distilled essential oils or synthetic analogs are used as flavouring agent in the food and beverage industry. Although traditionally known, some researchers have revealed antimicrobial activity of essential oils of *C. zeylanicum*, *Cinnamomum cassia* and *C. osmophloeum* (Tiwari and Tiwari, 1997; Ferhout *et al.,* 1999; Mastura *et al.,* 1999; De *et al.,* 1999; Chang *et al.,* 2001). More recently, Cinnamon has been proved for its medicinal property treating gastrointestinal complaints (Cao and Anderson, 2011). Cinnamon is known by antiallergenic, anti-inflammatory, anti-ulcerogenic, anti-pyretic, antioxidant, and anesthetic activities (Lin et al., 2003).
Antioxidant studies with *Cinnamomum zeylanicum* bark revealed good free radical scavenging capacity against free radicals (Varalakshmi *et al.,* 2014). The main constituent of cinnamon bark oil is Cynnamaldehyde. Essential oils have been shown to possess antibacterial, antifungal, antiviral, insecticidal and antioxidant properties (Burt, 2004; Kordali *et al.,* 2005; Abbasipour *et al.,* 2012; Hadri *et al.,* 2014). The bark oil is used in the food and pharmaceutical industries (Jayaprakasha *et al.,* 2000).
Previous researches reported that the antimicrobial character of cinnamon is mostly due to two major phytochemicals cinnamic aldehyde from the bark (65 to 75%) (Lopez-Malo *et al.,* 2000) and eugenol from the leaf (80%) (Ayala-Zavala *et al.,*2008). Zaika (1988) reported the antimicrobial strength of different spices and ranked essential oils from cinnamon and clove as the strongest natural

antimicrobials. Muthuswamy *et al.* (2008) reported that cinnamaldehyde is the main compound responsible for the antimicrobial effect of cinnamon extract.
The cinnamon essential oil was screened by Prabuseenivasan and collaborators (2006) against four gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*) and two gram-positive bacteria (*Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*) at four different concentrations (1:1, 1:5, 1:10 and 1:20) using the disc diffusion method. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the active essential oils was tested using two-fold agar dilution method at concentrations ranging from 0.2 to 25.6 mg/ml. A zone of inhibition above 7 mm in diameter was taken as positive result. Cinnamon oil exhibited a promising inhibitory effect, showing inhibitory activity, even at low concentration, on both gram-positive and gram-negative bacteria. Cinnamon oil showed inhibitory effect against *P. aeruginosa* (33.3 mm), *B. subtilis* (29.9 mm), *P. vulgaris* (29.4 mm), *K. pneumoniae* (27.5 mm) and *S. aureus* (20.8 mm) (Prabuseenivasan *et al.*, 2006).
In this study, the essential oil obtained from the bark of *Cinnamomum zeylanicum* was evaluated for its antibacterial effect on *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* KT11 *in vitro* and on olive plant epiphytic Psv populations, and then was characterized by GC-MS to identify its active compounds.

2. Material and Methods

2.1. Plant material and extraction of essential oils

Cinnamomum zeylanicum dried bark was purchased at a local spices store. Air-dried plant materials (500 g) were placed in a 5 l round-bottom distillation flask and added 3 l of double distilled water. The EO was obtained by hydro distillation for 3 h using a Clevenger-type apparatus. After removing water traces with anhydrous sodium sulphate, the EO was stored at 4 °C in a clean amber glass bottle until further use.

2.2. Bacterial strain, growth conditions and inoculum preparation

P. savastanoi pv. savastanoi strain KT11, isolated from active knots of naturally infected olive twigs collected from the South East of Tunisia, was characterized by the LOPAT tests for grouping green fluorescent pseudomonads (Lelliot and Stead, 1987) and confirmed for its identity and virulence by Salkowski (Gordon and Weber, 1951) and pathogenecity tests (Saad and Hanna, 2002). And by molecular characterization using IaaL and Ptz primers. And then lyophilized and deposited at the Culture Collection for further uses.
Bacterial inoculum was prepared from subculture previously grown on KBA (King *et al.*, 1954) medium at 26°C for 24 h. Bacterial suspension was prepared in 10mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ by scraping bacterial lawns off with a sterile rod, Bacterial cell densities were adjusted spectrophotometrically (A600 nm) to a concentration of 10^7CFU.ml^{-1} before inoculation.
Three tubes were used for the *in vitro* test. The first , considered as positive control, contained only the bacterial suspension (10^7 CFU/ml) of KT11. The second contained the KT11 suspension (10^7CFU.ml^{-1}) + Tween 20 (0.001%), and the third contained the bacterial suspension + Tween 20 + the *C. zeylanicum* bark essential oil (10 mg. ml^{-1}). Bacterial suspensions were prepared in 10mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ buffer.
Samples for viable cell counts were taken out at 0, 2, 4, 8, 24 and 48 hours time intervals. Evaluation of viable cells into 10mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ buffer were performed as following: 0.1ml sample of each treatment was diluted into10m M $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ buffer by diluting it 10-fold and spread on the surface of KBA plates. The colonies were counted after 24 hours of incubation at 26°C.

2.3. *Pseudomonas savastanoi* on olive plants

Four months and half-old olive plants (*Olea europaea* L. cv. Arbequina) were used. Plants were incubated in growth room (70% relative humidity, 15h of light, 25°C; 9h of dark, 22°C). To start with, the plants were cleaned carefully with 70% ethanol by spraying. After plant drying, the bacterial suspension (prepared in 10mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ buffer) containing 10^7 CFU.ml^{-1} of *P.*

savastanoi strain KT11 was sprayed until runoff occurred. One day after inoculation, solvent or EO emulsion, was sprayed until runoff occurred. The number of bacteria on leaves and twigs were periodically evaluated (0, 2, 9, 15 and 30 days). Ten leaves and around 15 cm of twigs were randomly collected at each sampling and separately added to 5 ml of a in 10mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ aqueous solution in 50-ml tubes, which were vigorously shaken at room temperature for 3 hours. The suspensions were then plated on KB containing cycloheximide (Sigma; 90 $mg.l^{-1}$) and incubated at 26°C for three days. The experiment was performed in duplicate with two different plants and carried out twice. *P. savastanoi* pv. *savastanoi* colonies were finally counted for populations evaluation.

2.4. Separation and analysis of oil components

The overall analysis was performed by GC/MS with a Gas Chromatograph Shimadzu brand (GC 2010 Plus) coupled to a QP 2010 Ultra Mass Spectrometer. As reported at table 1, the separation of EO components was achieved by capillary column chromatography on 0.25 µm thick flash silica RTX-5MS (30 mm x 0.25 mm), using Helium as eluting gas with a flow rate set of 1.2 ml min-1. Sample (1 µl) was injected in split mode (leakage ratio: 1/50). The device was connected to computer system managing mass spectrum libraries (NIST 98 and WILEY) and driven by software to monitor chromatographic analyses. Identification of EO components was made through the comparison of their retention indices with those of standard compounds of the computerized databases.

Table 1: The operating conditions used for GC-MS analysis.

Operating conditions for Gas Chromatography	
Autosampler	automatic
Injected volume	1 µL
Carrier gas	helium
Column used	RTX-5MS (30m x 0.25mm x 0.25µm film thickness)
Injection Temperature	250°C
Temperature of transfer line	200°C
Temperature programming	initial temperature: 100°C for 1 mn; ramp: 4°C/mn 260°C for 1 mn
Operating conditions of the Mass Spectrometry	
Ionization Mode	electron impact
Ionization potential	70 ev
Source temperature	200°C
Scan (m/z)	20-500UMA

2.5. Statistical Analysis

In vitro and *in vivo* KT11 population means were analyzed by General Linear Model Univariate Analysis of variance using Dancun's multiple-comparison test. A P value of < 0.05 was accepted as indicating statistical significance.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. In vitro effect of *C. zeylanicum* bark EO on *Pseudomonas savastanoi* KT11

As shown in figure 1 and table 2, *C. zeylanicum* bark essential oil has defined an antibacterial activity against *P. savastanoi* pv. *savastanoi* strain KT11 immediately (T0) after adding the EO emulsion to the bacterial suspension. We noted 7.725 ± 0.038 (mean $\log_{10}$ ($cfu.ml^{-1}$) ± SD), 7.713 ± 0.060 and 6.652 ± 0,069 at time 0 respectively for KT11, KT11 + Tween 20 and KT11 + C.z EO + Tween 20 tests. According to statistical analysis there is no difference between the first (KT11) and the second (KT11 + Tween 20) tests results. That means that Tween 20 at low concentration (0.001%) does not affect the bacterial growth.

However *C. zeylanicum* bark EO inhibited significantly the pathogen multiplication as shown in Fig. 1 and reported in table 2.

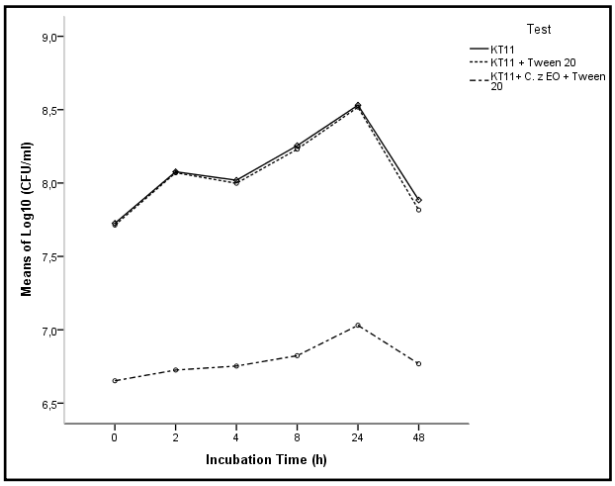


Figure1 : Effect of *C. zeylanicum* bark EO on KT11 populations *in vitro* assays

Table 2: KT11 populations at the different time intervals for the three tests

	KT11	KT11+Tween20 (0.001%)	KT11+C.z EO+Tween20 (0.001%)
0h	7.725 ± 0.038	7.713 ± 0.060	6.652 ± 0.069
2h	8.076 ± 0.055	8.070 ± 0.052	6.725 ± 0.041
4h	8.019 ± 0.026	7.998 ± 0.047	6.752 ± 0.023
8h	8.254 ± 0.022	8.230 ± 0.023	6.823 ± 0.015
24h	8.530 ± 0.006	8.517 ± 0.017	7.030 ± 0.004
48h	7.884 ± 0.023	7.816 ± 0.026	6.768 ± 0.017

Values are expressed as means of Log_{10} ($CFU.ml^{-1}$) of KT11 populations ± SD

3.2. Effect of *C. zeylanicum* bark EO on epiphytic populations of KT11

The Essential Oil extracted from dry bark of *Cinnamomum zeylanicum* has shown widely inhibitory activity against KT11epiphytic populations as well on leaves as on twigs. As reported in Fig. 2, the epiphytic survival of *P. savastanoi pv. savastanoi* strain KT11 was determined to be more relevant on twigs than on leaves from the first day after inoculation till 28 DAI.

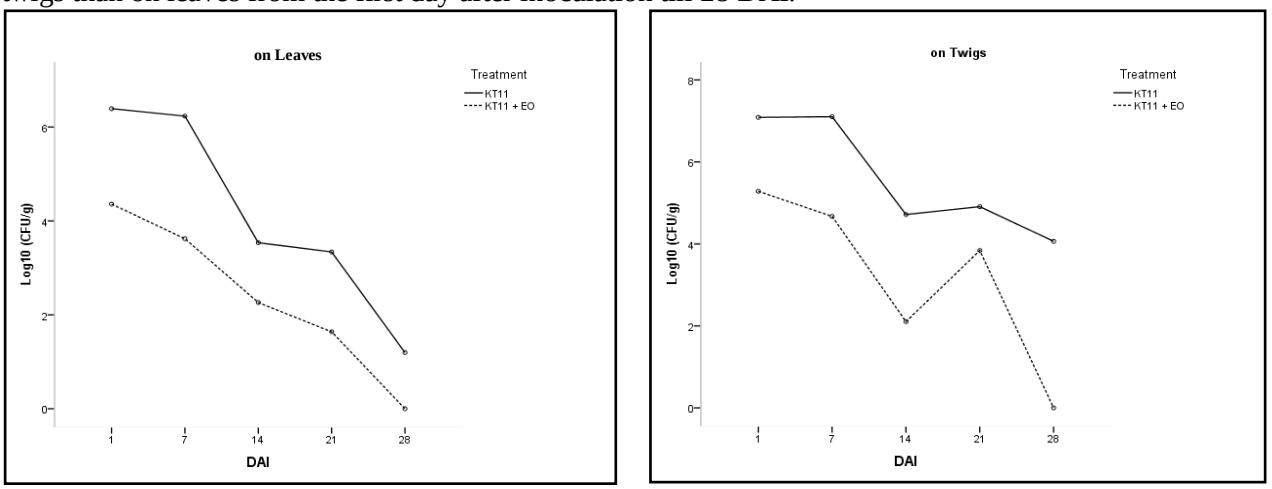


Figure 2 : Epiphytic populations of KT11 on leaves (left) and on twigs (right) after different time intervals.

The results of GC-MS analysis consigned in Table 3 showed the main volatile compounds of the *C. zeylanicum* bark oil. The major compounds were Cinnamaldehyde (90.39%), α-terpineol (2.82%),

Benzopyranone (1.68%) and Eucalyptol (1.51%). Some previous researches (Baratta *et al.*,1998; Simic *et al.*,2004; Yang *et al.*,2005; Unlu *et al.*,2010) have identified in this oil Cynnamaldehyde as main compound which confirm the present results. The antimicrobial activity recorded in this study could be attributed to the main aromatic compounds.

Table 3: GC-MS analysis of the essential oil from *C. zeylanicum* bark (results expressed in percent of total area).

Peak	RetentionTime (min)	Area (%)	Compound
1	6.235	2.824	α-terpineol
2	8.863	0.685	Phenyl propenal
3	9.722	1.511	Eucalyptol
4	11.794	90.393	Cynnamaldehyde
5	12.826	0.541	Benzenepropanal
6	13.197	0.262	Cyclohexenol
7	13.327	0.351	Propenol
8	13.479	0.687	Cyclohexene methanol
9	14.352	0.358	Benzene propanol
10	17.571	1.681	Benzopyranone
11	17.701	0.289	Propenol, phenyl acetate
12	18.806	0.417	Benzopyranone

4. CONCLUSION

In the present study, we have shown that *Cinnamomum zeylanicum* essential oil has a potential inhibitory effect on *Pseudomonas savastanoi* populations as well in vitro as on olive plants phylloplane. Essential oil was mainly composed in Cinnamaldehyde, α-terpineol, Benzopyranone and Eucalyptol. This composition can justify the significant antimicrobial activities observed. According to Prabuseenivasan *et al.* (2006) and Oussalah *et al.* (2006), the inhibitory effect of EO of *C. zeylanicum* may be related to the reduction of intracellular pH of the bacterium. Results obtained could be promising for furthermore investigations to control epiphytic populations of pathogens, which restrict the spread and contamination of other plant parts or new hosts.

REFERENCES

- Abbasipour, A., M. Mahmoudvand, F. Rastegar and M.H. Hosseinpour., 2012. Chemical composition, fumigant toxicity and oviposition deterrence of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil to three stored-product insects. *Archives des Sciences*, 65: 533- 542.
- Ayala-Zavala, J., G. Oms-Oliu, I. Odriozola-Serrano, G. Gonzalez-Aguilar, E. Alvarez-Parrilla and O. Martin-Belloso., 2008. Biopreservation of fresh-cut tomatoes using natural antimicrobials. *European Food Research and Technology* 226: 1047-1055.
- Baratta, M.T., H.J.D. Dorman, S.G. Deans, A.C. Figueredo, J.G. Barroso and G. Ruberto., 1998. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils, *Flavour Frag J.*, 13: 235-244.
- Burt, S.A., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Inter. J. Food Microbial.* 94: 223-253.
- Cao, H. and R.A. Anderson., 2011. Cinnamon polyphenol extract regulates tristetraprolin and related gene expression in mouse adipocytes. *J Agric. Food Chem.* 59: 2739–2744.
- Cao, H. and R.A. Anderson., 2011. Cinnamon polyphenol extract regulates tristetraprolin and related gene expression in mouse adipocytes. *J Agric. Food Chem.* 59: 2739–2744.
- Gordon S.A. and R.P. Weber., 1951. Colorimetric estimation of indole acetic acid. *Plant Physiology* 26: 192–195.
- Hadri, Z., R. Allam, M.G. Perry., 2014. Effect of essential oil of *Cinnamomum zeylanicum* on some pathogenic bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 8: 1026-1031.

- Jayaprakasha, G. K., M. Jagan, M. Rao and K.K. Sakariah., 2000. Chemical composition of the flower oil of *Cinnamomum zeylanicum* Blume. *Journal agricultural and food chemistry*. 48: 4294-4295.
- King, E.O., M.K. Ward and D.E. Raney., 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J Lab Clin Med*. 44: 301–307.
- Kordali, S., R. Kotan, A. Mavi, A. Caki, A. Ala and A. Yildirim., 2005. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dranculus* and of the antifungal and antibacterial activites of Turkish *Artemisia absinthium*, *Artemisia dranculus*, *Artiemisium santonicum* and *Artemisia spicigera* essential oil, J. *Agric. Food Chem*.,53: 9452-9458.
- Lin, C.C., S.J. Wu, C.H. Chang and L.T. Ng., 2003. Antioxidant activity of *Cinnamomum cassia*, *Phytotherapy Research*, 17 : 726–730.
- Lopez-Malo, A., S.M. Alzamora, and S. Guerrero., 2000. Natural antimicrobials from plants, pp. 237–264. In Stella M. Alzamora, María S. Tapia, Aurelio López-Malo (eds) Minimally Processed Fruits and Vegetables.Fundamentals Aspects and Applications, Aspen Publishing Inc., USA.
- Muthuswamy, S., H.P.V. Rupasinghe and G. Stratton., 2008. Antimicrobial effect of cinnamon bark extract on Escherichia coli O157: H7, listeria innocua and fresh-cut apple slices. of Food Safety 28 : 534-549.
- Oussalah, M., S. Caillet and M. Lacroix., 2006. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O57:H7 and *Listeria* monocytogenes. *J. Food Protection*. 69: 1046-1055.
- Prabuseenivasan, S., M. Jayakumar and S. Ignacimuthu., 2006. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement Altern Med.* 6 : 39
- Simic, A., M.D. Sokovic, M. Ristic, S. Grujic-Jovanovic, J. Vukojevic and P.D. Marin, 2004. The chemical composition of some *Lauraceae* essential oils and their antifungal activities, *Phytother. Res*., 18: 713-717.
- Unlu, M., E. Ergene, G.V. Unlu, H.S. Zeytinoglu and N. Vural., 2010. Composition, antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (*Lauraceae*), *Food Chem Toxicol*., 48: 3274-3280.
- Unlu, M., E. Ergene, G.V. Unlu, H.S. Zeytinoglu and N. Vural., 2010. Composition, antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (*Lauraceae*), *Food Chem Toxicol*., 48 : 3274-3280.
- Varalakshmi, B., A. Vijaya, K. Vijayakumar and R. Prasanna., 2014. *In vitro* antioxidant activity of *Cinnamomum zeylanicum* linn bark, *International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences*. 2: 154-166.
- Yang, Y.C., H.S. Lee, S.H. Lee, J.M. Clark and Y.J. Ahn., 2005. Ovicidal and adulticidal activities of *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil compounds and related compounds against *Pediculus humanus capitis* (*Anoplura*: *Pediculicidae*), *Int. J. Parasitol*, 35: 1595-1600.
- Zaika, L.L., 1988. Spices and herbs: Their antimicrobial activity and its determination. Journal of Food Safety 9: 97-118.

Session 4 : Biotechnologies végétales et cultures alternatives en milieu oasien (Biotechnologie, amélioration des plantes, qualité, agroalimentaire, compostage, transformation, cultures alternatives…).

Pasteurisation et hygiénisation par champs électriques pulsés (CEP) des produits et sous-produits des industries alimentaires

Jean-Louis Lanoisellé*, Xiaojun Liu, Thomas Lendormi
Univ. Bretagne Sud, UMR CNRS 6027, IRDL, F-56300 Pontivy, France
*Correspondant : jean-louis.lanoiselle@univ-ubs.fr

RESUME

Le procédé de traitement par Champs Électriques Pulsés (CEP) consiste à soumettre un produit ayant une structure cellulaire (bactéries, tissus végétaux, …) à des champs électriques de forte intensité (15 - 50 $kV \cdot cm^{-1}$), de manière répétée (pulsée) et pendant un temps de traitement très court (de l'ordre de la microseconde). Ce traitement est connu pour permettre la formation d'ouvertures nanométriques au niveau de la membrane cellulaire et faciliter, ainsi, les procédés d'extraction et de débactérisation. La pasteurisation des produits alimentaires pompables (par exemple des liquides comme le jus de pommes ou des systèmes pâteux) par CEP a été étudié depuis les années 1960. C'est un procédé considéré comme non-thermique qui peut atteindre des efficacités comparables à l'inactivation des microorganismes réalisée par la pasteurisation traditionnelle. Les études menées ces vingt dernières années ont confirmé que ce traitement est capable de provoquer un niveau très significatif de destruction microbienne (> 5 log_{10}) d'agents pathogènes comme *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium welchii*, *Bacillus megaterium*, etc. Au-delà de l'effet de pasteurisation, les traitements par CEP sont également reconnus pour la conservation des qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits alimentaires. Cet état de l'art présente le mécanisme d'action des CEP avec ses aspects théoriques, les avantages de la technologie, les principaux laboratoires de recherche qui les étudient ainsi que les développements commerciaux de la pasteurisation par CEP dans l'industrie alimentaire. L'application des CEP aux produits africains sera également abordée à travers de quelques exemples.

Mots-clés : bactéries, Champs électriques pulsés, hygiénisation, micro-organismes, pasteurisation, spores

SUMMARY

The treatment of Pulsed Electric Field (PEF) involves the exposure of a product with cellular structure (bacteria, plant cells ...) to a series of pulses with high electric field strength (15 - 50 $kV \cdot cm^{-1}$) during a short treatment time (in the order of microseconds). This treatment is recognized for its capability to induce nanometric pores on the cell membrane, thus facilitating the extraction processes by increasing the permeability and pasteurization by causing lethal damage of pathogens. The pasteurization of pumpable food products by PEF (for example liquid substrates like apple juice and pasty products) has been studied since 1960. This is a process considered non-thermal, which can obtain a comparable efficiency of pathogen reduction as thermal pasteurization. The studies realized during the recent 2 decades confirm that this treatment is able to generate a significant reduction (> 5 log_{10}) of pathogens like *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium welchii*, *Bacillus megaterium*, etc. In addition to the pasteurization effect, the treatment by PEF has also been acknowledged for its conservation of the organoleptic and the nutritional qualities of food. This paper deals with an introductive review about the mechanism, the advantages, the principal research laboratories and the commercial development of the PEF-assisted pasteurization technology. The application of PEF to African products will be discussed as well.

Key words: bacteria, Pulsed Electric Field, hygienization, microorganisms, pasteurization, spores

1. INTRODUCTION

La sécurité alimentaire reste la préoccupation majeure pour l'industrie alimentaire et ses consommateurs. Dans ce cadre, la maîtrise du risque microbiologique des aliments est indispensable. Plusieurs accidents de toxiinfections alimentaires ont été identifiés au cours de ces vingt dernières années en raison de la mauvaise prise en compte du risque. La contamination des produits alimentaires par des agents pathogènes comme, par exemple, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium welchii* et *Bacillus megaterium* est reconnue comme une menace considérable pour la santé publique (Newell *et al.*, 2010). Au-delà du risque sanitaire, la présence de microorganismes conduit également à une réduction de la durée de conservation des aliments et à une détérioration rapide de leurs qualités organoleptiques et nutritionnelles.

Le procédé de pasteurisation est ainsi largement utilisé dans l'industrie alimentaire afin de lutter contre ces deux défis. La pasteurisation vise, d'une part, à réduire la quantité de microorganismes d'un facteur significatif (généralement 100 000, équivalent à une réduction microbienne de 5 $\log_{10}$) dans des aliments et, d'une autre part, à reculer leur date limite de consommation. Ce procédé est classiquement réalisé par un traitement thermique (60 - 90 °C) pendant un temps défini. Cela représente une consommation énergétique importante et, souvent, dégrade la qualité organoleptique et nutritionnelle des aliments quand elle concerne certains paramètres thermosensibles, par exemple la couleur, l'acidité, les teneurs en vitamine C et en caroténoïdes, etc. (Vervoort *et al.*, 2011).

La technologie des Champs Électriques Pulsés (CEP) est un traitement émergeant utilisé comme un prétraitement des substrats pour l'intensification de procédés extractifs et la pasteurisation à froid. Ainsi, dès la fin du 19ème siècle les électrotechnologies ont été employées pour une pasteurisation des produits laitiers via chauffage ohmique. En 1949, le champ électrique a été adopté pour faciliter l'extraction du jus en augmentant la perméabilité des fruits. Depuis les années 1960, la technologie électrique a été systématiquement étudiée sous forme impulsionnelle (CEP) pour la débactérisation des produits alimentaires (Brennan et Grandison, 2012). En vue de la maitrise du procédé, Hülsheger *et al.* (1983) ont développé un premier modèle mathématique regroupant les paramètres importants du procédé de CEP pour estimer les cinétiques de destruction microbienne.

Ce document est un état de l'art concernant l'application des CEP pour la débactérisation des produits alimentaires. Au-delà de la pasteurisation, la question de la destruction des spores bactériennes par les technologies électriques est également abordée. Il présente également les principaux laboratoires de recherche impliqués et les développements commerciaux de cette technologie électrique. De plus, un résumé regroupant les études de l'application des CEP aux produits africains est réalisé.

2. MECANISME DES CEP

Le procédé de traitement par Champs Électriques Pulsés (CEP) consiste à soumettre un produit ayant une structure cellulaire (bactéries, tissus végétaux, etc) à des champs électriques de forte intensité (15 - 50 kV·cm^{-1}), de manière répétée (pulsée) et pendant un temps de traitement très court (de l'ordre de la microseconde). Cet effet entraine l'augmentation du potentiel transmembranaire (U_m) de la membrane cellulaire (Barsotti et Cheftel, 1999), qui est connu pour y permettre la formation d'ouvertures nanométriques et faciliter, ainsi, les procédés d'extraction et de débactérisation. Ce descriptif a été enrichie par la théorie dit du « pore critique » décrite par Weaver et Chizmadzhev (1996).

La Figure 1 illustre que ce potentiel transmembranaire est défini comme la différence de potentiel électrique entre les milieux intercellulaire et extracellulaire. S'il dépasse une valeur critique (V_C = 0,7 – 1,1 V, qui dépend de la température, selon Zimmermann, 1986), la rupture de la membrane cellulaire peut être obtenue. Le potentiel transmembranaire de la cellule sous CEP peut être calculé selon l'Eq. 1. :

$$U_m = k \cdot d_c \cdot E \cdot cos\theta \qquad \text{Eq. 1}$$

où *k* est le facteur de la forme de la cellule microbienne étudiée (-), d_c est la longueur ou le diamètre caractéristique du microorganisme considéré (cm), *E* est l'intensité du champ électrique appliquée (kV·cm^{-1}) et θ est l'orientation du champ électrique (°). À partir de cette équation, on constate : (i) que plus une cellule sera grande, plus elle est sensible aux CEP ; (ii) les pores ont tendance à se situer à l'équateur de la cellule ($cos\ \theta = 1$).
L'intensité du champ électrique externe est un paramètre clé pour atteindre ce potentiel critique. Elle est définie par l'Eq. 2 :

$$E = U/d \qquad \text{Eq. 2}$$

où *U* est la tension électrique appliquée (kV) et *d* est la distance entre deux électrodes de la cellule de traitement CEP (cm).

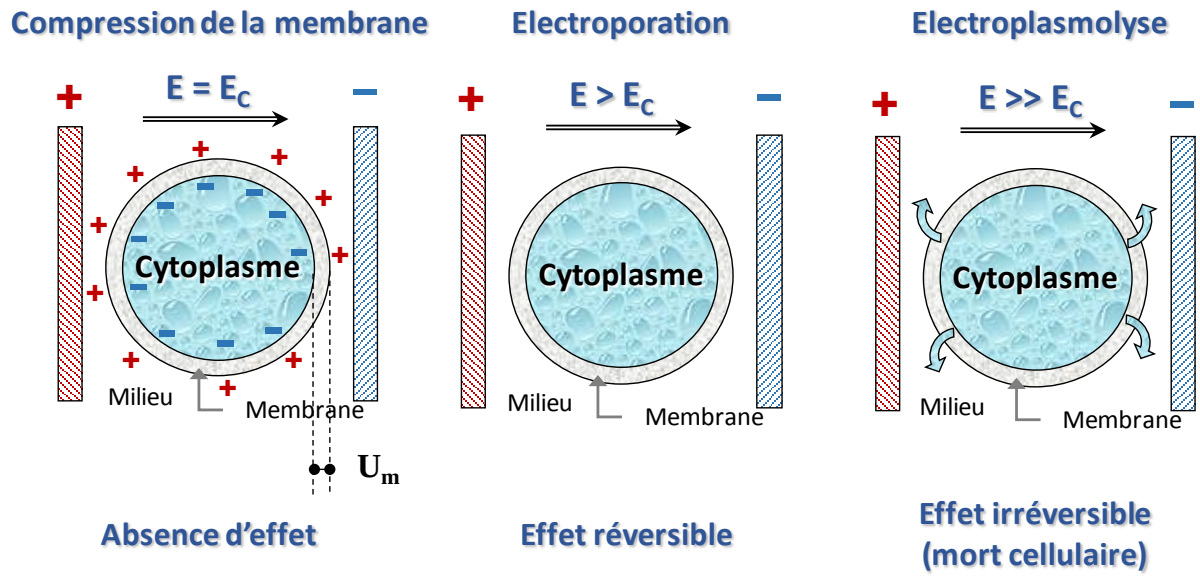


Figure 1. Introduction du potentiel transmembranaire dans une cellule exposée à un champ électrique externe

Le traitement par CEP consiste à une application des tensions non continues (pulsées) comme le montre la Figure 2. Ces paramètres servent à donner un autre paramètre important, notamment le temps effectif de traitement CEP, calculé selon l'Eq. 3. Il permet de calculer le temps effectif pendant lequel l'échantillon reçoit les impulsions de champs électriques :

$$t_{CEP} = N \cdot n \cdot t_i = N \cdot f \cdot t \cdot t_i \qquad \text{Eq. 3}$$

où t_{CEP} est le temps effectif du traitement par CEP (ms ou µs), *N* est le nombre de trains appliqués, *n* est le nombre d'impulsions envoyées, t_i est la durée d'une seule impulsion (µs), *f* est la fréquence de répétition (Hz) et *t* est le temps réel de traitement par un train (s).

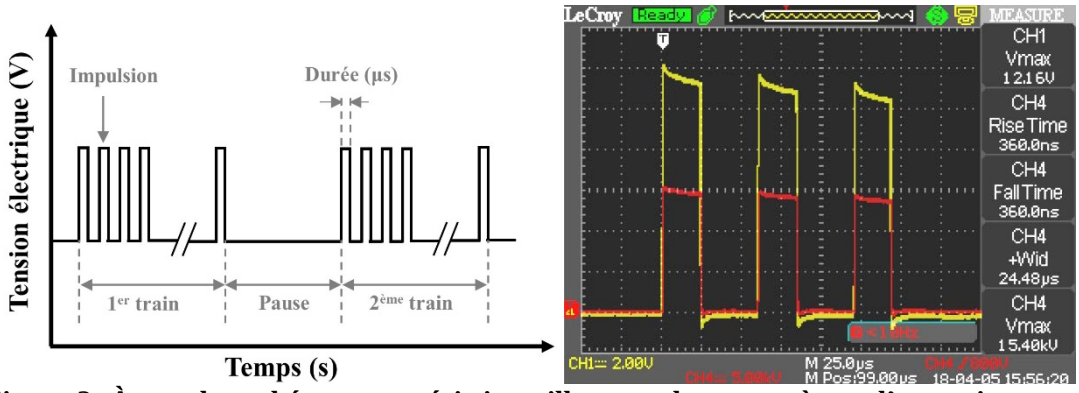


Figure 2. À gauche, schéma caractéristique illustrant les paramètres d'un traitement CEP. À droite, enregistrement lors d'un traitement réel (ITHPP, Thégra, France)

En plus des paramètres électriques mentionnés ci-dessus, la forme des impulsions joue également un rôle important au niveau de l'efficacité du traitement. La Figure 3 en donne deux exemples.
La forme de l'impulsion résulte de la conception des générateurs de CEP. Ils sont généralement composés d'un générateur électrique de haute tension, d'un sous-système pour la génération des impulsions envisagées et d'une chambre de traitement contenant les produits à traiter (Fig. 4). Les systèmes qui génèrent des impulsions exponentielles sont meilleur marché que ceux destinées aux impulsions carrées mais ces derniers sont plus efficaces en terme de densité énergétique (Zhang *et al.*, 1995).

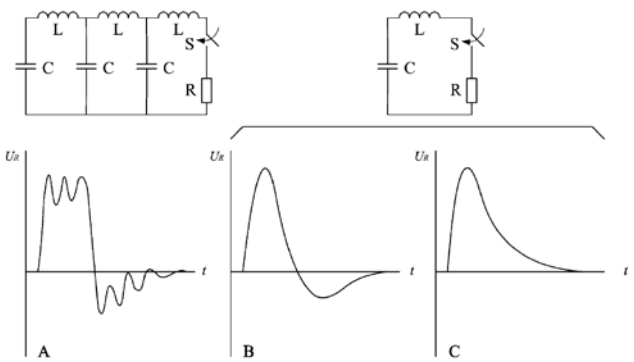


Figure 3. Formes typiques des impulsions (en bas) en fonction de la configuration du circuit électrique (en haut).
A) forme carrée, B) et C) formes exponentielles (Roodenburg *et al.*, 2005)

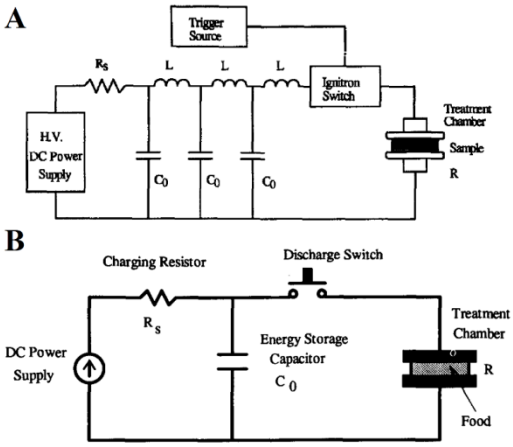


Figure 4. Deux circuits électriques simplifiés pour la génération d'impulsions.
A) Formes carrées et B) Formes exponentielles (Zhang *et al.*, 1995)

3. DEBACTERISATION PAR CEP

3.1 Effet sur la flore microbienne

La majorité des microorganismes n'est pas affectée par les CEP si l'intensité du champ électrique est faible (< 10 kV·cm^{-1}) en considérant que cela ne conduit pas à potentiel transmembranaire suffisant pour la lyse des cellules. Une intensité de champ électrique plus élevée (15 – 50 kV·cm^{-1}) est nécessaire afin de réaliser la désinfection des produits. Ici, on introduit la notion d'un paramètre champ électrique critique. Il correspond à la valeur du champ électrique au-delà duquel l'on observe une destruction significative des microorganismes indicateurs. La Figure 5 montre que ce champ critique théorique dépend de la souche microbienne, de la forme des cellules et de leurs tailles. On

constate que les levures sont moins résistantes que les bactéries. De plus, les bactéries type « Gram positif » sont plus résistantes aux CEP que celles type « Gram négatif » (Wang *et al.*, 2018). La forme de la cellule bactérienne (sphères, bâtonnets) peut également avoir un impact sur le champ critique.

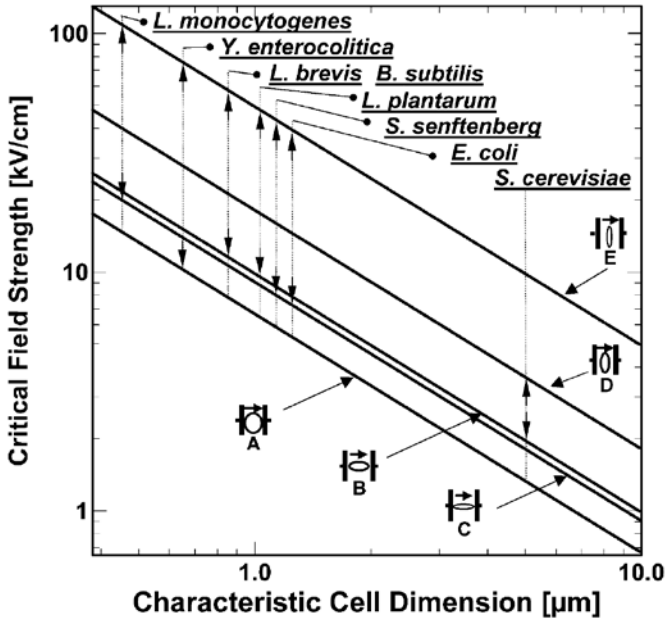


Figure 5. Champ électrique critique en fonction de la taille des cellules de micro-organismes (Heinz *et al.*, 2001). *A* à *E* : différentes formes de cellules et de leurs orientations dans le champ électrique

Dans la Figure 6, sont présentées des photographies réalisées en microscopie électronique à transmission de cellules de *Saccharomyces cerevisiae* et *Lactobacillus brevis*, traitées ou non par CEP. On peut observer une séparation entre la membrane et la paroi cellulaire et une structure cytoplasmique désintégrée de la cellule traitée par CEP. Une fuite des matériels intercellulaires, due à la lyse cellulaire, a ainsi conduit à la mort du microorganisme.

Plusieurs produits alimentaires ont été étudiés au niveau de la pasteurisation à froid réalisée par CEP, comme les jus de fruit, le concentré de tomate, la purée de fruit, la sauce spaghetti avec morceaux de viande, les yaourts, les confitures, les boissons, le vin, les œufs entiers, les sirops, les laits entier ou écrémé, la viande hachée, etc. Certains articles de review ont relevé les effets des CEP sur l'inactivation de divers microorganismes dans différents produits.

Qin *et al.* (1995) ont résumé l'impact des CEP sur l'inactivation de levure *Saccharomyces cerevisiae* dans le jus de pomme. L'article a également discuté de la consommation énergétique des CEP pour une réduction de 6 $\log_{10}$ de *S. cerevisiae*.

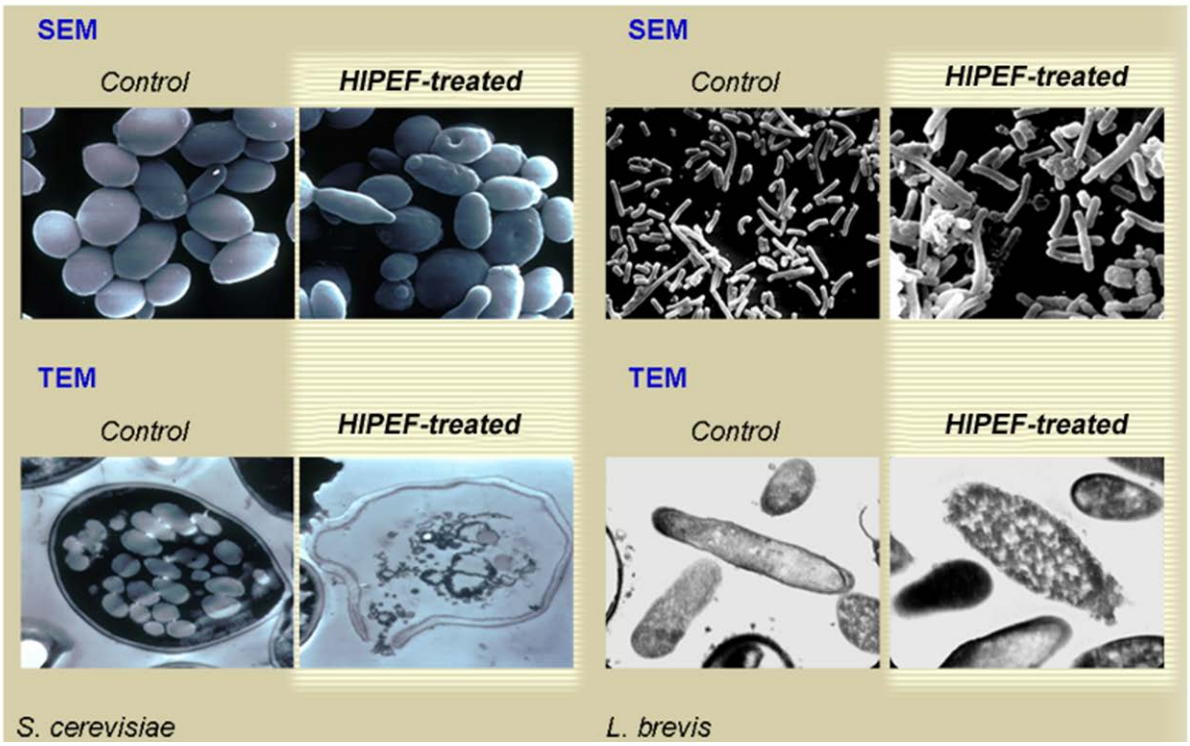


Figure 6. Comparaison de cellules de *S. cerevisiae* et *L brevis* avant et après traitement par CEP. *Control* : sans traitement ; *HIPEF-treated* : avec traitement CEP. SEM : microscopie électronique à balayage ; TEM : microscopie électronique à transmission (Martín-Belloso *et al.*, 2009)

Zhang *et al.* (1995) et Barsotti & Cheftel (1999) se sont focalisés, respectivement, sur le dimensionnement des systèmes de CEP et sur les aspects biologiques en liaison avec l'efficacité de l'inactivation des levures, des bactéries de type « Gram négatif » ou « Gram positif ». Leurs travaux se sont intéressés aux milieux de culture artificiels, aux jus de fruit, au lait et aux ovoproduits. Mosqueda-Melgar *et al.* (2008) et Pan *et al.* (2017) ont plus récemment complétés cette série d'études.

Jeyamkondan *et al.* (1999) et Ho & Mittal (2000) ont introduit des connaissances fondamentales liées au traitement CEP, notamment concernant le développement des matériels expérimentaux, de la conception de la chambre de traitement et de la modélisation des courbes de destruction microbienne.

Rastogi (2003) a réalisé un état de l'art de la technologie CEP et évalué son potentiel pour d'autres procédés industriels comme le séchage, l'extraction, la déshydratation osmotique et la réhydratation des produits alimentaires.

Pour les produits alimentaires, US Department of Agriculture (2006) a établi et publié des critères relatifs aux méthodes alternatives équivalentes à de la pasteurisation thermique, dont les CEP.

Gerlach *et al.* (2008) et Huang & Wang (2009) ont compilé les travaux sur la modélisation numérique de la distribution du champ électrique dans diverses chambres de traitement pour optimiser l'efficacité du traitement par CEP.

Wang *et al.* (2018) ont rédigé une review concernant l'effet sublétal des cellules traitées par CEP. Dans leur travail, les mécanismes protecteurs et métaboliques impliqués sont résumés. En outre, sont discutées en détail, certaines technologies, qui pourraient être combinées aux CEP pour renforcer l'effet de débactérisation.

D'autres reviews traitent de la question de la pasteurisation à froid des produits laitiers, des végétaux, des œufs et de la viande (Sampedro *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2012; Odriozola-Serrano *et al.*, 2013;

Sharma *et al.*, 2014; Yogesh, 2016). Quelques ouvrages du génie alimentaire ont également regroupé des informations intéressantes sur l'utilisation de cette nouvelle technologie à des fins de débactérisation non thermique et de l'amélioration des procédés d'extraction (Weaver & Chizmadzhev, 1996; Lebovka *et al.*, 2011; Jay, 2012; Brennan & Grandison, 2012; Vorobiev & Lebovka, 2016).

3.2 Effet sur les qualités nutritionnelles

La capacité de conservation de la qualité alimentaire des produits est un avantage majeur du traitement par CEP. De nombreuses études ont été menée sur ces aspects. Espachs-Barroso *et al.* (2003) ont résumé les modifications nutritionnelles et enzymatiques dans les jus de fruit et constaté que la plupart des propriétés biochimiques ont été conservées. Buckow *et al.* (2013), ont rassemblé les résultats de 12 études pour le jus d'orange. Les mêmes auteurs se sont intéressés à l'impact des CEP sur l'activité enzymatique de la pectine méthylestérase. Ils soulignent que les résultats sont contradictoires (avec une majorité de résultats présentant de 80 à 90% d'inactivation) et qu'il peut y avoir des biais dans les interprétations liés aux effets thermiques induits par les CEP. Quoiqu'il en soit, des champs électriques plus importants sont nécessaires à l'inactivation des enzymes en comparaison de la destruction des micro-organismes.

Une étude comparant l'impact des traitements thermiques par Haute Pression Hydrostatique (HPH) et par CEP sur les paramètres chimiques et biochimiques caractérisant la qualité alimentaire a été réalisée par Vervoort *et al.* (2011). Ce traitement électrique conserve également d'autres caractéristiques nutritionnelles telles que les teneurs en sucre, en acide organique, en composés amers, en vitamine C (acide ascorbique et déshydroascorbique), en caroténoïde, en furfural et en 5-hydroxyméthylfurfural.

Des conclusions similaires ont été émises pour d'autres reviews sur divers produits alimentaires : en comparaison avec la pasteurisation thermique, un traitement par CEP permet d'obtenir une meilleure conservation de la majorité des composés nutritionnels pour les produits laitiers, les légumes, le saké, la bière et les œufs (Sampedro *et al.*, 2005; Odriozola-Serrano *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2013; Milani *et al.*, 2015; Yogesh, 2016).

3.3 Effet sur l'inactivation des spores

Par définition, la pasteurisation thermique n'a aucun effet sur l'inactivation des spores bactériennes. Il en va de même pour les traitements par CEP qui ne sont pas supposés endommager les parois cellulaires. Néanmoins, quelques études ont confirmé l'effet positif, sur l'élimination de spores bactériennes, d'un traitement intensif par CEP (soit pendant un temps de traitement prolongé, soit pour une haute intensité du champ électrique, soit pour un traitement combiné avec une température élevée du milieu) (Qiu *et al.*, 2014; Siemer *et al.*, 2014; Pillet *et al.*, 2016). La Figure 7 donne un exemple du dommage des spores conduit par un traitement par 10 000 impulsions. Le mécanisme physique à l'origine de ces observations reste à ce jour inexpliqué.

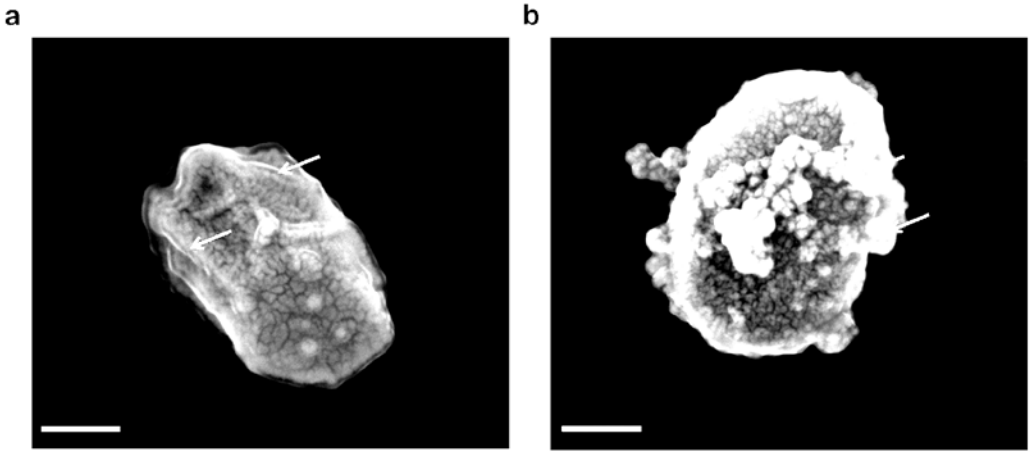


Figure 7. Spores de *Bacillus pumilus* A) intactes B) traitées par 10 000 impulsions à 7,5 kV·cm^{-1}, visualisées par microscope électronique à balayage (Pillet *et al.*, 2016). Barre d'échelle : 250 nm

3.4. Modélisation des cinétiques de destruction microbienne

Différents modèles mathématiques ont été développés dans la littérature pour une modélisation de la cinétique de destruction microbienne en fonction de l'allure des courbes et en s'appuyant sur différentes théories. Le Tableau 1 liste les six modèles principaux disponibles après une analyse bibliographique. Chaque modèle a ses propres particularités et contraintes d'application.

Tableau 1. Résumé des modèles cinétiques pour l'inactivation des microorganismes par champs électriques pulsés

N°	Modèles	Paramètres	Équations
1	Modèle réactionnel d'ordre un	D_T	$\log_{10} N / N_0 = - t / D_T$
2	Modèle de Weibull	α, β	$\log_{10} N / N_0 = - (t / \alpha)^{\beta} / 2{,}303$
3	Modèle de Fermi	E_c, k_c	$N / N_0 = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{E - E_c}{k_c}\right)}$
4	Modèle de Hülsheger	t_c, E_c, k_c	$N / N_0 = (t / t_c)^{-\frac{E - E_c}{k_c}}$
5	Modèle log-logistique	a, ω, σ, λ	$\log_{10} N / N_0 = a + \frac{\omega - a}{1 + \exp\left(\frac{4\sigma (\lambda - \log t)}{\omega - a}\right)}$
6	Modèle de réponse quadratique (deux effets combinés)	β_0, β_1, β_2, β_{11}, β_{22}, β_{12}	$N/N_0 = \beta_0 + \sum_{i=1}^{2} \beta_i x_i + \sum_{i=1}^{2} \beta_{ii} x_i^2 + \beta_{12} x_1 x_2$

Le modèle réactionnel d'ordre un est utilisé pour une modélisation de courbes rectilignes (**Fig. 8 A)**. Il suppose une population de microorganismes quasiment homogène du point de vue de sa résistance au traitement électrique (El Zakhem, 2006).

Le modèle de Weibull (Fig. 8C) considère une distribution du temps d'inactivation à l'échelle cellulaire. Cette répartition de la résistance cellulaire individuelle aux CEP conduit à différentes allures de cinétique de débactérisation (van Boekel, 2002).

Les modèles de Hülsheger et Fermi (Fig. 8B) s'appuient sur la notion de champ électrique critique (E_c). Il s'agit d'une identification de cette valeur critique à partir de la modélisation mathématique de la courbe de destruction d'un microorganisme en fonction du champ électrique appliqué. En plus du champ électrique critique, Hülsheger *et al.* (1983) ont également proposé d'introduire un temps critique (t_c) qui est le temps effectif minimal pour que la bactérie puisse être affectée par le traitement

électrique. Le modèle log-logistique (Fig. 8D) permet, comme le modèle de Weibull, de caractériser les courbes avec épaulement mais peu d'informations physiques peuvent en être déduites (Huang *et al.*, 2012).

Le sixième modèle est celui développé pour caractériser les interactions parmi les paramètres opératoires du traitement par CEP en utilisant la méthodologie des plans d'expériences et de calcul de surface de réponse (Huang *et al.*, 2012).

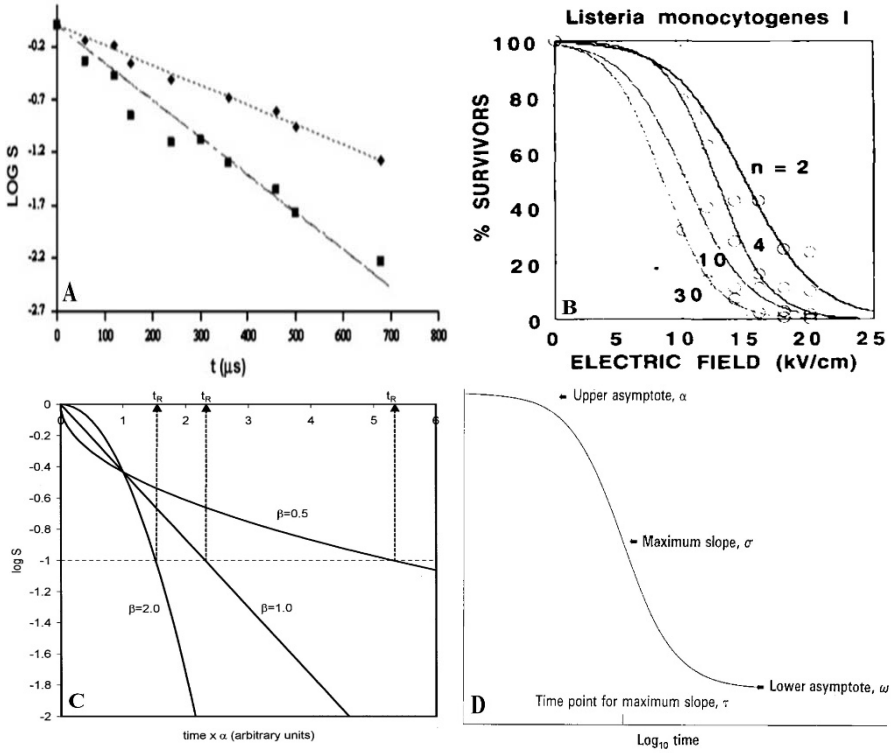


Figure 8. Formes typiques de différents modèles : A) Modèle réactionnel d'ordre un (Pérez *et al.*, 2007), B) Modèles de Hülsheger et Fermi (Peleg, 1995), C) Modèle de distribution Weibull (van Boekel, 2002) et D) Modèle log-logistique (Cole *et al.*, 1993)

En plus de ces modèles cinétiques, il existe aussi des études travaillant sur la modélisation dynamique et numérique du procédé de CEP au niveau de la chambre de traitement. Gerlach *et al.* (2008) ont contribué à une review sur la simulation numérique des CEP en prenant en compte les effets de la dynamique des fluides, les équations du transfert de chaleur et de l'électricité. La Figure 9 donne un exemple de la distribution du potentiel électrique et de l'intensité du champ électrique dans une chambre de traitement ayant un rayon de 2,2 mm et une longueur de 4,0 mm. Ces approches contribuent à l'optimisation de la conception de la cellule du traitement avec une meilleure efficacité de traitement.

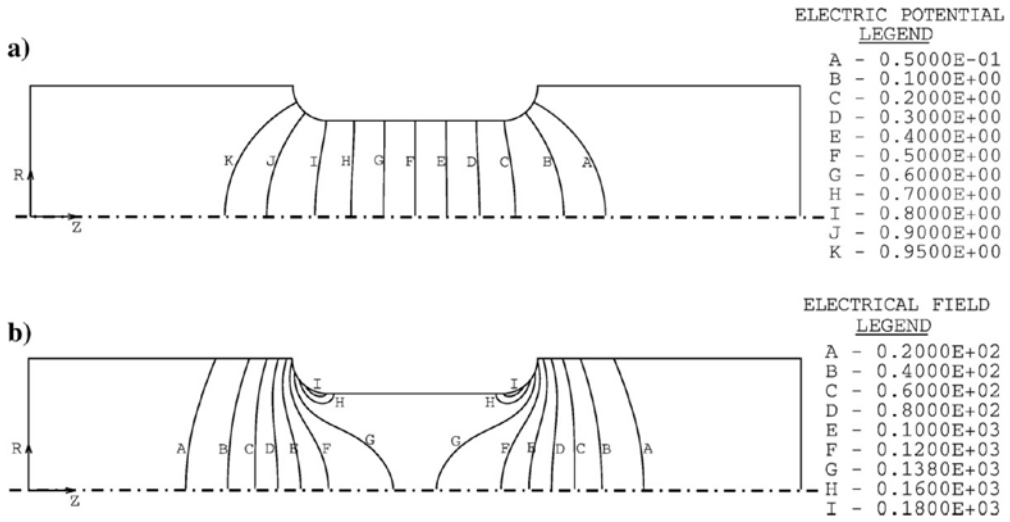


Figure 9. Distribution du potentiel électrique (A) et de l'intensité du champ électrique au sein d'une chambre du traitement CEP (Gerlach *et al.*, 2008)

4. ACTEURS DE LA TECHNOLOGIE CEP DANS LE MONDE

4.1 ORGANISMES DE RECHERCHE DANS LA FILIERE

Il y a une centaine de laboratoires dans le monde qui ont publié au total plus de 1200 publications (indexées par Scopus®, Elsevier, Amsterdam) concernant l'élimination des microorganismes par CEP. Parmi eux, 20 laboratoires européens, américains, canadiens et chinois représentent environ 60% de la production scientifique publiée. La Figure 10 montre la répartition géographique des principaux laboratoires dans ce domaine. Ils sont concentrés en Allemagne, Chine, Espagne, France, Irlande, Nouvelle Zélande, au Danemark, Pays-Bas et aux États-Unis.



Figure 10. Répartition géographiques des laboratoires avec au moins trois publications concernant la pasteurisation réalisée par CEP

4.2 Commercialisation du procédé

L'adoption commerciale de la pasteurisation par CEP a commencé au début des années 2000. La société « Genesis Juice Corporation » a introduit pour la première fois un jus de fruit pasteurisé par CEP dans le marché américain en 2005, après l'accord de l'USFDA au niveau de l'emploi d'un procédé alternatif à la place de la pasteurisation thermique pour leurs produits alimentaires. L'équipe de recherche de l'Université d'État de l'Ohio a participé à la conception et la fabrication du système de traitement par CEP à l'échelle industrielle (2000 $L \cdot h^{-1}$) (Kempkes, 2010).

La société « Diversified Technologies, Inc. » a développé un système CEP à l'échelle pilote qui permettait de traiter 100 - 500 $L \cdot h^{-1}$ de produits liquides en continu. Ce pilote a été fourni à plusieurs laboratoires en Europe, Australie et aux US pour les études de recherche et les projets de pré-production industrielle (Kempkes, 2010).
Une installation d'équipements CEP à grande échelle a été réalisée dans une station d'épuration aux États-Unis (Mesa Northwest Water Reclamation Plant, Arizona, US). Le projet a été porté par la société OpenCEL® qui a développé une unité du traitement « Focused Pulsed » pour le traitement des boues activées (Rittmann *et al.*, 2008).
En Europe, la première commercialisation de la pasteurisation par CEP a été réalisée par l'entreprise Hoogesteger au Pays-bas. En 2012, ce leader européen du jus de fruit a intégré un système CEP dans son procédé de pasteurisation (Hoogesteger, 2018). Cela a permis une extension de la durée de conservation jusqu'à 21 jours pour les jus de fruit. Ce projet a été réalisé par la société allemande Elea Technology à Quakenbrück (Elea Technology, 2017). En outre, il y existe plusieurs installations à l'échelle pilote en Allemagne et en France pour l'intensification des procédé d'extraction à partir de marcs de raisin et de betteraves à sucre. Les CEP sont également utilisés dans l'industrie de transformation de la pomme de terre.

5. APPLICATION DE CEP AUX PRODUITS AFRICAINS

Certaines études sur l'utilisation des CEP pour la pasteurisation à froid de produits comme le thé vert, les poudres de cacao et de lait peuvent servir d'exemple pour l'application des CEP aux produits africains.
Zhao *et al.* (2008) a étudié les effets des CEP sur l'inactivation des souches *E. coli* et *S. aureus* dans les extraits de thé vert. Ils constatent qu'un traitement CEP à 38,4 $kV \cdot cm^{-1}$ pendant 200 µs permet d'atteindre une réduction de 5,6 et 4,9 $\log_{10}$ des bactéries mentionnées ci-dessus. Ce traitement a provoqué une modification négligeable au niveau de la couleur, des teneurs en polyphénols de thé vert et en acides aminés libres. De plus, la durée de conservation de la boisson à 3 °C a été largement prolongée grâce à la conservation de la propriété antimicrobienne des polyphénols.
Pina-Pérez *et al.* (2013) ont trouvé un effet synergique de débactérisation en couplant la pasteurisation par CEP et l'ajout de poudre cacao qui est riche en polyphénols. Une réduction de 4,4 $\log_{10}$ a été obtenue dans du lait maternisé avec 5% de poudre cacao pour un traitement par CEP à 15 $kV \cdot cm^{-1}$ pendant 3000 µs.
Ait-Ouazzou *et al.* (2012) suggèrent une pasteurisation couplant des huiles essentielles marocaines avec un traitement par CEP à 30 $kV \cdot cm^{-1}$ pour une élimination de la souche *E. coli* O157 :H7 dans le jus de pomme.
Les productions principales dans les régions arides sont les olives, le lait, les dattes ainsi que leurs produits dérivés, comme par exemple les huiles essentielles et les sous-produits riches en polyphénols (noyaux de dattes). Les études disponibles dans la littérature prouvent la faisabilité de la technologie CEP dans des filières agro-industrielles similaires. Cela permet d'envisager une mise en œuvre des CEP pour la pasteurisation à froid des principaux produits alimentaires oasiens. En tenant en compte d'autres finalités de la technologie CEP, comme par exemple l'intensification des procédés extractifs et de séchage, on voit un potentiel non négligeable de l'implantation de ce traitement innovant dans les régions méditerranéennes.

6. CONCLUSIONS

Le procédé de traitement par Champs Électriques Pulsés a été systématiquement étudié à propos de sa capacité de pasteurisation à froid des produits alimentaires. Il peut en même temps réaliser l'inactivation des souches pathogènes et la conservation de la qualité alimentaire. Des études récentes ont montré également son effet sur l'inactivation des spores bactériennes. Divers modèles mathématiques ont été développé pour la modélisation de la performance de ce procédé. La commercialisation de ce traitement au niveau de la pasteurisation des produits alimentaires a été déjà réalisée aux États-Unis et en Europe. Aujourd'hui, la connaissance de cette technologie permet son

application dans les industries y compris pour la pasteurisation à froid des produits de la région méditerranéenne. Cette technologie est également développée pour d'autres usages, par exemple, pour l'hygiénisation des sous-produits alimentaires, l'intensification de l'extraction et de la déshydratation ainsi que l'électro-chimiothérapie des tumeurs dans le domaine de la médecine. Des études plus approfondies restent d'actualité pour avoir une connaissance de ses avantages et de ses limites dans divers domaines d'application.

REMERCIEMENT

Ce travail bibliographique a été réalisé dans le cadre d'une thèse doctorale financée par le Conseil Régional de Bretagne (France) et le Conseil Départemental de Morbihan (France). Nous tenons également à remercier la SEM LIGER (Locminé, France) pour leurs soutiens techniques et financiers.

REFERENCES

- Ait-Ouazzou A, Espina L, Cherrat L *et al.* 2012. Synergistic combination of essential oils from Morocco and physical treatments for microbial inactivation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **16**, 283–290.
- Barsotti L, Cheftel JC. 1999. Food processing by pulsed electric fields. II. Biological aspects. *Food Reviews International*, **15**, 181–213.
- van Boekel MAJS. 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*, **74**, 139–159.
- Brennan JG, Grandison AS. 2012. *Food Processing Handbook*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, US.
- Buckow R, Ng S, Toepfl S. 2013. Pulsed Electric Field Processing of Orange Juice: A Review on Microbial, Enzymatic, Nutritional, and Sensory Quality and Stability. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **12**, 455–467.
- Chen JH, Ren Y, Seow J, Liu T, Bang WS, Yuk HG. 2012. Intervention technologies for ensuring microbiological safety of meat: current and future trends. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **11**, 119–132.
- Cole MB, Davies KW, Munro G, Holyoak CD, Kilsby DC. 1993. A vitalistic model to describe the thermal inactivation ofListeria monocytogenes. *Journal of Industrial Microbiology*, **12**, 232–239.
- Elea Technology. 2017. Hoogesteger extends shelf life of fresh juice with ELEA PEF since 2012. http://elea-technology.de/hoogesteger-extends-shelf-life-of-fresh-juice-with-elea-pef-since-2012/.
- El Zakhem H. 2006. Inactivation des suspensions microbiennes de Saccharomyces cerevisiae et d'Escherichia coli par champs électriques pulsés modérés. Université de Technologie de Compiègne.
- Espachs-Barroso A, Barbosa-Canovas GV, Martin-Belloso O. 2003. Microbial and enzymatic changes in fruit juice induced by high-intensity pulsed electric fields. *Food Reviews International*, **19**, 253–273.
- Gerlach D, Alleborn N, Baars A, Delgado A, Moritz J, Knorr D. 2008. Numerical simulations of pulsed electric fields for food preservation: A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **9**, 408–417.
- Heinz V, Alvarez I, Angersbach A, Knorr D. 2001. Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields—basic concepts for process design. *Trends in Food Science & Technology*, **12**, 103–111.
- Ho S, Mittal GS. 2000. High Voltage Pulsed Electrical Field for Liquid Food Pasteurization. *Food Reviews International*, **16**, 395–434.
- Hoogesteger. 2018. Cold Pressed. https://www.hoogesteger.nl/en/cold-pressed.
- Huang K, Tian H, Gai L, Wang J. 2012. A review of kinetic models for inactivating microorganisms and enzymes by pulsed electric field processing. *Journal of Food Engineering*, **111**, 191–207.

- Huang K, Wang J. 2009. Designs of pulsed electric fields treatment chambers for liquid foods pasteurization process: A review. *Journal of Food Engineering*, **95**, 227–239.
- Huang K, Yu L, Liu D, Gai L, Wang J. 2013. Modeling of yeast inactivation of PEF-treated Chinese rice wine: Effects of electric field intensity, treatment time and initial temperature. *Food Research International*, **54**, 456–467.
- Hülsheger H, Potel J, Niemann E-G. 1983. Electric field effects on bacteria and yeast cells. *Radiation and environmental biophysics*, **22**, 149–162.
- Jay JM. 2012. *Modern food microbiology*. Springer Science & Business Media.
- Jeyamkondan S, Jayas DS, Holley RA. 1999. Pulsed Electric Field Processing of Foods: A Review. *Journal of Food Protection*, **62**, 1088–1096.
- Kempkes MA. 2010. Pulsed electric field (PEF) systems for commercial food and juice processing. In: *Case Studies in Novel Food Processing Technologies*. Elsevier, 73–102.
- Lebovka F, Vorobiev N, Chemat E. 2011. *Enhancing extraction processes in the food industry*. CRC Press.
Martín-Belloso O, Elez-Martínez P, Soliva-Fortuny R. 2009. Recent development in food preservation by pulsed electric fields. In: *International conference on bio and food electrotechnologies – BFE 2009*. Université de Technologie de Compiègne: Vorobiev E, Lebovka N, Van Hecke E, Lanoisellé J-L, 15.
- Milani EA, Alkhafaji S, Silva FVM. 2015. Pulsed Electric Field continuous pasteurization of different types of beers. *Food Control*, **50**, 223–229.
- Mosqueda-Melgar J, Elez-Martínez P, Raybaudi-Massilia RM, Martín-Belloso O. 2008. Effects of Pulsed Electric Fields on Pathogenic Microorganisms of Major Concern in Fluid Foods: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **48**, 747–759.
- Newell DG, Koopmans M, Verhoef L *et al.* 2010. Food-borne diseases — The challenges of 20years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*, **139**, S3–S15.
- Odriozola-Serrano I, Aguiló-Aguayo I, Soliva-Fortuny R, Martín-Belloso O. 2013. Pulsed electric fields processing effects on quality and health-related constituents of plant-based foods. *Trends in Food Science & Technology*, **29**, 98–107.
- Pan Y, Sun D-W, Han Z. 2017. Applications of electromagnetic fields for nonthermal inactivation of microorganisms in foods: An overview. *Trends in Food Science & Technology*, **64**, 13–22.
- Peleg M. 1995. A model of microbial survival after exposure to pulsed electric fields. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **67**, 93–99.
- Pérez MCP, Aliaga DR, Bernat CF, Enguidanos MR, López AM. 2007. Inactivation of Enterobacter sakazakii by pulsed electric field in buffered peptone water and infant formula milk. *International Dairy Journal*, **17**, 1441–1449.
- Pillet F, Formosa-Dague C, Baaziz H, Dague E, Rols M-P. 2016. Cell wall as a target for bacteria inactivation by pulsed electric fields. *Scientific Reports*, **6**, 19778.
- Pina-Pérez MC, Martínez-López A, Rodrigo D. 2013. Cocoa powder as a natural ingredient revealing an enhancing effect to inactivate Cronobacter sakazakii cells treated by Pulsed Electric Fields in infant milk formula. *Food Control*, **32**, 87–92.
- Qin B-L, Chang F-J, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG. 1995. Nonthermal inactivation of Saccharomyces cerevisiae in apple juice using pulsed electric fields. *LWT - Food Science and Technology*, **28**, 564–568.
- Qiu X, Lee YT, Yung PT. 2014. A bacterial spore model of pulsed electric fields on spore morphology change revealed by simulation and SEM. In: Chicago, US, 6822–6825.
- Rastogi NK. 2003. Application of high-intensity pulsed electrical fields in food processing. *Food Reviews International*, **19**, 229–251.
- Rittmann BE, Lee H, Zhang H, Alder J, Banaszak JE, Lopez R. 2008. Full-scale application of focused-pulsed pre-treatment for improving biosolids digestion and conversion to methane. *Water Science and Technology*, **58**, 1895–1901.

- Roodenburg B, Morren J, Berg HE (Iekje), de Haan SWH. 2005. Metal release in a stainless steel Pulsed Electric Field (PEF) system: Part I. Effect of different pulse shapes; theory and experimental method. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **6**, 327–336.
- Sampedro F, Rodrigo M, Martinez A, Rodrigo D, Barbosa-Canovas GV. 2005. Quality and safety aspects of PEF application in milk and milk products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **45**, 25–47.
- Sharma P, Oey I, Everett DW. 2014. Effect of pulsed electric field processing on the functional properties of bovine milk. *Trends in Food Science & Technology*, **35**, 87–101.
- Siemer C, Toepfl S, Heinz V. 2014. Inactivation of Bacillus subtilis spores by pulsed electric fields (PEF) in combination with thermal energy – I. Influence of process- and product parameters. *Food Control*, **39**, 163–171.
- US Department of Agriculture. 2006. Requisite Scientific Parameters for Establishing the Equivalence of Alternative Methods of Pasteurization. *Journal of Food Protection*, **69**, 1190–1216.
- Vervoort L, Van der Plancken I, Grauwet T *et al.* 2011. Comparing equivalent thermal, high pressure and pulsed electric field processes for mild pasteurization of orange juice: Part II: Impact on specific chemical and biochemical quality parameters. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **12**, 466–477.
- Vorobiev E, Lebovka N. 2016. *Electrotechnologies for extraction from food plants and biomaterials.*
- Wang M-S, Wang L-H, Bekhit AE-DA *et al.*, 2018. A review of sublethal effects of pulsed electric field on cells in food processing. *Journal of Food Engineering*, **223**, 32–41.
- Weaver JC, Chizmadzhev YA. 1996. Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **41**, 135–160.
- Yogesh K. 2016. Pulsed electric field processing of egg products: a review. *Journal of food science and technology*, **53**, 934–945.
- Zhang Q, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG. 1995. Engineering aspects of pulsed electric field pasteurization. *Journal of Food Engineering*, **25**, 261–281.
- Zhao W, Yang R, Lu R, Wang M, Qian P, Yang W. 2008. Effect of PEF on microbial inactivation and physical–chemical properties of green tea extracts. *LWT - Food Science and Technology*, **41**, 425–431.
- Zimmermann U. 1986. Electrical breakdown, electropermeabilization and electrofusion. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, **105**, 175–256.

Activité β-glucosidase de *Lactobacillus plantarum* FSO1 et *Candida pelliculosa* L18 isolées des olives vertes en fermentation

Rokni[1*] Y., Abouloifa[1] H., Ghabbour[1] N., Bellaouchi[1] R., Ben Salah[2] R., Taybi[3] A. F., Mabrouki[2] Y., Chaoui[1] J., Hasnaoui[1] A., Nagaz[4] K. Chaira[4] N., Saalaoui[1] E. et Asehraou[1*] A.

[1]Laboratory of Biochemistry and Biotechnology, Faculté des Sciences, Université Mohammed Premier, Oujda, Maroc.

[2]Laboratory of Microorganisms and Biomolecules, Centre de Biotechnologie de Sfax, Tunisie

[3]Laboratory of Water Science, Environment and Sustainable Development, Faculté des Sciences, Université Mohammed Premier, Oujda, Maroc.

[4]Drylands and Oases Cropping Laboratory, Institut des Régions Arides, Médenine, Tunisie

*correspondance : yahya.rokni@gmail.com ; a.asehraou@ump.ac.ma

RESUME

L'oleuropéine est le principal polyphénol responsable de l'amertume des olives vertes. Ce glucoside amer peut être dégradé par la β-glucosidase conduisant ainsi à la production du glucose et d'autres composés phénoliques. Les souches de *Lactobacillus plantarum* FSO1 et *Candida pelliculosa* L18, isolées à partir des olives vertes en fermentation naturelle, ont été étudiées pour leur activité β-glucosidase sur le milieu MRS contenant l'oleuropéine comme seule source de carbone. L'étude de la production et de l'activité de la β-glucosidase a été réalisée à différents pH, concentrations de NaCl et température. Les résultats obtenus ont montré que la production de la β-glucosidase est extracellulaire et induite par le substrat (oleuropéine). La production la plus élevée a été obtenue aux pH 5 et 6, respectivement pour *L. plantarum* et *C. pelliculosa*. L'augmentation de la concentration en NaCl (0% à 10%) a inhibé la production de β-glucosidase. Cependant, l'enzyme a été activée par des concentrations croissantes de NaCl, avec une activité maximale à 8% de NaCl (m/v). Les conditions optimales d'activité de la β-glucosidase sont pH5 pour les deux souches étudiées, et des températures de 45°C pour *L. plantarum* et 35°C pour *C. pelliculosa*.

Mots-clés : β-glucosidase, *Candida pelliculosa, Lactobacillus plantarum*, oleuropéine, olive.

SAMMARY

Oleuropein is the main polyphenol responsible for green olives bitterness. This bitter glucoside may be degraded by the β-glucosidase enzyme to produce glucose and other phenolic compounds. *Lactobacillus plantarum* FSO1 and *Candida pelliculosa* L18 strains, isolated from natural fermenting green olives, were cultured in modified MRS, containing oleuropein as a sole carbon source, and measured for their β-glucosidase activity at different initial pH, NaCl concentration and temperature. The results obtained showed that the production of β-glucosidase is extracellular and induced by the substrate (oleuropein). The highest production of β-glucosidase was obtained at pHs 5 and 6, respectively for *L. plantarum* and *C. pelliculosa*. The increase of NaCl concentration, from 0% to 10%, inhibited the production of β-glucosidase. However, the enzyme was activated by increasing concentrations of NaCl, with a maximum of activity obtained at 8% NaCl (w/v). The optimal conditions of activity of the enzyme were pH5 for all strains tested, and temperature of 45°C for *L. plantarum* and 35°C for *C. pelliculosa*.

Keywords: β-glucosidase, *Candida pelliculosa, Lactobacillus plantarum*, oleuropein, olive

1. Introduction

L'oleuropéine est le principal polyphénol responsable du goût amer de l'olive crue. Le procédé actuel, largement utilisé pour l'élaboration des olives vertes de tables, est basé sur la désamérisation chimique, moyennant la soude (NaOH), pour dégrader l'oleuropéine. Cette dégradation élimine l'amertume des fruits et permet le développement de la fermentation lactique dans leur saumure (Brenes and de Castro, 1998).

L'oleuropeine est un glucoside phénolique. Son hydrolyse par la β-glucosidase entraine la libération du glucose et de l'oleuropéine aglycone (Limiroli et al., 1995). Ce dernier s'hydrolyse par la suite par des

estérases en composés plus simples non amers tels que l'hydroxytyrosol et l'acide élénolique (Segovia-Bravo et al., 2009). Ce type d'hydrolyse joue un rôle important dans l'amélioration de la fermentation, d'une part, par l'enrichissement de la saumure par le glucose favorisant ainsi la fermentation lactique (Soler-Rivas et al., 2006), et d'autre part, il favorise le processus de désamérisation biologique des olives.

La β-glucosidase appartient à la famille des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des composés glycosylés, par une liaison β, en libérant l'aglycone et le D-glucose (Leah et al., 1995, Verdoucq et al., 2003). La β-glucosidase est principalement produite par des microorganismes regroupant les bactéries, les levures et les moisissures. Les bactéries lactiques, particulièrement, *Lactobacillus casei*, *L. brevis et L. plantarum* ont été identifiées pour leur capacité de production de la β-glucosidase (Michlmayr et al., 2010). En général, les β-glucosidases de sources différentes présentent une similitude dans leur spécificité pour la partie glycone, et se distinguent par leur spécificité pour la partie aglycone du substrat (Sarry, 2001). La β-glucosidase a été utilisée sous forme naturelle dans la fermentation des olives, en utilisant les cultures microbiennes qui la synthétisent, telles que les bactéries lactiques (Ghabbour et al., 2011) et les levures (Rodriguez-Gomez et al., 2012). La participation de la β-glucosidase endogène des fruits d'olives dans leur désamérisation a été démontrée au cours des premiers mois de saumurage (Ramírez et al., 2017).

L'objectif de ce travail est d'étudier la production et l'activité de la β-glucosidase chez des souches de bactérie lactique et de levure isolées des saumures d'olives de table vertes Marocaine en fermentation naturelle.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Microorganismes étudiés

Les souches microbiennes utilisées dans cette étude sont *Lactobacillus plantarum* FSO1 et *Candida pelliculosa* L18. Ces souches ont été isolées des saumures d'olives vertes en fermentation naturelle, et sélectionnées pour leur activité capacité de dégradation de l'oleuropeine (Rokni, 2017).

2.2. Détection de l'enzyme β-glucosidase

2.2.1. Milieu à base de l'esculine

Le milieu à base de l'esculine utilisé pour détecter l'activité de la β-glucosidase se compose de : peptone de caséine 8 g/l, esculine sesquihydratée 1 g/l, citrate ferrique ammoniacal 1 g/l, agar 17 g/l et le pH est ajusté à 7,4 (Devoyod and Poullain, 1988). Les souches de bactéries et de levures ont respectivement été cultivées dans le milieu MRS et YEG liquide pendant 24 heures à 30 C, et ensuite 60 µl des cultures ont été déposés sur le milieu gélosé à base de l'esculine. Les cultures ont été incubées à 30 C pendant 48 h. Les souches qui expriment une β-glucosidase positive (esculinase), hydrolysent l'esculine et libèrent le glucose et l'esculétine, composé aglycone qui possède une fonction phénol. L'esculétine produite réagit avec les ions de fer III pour former un précipité noir dans le milieu. L'enzyme commerciale (β-glucosidase EC 3.2.1.21) filtrée a été utilisée comme témoin positif, et l'eau distillée filtrée a été utilisée comme témoin négatif. Les essais ont été réalisés trois fois.

2.2.2. Milieu à base de X-glu

L'activité β-glucosidase a été détectée sur le milieu MRS à base de 5- bromo-3- indolyl- β-D-glucoside (X-Gluc) (Ciafardini et al., 1994). Un volume de 0,5 ml de X-glu à 0,3 % (m/v) dans le N, N- dimethylformamide (DMF) a été étalé sur MRS Agar en boites de Pétri. Elles sont ensuite inoculées par 5 µl de cultures jeunes de 24 h des souches étudiées et incubées à 30 °C pendant 3 jours. Les colonies produisant la β-glucosidase prennent une couleur bleue. L'intensité de la couleur indique la quantité de la β-glucosidase produite. L'enzyme commerciale (β-glucosidase) filtrée et deux souches β-glucosidase positive ont été utilisées comme témoins positifs (*L. pentosus* and *L. plantarum)* (Ghabbour et al., 2011). L'eau distillée filtrée a été utilisée comme témoin négatif.

2.2.3. Induction et localisation de l'activité β-glucosidase

Les souches étudiées dans ce travail (*L. plantarum* FSO1, *C. pelliculosa* L18) ont été testées pour la localisation (extracellulaire, intracellulaire ou membranaire) de leur activité β-glucosidase. Pour cela, des cultures d'une nuit (5 µl) des souches étudiées ont été inoculées dans 5 ml de MRS normal et MRS modifié (MRSm), contenant 1 % (m/v) d'oleuropéine (Extrasynthese, Genay, France) comme seule source de carbone, puis incubées à 30 C pendant 7 jours. Les cultures obtenues ont été ensuite centrifugées à 12 000 g pendant 12 min à 4°C (Hermle Labnet Z216MK). Le surnageant obtenu a été soigneusement séparé du culot (crème cellulaire). La crème cellulaire est remise en suspension dans un tampon phosphate 0,1 M à pH 5, puis les cellules sont lysées par sonication à 4°C dans un bain à ultrasons (impulsions de 5 à 5 s d'intervalle pendant 45 min) (bain à ultrasons, Bandelin Sonorex Digitec). Les cellules lysées sont centrifugées à 12 000 g pendant 12 min à 4°C pour séparer les fractions intracellulaire et membranaire. Après ces opérations, nous avons obtenu pour chaque souche trois fractions utilisées pour mesurer l'activité enzymatique. Le contenu extracellulaire (surnageant 1 : S1), le contenu intracellulaire (surnageant 2 : S2) et le culot membranaire (suspension pariétale : P).

2.2.4. Mesure de l'activité β-glucosidase (β-G)

L'activité β-glucosidase a été déterminée selon la méthode de Norkrans (1950), en mesurant l'hydrolyse du paranitrophényl-β-D-glucopyranoside (p-NPG) (Merck), utilisé comme substrat. Pour le dosage enzymatique, le mélange d'incubation contient 0,9 ml de p-NPG (5 mM), préparé dans le tampon citrate 50 mM (pH 4,8), et 0,1ml l'extrait enzymatique (S1, S2 ou P). La réaction a été effectuée à 50°C pendant 10 min et a été arrêtée par l'addition de 2 ml de solution de Na_2CO_3 (1M) puis on ajoute 10 ml d'eau distillée. La quantité de paranitrophénol (p-NP) libérée a été déterminée par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance de la solution à 405 nm. Une unité d'activité enzymatique (U) a été définie comme étant la quantité d'enzyme qui a produit 1 µmol de p-NP par minute dans les conditions de l'expérience. Une courbe d'étalonnage a été préparée par du p-NP. Tous les tests ont été réalisés trois fois.

2.3. Conditions de production de la β-glucosidase

2.3.1. Suivi au cours du temps d'incubation

Le suivi de la production de la β-glucosidase a été déterminé in vitro en mesurant le taux d'hydrolyse du p-NPG en β-D-glucose et en paranitrophénol par la β-glucosidase de la fraction S1 (surnageants S1) des souches FSO1, L18 et leur combinaison (FSO1/L18). Pour cela, 10 µl de cultures d'une nuit des souches ont été inoculés dans 10 ml de bouillon MRSm (contenant 1% (m/v) d'oleuropéine comme seule source de carbone). Les cultures, répétées trois fois, ont été incubées à 30 C pendant 9 jours. Les échantillons récupérés à partir des cultures ont été analysés pour la mesure de l'activité β-glucosidase, le pH et la biomasse. L'activité enzymatique (β-glucosidase) a été mesurée comme décrit ci-dessus (paragraphe 4.). Le pH a été mesuré en utilisant un pH-mètre de type VWR SB70P, calibré à pH 4 et 7. La biomasse a été mesurée par dénombrement sur milieu MRS solide pour *L. plantarum* FSO1 et milieu PDA pour *C. pelliculosa* L18. La cycloheximide (0,01 %) a été ajoutée au milieu MRS pour empêcher la croissance de la levure, tandis que de la gentamicine a été ajoutée au milieu PDA pour empêcher la croissance de *L. plantarum*.

2.3.2. Effet du pH

L'effet du pH sur la production de la β-glucosidase par les souches étudiées (*L. plantarum* FSO1, *C. pelliculosa* L18), ainsi que leur combinaison (FSO1/L18) a été déterminé en mesurant l'activité enzymatique dans le bouillon MRSm ajusté initialement à différents pH (4, 5 et 6) et inoculé par les souches en question. Après 7 jours d'incubation à 30°C, l'activité de la β-glucosidase a été mesurée dans la fraction S1 (surnageant S1), en utilisant le même protocole que celui décrit ci-dessus (paragraphe 4.). Deux témoins ont été utilisés dans cette expérience, le tampon citrate (50 mM à pH 4,8) comme témoin négatif et la β-glucosidase commerciale (EC 3.2.1.21) comme témoin positif. Tous les essais ont été répétés trois fois.

2.3.3. Effet du NaCl

L'effet du NaCl sur la production de la β-glucosidase par les souches étudiées FSO1, L18 et FSO1/L18, a été déterminé en mesurant l'activité de la β-glucosidase dans le bouillon MRSm ajusté initialement à différentes concentrations de NaCl (0, 2, 4, 6, 8 et 10%, m/v) et inoculé par les souches étudiées. Après 7 jours d'incubation à 30°C, l'activité de la β-glucosidase a été mesurée dans la fraction S1 (surnageant S1), en utilisant le même protocole que celui décrit ci-dessus (paragraphe 4.). Le tampon citrate (50 mM à pH 4,8) a été utilisé comme témoin négatif et la β-glucosidase commerciale comme témoin positif. Tous les essais ont été répétés trois fois.

2.4. Conditions d'activité de la β-glucosidase

2.4.1. Effet du pH

L'activité β-glucosidase a été mesurée dans la fraction S1 (surnageant S1) issue des conditions optimales de la production de la β-glucosidase par les souches étudiées, notamment le pH5 pour FSO1 et pH6 pour L18 et FSO1/L18, et en absence de NaCl. L'effet du pH sur l'activité de la β-glucosidase a été mesuré dans un tampon citrate à 50 mM à différentes valeurs de pH (4, 5 et 6) en utilisant le p-NPG (5 mM) comme substrat. L'activité de la β-glucosidase a été mesurée comme indiqué ci-dessus (paragraphe 4.). Tous les tests ont été répétés trois fois.

2.4.2. Effet du NaCl

L'effet de NaCl sur l'activité de la β-glucosidase a été évalué dans le tampon citrate 50 mM (pH 5), additionné de la fraction S1 et de NaCl aux concentrations 0, 2, 4, 6 et 8 % (m/v). La mesure a été effectuée à une température de 50°C en utilisant le p-NPG (5 mM) comme substrat. L'activité de la β-glucosidase a été mesurée comme indiqué ci-dessus. Tous les essais ont été réalisés 3 fois.

2.4.3. Effet de la température

L'effet de la température sur l'activité de la β-glucosidase a été mesuré sur la fraction S1 des souches étudiées, dans le tampon citrate (50 mM, pH 5), à des températures de 6, 15, 25, 35, 45 et 50°C, en utilisant le p-NPG (5 mM) comme substrat. L'activité de la β-glucosidase a été mesurée comme indiqué ci-dessus (paragraphe 4.). Toutes les expériences ont été répétées trois fois.

2.5. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été exécutées sur le logiciel R. L'ANOVA à un facteur et la signification statistique a été déterminée à la valeur de p de 0,05.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Détection de la β-glucosidase

3.1.1. Milieu à base de l'esculine

L'hydrolyse de l'esculine a été déterminée par l'observation d'une coloration brune-noire, suite à la réaction des ions Fe3+ avec l'esculétine, qui est le produit d'hydrolyse de l'esculine (Edberg et al., 1976). Les deux souches étudiées ont hydrolysé l'esculine en formant le précipité noir, indiqué dans la figure 1A. Ce résultat est confirmé par la production de la même couleur dans le cas du témoin positif (enzyme commerciale : β-glucosidase), et son absence dans le cas du témoin négatif (eau distillée). Ainsi, il est fort probable que les souches de *L. plantarum* FSO1 et de *C. pelliculosa* L18 produisent de la β-glucosidase.

3.1.2. Milieu à base de X-glu

Les souches étudiées ont montré la production d'une couleur bleue au tour des colonies, indiquant leur activité β-glucosidase positive (Figure 1B). Toutefois, la vitesse d'apparition de la couleur bleue et son intensité varient d'une souche à l'autre. *C. pelliculosa* L18 a montré un retard dans l'apparition de la couleur bleue par rapport à la souche de *L. plantarum* FSO1, qui a développé cette couleur

après 24 heures d'incubation. Cette différence entre les souches microbiennes a été observée par Mathara et al. (2004).

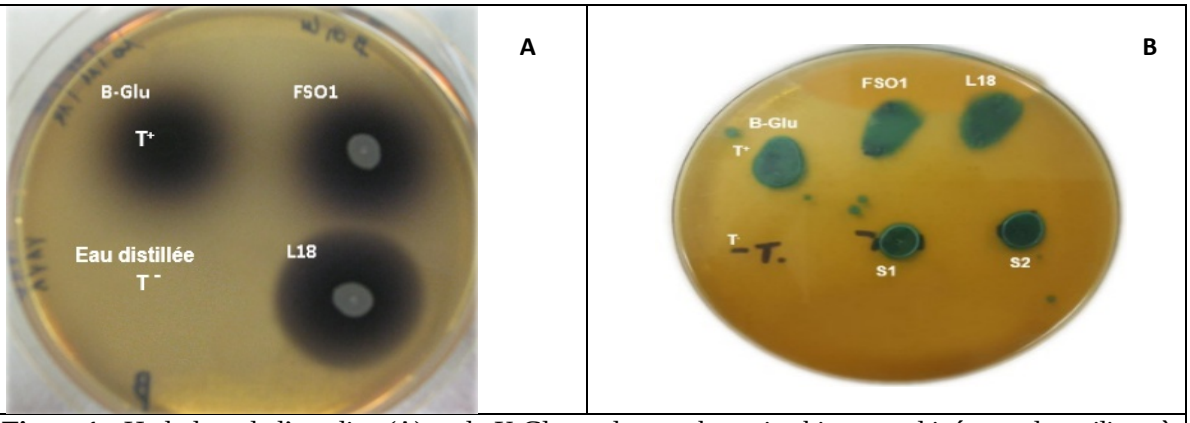


Figure 1 : Hydrolyse de l'esculine (A) et du X-Glu par les souches microbiennes cultivées sur les milieux à base d'esculine (A) et du X-Glu (B). (Légende, FSO1: *L. plantarum*, L18: *C. pelliculosa*, T+ : enzyme commerciale (β-glucosidase EC 3.2.1.21), T-: eau distillée ; S1 et S2 : *L. pentosus* et *L. plantarum* souches connues β-glucosidase positives (Ghabbour et al., 2011)).

3.2. Mesure et localisation de l'activité de la β-glucosidase

Les résultats de l'induction et de la localisation de l'activité β-glucosidase obtenus pour les souches étudiées sont indiqués dans la figure 2. En présence de l'oleuropéine, comme seule source de carbone (MRSm), l'activité β-glucosidase est plus élevée et varie entre 0,71 U/ml et 1,32 U/ml pour toutes les souches étudiées. Alors qu'en absence de l'oleuropéine, une très faible activité a été détectée. Ce résultat indique bien que la production de la β-glucosidase par les souches est extracellulaire, et elle est induite par l'oleuropéine (1%). Les valeurs maximales d'activité obtenues sont de l'ordre de 1,32 U/ml pour *C. pelliculosa* L18 et 0,71 U/ml pour *L. plantarum* FSO1 (Figure 3). Tandis que dans la paroi cellulaire (fraction P) et la fraction intracellulaire (fraction S2), l'activité enzymatique est très faible, en comparaison à la fraction extracellulaire. Ce résultat est en accord avec celui trouvé par Sestelo et al. (2004).

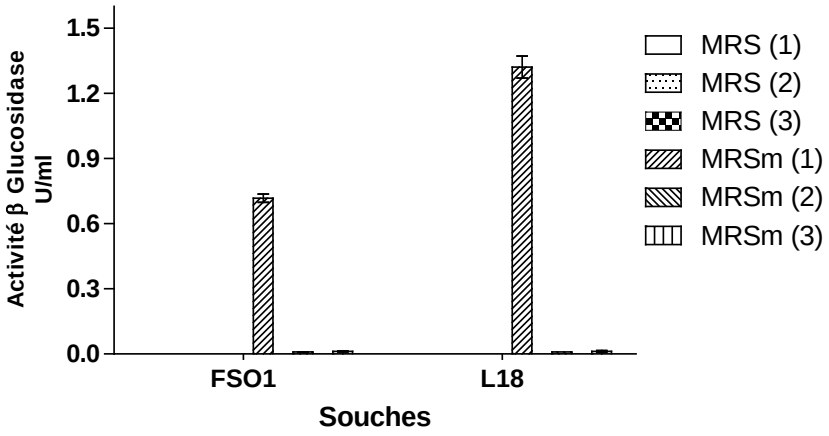


Figure 2 : Activité β-glucosidase obtenue pour *L. plantarum* FSO1 et *C. pelliculosa* L18 dans le milieu MRS et MRS modifiée (MRSm) contenant l'oleuropéine (1%) comme seule source de carbone. (Légende, Activité enzymatique des fractions (1) : extracellulaire ; (2) : intracellulaire et (3) : suspension pariétale).

3.3. Conditions de production de la β-glucosidase

3.3.1. Suivi au cours du temps d'incubation

Les souches étudiées et leur combinaison ont montré une augmentation de leur activité β-glucosidase (β-G) pendant les 6 premiers jours de culture et diminue ensuite (Figure 3A). Les maximas d'activité obtenus sont 0,80 et 1,47 U/ml, respectivement pour *L. plantarum* FSO1 et *C. pelliculosa* L18. La souche de levure présente une activité β-G presque deux fois supérieure à celle de *L. plantarum* FSO1. La combinaison des deux souches FSO1/L18 a montré une valeur maximale d'activité β-G de 0,96 U/ml. Cette activité β-G est significativement inférieure ($p<0,05$) à celle obtenue avec la levure L18 seule, mais significativement supérieure ($p<0,05$) à celle de *L. plantarum* FSO1.

D'autre part, la biomasse de *L. plantarum* et de *C. pelliculosa* en culture mixte est supérieure à celle obtenue avec les cultures pures des deux souches (Figure 3B). Ainsi, on peut conclure, qu'il y a une certaine synergie de croissance entre les deux souches. La stimulation de la croissance des bactéries lactiques par la levures a été démontrée dans la littérature (Leroi and Pidoux, 1993).

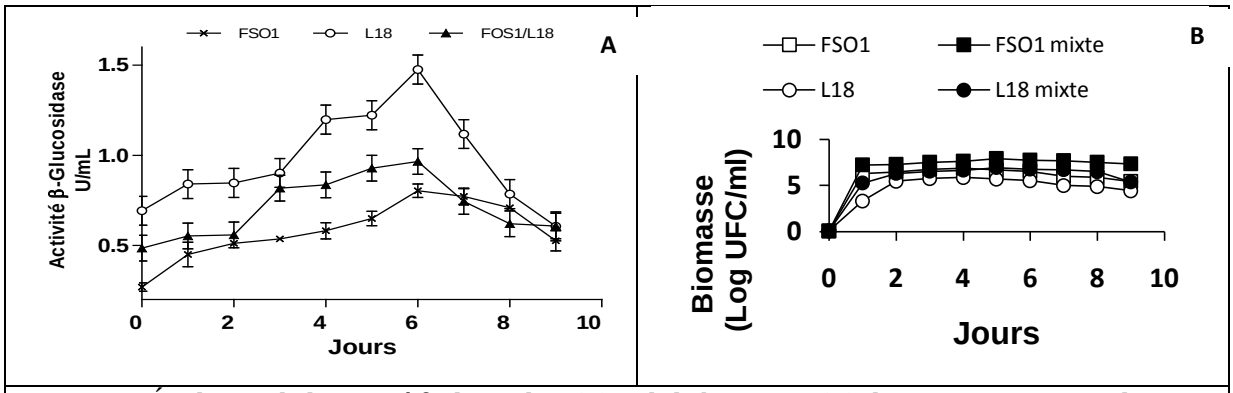


Figure 3 : Évolution de l'activité β-glucosidase (A) et de la biomasse (B) de FSO1 et L18 en cultures pures et mixte (FSO1/L18) pendant 9 jours de cultures à 30°C dans le milieu MRS modifié. (Légende, FSO1 : *L. plantarum*, L18 : *C. pelliculosa*)

3.3.2. Effet du pH

Les résultats obtenus de l'activité β-G des souches étudiées en présence de l'oleuropéine comme seule source de carbone à différents pH initiaux sont indiqués dans la figure 4A. *L. plantarum* FSO1 a montré une valeur (0,91 U/ml) significativement élevée ($p <0,05$) à pH5 par rapport aux valeurs obtenues aux autres pH. Alors que pour L18, l'activité β-G est de 0,91 à pH 6, et ne présente aucune différence significative avec les valeurs obtenues aux pH 4 et 5. La combinaison FSO1/L18 a montré des activités β-G plus faibles que celles obtenues avec les cultures pures, et les valeurs obtenues sont de l'ordre de 0,61 et 0,64 U/ml, respectivement à pH 5 et 6. Ainsi l'activité enzymatique optimale a été obtenue au pH 5 pour *L. plantarum* FSO1 et pH 6 pour *C. pelliculosa* L18. Ces valeurs de pH optimal son comparables à celles obtenues par d'autres auteurs (Saha and Bothast, 1996, Pandey and Mishra, 1997).

3.3.3. Effet du NaCl

L'effet du NaCl sur la production de l'activité β-glucosidase (β-G) par les souches étudiées est indiqué dans la figure 4B. L'activité β-G maximale a été obtenue en absence de NaCl (0 %), avec des valeurs de l'ordre de 0,76, 1,02 et 0,72 U/ml, respectivement pour *L. plantarum* FSO1, *C. pelliculosa* L18 et leur combinaison FSO1/L18. La production de la β-glucosidase diminue significativement ($p<0,05$), pour toutes les souches étudiées et leurs combinaisons, lorsque la concentration en NaCl augmente de 0 à 10%. Ce résultat est en accord avec celui trouvé par Gouripur and Kaliwal (2017).

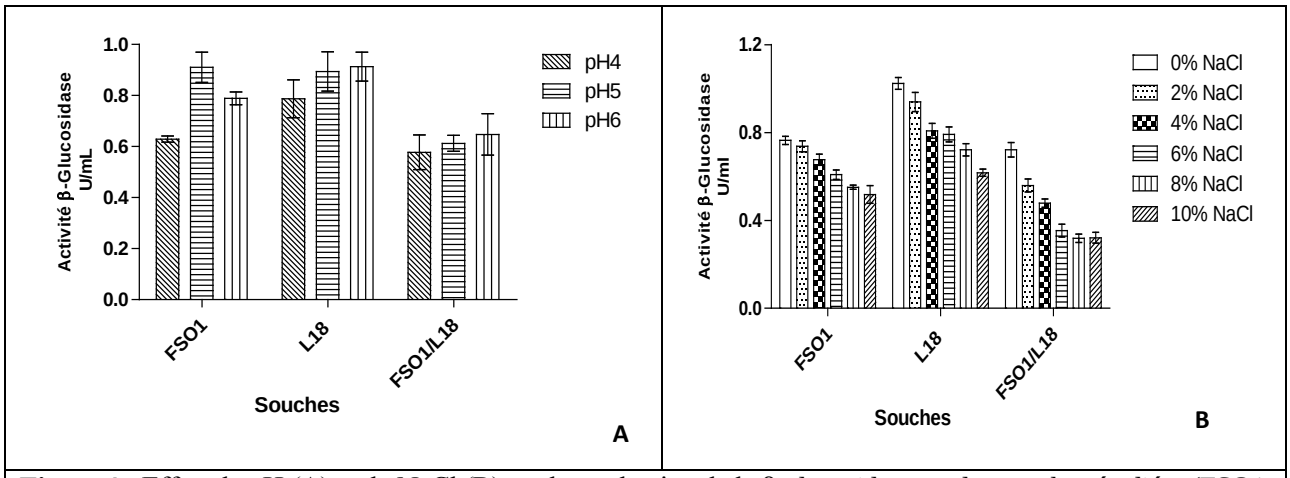


Figure 4 : Effets du pH (A) et du NaCl (B) sur la production de la β-glucosidase par les souches étudiées (FSO1, L18 et FSO1/L18) après 7 jours de culture à 30°C dans le bouillon MRS modifié. (Légende, FSO1 : *L. plantarum*, L18 : *C. pelliculosa*).

3.4. Conditions d'activité de la β-glucosidase

3.4.1. Effet du pH

Les résultats de l'effet du pH sur l'activité de la β-glucosidase, des souches étudiées, sont présentés dans la figure 5A. Les valeurs d'activité enzymatique maximales ont été enregistrées à pH 5 pour *L. plantarum* FSO1 (0,79 U/ml) et *C. pelliculosa* L18 (1 U/ml) et leur combinaison (0,88 U/ml). L'activité enzymatique a augmenté significativement ($p<0,05$) avec l'augmentation du pH de 4 à 5. Ainsi, le maximum d'activité enzymatique est enregistré pour *L. plantarum* à pH 5-6 ; alors que pour la levure il est de l'ordre de pH5. La combinaison des deux souches a montré une activité enzymatique plus faible que celle observées chez la levure pure, mais plus grande que celle de *L. plantarum* pure. En culture mixte, il apparait que l'activité enzymatique de la levure domine celle de la bactérie lactique.

3.4.2. Effet du NaCl

Les résultats de l'effet du NaCl sur l'activité de la β-glucosidase sont indiqués dans la figure 5B. L'activité maximale de la β-glucosidase a été obtenue à 8% (m/v) de NaCl, avec des valeurs de l'ordre de 0,75 U/ml pour *L. plantarum* FSO1, 1,04 U/ml pour *C. pelliculosa* L18, et 0,73 U/ml pour leur combinaison. L'activité β-glucosidase des souches étudiées à l'état pur ou combiné augmente significativement ($p<0,05$) avec l'augmentation de la concentration de NaCl de 0% à 8%. La valeur maximale de l'activité enzymatique a été enregistrée à 8 % pour les souches étudiées et leur combinaison. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par Restuccia et al. (2011).

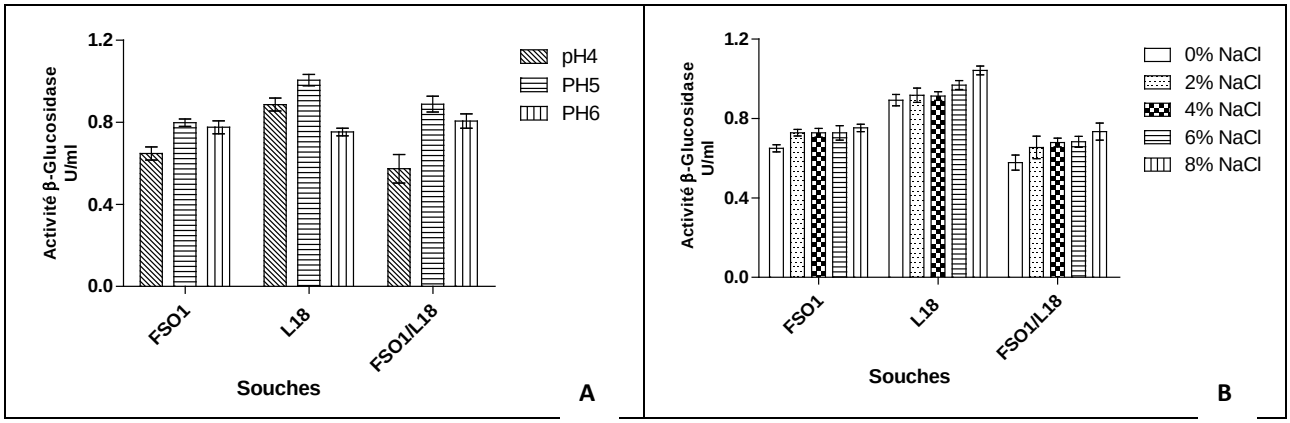


Figure 5 : Effet du pH (A) et du NaCl (B) sur l'activité de la β-glucosidase obtenue après 7 jours de culture des souches étudiées (FSO1, L18 et FSO1/L18) à 30 C dans le bouillon MRS modifié. (Légende, FSO1 : *L. plantarum*, L18 : *C. pelliculosa*)

3.4.3. Effet de la Température

L'influence de la température sur l'activité de la β-glucosidase a été étudiée avec le tampon citrate 50 mM (pH 4,8). Les résultats obtenus sont indiqués dans la figure 6. L'activité β-G augmente significativement ($p<0,05$) lorsque la valeur de la température augmente de 6°C à 35°C. L'activité enzymatique maximale a été enregistrée à 45°C pour *L. plantarum* FSO1 (1,46 U/ml) et à 35°C pour *C. pelliculosa* L18 (1,47 U/ml) ainsi que leur combinaison (1,17 U/ml). L'activité enzymatique a considérablement diminué lorsque la température a dépassé 45°C. Ce résultats est accord avec ceux de Restuccia et al. (2011).

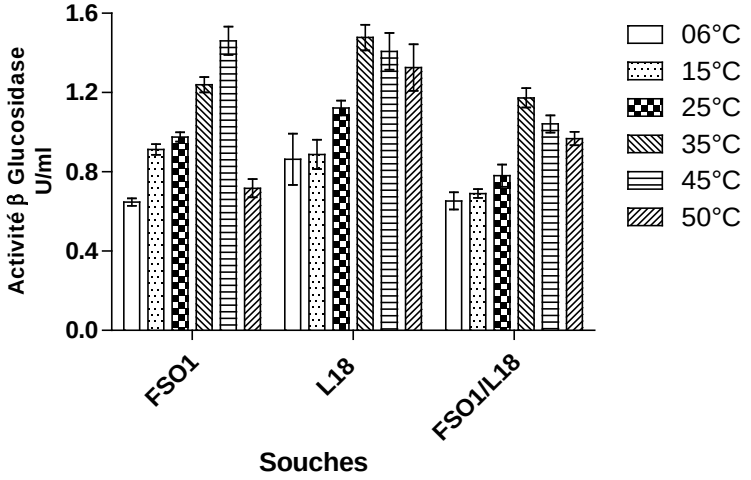


Figure 6 : Effet de la température sur l'activité de la β-glucosidase obtenue après 7 jours de culture des souches étudiées (FSO1, L18 et FSO1/L18) à 30°C dans le bouillon MRS modifié. (Légende, FSO1 : *L. plantarum*, L18 : *C. pelliculosa*)

4. CONCLUSION

Les conditions de production et d'activité de la β-glucosidase, des souches *L. plantarum* FSO1, *Candida pelliculosa* L18 et leur combinaison, ont été étudiées sur le milieu MRS contenant l'oleuropéine comme seule source de carbone. Les techniques utilisées, basées sur la culture sur les milieux à base d'esculine et de X-glu en plus de l'enzyme commerciale comme témoin, ont confirmé la capacité des souches étudiées à produire la β-glucosidase. Cette enzyme est produite en milieu extracellulaire, et elle est induite par le substrat (oleuropeine). La production de la β-glucosidase est maximale aux pH 5 et 6, respectivement pour *L. plantarum* et *C. pelliculosa*. La levure a montré une capacité de production de l'enzyme plus importante que celle de *L. plantarum* ; alors que leur combinaison a montré une production intermédiaire entre celles obtenues pour les deux souches à l'état pur. L'augmentation de la concentration en NaCl (0% à 10%) inhibe la production de l'enzyme pour toutes les souches. Cependant, l'activité enzymatique est améliorée par cette augmentation de concentration en NaCl, avec une activité maximale obtenue à 8% de NaCl (m/v). Les conditions optimales d'activité de la β-glucosidase sont pH5 pour les deux souches étudiées, et des températures de 45°C pour *L. plantarum* et 35°C pour *C. pelliculosa*.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé par le Ministère de l'enseignement Supérieur du Maroc sous contrats CNRST-PPR/19/2015 et 17TM06.

REFERENCES

- Brenes, M. & de Castro, A. 1998. Transformation of oleuropein and its hydrolysis products during Spanish-style green olive processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* 77, 353-358.
- Ciafardini, G., Marsilio, V., Lanza, B. & Pozzi, N. 1994. Hydrolysis of oleuropein by *Lactobacillus plantarum* strains associated with olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology,* 60, 4142-4147.
- Devoyod, J. & Poullain, F. 1988. The *Leuconostocs.* Characteristics, their role in dairy technology. *Lait (France),* 68, 249 - 279.
- Edberg, S. C., Gam, K., Bottenbley, C. J. & Singer, J. M. 1976. Rapid spot test for the determination of esculin hydrolysis. *Journal of Clinical Microbiology,* 4, 180-184.
- Ghabbour, N., Lamzira, Z., Thonart, P., Cidalia, P., Markaoui, M. & Asehraou, A. 2011. Selection of oleuropein-degrading lactic acid bacteria strains isolated from fermenting Moroccan green olives. *Grasas y Aceites,* 62, 84-89.
- Gouripur, G. & Kaliwal, B. 2017. Screening and optimization of β -glucosidase producing newly isolated *Lactobacillus plantarum* strain LSP-24 from colostrum milk. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology,* 11, 89-96.
- Leah, R., Kigel, J., Svendsen, I. & Mundy, J. 1995. Biochemical and molecular characterization of a barley seed beta-glucosidase. *The Journal of biological chemistry,* 270, 15789-97.
- Leroi, F. & Pidoux, M. 1993. Characterization of interactions between Lactobacillus hilgardii and Saccharomyces florentinus isolated from sugary kefir grains. *Journal of Applied Bacteriology,* 74, 54-60.
- Limiroli, R., Consonni, R., Ottolina, G., Marsilio, V., Bianchi, G. & Zetta, L. 1995. 1 H and 13 C NMR characterization of new oleuropein aglycones. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1,* 1519-1523.
- Mathara, J. M., Schillinger, U., Kutima, P. M., Mbugua, S. K. & Holzapfel, W. H. 2004. Isolation, identification and characterisation of the dominant microorganisms of kule naoto: the Maasai traditional fermented milk in Kenya. *International journal of food microbiology,* 94, 269-78.
- Michlmayr, H., Schumann, C., da Silva, N. M., Kulbe, K. D. & del Hierro, A. M. 2010. Isolation and basic characterization of a beta-glucosidase from a strain of *Lactobacillus brevis* isolated from a malolactic starter culture. *Journal of Applied Microbiology,* 108, 550-9.
- Norkrans, B. 1950. Influence of cellulolytic enzymes from Hymenomycetes on cellulose preparations of different crystallinity. *Physiologia Plantarum,* 3, 75-87.
- Pandey, M. & Mishra, S. 1997. Expression and characterization of Pichia etchellsii β-glucosidase in Escherichia coli. *Gene,* 190, 45-51.
- Ramírez, E., Medina, E., García, P., Brenes, M. & Romero, C. 2017. Optimization of the natural debittering of table olives. *LWT - Food Science and Technology,* 77, 308-313.
- Restuccia, C., Muccilli, S., Palmeri, R., Randazzo, C. L., Caggia, C. & Spagna, G. 2011. An alkaline β-glucosidase isolated from an olive brine strain of Wickerhamomyces anomalus. *FEMS Yeast Research,* 11, 487-493.
- Rodriguez-Gomez, F., Romero-Gil, V., Bautista-Gallego, J., Garrido-Fernandez, A. & Arroyo-Lopez, F. N. 2012. Multivariate analysis to discriminate yeast strains with technological applications in table olive processing. *World Journal of Microbiology and Biotechnology,* 28, 1761-70.
- Rokni, Y. 2017. *Contribution à l'étude de la biodégradation de l'oleuropéine par des souches de bactéries lactiques et de levures isolées des olives vertes en fermentation naturelle.* Doctorat en Sciences, Université Mohammed Premier, Faculté des Sciences - Oujda.

- Saha, B. C. & Bothast, R. J. 1996. Production, purification, and characterization of a highly glucose-tolerant novel beta-glucosidase from *Candida peltata*. *Applied and environmental microbiology,* 62, 3165-3170.
- Sarry, J.-E. 2001. *Etude biochimique & moléculaire de β-D-Glucoside hydrolases de la baie de raisin (Vitis vinifera L.).* Thèse de doctorat : Biochimie et biologie moléculaire, Université des sciences et techniques de Montpellier 2.
- Segovia-Bravo, K. A., Jarén-Galán, M., García-García, P. & Garrido-Fernández, A. 2009. Browning reactions in olives: Mechanism and polyphenols involved. *Food Chemistry,* 114, 1380-1385.
- Sestelo, A. B. F., Poza, M. & Villa, T. G. 2004. β-Glucosidase Activity in a *Lactobacillus Plantarum* Wine Strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology,* 20, 633.
- Soler-Rivas, C., García-Rosado, A., Polonia, I., Junca-Blanch, G., Marín, F. R. & Wichers, H. J. 2006. Microbiological effects of olive mill waste addition to substrates for Pleurotus pulmonarius cultivation. *International Biodeterioration & Biodegradation,* 57, 37-44.
- Verdoucq, L., Czjzek, M., Moriniere, J., Bevan, D. R. & Esen, A. 2003. Mutational and structural analysis of aglycone specificity in maize and sorghum β-glucosidases. *Journal of Biological Chemistry,* 278, 25055-25062.

Etude de l'effet de l'extrait du bourgeon terminal des gourmands du dattier (*Phoenix dactylifera*. L) sur le développement de ses cals embryogènes

Othmani Ahmed[1*], Gemni Monia[1], Touati Marwa[2], Sellemi Amel[1], Touati Rabaa[1], Bedoui Khouloud[1]
[1]Centre Régional des Recherches en Agriculture Oasienne, Degache Tozeur, Tunisie
[2]Faculté des sciences Gabès, Gabès, Tunisie
*Email: degletbey@yahoo.fr

RESUME
Le présent travail vise à tester l'effet de l'addition au milieu de culture de type MS (Murashige et Skoog, 1962) du filtrat du bourgeon terminal d'un gourmand de la variété d'élite de palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), 'Deglet nour' sur la capacité de régénération par culture *in vitro* de 4 autres variétés d'élites, à savoir Berhi, Boufeggous, Tekermest et Deglet nour. Dans une première étape, nous avons arrivé à réduire la nécrose de ce filtrat par l'addition de l'acide citrique (300 mg/l), l'acide ascorbique (300 mg/l) et la silice (1g/l). L'emploi de tel filtrat à des volumes de 10, 20 et 50 ml/l de milieu de culture, nous a permis de constater que 1) chaque variété testée répond de façon spécifique au volume du filtrat ajouté au milieu de culture, 2) parmi les 4 variétés testées, le filtrat parait efficace à induire une croissance des cals embryogènes des variétés Tekermest et Berhi seulement, 3) la croissance optimale des cal embryogène des 4 variétés testées a été enregistrée chez la variété Tekermest sur le milieu MS additionné de 10 ml du filtrat. De même, sur ce même milieu, nous avons enregistré une différenciation optimale des cals embryogènes en embryons somatiques, 4) le filtrat testé a montré un effet inhibiteur de croissance chez les variétés Boufeggous et Deglet nour par rapport au milieu témoin et 5) parmi les cals embryogènes testés en termes de capacité de différenciation en embryons somatiques, seul celui de la variété Deglet nour parait incapable de donner des embryons somatiques.
Mots-clés : Cals embryogènes, culture *in vitro*, embryons somatiques, filtrat du bourgeon terminal, palmier dattier.

SAMMARY
The present work aims to test the effect of addition to the MS culture medium (Murashige and Skoog, 1962) of apical meristem filtrate of high offshoots of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.), variety 'Deglet nour' on the capacity of in vitro regeneration of 4 other elite varieties, namely Berhi, Boufeggous, Tekermest and Deglet nour. In a first step, we succeed to reduce the necrosis of the filtrate by addition of citric acid (300 mg/l), ascorbic acid (300 mg/l) and silica (1 g/l). The use of such filtrate at volumes of 10, 20 and 50 ml/l of culture medium, allowed us to note that 1) each tested variety specifically responded to the volume of the filtrate added to the culture medium, 2) Among the 4 varieties tested, the filtrate seems effective in inducing a growth of embryogenic callus of varieties Tekermest and Berhi only, 3) the optimum growth of embryogenic callus of the 4 varieties tested was recorded in the Tekermest variety on MS medium supplemented with 10 ml of the filtrate. Similarly, on this same medium, we recorded an optimal differentiation of embryogenic callus to somatic embryos 4) the filtrate tested showed a growth inhibiting effect in the Boufeggous and Deglet nour varieties compared to the control medium and 5) among embryogenic calli tested in terms of differentiation capacity in somatic embryos only that of the variety Deglet nour seems unable to give somatic embryos.
Key words: Embryogenic calli, in vitro culture, somatic embryos, terminal bud filtrate, date palm.

1. INTRODUCTION

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera*. L.) est une monocotylédone (2n = 36) cultivé essentiellement en Afrique du Nord et au Proche Orient où il constitue l'élément clé de l'écosystème oasien et joue un rôle socioéconomique et écologique considérables. Etablies depuis

des siècles, les oasis tunisiennes ont joué et continuent à jouer un rôle capital dans la lutte contre la désertification, le maintien de l'équilibre écologique et la diversité biologique. En effet, le palmier dattier représente un front réel contre la désertification et forme un abri pour de nombreuses espèces végétales et animales autochtones, ce qui constitue alors un agro-écosystème diversifié et durable dans un milieu désertique aride caractérisé par la vulnérabilité écologique, la précarité climatique et la rareté des ressources naturelles.

Toutefois, avec l'évolution économique et sociale, les oasis se sont réorganisées pour satisfaire une demande croissante en dattes de bonne qualité à l'instar de la variété d'élite Deglet Nour. Cette réorganisation a conduit la phœniciculture d'un système de culture traditionnelle riche et diversifiée à un système industriel axé sur une oligoculture monovariétale, ce qui constitue un risque potentiel d'érosion génétique du patrimoine phœnicicole local. Cette situation alarmante est aggravée par les diverses contraintes biotiques (maladie du 'Bayoud', syndrome des feuilles cassantes, la pyrale des dattes etc.) et abiotiques (sécheresse, changements des systèmes agraires, urbanisation intensive, changement climatique, salinisation des sols, etc.) auxquelles sont soumises les oasis. Ainsi, la préservation du patrimoine local du dattier est devenue l'un des impératifs des différents partenaires impliqués dans ce secteur agronomique.

Pour parvenir à répondre à cet objectif, les phoeniciculteurs ont recours à intensifier la multiplication végétative de cette espèce qui se fait soit par des semis soit par des rejets. Néanmoins, vu sa dioïcie, la première méthode de multiplication qualifiée de sexuée est infidèle étant donné qu'elle engendre des plantations très hétérogènes composées théoriquement d'une moitié de palmiers mâles et d'une moitié de palmiers femelles qui demeurent indiscernables jusqu'à leur floraison (Carpenter et Ream, 1976).

Par ailleurs, en assurant la conservation des caractéristiques de la plante mère, la multiplication par rejets est le seul moyen de multiplication végétative traditionnelle conforme du palmier dattier. Cependant, cette méthode traditionnelle de propagation présente également des inconvénients tels que la diffusion des maladies et surtout sa lenteur dans le temps et dans l'espace.

Cette situation de la phoeniciculture tunisienne impose avec une grande vigilance, la mise en œuvre des techniques de culture *in vitro* afin de contribuer efficacement à la multiplication rapide et la conservation des variétés et des cultivars rares et de bonne qualité dattière.

Dans la littérature, il est connu que le rapport hormonal (auxine/cytokinine) semble être l'un des plus importants facteurs à maitriser pour réussir la régénération par culture *in vitro* des plantes vu que ces phytohormones jouent un rôle primordial dans la régulation de la prolifération et la différenciation cellulaire végétale (Mazinga et al, 2012). Mais, sachant que les phytohormones synthétiques utilisées lors de différentes phases de régénération par culture *in vitro* sont très chères et présentent une forte potentialité de création des variations somaclonales allant jusqu'à des aberrations chromosomiques (Larkin et Scowcroft, 1981 ; Kaeppler *et al*., 2000), surtout lorsqu'elles sont employées avec de fortes doses, il est indispensable de chercher d'autres alternatives pour garantir la stabilité génétique des vitroplants produits et réduire le coût de ce processus de régénération.

À ce sujet, il est connu que tous les végétaux produisent des phytohormones endogènes surtout au niveau des zones méristématiques mais avec des teneurs très faibles (Berthon et al, 1989). Chez le dattier, il existe deux types de ramifications qui présentent des méristèmes apicaux, une basale qui donne naissance à des rejets et une au niveau du stipe qualifiée de gourmand incapable de former des racines vu son éloignement du sol et de ce fait elle épuise inutilement la plante.

Le présent travail a été conduit en vue de tester l'effet de l'extrait du bourgeon terminal d'un gourmand de dattier variété Deglet nour présumé inclure des phytohormones endogènes sur l'évolution des cals embryogènes de 4 variétés du dattier, à savoir Berhi, Boufeggous, Tekermist et Deglet nour.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans ce travail est constitué de l'extrait du bourgeon terminal d'un gourmand de palmier dattier, variété Deglet Nour ainsi que des cals embryogènes des variétés d'élites *à savoir* Berhi, Boufeggous, Tekermist et Deglet nour. *Ces cals embryogènes sont issus des explants foliaires des dites variétés après 8 mois de culture sur le milieu MS additionné de 0,5 mg/l de 2,4-D.*

2.2. Méthodes

2.2.1. Préparation de l'extrait du bourgeon terminal d'un gourmand de dattier

En mois de Mars, un gourmand d'un dattier variété Deglet nour situé à l'oasis d'Elmahassen à 14 Km de Tozeur a été prélevé puis transféré au laboratoire. Ensuite, les feuilles sont éliminées une à une jusqu'à atteindre le bourgeon terminal caractérisé par sa couleur blanche. Après l'isolement du bourgeon du reste du gourmand, le tissu tendre est fragmenté à l'aide d'un coteau en petits morceaux. Ceux-ci seront dilués dans le même volume d'eau puis broyés dans un broyeur électrique de cuisine. Le broyat ainsi obtenu est filtré par passage à travers une bande de gaz. Le filtrat recueilli est stocké au congélateur à -20 °C pour être utilisé lors de préparation des milieux de culture.

2.2.2. Lutte contre la nécrose du filtrat

Pour lutter contre l'oxydation du filtrat du bourgeon terminal, nous avons testé plusieurs antioxydants tels que l'acide acétique (300 mg/l), l'acide ascorbique (300 mg/l) et la silice (1g/l) associés ou non (Tableau 1).

2.2.3. Détermination de la couleur du filtrat

La détermination des coordonnées chromatiques des aliquotes de filtrat auxquels sont ajoutés les antioxydants en question (Tableau 1) a été effectué à l'aide d'un chroma mètre (Minolta, CR - 300).
Pour la présentation de la nature tridimensionnelle de la couleur dans le système fondamental de solide des couleurs de JUDD_HUNTER, on a adopté les coordonnées chromatiques conventionnelles L, a et b.

- ✓ L : est une mesure de la luminosité dans une plage allant du noir (0) au blanc (100)
- ✓ a : indique la différence entre les tons rouge et vert.
- ✓ b : décrit la différence entre les tons bleu et jaune.

L'expression de ces coordonnées se fait sur un cercle contenant les trois axes L, a et b appelé cercle de Mansell et comportant toute une gamme de couleur. La couleur a également été exprimée en :

- ✓ Angle de teinte : **Hue°ATAN =** tg (b/a)*180/π
- ✓ Chrominance : **Chroma =** $\sqrt{(a^2 + b^2)}$.

2.2.4. Les conditions de culture

Le milieu de culture employé dans cette étude est celui de Murashige et Skoog (1962) dépourvu de phytohormones et inoculé de 0,5 g des cals embryogènes des variétés étudiées. A ce milieu on ajoute le filtrat du bourgeon terminal du gourmand du dattier avec les volumes de 10, 20 et 50 ml/l. Toutes les cultures sont maintenues dans une chambre de culture avec une photopériode de 16/8 h et où la température est de 27±2 °C. Le repiquage des cultures ainsi que le suivi de l'évolution de leurs biomasses sont effectués après 30 et 60 jours de culture. L'état de différenciation des cals embryogènes est évalué après 60 jours de culture.

2.2.5. Les analyses statistiques

Les données ont été analysées en utilisant la procédure ANOVA/MANOVA du logiciel d'analyse statistique (STATISTICA). Ces analyses englobent des analyses de la variance et la comparaison des moyennes par le test PPDS (Plus Petite Différence Significative) ou LSD (Little Significant Difference).

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. La lutte contre l'oxydation des filtrats du bourgeon terminal

Après la préparation de l'extrait végétal, nous avons remarqué que sa couleur devient rapidement très sombre (virage rapide de la couleur blanche à la couleur brune rougeâtre), reflétant le déroulement d'une intense réaction d'oxydation. L'adjonction des antioxydants (acide acétique**,** acide ascorbique et la silice associés), nous a permis de lutter efficacement contre ce phénomène. Le meilleur résultat obtenu (la valeur de « L » est maximale : 37.68 $\mu Em^{-2}s^{-1}$ d'après Figure 1 et Tableau 1) a été enregistré après addition au filtrat de l'acide citrique (300 mg), acide ascorbique (300 mg) et la silice (1 g). L'effet bénéfique de l'acide ascorbique et l'acide acétique dans l'atténuation du brunissement des tissus de dattier a été précédemment décrit par Zaid & Tisserat (1983a; 1983b). Selon Zaid (1987) et El Hadrami (1995), le brunissement des tissus du dattier pourrait être dû à l'oxydation des composés polyphénoliques et à la formation des quinones qui sont toxiques aux cultures. Ces résultats concordent avec ceux rapportés par Standardi & Romani, (1990) sur le pommier et par Bellarosa (1988) sur *Quercus sp*.

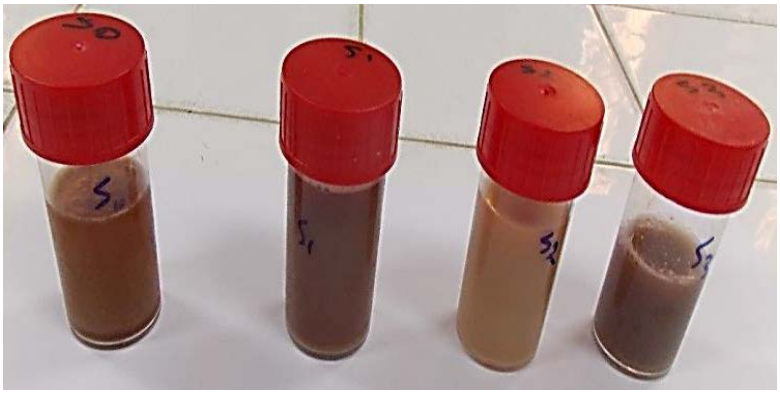


Figure 1 : Effets de l'emploi des antioxydants sur la coloration du filtrat du bourgeon terminal du gourmand du dattier, variété Deglet nour dilué 2x par l'eau. S0 : filtrat, S1 : filtrat + acide citrique (300 mg) + acide ascorbique (300 mg), S2 : filtrat + silice (1 g) + acide citrique (300 mg) + acide ascorbique (300 mg) et S3 : filtrat + silice (1 g).

Tableau 1 : Effets de l'emploi des antioxydants sur l'intensité lumineuse du filtrat du bourgeon terminal du gourmand du dattier, variété Deglet nour dilué 2x par l'ea.

La solution	Composition	Intensité lumineuse
S0 (témoin)	filtrat seul	L = (30.06 $\mu Em^{-2}s^{-1}$) a = (-0.16), b = 7.18
S1	filtrat + acide citrique + acide ascorbique (300-300 mg)	L = (36.24 $\mu Em^{-2}s^{-1}$) a = (-0.36), b = (1.84)
S2	filtrat + acide citrique (300 mg) + acide ascorbique (300 mg) + silice (1 g)	L = (37.68 $\mu Em^{-2}s^{-1}$), a = 0, b = (- 0.53)
S3	filtrat + silice (1 g)	L = (34.04 $\mu Em^{-2}s^{-1}$) a = (0.70), b = (3.97)

3.2. Effet du filtrat du bourgeon terminal du dattier sur le développement des cals embryogènes des variétés étudiées

3.2.1. La variété Berhi

3.2.1.1. Evolution de la biomasse du cal embryogène

Le suivi de l'évolution du poids des cals embryogènes de la variété Berhi en fonction du volume de filtrat employé nous a permis d'obtenir la figure 2 dont l'analyse montre qu'a l'exception des cals

transférés sur le milieu témoin (BA0) tous les autres cals ont montré une croissance continue. La croissance discontinue des cals embryogènes sur le milieu témoin est probablement due à l'effet d'un inhibiteur de croissance qui s'active après au moins 1 mois de culture. Après 2 mois de culture, la croissance optimale des cals a été enregistrée sur le milieu BA50 (7,34 g) et elle est suivie respectivement de celles enregistrées sur les milieux BA20, BA0 et BA10. Ce résultat plaide alors en faveur d'un effet stimulant du filtrat de bourgeon terminal du gourmand sur la multiplication des cellules qui constituent le cal embryogène lorsque son volume est supérieur ou égale à 20 ml. Par conséquent, il s'avère utile de tester l'effet des volumes supérieurs à 50 ml.

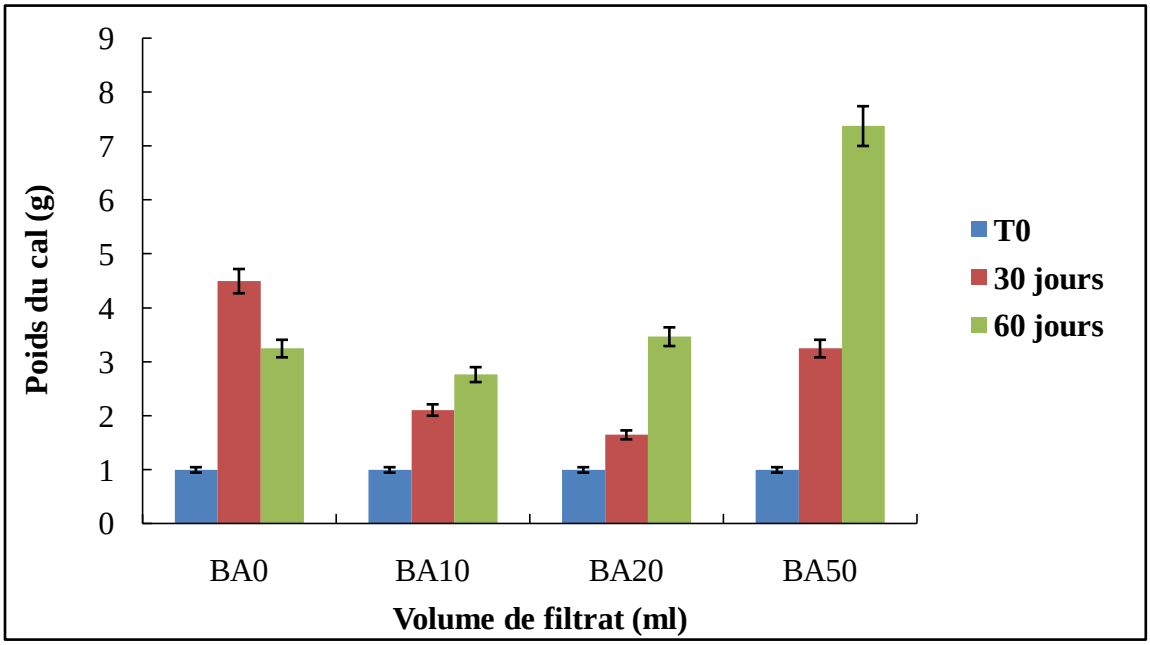


Figure 2: Evolution du poids des cals embryogènes de la variété Berhi en fonction du volume de filtrat du bourgeon terminal du gourmand de dattier, variété Deglet nour ajouté au milieu de culture. BA0, B10, BA20 et BA50 : milieux MS additionnés respectivement de 0, 10, 20 et 50 ml de filtrat.

3.2.1.2. La capacité de différenciation des embryons somatiques à partir du cal embryogène

Il s'avère que le processus *de différenciation du cal embryogène en embryons somatiques* se déclenche exclusivement sur les milieux additionnés du filtrat (Figure **3**) avec un taux maximal sur le milieu (F10) sur lequel nous avons remarqué un taux de multiplication minimale du cal embryogène. Ce résultat pourrait être expliqué par le fait que l'entrée du cal embryogène en phase de production des embryons somatiques lui fait perdre une masse de cellule aptes à la multiplication. En outre, chez la variété Berhi, le filtrat employé présente très vraisemblablement un effet stimulant sur la différenciation des embryons somatiques à partir du cal.

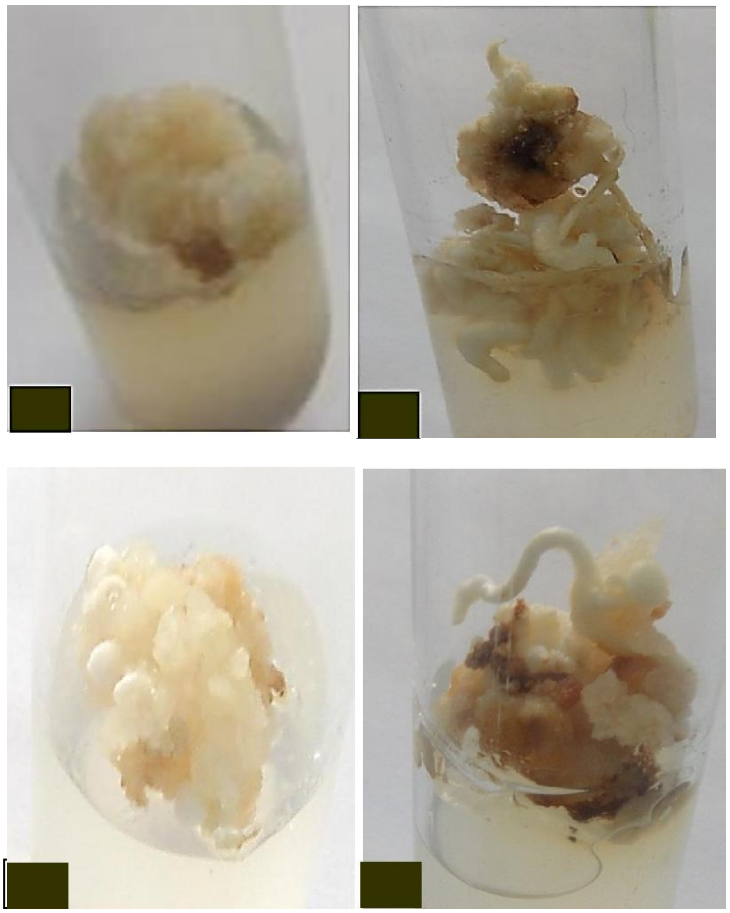


Figure 3 : Etat des cals embryogènes de la variété Berhi après 2 mois de culture sur les milieux BA0 (**a**), BA10 (**b**), BA20 (**c**) et BA50 (**d**).

3.2.2. La variété Boufeggous

3.2.2.1. Evolution de la biomasse du cal embryogène

L'analyse des résultats de la figure 4, nous montre que quel que soit le milieu de culture employé dépourvu ou additionné du filtrat du bourgeon terminal du gourmand, le poids du cal embryogène augmente de façon continue. Par opposition aux résultats obtenus avec la variété Berhi, le milieu témoin sans filtrat parait le plus efficace à induire la multiplication du cal embryogène de la variété Boufeggous (3,75 g). Ce résultat suppose (suggère) que le filtrat employé inhibe la multiplication des cellules qui constituent le cal embryogène de la variété étudiée et cet effet atteint son maximum quand le volume du filtrat est de 50 ml (1,94 g).

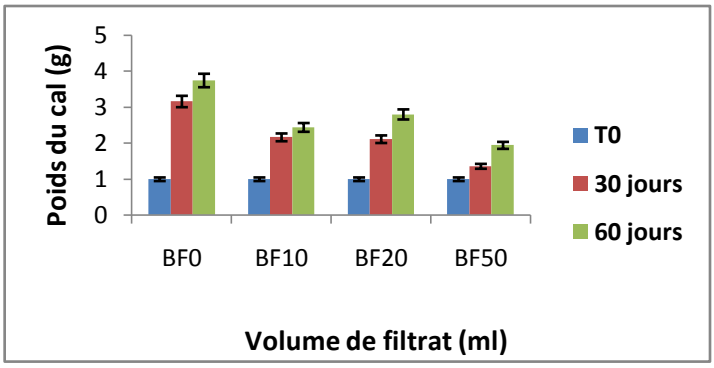


Figure 4: Evolution du poids des cals embryogènes de la variété Boufeggous en fonction du volume de filtrat du bourgeon terminal du gourmand de dattier, variété Deglet nour ajouté au milieu de culture. BF0, BF10, BF20 et BF50 : milieux MS additionnés respectivement de 0, 10, 20 et 50 ml de filtrat.

3.2.2.2. La capacité de différenciation des embryons somatiques à partir du cal embryogène

Chez cette variété, on s'est rendu compte que la capacité de différenciation des embryons somatiques à partir des cals embryogènes est presque nulle sur tous les milieux testés, sauf le cas du milieu BF10 où quelques embryons entament le processus de différenciation (Figure 5). Ce résultat suggère qu'à faible dose, le filtrat employé semble être relativement bénéfique pour l'entame de différenciation des embryons somatiques. Par contre, employé à des volumes supérieures, le filtrat bloque ce processus au moins pendant la période d'expérimentation. Il s'avère alors utile de tester des volumes inférieurs à 10 ml.

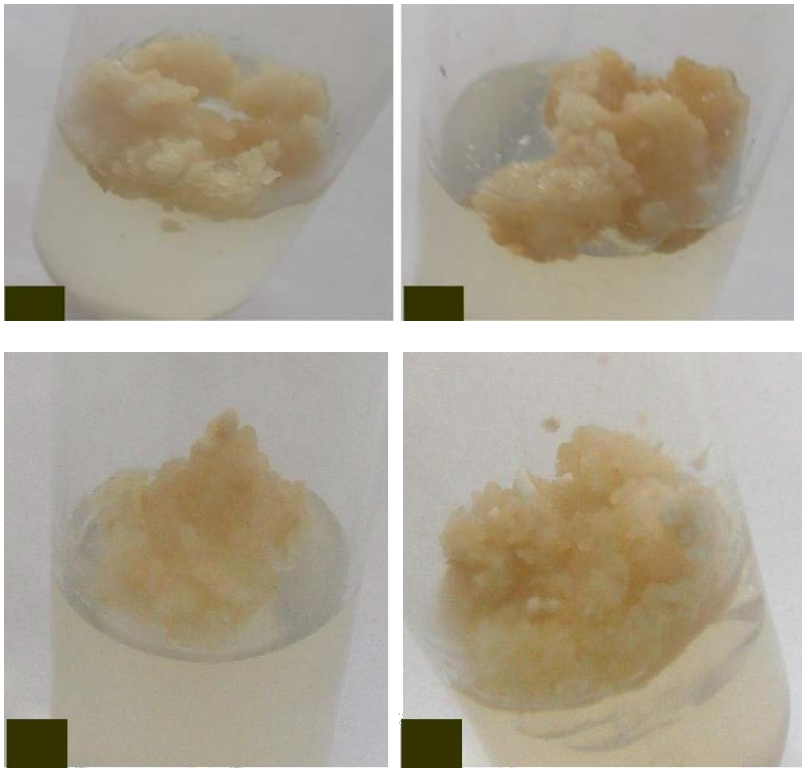


Figure 5 : Etat des cals embryogènes de la variété Boufeggous après 2 mois de culture sur les milieux BF0 (a), BF10 (b), BF20 (c) et BF50 (d).

3.2.3. La variété Tekermest

3.2.3.1. Evolution de la biomasse du cal embryogène

A l'instar de la croissance des cals embryogènes de la variété Boufeggous, celle de la variété Tekermest est continue sur tous les milieux testés (Figure 6). Néanmoins, le poids maximal a été enregistré sur le milieu BF10 (14,08g) au lieu du milieu F0 chez la variété Boufeggous et BF50 chez la variété Berhi. A des volumes supérieures à 10 ml, le filtrat semble avoir une action inhibitrice sur la croissance de la biomasse du cal embryogène étant donné que le poids enregistré sur les milieux BF20 et BF50 est inférieur même à celui enregistré sur le milieu témoin (BF0).

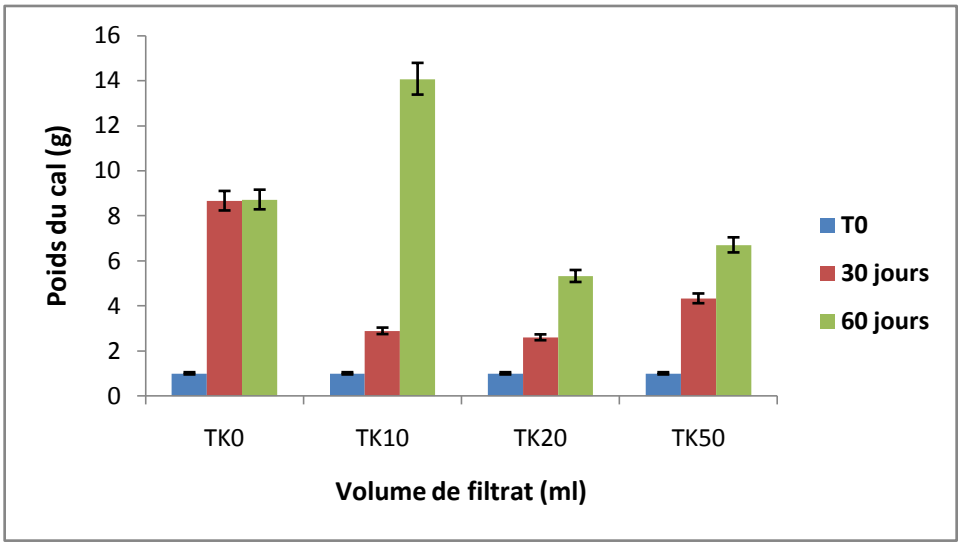


Figure 6: Evolution du poids des cals embryogènes de la variété Tekermest en fonction du volume de filtrat du bourgeon terminal du gourmand de dattier, variété Deglet nour ajouté au milieu de culture. BF0, BF10, BF20 et BF50 : milieux MS additionnés respectivement de 0, 10, 20 et 50 ml de filtrat.

3.2.3.2. La capacité de différenciation des embryons somatiques à partir du cal embryogène

D'après les résultats de la figure 7, on s'aperçoit que quel que soit le volume du filtrat employé, une morphogenèse des embryons somatiques prend naissance et peut même s'achever lorsque le filtrat est utilisé avec un volume de 10 ml. Il convient de noter que sur le milieu témoin, nous avons observé un grand nombre de nodules qui constituent des cellules mères des embryons somatiques. On suppose qu'après 1 à 2 mois on pourra observer des embryons somatiques matures qui se forment à partir de ces nodules. Cela suggère alors que le filtrat ajouté au milieu de culture ne fait qu'accélérer le processus de morphogenèse des embryons somatiques à partir des cals embryogènes.

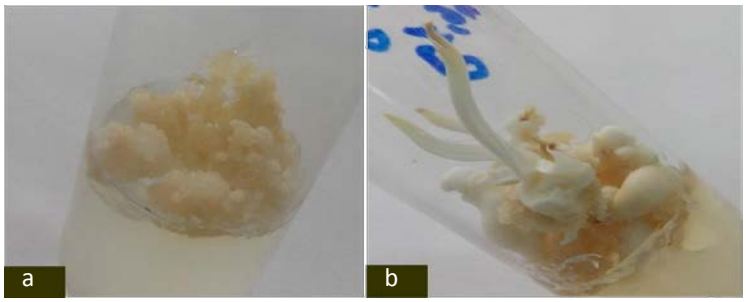




Figure 7: Etat des cals embryogènes de la variété Tekermest après 2 mois de culture sur les milieux TK0 (**a**), TK10 (**b**), TK20 (**c**) et TK50 (**d**).

3.2.4. La variété Deglet nour

3.2.4.1. Evolution de la biomasse du cal embryogène

A la lumière des résultats recueillis dans la figure 8, on s'est rendu compte qu'à l'exception du milieu DN50, la croissance sur les autres milieux est continue. Par ailleurs, en absence de filtrat la croissance est maximale (2,96 g), celle-ci diminue progressivement en fonction de l'augmentation du volume de filtrat jusqu'à devenir 1,31 g. Il apparait par conséquent que le filtrat ajouté au milieu de culture inhibe légèrement la croissance du cal embryogène de la variété Deglet nour. Cet effet inhibiteur est corrélé positivement au volume du filtrat ajouté au milieu de culture. Ce résultat non escompté est le plus souvent dû à la présence au niveau du filtrat des gourmands de la variété Deglet nour des inhibiteurs de croissance du cal embryogène qui agissent préférentiellement à forte dose.

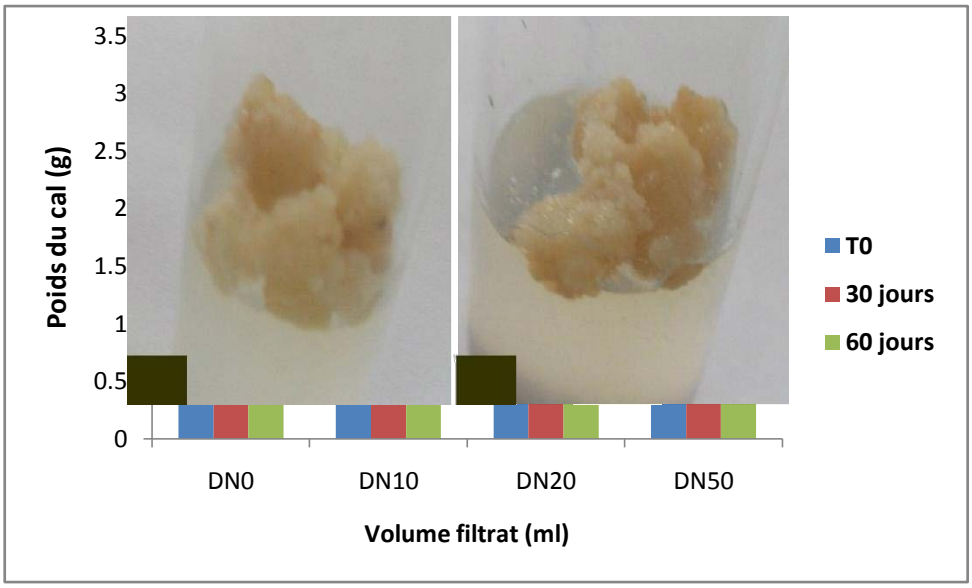


Figure 8: Evolution du poids des cals embryogènes de la variété Deglet nour en fonction du volume de filtrat du bourgeon terminal du gourmand de dattier, variété Deglet nour ajouté au milieu de culture. BF0, BF10, BF20 et BF50 : milieux MS additionnés respectivement de 0, 10, 20 et 50 ml de filtrat.

3.2.4.2. La capacité de différenciation des embryons somatiques à partir du cal embryogène

A propos de l'influence du filtrat sur l'aptitude du cal embryogène à produire des embryons somatiques, il s'est avéré que ce traitement est inefficace étant donné que quel que soit le volume du filtrat testé, les cals embryogènes continuent leur croissance sans aucun signe de régénération des embryons somatiques même au stade globulaire (Figure 9). Ce résultat suggère que les cals embryogènes de la variété étudiée nécessitent un traitement particulier pour stimuler leurs orientations vers la voie de différenciation en embryons somatiques. Ce traitement pourrait être, l'ajout d'autres constituants au milieu de culture à savoir maltose, polyethylene glycol, ABA, et le charbon actif (Maruyama et al. 2007) ou addition du thidiazuron au milieu de culture (Jones et al. 2007) ou déshydratation partielle du cal embryogène et emploi de forte concentrations d'agar ou la culture en suspension du cal embryogène (De Touchet et al. 1991) ou immersion temporaire du cal embryogène à un bioréacteur de type RITA (Teisson and Alvard 1995) ou déshydratation et hachage fin du cal embryogène (Othmani et al. 2009).

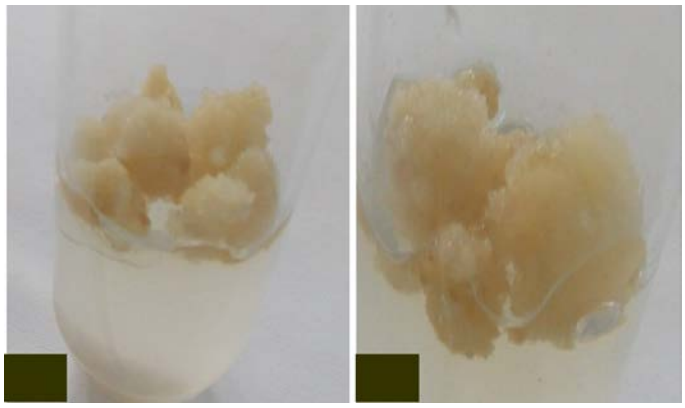


Figure 9 : état des cals embryogènes de la variété Deglet nour après 3 mois de culture sur les milieux DN0 (a), DN 10 (b), DN 20 (c) et DN 50 (d).

4. CONCLUSION

Le présent travail vise l'étude de l'effet du filtrat du bourgeon terminal d'un gourmand de dattier, variété Deglet nour sur l'évolution des cals embryogènes des variétés Berhi, boufeggous, Tekermest et Deglet nour. Il en ressort que malgré la disponibilité de cet additif, il ne peut pas être employé tel qu'il est car il présente une forte aptitude de se nécroser à cause de sa richesse en polyphénols. Le recours à une solution antioxydante composée de l'acide citrique (300 mg), l'acide ascorbique (300 mg) et de la silice (1 g), nous a permis de réduire efficacement le brunissement de ce filtrat.

L'addition du filtrat traité aux milieux de culture de type MS avec des volumes de 0, 10, 20 et 50 ml et inoculés par 0,5 g des cals embryogènes des variétés étudiées a montré que ce produit s'avère inducteur de la croissance des variétés Berhi lorsqu'il est employé avec un volume supérieur à 20 ml et de la variété Tekermest s'il est utilisé à 10 ml. Toutefois, chez les variétés Boufeggous et Deglet nour, cet additif exerce un effet inhibiteur sur la croissance des cals embryogènes. Par ailleurs, cet additif a montré un effet stimulant de différenciation des embryons somatiques à partir des cals embryogènes de toutes les variétés testées sauf celle de Deglet nour.

REFERENCES

- Bellarosa R. 1988. *In vitro* propagation of oaks (*Q. suber, Q. pubescens, Q. cerris*). Acta Horticult, 227, 433:435.
- Carpenter JB, Ream CL. 1976. Date palm breeding, a review. Date Grow Inst Rep, 53:23–33
- De Touchet B, Duval Y, Pannetier C. 1991. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of oil palm (Elaeis guineensis Jacq.). Plant Cell Rep, 10:522–532
- El Hadrami I. 1995. L'embryogenèse somatique chez *Phoenix dactylifera* L.: quelques facteurs limitants et marqueurs biochimiques. Thèse de Doctorat. Etat; Faculté des Sciences Semlalia, Marrakech, 176 pp.
- Jones MPA, Yi Z, Murch SJ, Saxena PK. 2007. Thidiazuron-induced regeneration of *Echinacea purpurea* L.: Micropropagation in solid and liquid cultures systems. Plant Cell Rep. 26:13-19.
- Kaeppler SM, Karppler HF, Rhee Y. 2000. Epigeneticaspects of somaclonal variation in plants. Plant Molecular Biology, 43:179-88.
- Larkin PJ, Scowcroft WR. 1981. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Genet, 60:197-214.
- Berthon Y, Maldiney R, Sotta B, Gaspar T, Boyer N. 1989. Endogenous Levels of Plant Hormones during the Course of Adventitious Rooting in Cuttings of *Sequoiadendron giganteum* (LINDL.) *in vitro*. Biochemie und Physiologie der Pflanzen, 184: 405-412.
- Maruyama E, Hosoi Y, Ishii K. 2007. Somatic embryogenesis and plant regeneration in yakutanegoyou, *Pinus armandii* Franch. Var. *amamiana* (Koidz.) Hatusima, an endemic and endangered species in Japan. *In vitro* Cell Dev Biol-Plant, 43:28-34.
- Mazinga K M, Mario G, Baboy LL, Useni SY, Van KM. 2012. Détermination des teneurs en phytohormones endogènes des organes caulinaires et racinaires des hybrides de bananier (Musa sp.). Journal of Applied Biosciences, 58: 4243– 4250.
- Onagri, 2014**.** Observatoire National de l'Agriculture en Tunisie
- Othmani A, Bayoudh C, Drira n, Trifi m. M. 2009a. Somatic embryogenesis and plant regeneration in date palm *Phoenix dactylifera* L., cv. Boufeggous is significantly improved by fine chopping and partial desiccation of embryogenic callus. Plant Cell Tiss Organ Cult, 97:71-79.
- Standardi A, Romani F. 1990. Effects of some antioxidants on *in vitro* rooting of apple shoots. HortScience. 25:1435-1436.
- Teisson C, Alvard D. 1995. A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: temporary immersion. In: Terzi M, Cella R and Falavigna A (eds) Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. Current Issue in Plant Molecular and Cellular Biology, 22:105-110.
- Zaid A. 1987. *In vitro* browning of tissues and media with special emphasis to date palm cultures. Acta. Horticult. 212:561-566.

Phenolic profiles and antioxidant activity of Tossa jute extracts (*Corchorus olitorius* L.)

Amira Racha Ben Yakoub[1,2], Ola Abdehedi[3], Mourad Jridi[3], Walid Elfalleh[4], Moncef Nasri[3], Ali Ferchichi[5]

[1]Arid and Oases Cropping Laboratory, Arid Lands Institute , 4119 Medenine, Tunisia
[2]Faculty of Sciences of Tunis, University Campus, 2092 El Manar, Tunisia
[3]Enzyme Engineering and Microbiology Laboratory, Sfax-University, National School of Engineering of Sfax (ENIS), BP 1173 Sfax 3038, Tunisia.
[4]UR Catalyse et Matériaux pour l'Environnement et les Procédés URCMEP (UR11ES85), Faculté des Sciences de Gabès, Université de Gabès, 6072, Tunisia
[5]National Institute of Agronomy, 43, Avenue Charles Nicole, 1082, Mahrajène City, Tunisia.

SAMMARY

Tossa jute (*Corchorus olitorius* L.) is one of the Tunisian plants, traditionally used as a medicinal herb. The purpose of this study was to analyze the antioxidant and phenolic profiles of *C. olitorius* L extracts. The effects of various solvents (ethanol, 50/50 ethanol/water and water) on the phenolic profile of C. *olitorius* leaf and their antioxidant activity were studied. The results showed that ethanol appeared the most effective solvent for polyphenols and flavonoids extraction as confirmed by the LC-MS analysis. The ethanolic extract (EE) showed the highest content of phenolic acid and flavonoid compounds. The major identified compounds were quinic acid, 4-O-caffeoylquinic acid, 3,4-di-O-caffeoyquinic acid, protocatchuic acid, caffeic acid, quercetin, and cirsiliol. Other phenolic compounds such as p-coumaric acid, trans-Ferulic acid, rosmarinic acid, naringenin, naringin, apegenin-7-O-glucoside, cirsilineol, and cirsiliol were detected in this extract.

Results indicated that EE extraction exhibited higher antioxidant activities than the ethanol/aqueous extract (EAE) and aqueous extract (AE), in dose-dependent manner ($p< 0.05$). At EE concentration of 500 µg/mL, the antioxidant activities were about 91.65±0.15% against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) radicals and 86.19±0.85% against β- carotene bleaching. The overall data suggested that EE of C. *olitorius* leaf might be used as a natural antioxidant for functional foods.

Key words: *Corchorus olitorius*, Phenolic compounds, LC-MS, Antioxidant activities.

1. INTRODUCTION

In recent years, there has been a great deal of attention to bioactive molecules from plants due to the increasing interest for human health. Finding antioxidants from natural sources is of great interest in the medical and industrial. Indeed, many vegetables, particularly medicinal plants, have been extensively studied for their natural antioxidant activity. They can act as suitable antioxidants to replace synthetic ones and interfere with the oxidation process and the alteration of lipids, proteins and DNA (Neffati et al., 2017). Natural antioxidant can also provide protection against degenerative diseases particularly cardiovascular diseases and cancer by inhibiting and scavenging free radicals function (Perez-Jimenez et al., 2008).

Tossa jute (*Corchorus olitorius* L.) is one of the traditional plants that have great potential on the medicinal purpose. Their leaves are used in domestic preparation for their nutritive values. They are also employed as a medicine to possess diuretic, antipyretic, analgesic, antimicrobial activities and to contain antitumor (Zakaria et al., 2006; Furumoto et al., 2002) and phenolic antioxidative compounds (Azuma et al., 1999).

In the herbal medicine industry, the extraction condition can influence the isolation and the characterization of compounds. Indeed the variation in the composition and the antioxidant activity are related to the technical practices among different laboratories, briefly named as post-harvest techniques such as solvent type, sample preparation, extraction method (Tanko et al., 2005). Among these, solvent type has been considered as one of the most important factor which can be organic (ethanol, methanol, acetone, diethyl ether) or aqueous (Dorta, et al., 2012). Thus, the quantity and

quality of the final extract can be influenced by the solvent used for the extraction of bioactive compounds. Indeed, the selection of the appropriate solvent is critical because the variation in chemical characteristics, polarities and solubility of phenolic compounds between plants (Chan et al., 2009). Ethanol and methanol can be the most solvents used for the best extraction. However, comparing to methanolic extract, ethanol are more usual for human consumption, reusable and nontoxic. Indeed, ethanol can be utilized in industry of beverages, foods and cosmetics (Galanakis et al., 2010). Many researches concerning the estimation of the antioxidant capacity of various types of herbs especially medicinal ones. However and to the best of our knowledge there are few systemic researches on the evaluation of the effect of solvents especially the ethanol on antioxidant activity of *C. olitorius*. In this study, total flavonoid, the total phenolic and the antioxidant activity of absolute ethanol (EE), aqueous/ethanol (50:50 v/v) (EAE) and aqueous extracts (AE) from *C. olitorius* leaves were evaluated. To the best of our knowledge, qualitative and quantitative determination of phenolic acids and flavonoid from these extracts was assessed by *LC-ESI-MS*.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant materials

Fresh leaves of *C. olitorius* were harvested from a farm at 'Arid Lands Institute, Gabes, Tunisia', washed and air-dried to constant weight. After which were powdered, labeled and kept in the airtight glass at -20° C.

2.2. Preparations of extracts

Phenolic compounds were extracted by maceration at room temperature using absolute ethanol, ethanol/water (50:50 v/v) and water as solvents. 5 g of dry powder of *C. olitorius* leaves was suspended in 20 ml of each solvent followed by agitation for 24h. The mixtures were centrifuged at 3000 rpm for 30 min and the obtained supernatants were evaporated under vacuum in a rotatory evaporator. EE, AEE and AE were lyophilized and stored at 4 °C in tightly closed dark vials until analysis.

2.3. Total phenolic content

The total quantity of phenolic compounds of *C. olitorius* the method described by (Javanmardi et al., 2003). Briefly, 100 µl of EE, EAE and AE extracts placed in eppendorf and 100 µL of 1 N Folin-Ciocalteu reagent was added. The mix was incubated for 2 min in darkness at ambient temperature. Then, 800 µl of Na_2CO_3 (5 %) was added. The absorbance was measured at 760 nm after 20 min of incubation at 40 °C in darkness, using a spectrophotometer. A blank was prepared by adding 100 µl of the sample solution to 100 µl of distilled water. The total phenolic content of each extract was estimated and expressed as mg gallic acid equivalent (GAE) per100 g of extract.

2.4. Total flavonoid content

The aluminum chloride colorimetric method was used to measure the flavonoid content of *C. olitorius* extracts. It was investigated according to the reported methods with minor modifications (Nguyen and Eun, 2011). Briefly, 250 µl of extract solution of each extract were added to 1 ml of distilled water. After supplement sodium nitrite solution (0.15 ml, 15%), the mixture was incubated for 6 minutes followed by the adding of 0.075 ml of 10% aluminum chloride. The combination was allowed to stand for 5 min at room temperature before 1 ml of sodium hydroxide (4%) was finally additional to the mixture. The absorbance of the reaction mixture was measured at 510 nm with spectrophotometer and the total flavonoid content was expressed as mg quercetin acid equivalents (QE)/ 100 g.

2.5. Liquid Chromatography-electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry (LC-ESI-MS) Analysis

C. olitorius extracts at 20 mg/ml filtered through a 0.45 µm membrane filter before injection into the HPLC system. LC-ESI-MS analysis was performed using a LCMS-2020 quadrupole mass spectrometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with an electrospray ionisation source (ESI) and

operated in negative ionization mode. Mass spectrometer was coupled online with an ultra-fast liquid chromatography system consisted of a LC-20AD XR binary pump system, SIL-20AC XR autosampler, CTO-20AC column oven and DGU-20A 3R degasser (Shimadzu, Kyoto, Japan). For analysis, Aquasil C18 guard column (10 mm × 3 mm, 3 µm, Thermo Electron) and Aquasil C18 column (Thermo Electron, Dreieich, Germany) (150 mm × 3 mm, 3 µm) were used. The mobile phase was composed of A (0.1% formic acid in H2O, v/v) and B (0.1% formic acid in methanol, v/v) with a linear gradient elution: 0-45 min, 10-100% B; 45-55 min, 100% B. The period for equilibrate was controlled for 5 min between individual runs. The injection volume was 5 µl, the flow rate of the mobile phase was 0.4 ml/min and temperature of the column was fixed at 40°C. Spectra were monitored in mode SIM (Selected Ion Monitoring) and processed using Shimadzu LabSolutions LC-MS software. The mass spectrometer was operated in negative ion mode with a capillary voltage of -3.5 V, a nebulizing gas flow of 1.5 l/min, a dry gas flow rate of 12 l/min, a DL (dissolving line) temperature of 250°C, a block source temperature of 400°C, a voltage detector of 1.2 V and the full scan spectra from 50 to 2000 Da.

2.6. Antioxidant tests

2.6.1. Free radical scavenging activity on (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) (DPPH)

The free radical scavenging capability of each extract solution on DPPH radicals was determined as described previously by Bersuder et al. (1998). EE, EAE and AE solutions were prepared at different concentrations from 10 to 500 µg/ml.

In each tube, 500 µl of the sample solution at all concentration was allowed to react with 375 µl of ethanol solution and 125 µl of 0.02% DPPH. The reaction mixtures were incubated for 60 min in the dark at room temperature and the reduction of DPPH radical was measured at 517 nm. The control tube contains all reagents except the sample and blank tubes were prepared for each concentration containing 500 µl of extracts at each concentration and 500 µl of the ethanol solution. The decrease of the reaction mixture absorbance leads to the increase of the free radical-scavenging activity.

Extracts scavenging activity on DPPH radical were calculated as follows:

$$\text{Scavenging activity (\%)} = \frac{\text{Acontrol} + \text{Ablank} - \text{Asample}}{\text{Acontrol}} \times 100$$

Where $A_{control}$, A_{blank} and A_{sample} are the absorbance of the control reaction, the blank and the extracts, respectively.

2.6.2. β-carotene bleaching method

The capacity of extracts to prevent bleaching of β-carotene was evaluated using the method of Koleva et al. (2002). First, the emulsion of β-carotene/linoleic acid was freshly prepared by dissolving 0.5 mg of β-carotene, 25 µl of linoleic acid and 200 µl of Tween 40 in 1 ml of chloroform. The chloroform was then completely evaporated under vacuum in a rotatory evaporator at 50 °C. Then, 100 ml of distilled water were added and the resulting mixture was vigorously stirred. After, 0.5 ml of each extract prepared in test tubes (10 to 500 µg/ml) was allowed to react with 2.5 ml of the β- carotene/linoleic acid emulsion. Control tubes contain 0.5 ml of water and 2.5 ml of the emulsion. The antioxidant activity was evaluated in terms of β-carotene bleaching and the absorbance of every tube was measured at 470 nm, before and after incubation for 1 h at 50 °C referring to the following equation:

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = \frac{1 - (\text{A0} - \text{At})}{\text{A'0} - \text{A't}} \times 100$$

Where A0 and At are the absorbances of the test sample measured before and after incubation, respectively; and A'0 and A't are the absorbances of the control measured before and after incubation, respectively.

2.7. Statistical analysis of data

All the measurements were carried out in triplicate. The mean values and standard deviations were calculated. The data analysis and statistical analysis were done using Xlstat 2016 software (www.xlstat.com). Post-hoc multiple comparison test were used and differences were considered significant at the $p<0.005$ level.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Total phenols and flavonoids determination

The average total phenols and flavonoids contents of *C. olitorius* leaves extracts tested for each solvent type are presented in table 1. These results showed that extraction solvent influenced significantly the total phenols content. The total phenols level was higher (920.48±0.65 mg GAE/100g of extract) when it is extracted with ethanol, while the lowest content was shown with water extraction (500±0.38 mg GAE/100g of extract). The phenolic content in AE obtained in our study is lower than the AE and higher than lipophilic extract (hexane) from C. *olitorius* leaves (630.8±4.4 and 99.9±4.6 mg/100 g respectively) found by Oboh et al. (2009).

According to table 1, data showing that flavonoids extraction depend on the solvent used. Significant difference was observed between extracts and the highest content was obtained by EE 410.64mg QE/100g followed by AEE (302.48 mg Q/100g) and AE (217.22 mg QE/100g). Our results are in agreement with those of Figueroa-Espinoza et al. (2015) which indicated that EE contained more total phenol and flavonoid than AE in Grape and apple. Thus, the abundance of total phenolic content in EE is due to massive amount of phenolic compounds such as tannin which can be more soluble in polar organic than aqueous solvents (Hwang and Do Thi, 2014). However, Bhebhe et al. (2016) indicated that more phenolic compounds from black tea and some infusions were more extracted using water or a combination of aqueous organic solvent (ethanol, methanol and acetone) than absolute organic. Indeed, the high total phenol content in AE indicates that the plant extract contains more water soluble phenolic compounds and may be a result of abundance of phenolic acids that they can be preferably soluble in water than other organic solvents (Bhebhe et al., 2016; Galanakis et al., 2010).

The EAE of C. *olitorius* was significantly richer in phenolic content comparing to AE. In the same context, Durling et al. (2007) reported that the ethanol-water mixture (50%) is the most commonly used solvents for extracting phenolic compounds from plant materials because a wide range of plant phenolics are soluble in this combination. The total phenol content obtained from EAE in our study (705.87±0.25 mg GAE/100 g) is higher than those find in aqueous-methanol extract of *C. olitorius* (316.34 mg GAE/100 g) (Katerere et al., 2012). Based on these results, thus, EE showed the highest total phenolic and flavonoid contents in *C. olitorius* leaves and can be used extensively in the industry.

Table 1. Total phenols and total flavonoids in different extracts from *C. olitorius* leaves

Extracts	Total phenols (mg GAE/100g)	Total flavonoids (mg QE/100g)
EE	920.48±0.65^{a}	410.64±0.18^{a}
EAE	705.87±0.25^{b}	302.48±0.20^{b}
AE	500.1±0.38^{c}	217.22±0.11^{c}

a,b,c : different letters in different extracts indicate significant differences ($p < 0.05$).

3.2. Identification of phenolic compounds: LC MS analysis

Quantitative analysis of individual phenolic compounds from *C. olitorius* leaves extracts showed that the EE was more applicable for the identification of these compounds (Table 2). The analysis of the results of LC MS allowed the detection of eleven, nine and eight phenolic acids from EE, AE

and EAE respectively. The major identified phenolic acids were quinic acid, 4-O-caffeoylquinic acid, 3,4-di-O-caffeoyquinic acid, protocatchuic acid and caffeic acid. The quinic acid was totally absent in the AE and EAE and their amount was 6484.277 ppm in the EE. Protocatechuic acid is identified in all extract but their amount was more noticeable in AE (8341.788 ppm). This compound presents anti-inflammatory as well as anti-hyperglycemic and antimicrobial activities. It has also a noticeable pharmacological propriety by inhibiting chemical carcinogenesis and exerting an anti-proliferative effect in cancerous tissues (Semaming et al., 2015).

In addition, caffeic acid, 4-O-caffeoylquinic acid, 1,3-di-O-caffeoyquinic acid 3,4-di-O-caffeoyquinic acid 4,5-di-O-caffeoyquinic acid are detected in all extracts except 1,3-di-O-caffeoyquinic which was absent in AE. The abundant compound was 4-O-caffeoylquinic acid and their amount was 5771.416, 6736.445 and 1003.802 ppm for EE, EAE and AE respectively. In this context, Azuma et al. (1999) showed that six phenolic compounds were identified from the methanolic extract from *C. olitorius* leaves and 5-caffeoylquinic acid 3,5-dicaffeoylquinic acid was the predominant compound. This result was in line with previous works and confirmed the detection of quinic acid, chlorogenic acid, caffeoylquinic derivate, 1,5 dicaffeoyl quinic acid, 3,5 dicaffeoylquinic acid and dicaffeoyl quinic acid derivate from the EAE of aerial part of *C. olitorius* (Ola et al., 2009; Handoussa et al., 2017). These compounds can be used in pharmaceutical industry for their antioxidative, peroxynitrite-scavenging, hepatoprotective, antiviral, antiobese, and antidiabetic activities (Park, 2010).

Table 2. Phenolic acids and flavonoids from *C. olitorius* leave extracts identified by LC-MS

Phenolic acids	*m/z*	CC (ppm)	Rt (min)	CC (ppm)	Rt (min)	CC (ppm)	Rt (min)
		EE		EAE		AE	
Quinic acid	191	6484.277	2.039	N.D	-	N.D	-
Gallic acid	169	41.734	4.055	191.156	4.057	83.110	4.062
Protocatechuic acid	153	212.884	7.022	164.864	7.024	8341.788	7.041
4-O-caffeoylquinic acid	353	5771.416	12.040	6736.445	12.033	1003.802	12.055
Caffeic acid	179	229.561	14.544	146.021	14.545	306.428	14.563
1,3-di-O-caffeoyquinic acid	515	0.529	15.078	N.D	-	2.712	15.048
p-coumaric acid	163	60.487	20,886	N.D	-	N.D	-
trans-Ferulic acid	193	19.609	23.167	17.311	23.128	3.919	23.181
3,4-di-O-caffeoyquinic acid	515	4413.197	25.140	6038.543	25.136	170.621	25.151
Rosmarinic acid	359	14.523	26.836	7.777	26.887	15.294	26.778
4,5-di-O-caffeoyquinic acid	515	2462.815	27.038	2558.624	27.033	60.585	27.057
Flavonoids	*m/z*	CC (ppm)	Rt (min)	CC (ppm)	Rt (min)	CC (ppm)	Rt (min)
		EE		EAE		AE	
Naringin	579	61.666	25.990	60.823	25.984	27.323	26.004
Quercetrin (quercetin-3-O rhamonoside)	447	2576.974	26.570	2520.626	26.570	45.240	26.583
Apegenin-7-O-glucoside	431	217.192	26.881	206.715	26.879	N.D	-
Quercetin	301	52.014	31.885	35.259	31.872	3.130	31.958
kaempferol	285	18.277	31.909	29.395	31.905	16.245	31.919
Naringenin	271	9.905	33.852	12.385	33.856	9.213	33.911
Apigenin	269	6.807	34.489	15.219	34.484	3.604	34.493
Luteolin	285	50.100	34.904	43.780	34.880	N.D	-
Cirsiliol	329	501.420	35.557	339.548	35.556	183.305	35.561
Cirsilineol	343	13.821	38.619	13.596	38.631	N.D	-

Rt: retention time, N.D: Not Detected

While the presence of quinic acid, caffeoylquinic acid, caffeic acid and its derivates in *C. olitorius* leaves extracts is well documented (Azuma et al., 1999; Ola et al., 2009; Handoussa et al., 2017), the detection of other phenolic acid such as p-coumaric acid, *trans*-Ferulic acid and rosmarinic acid were less previously documented in extract from this plant. Indeed, these phenolic acids identified in our study in EE, EAA and AE exception *p*-coumaric acid which was detected just in EE. These three compounds identified were characterized by a several important biological proprieties such as anticarcinogenic, anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant, antiageing, antiallergic, antidiabetic, neuroprotective, radioprotective and hepatoprotective (Singh et al., 2016; Alagawany et al., 2017). Also rosmarinic acid can be also used in the cosmetic and food industries such as in meat production for improving shelf-life and the quality of product (Alagawany et al., 2017).
The analysis revealed also that flavonoids detected and their concentration depends on the solvent used. Indeed, ten compounds were identified from EE and EAE and seven compounds have been found in AE (Table 2). Cirsiliol and quercetin are the most abundant flavonoids in all extracts from *C. olitorius* leaves. The amounts of quercetin were 2576.974, 2520.626 and 45.240 ppm for EE, EAE and AE respectively. In the same context, (Azuma et al., 1999) showed that the quercetin 3-galactoside, quercetin 3-glucoside, quercetin 3-6-malonylglucoside and quercetin 3-6 malonylgalactoside were identified from the methanolic extract from *C. olitorius* leaves. This result was confirmed by the observation of Handoussa et al. (2017) and Ola et al. (2009) which the EAE allows the detection quercetin derivative, quercetin3-O galactoside (hyperoside), quercetin3-β-glucoside (Isoquercitrin) and quercetin 3-6 malonylglucoside from the aerial part of *C. olitorius.* These compounds, found mostly in fruits and vegetables can play vital activities by exhibiting protection against cancer, cardiovascular and neurodegenerative diseases (David et al., 2016).
In addition, other flavonoid compounds such as flavanones (naringenin, naringin), flavones glycosides (apegenin-7-O-glucoside) and flavones (cirsilineol and cirsiliol) were identified. These natural compounds have not previously detected in *C. olitorius* leaves extracts. They have been found also identified in *Salvia verbenaca* extracts and are of considerable interest because of their potential industrial, pharmacological and medicinal values like antioxidant, antidiabetic, antiulcer, anticancer, antibacterial and antifungal proprieties (Ben Farhat et al., 2015).

3.3. Antioxidant activity

3.3.1. Free radical scavenging activity determination

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl ($DPPH^{\cdot}$) is a stable free radical that presents maximum absorbance at 517 nm. The $DPPH^{-}$ radical scavenging activity system is evaluated on the reduction of $DPPH^{\bullet}$ to $DPPH^{-}H$ by a proton-donating substrate, such as an antioxidant. This reaction reduces the propagation of oxidation by leading to the loss of purple color to yellow. The degree of discoloration of $DPPH^{\bullet}$ reflects the scavenging potential of the antioxidant sample (Hseu et al., 2008).
On the basis of this principle, the scavenging effects of different extracts on the DPPH radical were evaluated and the results are shown in figure 1. Data indicated that DPPH radicals of *C. olitorius* extracts increased dose-dependently and reached the best activity at the dose of 500 µg/ml. Solvent type has significant impact on the antioxidant capacities of *C. olitorius* leaves extracts at this concentration. Indeed, extraction with ethanol showed higher scavenging activity (91.65±0.15%) followed by AEE (82.54±1.23%) and AE (77.64±1.44 %). This answer is comparable with those described in the literature for *Pistacia atlantica*, which the radical scavengers were more soluble in EE than AE (Rigane et al., 2016). However, extracting some teas by different solvents showed that absolute organic solvents recorded lower free radical scavenging activity than their aqueous organic preparations (50 % methanol, 50 % ethanol and 50 % acetone) (Bhebhe et al., 2016). Indeed, the antioxidant activities and the yield of extraction of plants depend on the solvent nature. The difference in antioxidant capacity between extracts can be explained by the existence of polyphenolic compounds with different chemical features and polarities which can be solubilized especially in certain solvent (Chan et al., 2009). In the same context, previous studies showed that radical scavenging ability of C. *olitorius* extracts depends of the solvent and the DPPH of hexane

extract attain 20.4% at 100 µg/ml (Oboh et al., 2009). This activity is enhanced when using methanol and reached 94.19% at 800 ppm (Barku et al., 2013).

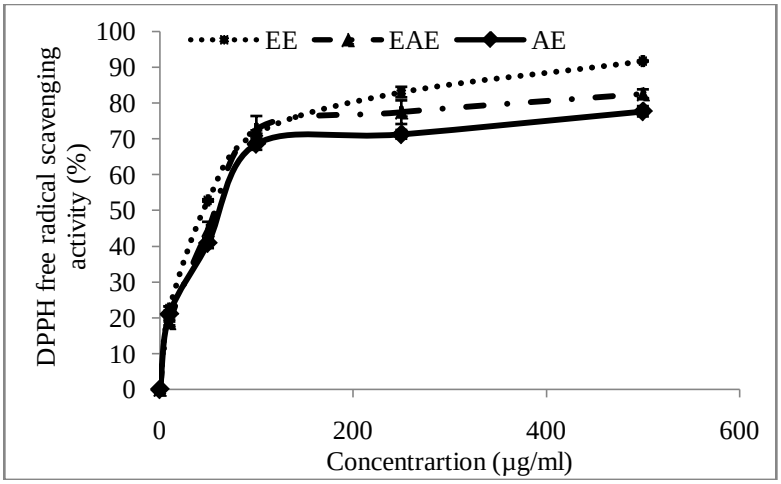


Figure 1. DPPH Free radical scavenging activity of EE, AEE and AE from *C. olitorius* leaves as a function of their concentrations.

3.3.2. β-carotene bleaching

The antioxidant activity of *C. olitorius* extracts was determined as % of inhibition of the β-carotene-linoleic acid system (Figure 2). All extracts protected β-carotene bleaching in a dose-dependent manner and the strongest protective effect was obtained by EE followed by EAE and AE. At 10 µg/ml, the antioxidant capacity of EE is higher (31.82±0.36%) achieved by AE and EAE (13.29±1.09% and 11.84±2.8 % respectively) and not significant difference was noted between EAE and EA. Furthermore, when increasing the level of extract to 500 µg/ml, significant difference was observed and the ability of the extracted EE to inhibit bleaching of β-carotene has increased to 86.19±0.85% versus 79.33±2.55 and 70.84±1.94% for the AEE and AE respectively. These results are similar to previous works performed by Siddhuraju and Becker (2003), showing that EE from moringa leaves exhibited the highest antioxidant activity followed by AEE (66.8%) and AE (20%). The activities obtained in our study are better than those found in aqueous, methanol, ethylacetate extracts from *C. olitorius* leaves at 0.2 mg/ml (12.5, 18.00 and 27.25%, respectively) (Öztürk and Savaroğlu, 2011) and methanol, hexane, ethyl acetate and aqueous extracts from *Corchorus aestuans* leaves at 4 mg/ml (54.46, 18.54, 40.98 and 17.54%, respectively) (Patel and Patel, 2012).

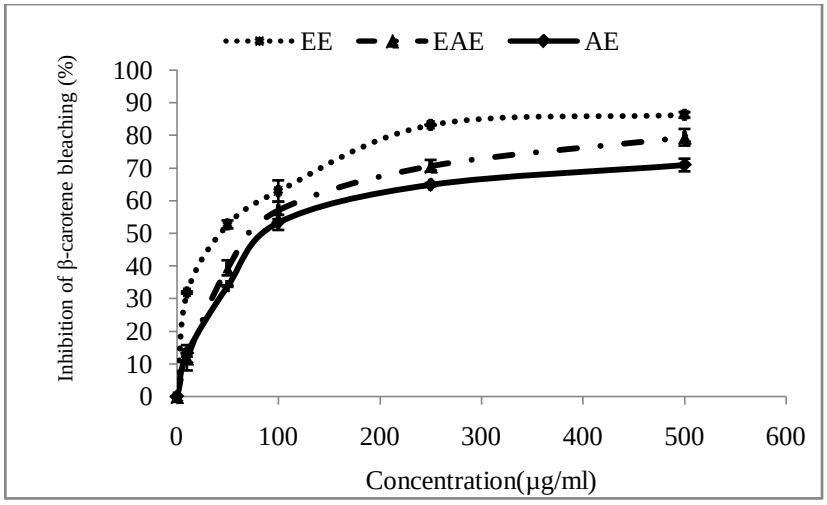


Figure 2. Inhibition of β-carotene bleaching of EE, AEE and AE from *C. olitorius* leaves as a function of their concentrations.

4. CONCLUSION

The results proved that solvent type was effective on phenolic compounds extraction and their antioxidant activities. The EE was the most efficient for antioxidants extraction followed by EAE and AE. Quantitative analysis of individual phenolic compounds showed that the EE was the most appropriate solvent for the extraction and the identification of phenolic acids and flavonoid compounds identified for the first time from *C. olitorius.*

These biological properties confirm its potential either as natural preservatives or in pharmaceutical applications. Additional antimicrobial assays confirmed the potential use of this extracts in disease treatment. The combinations water and ethanol, because of their none-toxic nature, may be recommended for recovering bioactive phytochemicals such as phenolic compounds, as they may also be consumed together with their extracts without need of further processing.

REFERENCES

- Alagawany, M., Abd El-Hack, M.E., Farag, M.R., Gopi M.2017. Rosmarinic acid: modes of action, medicinal values and health benefits. Anim. Health Res. Rev. 1-10.
- Azuma, K., Nakayama, M., Koshioka, M., Ippoushi, K., Yamaguchi, Y., Kohata, K., Yamauchi, Y., Ito, H., Higashio, H. 1999. Phenolic Antioxidants from the Leaves of *Corchorus olitorius* L. J. Agric. Food Chem. 47, 3963–3966.
- Barku, V.Y. A., Boahen, Y. O., Ansah, E. O., Dayie, N. T. K. D., Mensah, F.E. 2013. In-Vitro Assessment of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Methanol Extracts of Six Wound Healing Medicinal Plants. J. Nat. Sci. Res. 3, 74–80.
- Bhebhe, M., Fülle, T. N., Chipurura, B., Muchuweti, M. 2016. Effect of Solvent Type on Total Phenolic Content and Free Radical Scavenging Activity of Black Tea and Herbal Infusions. Food Anal. Methods. 9, 1060–1067.
- Ben Farhat, M., Hamada R.C., Sotomayor J.A., Landoulsi A., Jordán M.J. 2015. Antioxidant Properties and Evaluation of Phytochemical Composition of Salvia verbenaca L. Extracts at Different Developmental Stages. Plant Foods Hum. Nutr. 70, 15–20.
- Bersuder, P., Hole, M., Smith, G. 1998. Antioxidants from a heated histidine–glucose model system. Investigation of the antioxidant role of histidine and isolation of antioxidants by high performance liquid chromatography. J. Am. Oil Chem. Soc. 75, 181–187.
- Chan, S.W., Lee, C.Y, Yap, C.F., Wan, A.W.M., Ho, C.W. 2009. Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. Int. Food Res. J. 16, 203–213.
- David, A.V.A., Arulmoli R., Parasuraman, S. 2016. Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid. Pharmacogn. Rev.10, 84-89.
- Durling, N.E., Catchpole, O.J., Grey, J.B, Webby, R.F., Mitchell, K.A., Foo, L.Y., Perry, N.B. 2007. Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures. Food Chem. 101, 1417–1424.
- Dorta, E., Lobo, M. G., Gonzalez, M. 2012. Reutilization of mango byproducts: study of the effect of extraction solvent and temperature on their antioxidant properties. J. Food Sci. 77, 80–88.
- Figueroa-Espinoza, M.C, Zafimahova, A., Alvarado, P.G.M., Dubreucq, E., Poncet-Legrand, C. 2015. Grape seed and apple tannins: Emulsifying and antioxidant properties. Food chem. 178, 38–44.
- Furumoto, T., Wang, R., Okazaki, K., Hasan, A.F.M.F., Ali, M.I., Kondo, A., Fukui, H. 2002. Antitumor promoters in leaves of jute (*Corchorus capsularis* and *Corchorus olitorius*). Food Sci. Technol. Res. 8, 239–243.
- Galanakis, C.M., Tornberg, E, Gekas, V. 2010. Clarification of high-added value products from olive mill wastewater. J. Food Eng. 99,190–197.
- Handoussa, H., Hanafi, R., El-Khatib, A., Linscheid, M., Mahran, L. Ayoub, N. 2017. Computer-Assisted HPLC Method Development Using DryLab for Determination of Major Phenolic Components in *Corchorus olitorius* and *Vitis vinifera* by using HPLC-PDA-ESI-TOF- MSn. Research and Reviews: J. Botanical Sci. 6, 9–16.

- Hseu, Y.C., Chang, W.H., Chen, C.S. 2008. Antioxidant activities of *toona sinensis* leaves extracts using different antioxidant models. Food Chem. Toxicol. 46, 105–114.
- Hwang, E.S., Do Thi, N. 2014. Effects of extraction and processing methods on antioxidant compound contents and radical scavenging activities of laver (*Porphyra tenera*). Prev. Nut. Food Sci. 19, 40– 48.
- Javanmardi, C., Stushnoff, E., Locke, J., Vivanco, J.M. 2003. Antioxidant activity and total phenolic content of *Iranian Ocimum* accessions. Food. Chem. 83, 547–550.
- Katerere, D. R., Graziani, G., Thembo, K.M., Nyazema, N. Z. Ritieni, A. 2012. Antioxidant activity of some African medicinal and dietary leafy African vegetables. Afr. J. Biotechnol. 11, 4103–4108.
- Koleva, I.I., Van Beek, T.A., Linssen, J.P.H., de Groot, A., Evstatieva, L.N. 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: A comparative study on three testing methods. Phytochem. Anal. 13, 8–17.
- Neffati, N., Aloui, Z., Karoui, H., Guizani, I., Boussaid, M., Zaouali, Y. 2017. Phytochemical composition and antioxidant activity of medicinal plants collected from the *Tunisian flora*. Nat. Product Res. 23, 1–6
- Nguyen, Q. Eun, J. 2011. Antioxidant activity of solvent extracts from Vietnamese medicinal plants. J. Med. Plants Res. 5, 2798–2811.
- Oboh, G., Raddatz, H., Henle, T. 2009. Characterization of the antioxidant properties of hydrophilic and lipophilic extracts of Jute (*Corchorus olitorius*) leaf. Int. J. Food Sci. Nutr. 60, 124–134.
- Ola, S.S., Catia, G., Marzia, I., Francesco, F.V., Afolabi, A.A., Nadia, M. 2009. HPLC/DAD/MS characterisation and analysis of flavonoids and cynnamoil derivatives in four Nigerian green-leafy vegetables. Food Chem. 115, 1568–1574
- Öztürk, N., Savaroğlu, F. 2011. Antioxidant activities of Molokhia (*Corchorus olitorius* L.) extracts. In: Gökçekus, H., Türker, U., Moreaux, J.W., editors. Survival and Sustainability, Environmental concerns in the 21st Century. 535–543.
- Park, H. J. 2010.Chemistry and pharmacological action of caffeoylquinic acid derivatives and pharmaceutical utilization of chwinamul (Korean Mountainous vegetable). Arch. Pharm. Res. 33, 1703–1720.
- Patel, R.P., Patel, M.P. 2012. Evaluation of antioxidant activity of *Corchorus aestuans* Linn leaves extracts. Inter. J. pharm. 3, 233–238
- Perez-Jimenez, J., Arranz, S., Tabernero, M., Díaz-Rubio, M.E., Serrano, J., Goñi, I., Saura-Calixto, F. 2008. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. Food Res. Int. 41, 274–285.
- Rigane, G., Ghazghazi, H., Aouadhi, C., Ben Salem, R., Nasr, Z. 2016. Phenolic content, antioxidant capacity and antimicrobial activity of leaf extracts from *Pistacia atlantica*. Nat. Prod. Res. 31, 696–699.
- Semaming, Y., Pannengpetch, P., Chattipakorn, S.C., Chattipakorn, N. 2015. Pharmacological properties of protocatechuic acid and its potential roles as complementary medicine. Evid. Based Complement Alternat. Med. 2015, 1–11.
- Siddhuraju, P., Becker, K. 2003. Antioxidant Properties of Various Solvent Extracts of Total Phenolic Constituents from Three Different Agroclimatic Origins of Drumstick Tree (*Moringa oleifera* Lam.) Leaves. J. Agric. Food Chem. 51, 2144–2155.
- Singh, B., Singh, J.P., Kaur, A., Singh, N.2016.Bioactive compounds in banana and their associated health benefits: A review. Food Chem. 1–44.
- Tanko, H., Carrier, D. J., Duan, L., Clausen, E. 2005. Pre- and post-harvest processing of medicinal plants. Plant Gen. Res. 3, 304–313.
- Zakaria, Z.A., Somchit, M.N., Zaiton, H., Mat Jais, A. M., Sulaiman, M.R., Farah, W.O., Nazaratulmawarina, R. Fatimah, C.A. 2006. The in vitro antibacterial activity of *Corchorus olitorius* extracts. Int. J. Pharmacol. 2, 213–215.

Caractérisation chimique de l'huile d'écotypes d'olivier identifiés dans l'oasis de Degache (Tozeur, Tunisie)

Fathi Ben Amar[1], Mohamed Ayadi[1] et Sihem Ben Maachia[2]
[1]Institut de l'Olivier, Sfax, Tunisie
[2]Centre Régional de Recherches en Agriculture Oasienne, Tozeur, Tunisie

Résumé
La prospection de l'olivier dans l'oasis de Degache (Tozeur) durant la période 2010-2012 a permis d'identifier 53 écotypes. La présente communication a pour objectif la caractérisation chimique de l'huile de 17 écotypes. L'acidité des huiles ne dépasse pas la valeur de 1,1. Les extinctions spécifiques dans l'ultraviolet K232 varie de 1,79 à 2,99 et celle K270 varie de 0,05 à 0,2. L'indice de réfraction oscille entre 1,46 à 1,48. La teneur en polyphénols varie largement selon les écotypes de 71,1 à 796,1 ppm. La teneur chlorophyllienne est comprise entre 0,14 et 3,28 ppm alors que les pigments caroténoïdes ont des valeurs entre 1,26 et 13,6 ppm. Pour les acides gras, le pourcentage varie de 11,8 à 23,4 pour l'acide palmitique, de 47,1 à 73,9 pour l'acide oléique, de 8,8 à 22,5 pour l'acide linoléique et de 1,1 à 5,4 pour l'acide stéarique. Il ressort de ces résultats que la plupart des écotypes d'olivier étudiés ont des huiles de type 'vierge extra' et les huiles de certains écotypes répondent aux normes de bonne qualité surtout au niveau des taux de polyphénols, d'acide palmitique et d'acide oléique. L'étude approfondie des performances agronomiques des élites peut aboutir à la sélection d'écotypes d'olivier adaptés aux oasis du sud tunisien.
Mots-clés : Composition chimique, Diversité, Ecotypes, Huile, Olive.

SAMMARY
The prospection of the olive tree in the oasis of Degache (Tozeur) during the period 2010-2012 allowed to identify 53 ecotypes. The present communication aims to present the oil chemical characterization of 17 ecotypes. The oil acidity does not exceed the value of 1.1. The specific extinctions in the K232 ultraviolet range from 1.79 to 2.99 and that K270 varies from 0.05 to 0.2. The refractive index oscillates between 1.46 and 1.48. The polyphenol content varies widely according to the ecotypes from 71.1 to 796.1 ppm. The chlorophyll content is between 0.14 and 3.28 ppm while the carotenoid pigments have values between 1.26 and 13.6 ppm. For fatty acids, the percentage varies from 11.8 to 23.4 for palmitic acid, from 47.1 to 73.9 for oleic acid, from 8.8 to 22.5 for linoleic acid and from 1.1 to 5.4 for stearic acid. These results show that most of the olive ecotypes studied have 'extra virgin' type oils and the oils of certain ecotypes meet good quality standards, especially with regard to the levels of polyphenols, palmitic acid and oleic acid. The in-depth study of the agronomic performances of the elites can lead to the selection of olive ecotypes adapted to the oases of southern Tunisia.
Key words: Chemical composition, diversity, ecotypes, oil, olive.

1. INTRODUCTION

Le patrimoine variétal oléicole de la Tunisie est très riche en variétés bien que l'oliveraie tunisienne est dominée par les variétés Chemlali Sfax et Chétoui pour l'olive à huile et Meski pour l'olive de table (Ben Amar et al. 2010).
La caractérisation primaire de l'olivier concerne les paramètres morphologiques des organes de l'arbre (COI, 1997a). La caractérisation secondaire se base sur les caractères agronomiques, pathologiques et chimiques de l'huile (COI, 1997b). La caractérisation chimique de l'huile ainsi que les normes de bonne qualité ont été rapportées par COI (2016).
L'étude chimique de l'huile d'olive est jugée très importante pour la détermination de sa qualité. Selon la norme du Conseil Oléicole International, la qualité des huiles d'olive est un ensemble de caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques permettant le classement des huiles en différentes catégories (COI, 2016). Cette qualité est influencée par plusieurs facteurs tels que les

techniques culturales, l'apport hydrique, le stade de maturité, les techniques d'extraction et les conditions de stockage (Pinatel et al, 2004). Les analyses physicochimiques concernent l'acidité libre, l'indice de réfraction, les coefficients d'extinctions spécifiques K232 et K270, la teneur en chlorophylles et en carotènes, la teneur en composés phénoliques et la composition en acides gras.

L'acidité libre est exprimée en pourcentage d'acide oléique de l'huile d'olive. Elle constitue un moyen simple et efficace pour l'évaluation qualitative et la classification par catégorie commerciale des huiles d'olive (COI, 2016).

L'indice de réfraction des huiles dépend de la structure des acides gras et du degré d'estérification (Gunstone, 2004). Il augmente avec le degré d'insaturation et prend des valeurs plus élevées pour les monoglycérides que pour les triglycérides. Toute variation de ce paramètre peut indiquer une modification de la composition glycéridique de l'huile et reflète une éventuelle modification de nature physique (Ouedrhiri et al. 2017).

La stabilité oxydative est un paramètre important pour l'évaluation de la qualité de l'huile d'olive. Elle se définit comme étant le temps nécessaire pour que l'huile d'olive commence à présenter des symptômes de rancissement suite à l'oxydation accélérée des acides gras insaturés (Salvador et al. 2000). Le recours à la détermination des coefficients d'absorbance dans l'ultraviolet (K232, K270) renseigne sur la présence ou l'absence de produits d'oxydation secondaire dans l'huile (Salvador et al. 2000).

La teneur des pigments chlorophylliens dans l'huile d'olive vierge fraîchement extraite à partir d'olives mûres varie de 1 à 10 mg / kg d'huile selon Fedeli (1977).

La teneur en caroténoïdes dans l'huile d'olive oscille entre 1 à 100 ppm, avec une prédominance du β-carotène (Tsimidou et al. 2004). Les caroténoïdes possèdent une activité antioxydante (Giuffrida et al., 2007).

Les composés phénoliques sont les antioxydants de l'huile d'olive les plus importants vu leur action à la fois antioxydante et nutritionnelle (Manai et al. 2007). Ces composés affectent la stabilité de l'huile d'olive et contribue à sa saveur et sa qualité aromatique et en particulier la qualité gustative (Salvador et al. 2000). La teneur en polyphénols de l'huile d'olive varie en général entre 50 et 500 mg/kg et peut atteindre la valeur de 800 mg/kg (Abaza et al. 2005).

Concernant la composition acidique, une bonne huile doit contenir des taux réduits en acides gras polyinsaturés et des taux élevés en acides gras monoinsaturés vu leur action surtout sur le taux de cholestérols et les maladies cardiovasculaires (D'Imperio et al. 2007). Les normes du COI (2016) précisent une marge pour les acides gras qui est de 55 à 83 % pour l'acide oléique, de 7,5 à 20 % pour l'acide palmitique, de 2,5 à 21 % pour l'acide linoléique et de 0,5 à 5 % pour l'acide stéarique.

Le présent article se propose de présenter les résultats des analyses physico-chimiques de l'huile de 17 écotypes d'olivier de l'oasis de Degache (Tozeur, Tunisie) qui ont été caractérisés sur le plan morphologique par Ben Amar et al. (2017).

2. MATERIEL ET METHODES

L'échantillonnage de fruits a été effectué à un stade de maturité entre 3 et 4 selon l'échelle de Hermoso et al. (1991) et l'huile a été extraite par un oléodoseur au laboratoire. Les analyses chimiques suivantes ont été faites :

- L'acidité (Ac) est définie comme étant le pourcentage d'acide gras libres résultants de l'hydrolyse des triglycérides et exprimée en acide oléique (g/100g d'huile). Le dosage des acides gras libres se fait par une solution titrée de soude (Wolff, 1968).
- L'oxydation d'un corps gras conduit à la formation d'hydro-peroxydes linoléiques qui absorbe la lumière au voisinage de 232 nm (K232). Si l'oxydation se poursuit, il y aura la formation des produits secondaires d'oxydation en particulier les cétones et les aldéhydes qui absorbent la lumière vers 270nm (K270). La matière grasse étudiée est dissoute dans le solvant requis, puis l'extinction de la solution est déterminée aux longueurs d'onde prescrites, par rapport au solvant pur. Les extinctions spécifiques sont calculées à partir de la lecture spectrophotométrique.
- Le dosage des phénols totaux (PP) est basé sur le couplage du Folin-Ciocalteu avec les composants phénoliques du matériel végétal (dosage spectrophotométrique). La méthode appliquée

pour extraire les composés phénoliques est celle de l'extraction liquide- liquide selon Pirisi et al. (2000).

- L'indice de réfraction (IR) est déterminé par le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée passant de l'air dans l'huile à la température constante (20° C) en utilisant le réfractomètre (Lion, 1955).
- La détermination de la teneur en chlorophylles (Chl) dans les huiles d'olives se réalise selon la méthode de Wolf (1968). On place l'échantillon à étudier dans une cuve en verre de 1cm d'épaisseur et on mesure d'absorbance à différentes longueurs d'onde 630, 670 et 710 nm par rapport à une cuve témoin remplie de tétrachlorure de carbone.
- Pour déterminer la teneur en caroténoïdes (Ca), on mesure l'absorbance à 470 nm de 3 g d'huiles dissoutes dans 10 ml de cyclohexane.
- L'analyse des acides gras s'effectue en deux étapes, préparation des esters méthyliques et analyse chromatographique des esters méthyliques obtenus. Les esters méthyliques des acides gras E.M.A.G sont obtenus par réaction de trans méthylation et sont analyses à l'aide d'un appareil de type Shimadzul 17A avec un détecteur à ionisation de flamme et une colonne capillaire. Le détecteur placé à la sortie de la colonne permet de repérer la concentration de chaque composant et de la convertir en signal électrique qui peut être enregistré sur un enregistreur sous forme de pics. Les acides gras présentés dans cette étude sont l'acide oléique (Ol), l'acide palmitique (Pa), l'acide linoléique (Lin) et l'acide stéaque (St).

3. RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats des analyses physico-chimiques sont présentés dans les tableaux 1 et 2.

3.1. Acidité libre

La plupart des huiles ont une acidité inférieure à 0,8 et leurs huiles sont classées 'vierge extra' selon les normes de COI (2016) à l'exception des écotypes DG4, DG5, DG6 et DG42 dont l'huile a une acidité libre de 0,8 à 1,1. Puisque cet indice dépend plutôt des procédures de récolte, de transport, de stockage et d'extraction (COI, 1997b), il peut être amélioré pour l'écotype DG6 pour être dans les normes de qualité.

3.2. Indice de réfraction

Ce paramètre varie légèrement de 1,467 à 1,472. La faible variation de ce paramètre indique une stabilité de la composition glycéridique des huiles testées.

3.3. Extinctions spécifiques

L'extinction spécifique K232 varie de 1,79 à 2,99 et celle à 270 nm varie de 0,05 à 0,2. En se basant sur les normes de qualité de COI (2016), il ressort que neuf écotypes ont une valeur K232 inférieur à 2,5 qui renseigne sur une limite supérieure de l'oxydation primaire. Pour K270, nous constatons que tous les écotypes ont une valeur inférieure à 0,22 qui indique la limité supérieure de l'oxydation secondaire selon COI (2016). Ainsi, la plupart des huiles testées sont dans un état d'oxydation acceptable.

3.4. Teneurs en pigments

La teneur en chlorophylles des écotypes testés est comprise entre 0,14 et 3,28 ppm. Nous constatons que 12 écotypes ont une teneur en chlorophylles inférieure à 1 et cinq écotypes seulement répondent aux valeurs établies par Abaza et al. (2005) de 1 à 100 ppm. Il s'agit des écotypes DG15, DG26, DG27, DG29 et DG31.

La teneur en pigments caroténoïdes varie entre 1,26 et 13,6 ppm selon l'écotype avec une valeur maximale pour l'écotype DG42. Ainsi, tous les écotypes répondent aux normes de qualité établies par Abaza et al. (2005).

3.5. Teneurs en polyphénols

La teneur en polyphénols varie largement selon les écotypes de 71,1 à 796,1 ppm avec la distinction des écotypes DG1, DG3, DG5 et DG27 dont les huiles contiennent plus de 500 ppm. Nous pouvons conclure que toutes les huiles testées ont une teneur en polyphénols conforme aux normes de qualité rapportées par Abaza et al. (2005).

3.6. Composition en acides gras

Pour la composition en acides gras, le pourcentage varie de 11,8 à 23,4 pour l'acide palmitique, de 47,1 à 73,9 pour l'acide oléique, de 8,8 à 22,5 pour l'acide linoléique et de 1,1 à 5,4 pour l'acide stéarique.

En se référant aux normes de COI (2016), six écotypes ont des valeurs en dehors ou dans les limites des normes et qui sont DG1, DG5, DG30, DG36, DG40 et DG42. En conséquence, il ressort que les écotypes DG3, DG4 et DG32 ont une bonne composition acidique de leurs huiles.

Tableau 1. Variation des paramètres de qualité de l'huile selon les écotypes

Ecotype	IR	Ca	Ac	Chl	PP	K232	K270
DG1	1,471	2,97	0,35	0,99	691,07	2,99	0,08
DG3	1,469	2,45	0,73	0,87	796,07	2,46	0,09
DG4	1,470	1,65	0,82	0,94	336,08	2,33	0,06
DG5	1,470	1,27	0,81	0,14	603,57	2,73	0,07
DG6	1,471	2,00	1,10	0,43	395,24	2,09	0,11
DG13	1,471	1,92	0,55	0,45	233,58	2,74	0,09
DG14	1,472	2,77	0,80	0,98	456,08	1,98	0,06
DG15	1,469	5,08	0,47	3,29	226,91	2,41	0,07
DG26	1,467	5,67	0,47	4,02	274,41	2,19	0,06
DG27	1,468	9,68	0,39	9,10	795,24	2,07	0,09
DG29	1,471	12,30	0,22	7,19	200,25	2,26	0,05
DG30	1,472	2,47	0,48	0,55	169,41	2,56	0,09
DG31	1,471	5,52	0,37	4,45	356,91	1,91	0,07
DG32	1,468	3,10	0,39	0,48	76,10	2,02	0,16
DG36	1,472	1,90	0,40	0,86	303,58	1,79	0,07
DG40	1,468	6,10	0,38	0,24	155,20	2,73	0,20
DG42	1,468	13,60	0,85	0,54	71,10	2,50	0,19

Tableau 2. Variation des teneurs en acides gras des huiles selon les écotypes

Ecotype	Ol	Pa	Lin	St
DG1	54,10	19,20	20,80	2,10
DG3	73,00	11,80	10,60	1,10
DG4	66,30	15,60	11,20	2,70
DG5	51,60	19,80	22,50	2,60
DG6	62,00	14,70	18,30	1,60
DG13	62,30	19,00	12,00	1,70
DG14	63,20	16,60	12,50	4,00
DG15	64,40	15,80	12,10	2,30

DG26	63,30	17,00	13,10	2,40
DG27	61,60	16,80	14,60	2,70
DG29	64,00	16,10	12,90	3,40
DG30	55,60	19,50	18,50	2,40
DG31	57,10	19,00	16,50	2,40
DG32	66,00	16,20	8,80	5,40
DG36	47,10	23,40	21,20	2,20
DG40	55,20	18,00	20,50	2,40
DG42	53,90	19,10	20,80	2,60

4. CONCLUSION

La présente étude confirme la diversité génétique de l'olivier en Tunisie et montre que la sélection de génotypes performants sur le plan de la qualité de l'huile est possible dans les oasis de la Tunisie. La sélection finale permettra de promouvoir le secteur oléicole dans la région sud-ouest de la Tunisie qui connait à la fois un manque de variétés locales et un essor de la culture de l'olivier.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le ministère de l'Agriculture, des Ressources hydrauliques et de la Pêche (IRESA) et le ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique pour leur aide financier.

REFERENCES

- Abaza L, Taamalli W, Ben Temime S, Daoud D, Gutierrez F, Zarrouk M. 2005. Natural antioxidant composition as correlated to stability of some Tunisian virgin olive oils. Riv Ital Sostanze Grasse, **82**, 12–18.
- Ben Amar F, Msallem M, Khabou W, Guedri F, Larguech I, Yengui A, Belguith H, Ouled Amor A. 2010. Ressources génétiques de la collection de l'olivier à Boughrara (Tunisie). Actes du séminaire international « la gestion et la conservation de la biodiversité continentale dans le bassin méditerranéen » à Tlemcen (Algérie).
- Ben Amar F, Ben Maachia S, Yengui A. 2017. Catalogue des ressources génétiques de l'olivier dans l'oasis de Degache (Tunisie). Editions FAO. 128 pages illustrées.
- COI. 1997 a. Méthodologie pour la caractérisation primaire des variétés d'olivier. Projet RESGEN 97. 10p.
- COI. 1997 b. Encyclopédie mondiale de l'olivier. Ed Conseil Oléicole International. Madrid. Espagne.
- COI. 2016. Norme commerciale applicable aux huiles d'olive et aux l'huiles de grignions d'olive. T. 15/NC n° 3/Rév. 6.
- D'imperio M, Dugo G, Alfa M, Mannina L, Segre A. 2007. Statistical analysis on Sicilian olive oils. Food Chem. **102**, 956-965. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.03.003
- Fideli E . 1977. Lipids of olives".Prog.Chem. Fats Other Lipids, **15**, 57 - 74.
- Giuffrida D, Salvo F, Salvo A, La Pera L, Dugo G. 2007. Pigments composition in monovarietal virgin olive oils from various Sicilian olive varieties. Food Chemistry. **101**, 833-837.
- Gunstone F.D. 2004. The Chemistry of Oils and Fats Sources, Composition, Properties and Uses. Oxford, UK : Blackwell Publishing
- Hermoso M, Uceda M, García-Ortiz A, Morales J, Frías L, Fernández A. 1991. Elaboración de aceite de oliva de calidad. Colección: Apuntes, nº 5/91. Dirección General de Investigación, Tecnología y Formación Agroalimentaria y Pesquera. Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía, Sevilla, 173.
- Lion P.H. 1955. Travaux pratiques de chimie organique. Ed Dunod. Paris.

- Manaî H, Mahjoub Haddada F, Trigui A, Daoud D, Zarrouk M. 2007. Compositional quality of virgin olive oil from two new Tunisian cultivars obtained through controlled crossings. J Sci Food Agric, **87**, 600–606.
- Ouedrhiri M, Benismail C, El Mohtadi F, Achkari-Begdouri A. 2017. Evaluation de la qualité de l'huile de pulpe d'olive vierge de la variété Picholine marocaine. Rev. Mar. Sci. Agron. Vét, **5 (2)**, 142-148.
- Pinatel C, Petit C, Olivier D, Artaud J. 2004. Outil pour l'amélioration organoleptique des huiles d'olive vierges. Oléagineux, Corps Gras, Lipides, **11(3)**, 217-222.
- Pirisi FM, Cabras P, Caoo CF, Migliorini M, Magelli M. 2000. Phenolic compounds in virgin oil. 2. Reappraisal of the extraction HPLC separation, and quantification procedures. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **48**, 1191–1196.
- Salvador MD, Aranda F, Gomez-Alonso S, Fregapane G. 2000. Quality characteristics of Cornicabra virgin olive oil. Res Adv Oil Chem, **1**,31–39.
- Tsimidou M, A. Georgiou A. Koidis. 2004. Loss of Stability of "veiled" (cloudy) Virgin Olive Oils in Storage. Food Chem, **93**, 377-383.
- Wolff P. J. 1968. Manuel d'analyse des corps gras. Ed AZOULAY., Paris.

Physicochemical properties, deoxynivalenol content and total antioxidant activity in whole grains of barley (*Hordeum vulgare. L*) grown in Tunisia

Teber Hajji[a*], Sonia Mansouri[b], Debora Giordano[c], Massimo Blandino[c], Amedeo Reyneri[c], Cyrine Darej[d], Ali Ferchichi[d,e]

[a]University of Tunis El Manar, Faculty of Sciences of Tunis, Department of Biology, Campus Universitaire, El Manar II 2092 Tunis, Tunisia

[b]National Institute for Agricultural Research of Tunisia, Field Crop Laboratory, Rue Hédi Karray, 2049 Ariana, Tunisia

[c]University of Torino, Department of Agriculture, Forest and Food Sciences, via Leonardo da Vinci 44, Largo Braccini 2, 10095 Grugliasco, TO, Italy

[d]University of Carthage, National Institute of Agronomy of Tunisia, 43 Avenue Charles Nicolle, Cité Mahrajène 1082 Tunis, Tunisia

[e] Institute of Arid Areas, Drylands and Oases Cropping Laboratory, Médenine 4119, Tunisia

*Email: hajji.teber123@gmail.com

SUMMARY

In the present study, twenty one barley genotypes (*Hordeum vulgare L.*) from different locations of Tunisia were analyzed for their physical properties (Test weight, thousand kernel weight and hardness), biochemical composition (contents of β-glucan, total proteins, starch, ashes and cellulose), deoxynivalenol (mycotoxins) and their total antioxidant activity (TAA). The samples included local cultivars and commercial varieties. The results suggested a specific (test) weight (TW) ranging between 56.53 and 67.67 Kg/hl; a thousand grain weight (TKW) between 31.97g and 51.71g. The hardness was between 2518.63 ± 11.40 W for the cultivar 'Ardhaoui Tataouine' and 3119.25 W for the barley 'Rihane'. The results showed that concentrations of β-glucan range from 3.46 to 5.12 g/100 g. Total proteins content of the barley samples ranged between 8.9 and 12.6 g/100g. The concentrations of mycotoxins were very low in all barley samples (DON < 37 ppb). The results showed a wide range of total antioxidant activity in the barley samples (TAA > 18.61±0.62 mmol Trolox eq/Kg DW). In synthesis, barley should be considered a good source of bioactive components, especially because of the soluble fiber β-glucan with potential health benefits besides the antioxidant power highlighting the presence of considerable amounts of phytochemicals and antioxidants.

Key words: Barley, test weight, hardness, bioactive compounds, deoxynivalenol, total antioxidant activity

RESUME

Dans la présente étude, vingt-un génotypes d'orge (*Hordeum vulgare L.*) provenant de différentes régions de la Tunisie ont été analysés : pour leurs propriétés physiques (poids spécifique, poids de mille grains et dureté), leur composition biochimique (amidon, cendres, protéines totales, teneur en β-glucane, cellulose etc.) le désoxynivalénol (mycotoxines) et leur activité antioxydante totale (TAA). Les échantillons comprenaient des cultivars locaux et des variétés améliorées. Les résultats suggèrent un poids spécifique (PS) compris entre 56,53 et 67,67 kg / hl; un poids de mille grains (PMG) entre 31,97 g et 51,71 g. La dureté était comprise entre 2518,63 ± 11,40 W pour le cultivar 'Ardhaoui Tataouine' et 3119,25 W pour l'orge 'Rihane'. Les résultats ont montré que les concentrations de β-glucane varient de 3,46 à 5,12 g / 100 g. La teneur en protéines totale des échantillons d'orge variait entre 8,9 et 12,6 g / 100 g. Les concentrations de mycotoxines étaient très faibles dans tous les échantillons d'orge (DON < 37 ppb). Les résultats ont montré une large plage d'activité antioxydante totale dans les échantillons d'orge (TAA> 18,61±0,62 mmol de Trolox éq/kg de poids sec). En synthèse, l'orge devrait être considérée comme une bonne source de composantes bioactives, notamment en raison de la présence des fibres solubles β-glucanes ayant des effets

bénéfiques sur la santé humaine, outre le pouvoir antioxydant soulignant la présence de quantités considérables de composés phytochimiques et antioxydants.

Mots-clés: orge, poids spécifique, dureté, composés bioactifs, désoxynivalénol, activité antioxydante totale

1. INTRODUCTION

Nowadays, there is great interest in barley (*Hordeum vulgare*) fractions due to its nutritional value, especially because of the dietary fiber content (the presence of non-starch polysaccharides) and natural antioxidants and phenolic compounds (Lahouar et al., 2014; Do et al., 2015). Barley is an important and old cereal that occupies about 9.4% of the total cereal production area in 2017 according to the FAO and 12% of the total cereals grown in 2014. This is one of the world's most cultivated field crops, ranking fourth among cereals after wheat, rice and maize. Barley surpasses other cereals under various environmental constraints due to its drought-resistant and early maturing nature, and is therefore generally more economical to grow (Idehen et al., 2017). In addition, consumption of whole grain cereals has long been considered beneficial to human health (Gangopadhyay et al., 2015; Idehen et al., 2017). Indeed, cereal grains are used as a popular and convenient staple around the world, constituting a major source of energy because of their high carbohydrate content. Its grains are an excellent source of dietary fiber, essential fatty acids, vitamins, non-nutritive compounds including several phenolic compounds and antioxidants (Blandino et al., 2015a,b; Gangopadhyay et al., 2015; Shen et al., 2016; Idehen et al., 2017; Maray et al., 2018). However, barley consumption is still important in some cultures around the world, particularly in Tunisia, the second center of genetic diversity for barley (Abdellaoui et al., 2007a,b, 2010).). Recent experimental studies (Lahouar et al., 2011, 2012) have shown a protective role for Tunisian varieties of barley against several diseases such as cardiovascular diseases and colon cancer. In Tunisia, barley is used for both livestock feed (85%) and human food (15%), with preferred local varieties for food preparations rather than improved cultivars (El Felah & Medimagh, 2005). Even thought, barley is now gaining renewed interest as an efficient ingredient for the production of natural antioxidants and dietary fibers (DF); its quality requirements for food uses have not however been well established, making it difficult for food manufacturers to select raw materials suitable for use in cereal products (Baik et Ullrich, 2008). Herein, the objective of this research work was to carry out a comparative study of variability and magnitude of the physicochemical parameters and to investigate the deoxynivalenol content of some barley genotypes grown in different localizations under different environmental conditions in the Northern and Southern of Tunisia. We also assessed changes in the total antioxidant activity of the scavenging capacities against DPPH radicals of barley grains.

2. Material and methods

2.1. Plant material

Plant materials tested in this study were twenty one genotypes of covered and six-rowed barley. Four improved varieties (Rihane, Manel, Konouz and Lemsi), were obtained from the Experimental Research Station of the National Institute for Agricultural Research of Tunisia (INRAT), Field Crop Laboratory located at Beja, 100 Km North-West of Tunisia. Fourteen local populations cultivated in different regions of Tunisia under different environmental conditions. This plant material is provided by the Field Crops Laboratory of INRAT. Three populations of the same cultivar “Ardhaoui”, grwon in three different areas in the Southern of Tunisia, were provided by the Institute of Arid Areas, Drylands and Oases Cropping Laboratory.

2.2. Chemicals

The Mixed-Linkage β-Glucans kit for the enzymatic determination was supplied by Megazyme (Megazyme International Ireland Ltd, Wicklow, Ireland). The solvents (Methanol HPLC) and 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) were purchased from Sigma Aldrich (Milan, Italy). The water was obtained from Milli-Q Instrument (Millipore Corp., Bedford, MA, USA). All the other chemicals were used for analytical grade and purchased from Sigma Aldrich (Milan, Italy). Distilled water was used throughout all the analysis.

2.3. Physicochemical parameters

All samples were characterized for the following parameters: grain yield, test weight (TW), thousand kernel weight (TKW), hardness, and deoxynivalenol (DON) contamination.

Their nutritional quality was assessed for moisture contents, ashes, starch, total protein content (TPC), cellulose, and β-glucan content. The moisture concentration and the TW were determined by means of a Dickey-John GAC2100 grain analysis meter (Dickey-John Corp. Auburn, IL, USA) using the supplied program. Two hundred kernels were randomly collected from each 1 Kg sample and weighed using an electronic scale to assess the TKW. Starch, TPC and cellulose were determined by near-infrared transmittance technology, using an InframaticTM1241 Grain Analyzer instrument (Perten, Instruments, Germany) and presented on a dry matter basis (Blandino et al., 2013; Sovrani et al., 2012).

A 20 g sample of the milled material was analyzed for DON. The DON contaminations were analyzed according to the ELISA method, Ridascreen® DON (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany). Briefly, DON was extracted from 20 g samples in a glass centrifuge bottle with 100 ml of distilled water by shaking for 15 min. The super-natant was filtered through Whatman®No. 1 filter paper and 50 lof the filtrate (range 18.5–500 g/Kg) or a 1:10 diluted filtrate (range 185–5000 g/Kg) were used for photometrical quantification at 450 nm, using a plate reader (Digital & Analog Systems srl, Ralombara Sabina, RM; Italy).

2.4. Total antioxidant activity (TAA)

The antioxidant activity (TAA) was determined using DPPH method (direct measurement on solid samples), as previously described by Gökmen et al. (2009), with some minor modification. DPPH antiradical activity was determined in both methanolic (DPPH MeOH) and hydro-alcoholic (DPPH H2O) solutions. As far as the DPPH MeOH method is concerned, the samples were opportunely weighted (0.5 – 20 mg, in order to obtain final inhibition percentage values < 70%), then 700 mL of methanol and 700 mL of a 100 mM DPPH methanolic solution were added. The reaction was carried out in the dark under stirring for 25 min, then the samples were promptly centrifuged for 1 min at 14 000 rpm (Micro-centrifuge 5417 R, Eppendorf Italia, Milan, Italy), and absorbance was measured at 515 nm after exactly 30 min of reaction (Evolution 60S spectrophotometer, Thermo Scientific, Milan, Italy). A control solution (without sample) was tested under the same conditions, in order to calculate the DPPH inhibition percentage (IP). The DPPH H2O method was performed in the same way as described for the DPPH in the methanolic solution, but adding 1400 mL of water and 1400 mL of DPPH methanolic solution to the solid samples (barley flour). The final results were expressed as mmol of trolox equivalents (TE) per Kg of sample (DW) through a calibration curve.

2.5 Statistical analyses

All the analyses were performed at least in triplicate; the results for the barley samples are reported as the means of the three replicates ± standard error. Significant differences were estimated by means of analysis of variance (ANOVA). The residual normal distribution was verified using the Student-Newman-Keuls test. Statistical analysis was carried out using SAS (V.9.1). Proc ANOVA with the option of $LSD_{0.05}$ to compare means was used for each trait.

3. Results and discussion

3.1. Physical characteristics and DON of barley grain

The physical characteristics of the barley seeds of the 21 Tunisian cultivars studied are essentially the grain yield expressed in %, the test weight (TW), the thousand kernel weight (TKW) and the hardness measured by the grinding energy expressed in Watt (W). With the exception of grain yield, which was measured at one time, ANOVA showed highly significant differences ($P < 0.0001$) between TW and TKW of all genotypes evaluated in this study, and slightly significant differences ($P < 0.05$) for the parameter of hardness measured by grinding energy.

Grain yield expressed as a percentage (%) and determined at the maturity of the crops, using a Walter Wintersteiger cereal combine, ranged from 35.11% for the improved variety "Rihane" to 53.33% for local barley from Kef. This parameter is highly variable with the season and thus depends on environmental, agronomic and climatic conditions, especially rainfall (Baik and Ullrich 2008, Marinaccio et al., 2015). The improved varieties and local barley have specific weights (TWs) from 64.33±0.06 to 67.67±0.06 Kg/hL, thus meeting the Tunisian standard which requires a specific weight above 60 Kg/hL for barley to be marketable (NT.51.61, 2004). In contrast, the three populations of "Ardhaoui" cultivar grown in three different regions of southern Tunisia had specific weights of less than 60 kg / hL. TKW ranged from 31.97 ± 0.45g to 51.71 ± 0.73g, indicating that barley in these cultivars has good grains and subsequently influences flour yields. Therefore, these cultivars are considered loyal and healthy to the required standard. This could be explained by genetic, environmental and agronomic factors that often influence the physical characteristics of cereal grains (Marinaccio et al., 2015). The grain hardness measured by the grinding energy varied from 2518.63 ± 11.40 W for the cultivar 'Ardhaoui Tataouine' to 3119.25 ± 6.89 W for the improved variety 'Rihane'. ANOVA shows that there was a significant difference ($P = 0.0122 < 0.05$) between the hardness values of all genotypes studied. The three 'Ardhaoui' populations grown in southern Tunisia were less harsh than the other cultivars. This could be explained by the genotype and chemical composition that is often strongly related to the environmental and agronomic conditions, as well as the storage of grain during storage (Baik and Ullrich 2008; Marinaccio et al. 2015). The content of deoxynivalenols (DON) sought in the selected barley grains, expressed in parts per billion (ppb), is reported in Table 1. This analysis was determined once for barley meal from the kernels. As shown in Table 1, all cultivars had DON levels of less than 37 ppb (< 37 ppb), with the exception of the three local barley varieties of Bizerte, Beja and Nabeul reported DON levels of 54.17, 39.27 and 57.22 ppb, respectively, which are relatively higher than in other cultivars. This is explained by the differences in climatic conditions in the geographical cultivation sites, as these local barleys are grown in sub-humid regions of northern Tunisia where there was sometimes an excess of humidity and temperature during the winter season, which promotes the development of these substances at the time of flowering cereals. However, in all cases, it should be noted that all recorded values are much lower than the limit of detection of mycotoxins which was between 20 and 1000 µg / Kg. As a result, these barley products are considered healthy and do not contain toxic substances of mycotoxins, which can be used in the food industry and consumed by humans. These found results are much better than those found by Sovrani et al. (2012) for different pearled fractions of some varieties of durum and soft wheat grown in northwestern Italy (28 - 1789 µg/Kg).

Table 1. Main physical characteristics and the DON content of the different barley genotypes

Cultivars	Grain yield (qx/ha)	TW (Kg/hL) ***	TKW (g) ***	Hardness (W)*	DON (mg/Kg)
Manel	40.73	65.03±0.15^{c}	41.78±1.15^{e}	2980.38 ±58.25^{ab}	< 37
Rihane	35.11	64.87±0.15^{c}	39.74±0.71^{f}	3119.25 ± 6.89^{a}	< 37
Kounouz	39.71	64.33±0.06^{c}	35.47±1.13^{g}	2954.00±80.96^{ab}	< 37
Lemsi	36.8	64.84±0.17^{c}	31.97±0.45^{h}	2798.13±127.37^{abc}	< 37
Ardhaoui Kerkennah	47.52	59.77±0.59^{f}	46.67±0.15^{d}	2650.63±131.43^{bc}	< 37
Ardhaoui Djerba	41.64	57.83±0.25^{h}	43.31±1.04^{e}	2825.38 ±107.22^{abc}	< 37
Ardhaoui Tataouine	45.9	56.53±0.40^{i}	41.71±1.23^{e}	2518.63 ±11.40^{c}	< 37
Local barley Bizerte	44.77	59.57±0.23^{f}	42.57±0.32^{e}	2811.63±18.47^{abc}	54.17
Local barley Béja	49.72	63.70 ±0.46^{d}	48.26±0.54^{c}	2980.13±5.39^{ab}	39.27
Local barley Jendouba	46.49	57.73 ±0.21^{h}	43.56±1.45^{e}	2831.50±25.81^{abc}	< 37
Local barley Kef	53.33	59.93±0.31^{f}	50.37±1.24^{ab}	2919.75±3.01^{ab}	< 37
Local barley Nabeul	50.87	62.03±0.68^{e}	49.13±0.67^{bc}	2928.50±11.67^{ab}	57.22
Local barley Zaghouan	35.89	58.97±0.49^{g}	33.04±0.54^{h}	2978.00±6.72^{ab}	< 37
Local barley Sousse	44.29	58.77 ±0.15^{g}	36.46±0.51^{g}	2912.00±2.12^{abc}	< 37
Local barley Monastir	47.68	60.20 ±0.44^{f}	45.88±0.82^{d}	2866.50±14.85^{abc}	< 37

Local barley Kairouan	44.2	59.73 ±0.49^{f}	43.63±0.66^{e}	2806.00±2.83^{abc}	< 37
Local barley Sfax	51.37	66.60 ±0.00^{b}	51.71±0.73^{a}	2861.00±12.73^{abc}	< 37
Local barley Gafsa	48.3	62.37 ±0.32^{e}	45.90±0.86^{d}	2828.75±11.67^{abc}	< 37
Local barley Kerkennah	38.01	60.00 ±0.30^{f}	35.01±0.92^{g}	2854.75±29.88^{abc}	< 37
Local barley Gabès	44.57	67.67±0.06^{a}	42.98±0.70^{e}	2965.25±15.38^{ab}	< 37
Local barley Djerba	40.39	60.17 ±0.29^{f}	35.49±0.46^{g}	2812.23±37.81^{abc}	< 37

Grain yield and DON were determined as one replicate. Statistical significance was evaluated separately for each barley cultivar. The same letter indicates no difference between cultivars (within column) as determined using the LSD at 5% level.

3.2. Chemical compounds in the barley flour

The mean of moisture contents, ashes, starch, total proteins, cellulose and β-glucan values for each cultivar are reported in Table 2. The ash, starch, total proteins, and β-glucan contents of the barley whole grain showed large amounts in all cultivars as illustrated in Table 2. ANOVA revealed significant differences ($P < 0.05$) between the kernel flours for all the considered parameters. All genotypes had different moisture content; differences were statistically significant ($P < 0.0001$). The ash content was on average 2.10% in Manel variety and 2.86% in Ardhaoui Tataouine, but little higher in the local varieties than in the improved varieties and there were significant differences ($P < 0.001$). A progressive decrease in the percentage of ashes was observed, thus confirming that the environmental conditions and genetic makeup can influence distribution of minerals. These differences may be due to the genotype variations and climate changes. Starch was very important in all genotypes; all recovered values were more than 54.10%. It was equally distributed in all barley cultivars.

Table 2. Nutritional quality (g/100g DW) of barley flour

Genotype	Moisture (%)	Ashes (%)	Starch (%)	TPC (%)	Cellulose (%)	B-glucan (%)
Manel	9.14±0.17^{def}	2.10±0.04^{g}	54.70±0.62^{de}	10.57±0.15^{d}	4.80±0.26^{ab}	3.69±0.08^{ef}
Rihane	10.35±0.01^{ab}	2.29±0.05^{ef}	55.03±0.21^{cde}	10.73±0.06^{cd}	4.37±0.12^{bcdefg}	4.24±0.27^{bcd}
Kounouz	10.17±0.01^{abc}	2.32±0.02^{e}	55.37±0.57^{cd}	10.63±0.12^{d}	4.30±0.20^{cdefgh}	4.31±0.25^{bcd}
Lemsi	9.59±0.16^{bcde}	2.25±0.05^{ef}	54.50±1.31^{de}	11.17±0.15^{b}	4.73±0.46^{abc}	4.26±0.08^{bcd}
Ardhaoui Kerkennah	9.84±0.04^{abcde}	2.34±0.05^{e}	55.03±0.06^{cde}	11.10±0.00^{b}	4.83±0.15^{a}	4.65±0.10^{ab}
Ardhaoui Djerba	10.56±0.08^{a}	2.62±0.03^{bc}	56.63±0.49^{ab}	10.10±0.10^{e}	4.03±0.21^{efghij}	4.27±0.02^{bcd}
Ardhaoui Tataouine	10.06±0.17^{abcd}	2.86±0.00^{a}	55.57±0.12^{cd}	11.13±0.06^{b}	4.50±0.10^{abcde}	4.20±0.04^{cd}
Local barley Bizerte	9.87±0.49^{abcde}	2.41 ±0.05^{de}	55.13±0.06^{cde}	9.27±0.06^{hi}	4.37±0.06^{bcdefg}	3.48±0.10^{f}
Local barley Béja	9.83±0.49^{abcde}	2.28±0.01^{ef}	56.53±0.15^{ab}	9.53±0.06^{g}	3.90±0.10^{ghij}	4.28±0.10^{bcd}
Local barley Jendouba	9.89±0.50^{abcde}	2.69±0.02^{b}	55.30±0.17^{cd}	9.57±0.06^{g}	4.67±0.06^{abcd}	4.69±0.10^{a}
Local barley Kef	9.09±0.53^{ef}	2.16±0.01^{fg}	56.60±0.17^{ab}	9.13±0.12^{i}	4.03±0.06^{efghij}	4.21±0.22^{bcd}
Local barley Nabeul	10.50±0.52^{ab}	2.52±0.05^{cd}	55.93±0.06^{bc}	8.67±0.12^{k}	4.00±0.10^{fghij}	4.61±0.20^{abc}
Local barley Zaghouan	9.86±0.49^{abcde}	2.39±0.04^{de}	55.17±0.21^{cde}	9.60±0.10^{g}	4.27±0.15^{defgh}	4.22±0.23^{bcd}
Local barley Sousse	9.68±0.48^{abcde}	2.65±0.01^{b}	54.80±0.20^{cde}	11.50±0.10^{a}	4.13±0.06^{efghij}	4.11±0.14^{d}
Local barley Monastir	9.55±0.50^{bcde}	2.41±0.08^{de}	56.73±0.49^{ab}	9.47±0.06^{g}	3.83±0.21^{hij}	4.13±0.17^{d}
Local barley Kairouan	9.97±0.50^{abcde}	2.34±0.01^{e}	57.30±0.20^{a}	8.40±0.10^{l}	3.90±0.10^{ghij}	3.90±0.18^{de}
Local barley Sfax	9.31±0.50^{cdef}	2.31±0.06^{ef}	57.23±0.50^{a}	8.83±0.12^{j}	3.87±0.25^{hij}	4.24±0.02^{bcd}
Local barley Gafsa	10.03±0.49^{abcd}	2.37±0.09^{de}	57.17±0.31^{a}	9.40±0.00^{gh}	3.70±0.10^{ij}	4.07±0.28^{d}
Local barley Kerkennah	10.04±0.48^{abcd}	2.76±0.11^{ab}	55.30±0.20^{cd}	9.80±0.00^{f}	4.17±0.12^{efghi}	4.60±0.13^{abc}
Local barley Gabès	8.80±0.49^{f}	2.35±0.09^{e}	56.90±0.35^{ab}	10.87±0.12^{c}	3.67±0.12^{j}	3.90±0.12^{de}
Local barley Djerba	10.25±0.47^{ab}	2.40±0.03^{de}	54.10±0.00^{e}	11.50±0.10^{a}	4.43±0.06^{abcdef}	4.33±0.05^{abcd}

Statistical significance was evaluated separately for each barley cultivar. The same letter indicates no difference between genotypes (within column) as determined using the LSD at 5% level.

TPC was equally distributed in all cultivars. The local barley of Djerba and Sousse had the most important TPC, followed by Lemsi forage variety and Ardhaoui Tataouine and Kerkennah. The protein content was little higher in the north varieties as compared to south cultivars. Improved varieties showed little more ratios as compared to local cultivars. These differences may be explained by the environmental conditions, cultivars variation and soil composition, and analytical factors (Bettaieb Ben Kaab et al., 2005). All cultivars had low protein levels that did not meet the Tunisian standard, which required a fairly high value (≥ 11.50%) (NT 51.68, 1994). This could be explained by the method used (Infrared Spectrometry) which is in some cases not precise. This trend is explained by genetic factors; in fact, the protein content of barley flour (13%) is lower than that of durum wheat semolina (17%) and soft wheat (15%); genetically, barley is lower in protein than wheat (Abdellaoui et *al.*, 2007 a, b; Hatcher et *al.,* 2008). The cellulose content ranged from 3.67 ± 0.12% for local barley of Gabes to 4.83 ± 0.15% for 'Ardhaoui Kerkennah', which had the best cellulose content, followed by the two improved varieties 'Manel' and 'Lemsi', and the local barley of Jendouba. ANOVA showed highly significant differences ($P < 0.0001$) between the different cultivars studied. The improved varieties showed higher levels of cellulose than local cultivars. This proves that these cultivars are very rich in phenolic compounds, antioxidants and minerals which are generally concentrated in the outer parts of the barley grains (Bleidere et al., 2018).

The content of soluble fibers β-glucan', well recognized for their nutritional and therapeutic importance, ranged from 3.48% for the local barley of 'Bizerte' to 4.69% for that of 'Jendouba'. All cultivars showed percentages that exceeded 4.1%, the value set by the official "Megazyme Kit" method. Thus, we can conclude that Tunisian barley genotypes tested in our study are considered rich in soluble β-glucan fiber. Analysis of variance showed highly significant differences ($P <0.0001$) between all cultivars studied. These differences are due to the genetic variability of barley cultivars, environmental, agronomic and analytical conditions (Agbenorhevi et *al.*, 2011). Soluble dietary fiber content such as β-glucans largely depends on isolation and purification conditions and protocols used during food processing (Skendi et al., 2010; Sharma et al., 2010; Lazaridou et al., 2011).

3.3. Total Antioxidant activity (TAA)

The antioxidant activities of barley flours are determined for whole grains. All the flours of the selected seeds were characterized for their inhibition percentage (IP) and total antioxidant activities (TAA) expressed in mmol equivalent Trolox per kilogram of dry matter (mmol eq Trolox / Kg DW). The results obtained are summarized in Table 3. Scavenging of DPPH radicals is a widely used model to evaluate the free radical scavenging activity of mixed and pure antioxidants level in crops, fruits, vegetables and natural plants (Gökmen et al., 2009; Lee et al., 2016). Barley flour showed high radical scavenging activities with the DPPH radical. Antioxidant properties through DPPH assays showed significant differences ($P < 0.0001$) in each cultivar. IPs recorded for whole grains of local barley were higher than improved varieties. AATs of local barley were higher than improved varieties and Ardhaoui populations. As illustrated in Table 3, all barley genotypes present an IP value showing more than 40.21%. The parameter IP values of the barley flour ranged from 40.21% to 60.94 %.

Indeed, cultivars that are rich in soluble and insoluble fibers and phenolic compounds have shown the best TAAs. All cultivars showed very important TAAs. In fact, mean values of TAA ranged from 18.61 ± 0.62 mmol eq Trolox / Kg DW for 'Ardhaoui Kerkennah cultivar ' to 27.65 ± 1.04 mmol eq Trolox / Kg DW for local barley of Jendouba. All cultivars have very high TAA and are therefore considered rich in antioxidants. Thondre et al. (2011) have previously shown that β-glucan fibers are considered a very rich source of antioxidants.

Lahouar et al. (2014) found significant correlations between total polyphenols content and DPPH scanning activity, indicating the role of phenolic compounds in the inhibition of free radicals and radical cations in these systems.

Barley cultivars had potent antioxidant properties, so, they may be considered as potential candidates for foods with high antioxidant activity, which play a role in prevention of chronic diseases such as diabetes, coronary heart diseases, diabetes and cancers. The health benefits

provided by these cereals are due to the presence of a number of bioactive compounds, present in the different parts of the grain. Many of these compounds are bound to the matrix of the grain (Zhu et al., 2015; Marecek et al., 2017).

Table 3. Total Antioxidant activity (TAA) of barley flour

Antioxidant properties		
Cultivars	IP (%)	TAA (mmol Trolox eq / Kg DW)
Manel	49.38±4.69^{bcd}	22.43±2.02^{bcde}
Rihane	53.79±5.27^{abc}	24.66±2.31^{abc}
Kounouz	46.60±4.17^{cde}	21.47±1.82^{cde}
Lemsi	57.75±2.87 ^{ab}	26.17±1.24^{abc}
Ardhaoui Kerkennah (Sfax)	40.21±1.42^{e}	18.61±0.62^{e}
Ardhaoui Djerba (Médenine)	56.92±4.55^{ab}	26.09±2.00^{abc}
Ardhaoui Tataouine	50.79±1.61^{abcd}	23.27±0.70^{abcd}
Orge locale Bizerte	59.09±2.28^{ab}	25.96±1.08^{abc}
Orge locale Béja	59.09±1.03^{ab}	26.78±1.28^{ab}
Orge locale Jendouba	60.94±2.12^{a}	27.65±1.04^{a}
Orge locale Kef	56.85±5.42^{ab}	25.18±1.77^{abc}
Orge locale Nabeul	55.04±3.25^{abc}	24.99±2.30^{abc}
Orge locale Zaghouan	57.92±2.95^{ab}	26.57±2.10^{ab}
Orge locale Sousse	55.00±4.00^{abc}	25.85±2.35^{abc}
Orge locale Monastir	57.42±4.68^{ab}	26.33±2.24^{abc}
Orge locale Kairouan	58.69±4.73^{ab}	26.24±2.04^{abc}
Orge locale Sfax	43.44±4.82^{de}	19.42±1.44^{de}
Orge locale Gafsa	55.21±3.00^{abc}	24.89±1.46^{abc}
Orge locale Kerkennah	57.80±2.73^{ab}	26.59±0.56^{ab}
Orge locale Gabès	43.93±2.90^{de}	20.57±1.55^{de}
Orge locale Djerba	57.64±1.48^{ab}	25.86±1.40^{abc}

Statistical significance was evaluated separately for each barley cultivar. The same letter indicates no difference between cultivars (within column) as determined using the Least Significant Difference (LSD) ($P < 0.05$).

4. CONCLUSION

In summary, barley has confirmed to be a good cereal rich in soluble β-glucan fiber, total nitrogenous matter and minerals. Barley flour is safe and does not contain deoxynivalenol (mycotoxins) and exhibits fairly strong antioxidant activity. TAA were very important which indicate that barley has an assortment of phytochemicals, which can impact human health. However, there is a need for more systemic and detailed study of the bioactive and phytochemicals compounds of barley, thus establishing a chemical profile of phytochemicals in barley and possibly identifying unique compounds, as has been done with avenanthramides in oats and alkylresorcinols in rye and wheat.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are grateful for the University of Tunis El-Manar, the University of Torino, Department of Agricultural, Forest and Food Sciences (DISAFA), Grugliasco (Italy), the Institution of Agricultural Research and Higher Education (IRESA), the National Agricultural Research Institute of Tunisia (INRAT), Field Crop Laboratory, the Institute of Arid Regions of Medenine, Drylands and Oases Cropping Laboratory, for provision of barley samples. Authors acknowledge especially all Team of the Organizing Committee for the organization of this prestigious international scientific event OASuD 2018.

REFERENCES

- Abdellaoui R, Cheikh M'hamed H, Ben Naceur M. 2007 a. Morpho-physiological and molecular characterization of some Tunisia barley ecotypes. *A. Journal of Plant Sciences*, 6, 2, 261-268.
- Abdellaoui R, Rouaissi M, Chenennaoui S, Ben Naceur M, Ben Hmida J, Bettaïb Ben Kaab L. 2007 b. Genetic Diversity of Tunisian Local Barley Accessions Analyzed with Morphological and RAPD Makers: Relationship between the Two Methods. *Korean J. Genetics*, 29, (3), 315-322.
- Abdellaoui R, Kadri K, Ben Naceur M, Bettaib Ben Kaab L. 2010. Genetic diversity in some Tunisian barley landraces based on rapd markers. *Pakistan Journal of Botany*, 42, 3775–3782.
- Baik BK, Ullrich SE. 2008. Barley for food: Characteristics, improvement, and renewed interest. J*ournal of Cereal Science*, 54, 354–362.
- Bettaieb-Ben Kaab L, Felah M, Lauriere M. 2005. Relationships between Some Hordein Components and Quality Properties in Two Tunisian Barley Varieties as Influenced by Nitrogen Fertilisation. *Czech J. Genet. Plant Breed*, 4, (1), 11–16.
- Blandino M, Locatelli M, Gazzola A, Coïsson JD, Giacosa S, Travaglia F, Bordiga M, Reyneri A, Rolle L, Arlorio M. 2015a. Hull-less barley pearling fractions: Nutritional properties and their effect on the functional and technological quality in bread-making. *Journal of Cereal Science*, 65, 48–56.
- Blandino M, Locatelli M, Sovrani V, Coïsson JD, Rolle L, Travaglia F, Giacosa S, Bordiga M, Scarpino V, Reyneri A, Arlorio M. 2015b. Progressive pearling of barley kernel: chemical characterization of pearling fractions and effect of their inclusion on the nutritional and technological properties of wheat bread. *J. Agric. Food. Chem.* 63, 5875–5884.
- Bleidere M, Jansone Z, Grunte I, Jakobsone I. 2017. Biochemical Composition of Spring Barley Grain Pearled to varying degrees. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences.* Section B, Vol. 71 (6), 468–473. DOI: 10.1515/prolas-2017-0082.
- Do TDT, Cozzolino D, Muhlhausler B, Box A, Able AJ. 2015. Antioxidant capacity and vitamin E in barley: Effect of genotype and storage. *Food Chemistry*, 187, 65–74.
- El Faleh M, Medimagh S. 2005. Food barley in Tunisia. In S. Grando & G.H. Macpherson (Eds.), Food barley: Importance, uses and local knowledge, p: 29–35. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA).
- FAO, 2017. http//:www.fao.org. Catalogue des publications (2017).
- Gangopadhyay N, Hossain MB, Rai DK, Brunton NP. 2015. A review of extraction and analysis of bioactives in oat and barley and scope for use of novel food processing technologies. *Molecules*, 20, 10884–10909.
- Gökmen V, Serpen A, Fogliano V. 2009. Direct measurement of the total antioxidant capacity of foods: the 'QUENCHER' approach. *Trends in Food & Technology*, 20, 278–288.
- Hatcher DW, Dexter JE, Anderson MJ, Bellido GG, Fu BX 2008. Effect of blending durum wheat flour with hard wheat flour on the quality of yellow alkaline noodles. *Food Chemistry*, 113, 4, 980-988.
- Idehen E, Tang Y, Sang S. 2017. Bioactive phytochemicals in barley. Article Review. *Food. Dg. Ana*. 25, 148–161.
- Lahouar L, Ghrairi F, El Felah M, Ben Salem H, Miled AH, Hammami M. 2011. Effect of dietary fiber of ''Rihane'' barley grains and azoxymethane on serum and liver lipid variables in Wistars rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 67, 27–34.
- Lahouar L, Pochart P, Ben Salem H, El Felah M, Mokni M, Magne F, Mangin I, Suau A, Pereira E, Hammami M, Achour L. 2012. Effect of dietary fibre of barley variety 'Rihane' on azoxymethane-induced aberrant crypt foci development and on colomic microbiota diversity in rats. *The Britinish Journal of Nutrition*, 108, 2034–2042.
- Lahouar L, El Arem A, Ghrairi F, Chahdoura H, Ben Salem H, El Felah M, Achour L. 2014. Phytochemical content and antioxidant properties of diverse varieties of whole barley (*Hordeum vulgare* L.) grown in Tunisia. *Food Chemistry*, 145, 578–583.

- Lazaridou A, Papoutsi Z, Biliaderis CG, Moutsatsou P. 2011. Effect of oat and barley β-glucans on inhibition of cytokine-induced adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells: Molecular structure–function relations. *Carbohydrate Polymers*, 84, 153-161.
- Lee JH, Park KH, Ryu HW, Yuk HJ, Choi SW, Lee MH, Kim SL, Seo WD. 2016. Elucidation of phenolic antioxidants in barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.) by UPLC-PDA-ESI/MS and screening for their contents at different harvest times. *Journal of Functional Foods*, 26, 667–680.
- Marecek V, Mikyska A, Hampel D, Cejka P, Neuwirthov J, Malachova A, Cerkal R. 2017. ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. *Journal of Cereal Science*, 73, 40–45.
- Marinaccio F, Reyneri A, Blandino B. 2015. Enhancing grain yield and quality of winter barley through agronomicstrategies to prolong canopy greenness. *Field Crops Research*, 170, 109–118.
- Maray ARM, Abed-El Bary MS, Khalil KE, Abed El-Baki MR. 2018. Effect of the Partial Replacement of Wheat Flour with Barley Flour on Quality Attributes of Bread and Biscuits. *Recent Advances in Food Science-RAdvFoodSci*, 1(1), 42–50.
- Skendi A, Papageorgiou M, Biliaderis CG. 2010. Influence of water and barley β-glucan addition on wheat dough viscoelasticity. *Food Research International*, 43, 57–65.
- Sharma P, Gujral HS, Rosell CM. 2010. Effects of roasting on barley β-glucan, thermal, textural and pasting properties. *Journal of Cereal Science*, 53(1), 1–6.
- Shen Y, Zhang H, Cheng L, Wang L, Qian H, Qi X. 2016. In vitro and in vivo antioxidant activity of polyphenols extracted from black highland barley. *Food Chemistry*, 194, 1003–1012.
- Sovrani V, Blandino M, Scarpino V, Reyneri A, Coïsson JD, Travaglia F, Locatelli M, Bordiga M, Montella R, Arlorio M. 2012. Bioactive compound content, antioxidant activity, deoxynivalenol and heavy metal contamination of pearled wheat fractions. *Food Chemistry*, 135, 39–46.
- Thondre PS, Ryan L, Henry CJK, 2011. Barley β-glucan extracts as rich sources of polyphenols and antioxidants. *Food Chemistry*, 126, 72–77.
- Zhu Y, Li T, Fu X, Abbasi AM, Zheng B, Liu RH. 2015. Phenolics content, antioxidant and antiproliferative activities of dehulled highland barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Functional Foods*, 19, 439–450.

Metabolites secondaires et activités biologiques de corètes (*Corchorus olitorius* L.) cultivées dans le sud tunisien

Yassine Yahia[1*], Mohamed Bagues[1], Samir Tlahig[1], Monia Lazreg[2], Mohamed Loumerem[1], Kamel Nagaz[1]

[1]Laboratoire d'Aridoculture et des Cultures Oasiennes - Institut des Régions Arides de Médenine (IRA), Tunisie

[2]Institut Supérieur de Biologie Appliquée de Médenine (ISBAM), Tunisie

***** Email: yassine_y2006@yahoo.fr

RESUME

L'étude de la qualité nutritionnelle et la composition biochimique constitue une étape indispensable pour la conservation, l'amélioration génétique et l'utilisation durable des ressources génétiques, par exemple de la Corète (*Corchorus olitorius* L.) cultivée dans le sud tunisien. C'est dans ce cadre que ce présent travail est mené sur une variété commerciale de corète originaire de Gabès « Gabsia » et une autre population locale largement utilisée à Médenine. En effet, ce travail vise essentiellement à l'évaluation de la qualité nutritionnelle et la composition biochimique en se basant sur une étude comparative de métabolites secondaires, les composés phénoliques et les activités antioxydante et antibatérienne des extraits de feuilles de deux provenances de Corète. L'analyse quantitative des extraits a révélé une richesse de corète en tanins, polyphénols et flavonoïdes totaux ainsi une activité antioxydante très importante (DPPH et ABTS). L'analyse qualitative des extraits méthanoliques par GC-MS a révélé la présence de 11 acides phénols et 12 flavonoïdes dont les composés majoritaires sont l'acide chlorogénique, l'acide 4,5-di-O-caffeoylquinique, l'acide cryptochlorogénique, l'acide 4,3-di-O-caffeoylquinique, l'acide quinique, la quercétine et la catéchine. L'étude de pouvoir Antioxydant des extraits montre que la meilleure activité est apparait au niveau de l'extrait de la variété d'origine Gabès.

Mots-clés : Corète (*Corchorus olitorius* L.); tanins; polyphénols et flavonoïdes totaux; acides phénols et flavonoides ; activités antioxydante et antibactérienne.

1. INTRODUCTION

En Tunisie, la large diversité des conditions naturelles, de ses sols et de son climat, a fini par controuver une grande diversité biologique. Parmi les espèces végétales largement cultivées on peut citer les cultures maraichères appelées d'une façon générale les cultures potagères (Ben friha 2008). Les cultures maraîchères de plein champ et sous abris occupent en Tunisie une moyenne de 140000 ha. Les superficies des cultures maraîchères sous abris (abri-serres, serres, serres multi-tunnels et petits tunnels) représentent seulement 6,2% de cette superficie. Parmi les cultures maraichères largement utilisées au sud tunisien, en particulier les oasis, est la corète ou *Corchorus olitorius* L. La corète potagère est une espèce de plantes dicotylédones de la famille des Tiliacées (Kiebre et al., 2016). Son origine géographique était souvent controversée, car on la cultive depuis des siècles tant en Asie qu'en Afrique. Certains auteurs considèrent l'Inde ou la région indo-birmane comme le centre d'origine de *Corchorus olitorius* L. et de plusieurs autres espèces de *Corchorus* (Bonnet, 2015). Ses feuilles sont utilisées en cuisine dans de nombreux pays d'Afrique de l'Ouest, du Maghreb et du Moyen-Orient, à la base du plat du même nom Mloukhiya dans les cuisines tunisienne, algérienne, égyptienne, syrienne, libanaise. En Tunisie, la corète est considérée parmi les aromates et les épices qui ont toujours été largement utilisés tant pour la cuisine, qu'en médicine traditionnelle, ainsi que pour certains usages particuliers. En effet, elle est cultivée depuis un temps immémorial. La place qu'elle occupe au niveau des superficies cultivées est relativement importante et c'est en raison des revenus qu'ils procurent aux agriculteurs (API 2017). Toutefois, les conditions des régions arides tunisiennes qui semblent plus sévères (sociales, climatiques et géologiques), la culture sous un système assez traditionnel, le manque des variétés locales, leur conservation et utilisation, constituent un obstacle majeur entravant l'augmentation de la surface cultivée et la productivité de plusieurs espèces (Yahia, 2015).

Dans le volet de contribution à l'amélioration et à la gestion de ces ressources génétiques à l'institut des régions arides de Médenine (IRA), une étude biochimique comparative entre la variété de corète «Gabsia» et une population locale de Médenine (largement consommée) des régions arides tunisiennes a été menée. L'objectif de ce présent travail se résume comme suit: Etude comparative de la composition en métabolites secondaires (polyphénols, flavonoïdes totaux et tannins condensés) et l'analyse de l'activité antioxydante d'une variété de corète « Gabsia » et une population locale de Médenine (sous un programme d'amélioration génétique à l'IRA de Médenine) ; Analyse des composés phénoliques (acides phénoliques et flavonoïdes) par GC-MS et l'activité antibactérienne.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé a été collecté de l'oasis de Gabès pour la variété « Gabsia » et une population locale largement cultivée et consommée d'origine Médenine et soumise à un programme l'amélioration génétique dans les parcelles situées à l'IRA (Médenine).

2.2. Dosage des métabolites secondaires

2.2.1. Dosage des poly phénols totaux

La teneur en polyphénols totaux de l'extrait des graines de corète a été déterminée par la méthode décrite par velioglu et al. (1998), en utilisant le réactif de Folin-Ciocateau diluée 10 fois avec de l'eau distillé. 100µl de l'extrait aqueux de corète sont dissout dans 900ml de méthanol (90 %), 0,1ml de cette solution d'extrait est mélangé à 0,75ml de réactif de Folin Ciocalteau dilué 10 fois. La solution de bicarbonate de soude 6% est y ajouté. Le mélange est incubé à température ambiante pendant 90 minutes. L'absorbance de la solution est déterminée à 750nm en utilisant un spectrophotomètre.

La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide gallique à différentes concentrations de 10, 50, 100, 400, 800 mg/l. La teneur en phénols totaux est rapportée en mg équivalent acide gallique/g de MS .Toutes les mesures sont répétées 3 fois.

$$[\text{Polyphénols}] = X \times fd \times V/M \times 0.001$$

X : DO/pente ; Fd : Facteur de dilution ; V : Volume de l'extrait ajouté (l) ; M : Masse matière sèche utilisée (g)

2.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La quantification des flavonoïdes totaux sera faite suivant une méthode colorimétrique. Une prise de 1ml d'extrait méthanolique dilué (20 fois) sera additionnée de 1ml d'une solution fraiche de chlorure d'aluminium (Al Cl3, 2%). Après 10min d'incubation à température ambiante (Nasri et al., 2010). Après agitation, l'absorbance de cette préparation sera mesurée à 430nm en se référant à un témoin d'éprouvé d'extrait. Une courbe d'étalonnage réalisée par le quercitrine à différentes concentrations 50, 100, 200, 400 et 800 µg/ml pratiquées dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons serviront à la quantification des flavonoïdes. Les teneurs en flavonoïdes seront exprimées en mg d'équivalent de quercitrine /g de MS. Toutes les manipulations sont répétées 3 fois.

2.2.3. Dosage des tanins condensés

On utilise la méthode de dosage Buthanol/HCl décrite par Çam et Hişil (2009). Cette méthode sert à déterminer la teneur en tannins condensés. Ces derniers en chauffant le mélange butanol/HCl, se scindent par hydrolyse acide coupant les liaisons C_4C_8 qui lient les monomères tanniques entre eux et produisent ainsi des anthocyanes colorées facilement quantifiées.

On prend la même quantité des échantillons obtenus (des 05 phases) à fin de ne pas fausser les proportions des résultats. Le réactif de dosage est préparé en mélangeant 95ml de butanol avec 5 ml d'HCl. On prend 0,5 ml de chaque échantillon auquel on ajoute 4,5 ml du réactif Butanol/HCl. On obtient alors des dilutions 1/10. Deux répétitions pour chaque phase sont nécessaires pour confirmer les résultats obtenus. Suivant le même principe, on fait une série de dilutions jusqu'à l'obtention des

dilutions 1/20 pour la phase éther qui paraît peu chargée et 1/30 pour les autres phases. On met les solutions dans un bain-marie à ébullition pendant 2 heures à 90°C puis on refroidit avec de l'eau pour stopper les réactions d'hydrolyse.

2.3. Dosage par chromatographie liquide des composés phénoliques

L'analyse de la fraction phénolique est réalisée sur une chaîne Lachrom (MERCK). Le solvant d'élution est un gradient binaire A=H2O/CH3COOH (98/2, v/v), B= CH3OH/CH3CN (50/50, v/v) suivant un gradient bien déterminé. L'appareil utilisé est un système avec un détecteur spectrophotométrique UV2000 (Spectra-Physics) fonctionnant à 2 longueurs d'onde. Le système de séparation est un ensemble de deux colonnes ChromolithTM Performance RP-18e MERCK (4,6 mm x 100 mm) montées en série précédé d'une pré-colonne ChromolithTM Guard Cartrridge RP-18e MERCK (4,6 mm x 5 mm). L'analyse est réalisée à un débit constant de 4 ml/min.

2.4. Etude des activités antioxydantes

2.4.1. Inhibition des radicaux $ABTS^{\bullet+}$

L'activité antiradicalaire vis-à-vis du radical ABTS+• est évaluée en utilisant la méthode de TEAC (Trolox equivalent antioxydant activity), qui permet de déterminer la capacité d'une molécule à piéger le radical ABTS+•. Ce radical est obtenu par réaction entre la molécule d'ABTS stable (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6 sulfonique)) et le persulfate de potassium, (K2S2O8) faisant ainsi apparaître une coloration bleue intense.

Le passage du radical ABTS+• à la forme non radicalaire s'accompagne de la disparition de cette coloration mesurée spectrophotométriquement à une longueur d'onde λ = 734 nm. Cette décoloration résulte d'une réaction entre le radical ABTS+• et un donneur de H•.

L'ABTS a été dissout dans l'éthanol à une concentration 7 mM avec le persulfate de potassium K2S2O8 mM. Le mélange soutenu dans l'obscurité à une température ambiante pendant 12 à 16 h avant utilisations. Ensuite, on prend 20 µl de l'extrait méthanoïque avec 2 ml de solution de l'ABTS. La lecture des échantillons se fait par un spectrophotomètre UV à une longueur d'onde λ = 734 nm.

2.4.2. Test de réduction du radical stable DPPH°

L'activité anti-radicalaire vis-à-vis du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH·) a été évaluée à l'aide d'une méthode colorimétrique. En effet, à température ambiante et en solution, le radical DPPH· présente une coloration violette intense. Son passage à la forme non radicalaire, après saturation de ses couches électroniques s'accompagne de la disparition de la coloration violette.

$$\underset{\text{(Violette)}}{DPPH^{\cdot} + AH} \rightarrow \underset{\text{(Incolore)}}{DPPH\text{-}H + A^{\bullet}}$$

La diminution de l'intensité de la coloration est suivie par spectrophotométrie à λ = 517 nm. Pour réaliser ce test on prend1 ml DPPH avec 0,1 ml de chaque extrait méthanoïque des espèces étudiées et 0,9 ml eau distillée. La lecture des échantillons se fait moyennant un spectrophotomètre UV à une longueur d'onde λ=517 nm.

2.5. Activité antimicrobienne

L'activité anti microbienne *in vitro* de notre extrait de plante « *Corchorus olitorius* L. » a été réalisée pour évaluer la capacité des métabolites secondaires à inhiber la croissance des différentes souches microbiennes par la méthode de diffusion de disques sur milieux gélosé décrite par (Ben Yakoub et al., 2018). Quatre bactéries pathogènes ont été utilisées. Deux bactéries sont Gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes*) et deux autres Gram négatif (*Salmonella Typhimurium* et *Escherichia coli*).

2.6. Analyse statistique

Les analyses statistiques sont réalisées en utilisant le logiciel XLSTAT 2016 (www.xlstat.com). L'analyse de la variance et la comparaison multiple des moyennes (test LSD) ont été utilisées dans l'étude des paramètres biochimiques. Les différences entre les moyennes inter-cultivars sont dites significatives à 5% (lorsque $p < 0,05$).

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Métabolites secondaires et activités biologiques de Corète

3.1.1. Métabolites secondaires

Une des particularités des végétaux est de former de nombreux composés dont le rôle au niveau de la plante n'est pas encore parfaitement élucidé. Le fait que beaucoup de ces composés ne se rencontrent pas chez toutes les espèces montre qu'ils n'entrent pas dans le métabolisme général (métabolisme primaire) : ce sont des métabolites secondaires, qui n'exercent aucune fonction directe aux niveaux des activités fondamentales de l'organisme végétal (croissance, développement, reproduction…), mais peuvent jouer différents rôles pour la survie du végétale lui-même, rôle de défense, rôle de résistance (Benabid et Bendal, 2017). Les recherches récentes sur les métabolites secondaires citant les composés phénoliques, les flavonoïdes et les tannins en particulier, sont très poussées en raison de leurs diverses propriétés physiologiques et biochimiques (Ksouri et *al.*, 2007). La comparaison de moyennes entre la variété « Gabsia » avec la population locale cultivée à l'IRA pour les teneurs en polyphénols, flavonoïdes totaux et tanins condensés (TPT, TFT et TCT) est illustrée dans le tableau 1.

Tableau1: Métabolites secondaires et activité antioxydante de corètes

	Métabolites secondaires			Activité antioxydante	
	TPC mg GAE/g MS	TFC mg QE/g MS	TCT mg C/g MS	DPPH mM TEAC/100g DW	ABTS mM TEAC/100g DW
Var. Gabsia	425.01 ± 80.93a	55.17 ± 7.80a	33.03 ± 12.01b	165.76 ± 1.14a	1053.54 ± 1.57a
Pop locale	320.78 ± 45.10b	34.44 ± 4.95b	60.06 ± 18.01a	145.20 ± 3.63b	918.76 ± 15.22b

Les moyennes ± les écarts-types suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0.05$) (test de LSD).

L'examen de la variation de teneurs moyennes en polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés révèle une différence significative entre la variété « Gabsia » et la population locale cultivée à l'IRA. On constate que les teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux sont plus importants chez la variété « Gabsia » (TPT= 425.01 mg éqAG/g MS et TFT= 55.17 mg éqQ/g MS) par rapport à la population locale (TPT= 320.78 mg éqAG/g MS et TFT= 34.43 mg éqQ/g MS). Au contraire, la population locale est plus riche en tannins que la variété « Gabsia », avec 60.06 et 33.03 mg C/g MS, respectivement. Ces valeurs sont plus importantes aux celles trouvées par Ben Yakoub et al. (2018) dans une étude comparative entre deux variétés « tunisienne et égyptienne » de corète utilisant trois méthodes différentes d'extraction. Plusieurs études ont montré que ces métabolites secondaires peuvent avoir des pouvoirs antioxydant, anti-inflammatoire et anti-cancérogènes (Chaira, 2009). Les tannins en particulier sont doués d'une activité antioxydante importante (Oszmianski *et al.*, 2007) et souvent utilisés dans l'industrie du cuir, également sont responsables de l'astringence de certains aliments.

3.1.2. Activité antioxydante

Selon le tableau 1, la capacité antioxydante déterminée par DPPH et ABTS a montré que la variété « Gabsia » est plus efficace ayant des valeurs plus importantes (165.76 et 1053.54 mM TEAC/100g DW) par rapport à la variété locale (145.20 et 918.76 mM TEAC/100g DW). En effet, de

nombreuses études ont démontré l'action antioxydante des polyphénols (Yahia, 2013). On utilise même ces composés comme nouvelle méthode de traitement de l'hypercholestérolémie, l'hyperlipidémie, l'arthéroscélérose et l'ulcère gastrique (Khennouf 2004).

3.2. Les composés phénoliques

Le terme acide-phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et hydroxyle phénolique. La pratique courante en phytochimie consiste à réserver ce terme aux dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique (Benabid et Bendal, 2017).

Le Tableau 2 résume la nature de chaque composé phénolique identifié dans la corète, les formules, les ions moléculaires, le temps de rétention et les concentrations issus des différentes fragmentations. L'analyse par LC-MS a révélé la présence de onze acides phénols et dix flavonoïdes. L'acide phénol majeur détecté pour la corète est l'acide chlorogénique suivi par l'acide quinique avec respectivement 953.42 et 215.03 µg/ml pour la variété Gabsia et 273.29 et 223.25 µg/ml pour la population locale de Médenine. On remarque l'absence de l'acide o-coumarique et, des acides protocatéchique et rosmarinique de l'extrait de la variété Gabsia et la population locale de Médenine respectivement. En fait, les acides phénoliques réagissent directement sur les problèmes causés par le stress environnemental, comme les attaques par les ravageurs, et contribuent au processus de guérison de la plante par la lignification des tissus endommagées (Khelfallah., 2013). Ils possèdent plusieurs propriétés antioxydante, pharmacologique, antiradicaline, antimicrobienne, antiviral, anti cholestérolémiante, antiulcéreuse, anti inflammatoire, antiallergique et inhibiteur *in vitro* des systèmes enzymatique (élastase, collagénase) (Boutaghane., 2015). Dix flavonoïdes ont été détectés chez la corète dont le maximum chez la variété Gabsia. L'élément majeur est la quercitrine avec 71.83 et 32.84 ug/ml chez la variété Gabsia et la population locale de Médenine respectivement. Au niveau des feuilles et fleurs, les flavonoïdes généralement ont un rôle attractif pour les abeilles ou répulsif sur les insectes herbivores entraînant ou non la consommation de feuillage (Merghem., 2009). Bien que les rapports associant la quercitrine au vieillissement cutané soient encore rares, une étude récente et prometteuse a révélé un effet cytoprotecteur de ce composé sur les lésions cellulaires induites par les UVB (radiation ultraviolet) dans les kératinocytes humains (HaCaT). En conséquence, il a été montré que le ROS intracellulaire (les dérivés réactifs de l'oxygène) et la mort cellulaire générés par l'exposition de cellules HaCaT au rayonnement UVB étaient significativement diminués après un traitement à la quercitrine. Les données globales suggèrent donc que les trois flavonols, la quercétine, la dihydroquercétine et la quercitrine, pourraient présenter des avantages pour retarder le vieillissement cutané chez l'homme (Menaa et al., 2014).

Tableau 2: Acides phénols et flavonoïdes des extraits de corète identifiés par LC-MS

				Concentration (ug/ml extrait)	
	Formule moléculaire	**[M-H]−m/z**	**Temps de rétention (min)**	**Var. Gabsi**	**Var. Locale**
Acides phénols					
Acide quinique	$C_7H_{12}O_6$	191	2,015	215.03 ± 33.29a	223.25 ± 30.30a
Acide protocatéchique	$C_7H_6O_4$	153	6,879	9.77 ± 2.75a	nd
Acide chlorogénique	$C_{16}H_{18}O_9$	353	9,165	953.42 ± 74.63a	273.29 ± 21.53b
Acide 4-O-caffeoylquinique	$C_{16}H_{18}O_9$	353	11,623	255.54 ± 2.57a	64.61 ± 1.21b
Acide caféique	$C_9H_8O_4$	179	14,588	9.46 ± 0.22a	3.33 ± 0.49b
Acide paracoumarique	$C_9H_8O_3$	163	21,083	2.53 ± 0.39a	2.45 ± 0.11a
Acide trans férulique	$C_{10}H_{10}O_4$	193	22,960	1.50 ± 0.23a	1.26 ± 0.36b

Acide o-coumarique	$C_9H_8O_3$	163	25,977	nd	2.33 ± 0.13a
Acide 3,4-di-O caffeoylquinique	$C_{25}H_{24}O_{12}$	515	24,843	235.97 ± 22.14a	148.66 ± 19.41b
Acide rosmarinique	$C_{18}H_{16}O_8$	359	26,363	4.34 ± 0.73a	nd
Acide 4,5-di-O-caffeoylquinique	$C_{25}H_{24}O_{12}$	515	26,675	301.35 ± 90.24a	189.28 ± 79.60b
Flavonoïdes					
Catéchine (+)	$C_{15}H_{14}O_6$	289	11,169	15.61 ± 0.40a	2.27 ± 0.16b
Epicatéchine	$C_{15}H_{14}O_6$	289	16,380	2.55 ± 0.20a	nd
Rutine	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609	23,698	7.10 ± 1.85a	nd
Luteolin-7-o-glucoside	$C_{21}H_{20}O_{11}$	447	24,461	nd	13.26 ± 0.24a
Quercétrine	$C_{21}H_{20}O_{11}$	447	26,425	71.83 ± 19.31a	32.84 ± 11.27b
Apigenin-7-o-glucoside	$C_{21}H_{20}O_{10}$	431	26,70	2.63 ± 0.25a	0.86 ± 0.08b
Quercétine	$C_{15}H_{10}O_7$	301	31,740	2.08 ± 0.05b	3.26 ± 0.33a
kaempférol	$C_{15}H_{10}O_6$	285	31,772	1.87 ± 0.02a	1.74 ± 0.04b
Apigénine	$C_{15}H_{10}O_5$	269	34,313	0.35 ± 0.11a	nd
Lutéoline	$C_{15}H_{10}O_6$	285	34,753	2.77 ± 0.17a	2.51 ± 0.09b

Les moyennes ± les écarts-types suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0.05$) (test de LSD).

3.3. Activité antibactérienne

L'activité anti microbienne *in vitro* de nos extraits de plante «*Corchorus olitorius* L.» a été réalisé pour évaluer la capacité des métabolites secondaires à inhiber la croissance des différentes souches microbiennes par la méthode de diffusion de disques sur milieux gélosé décrite par (Bijondi., 1993). Les résultats ont permis de savoir que l'activité antibactérienne est légèrement différente de deux extraits utilisés pour toutes les souches testées. Comme la montre le figure 1, avec des diamètres d'inhibition entre 10 mm et 12 mm (activité modérée) contre «Staphylococcus aureus», une activité plus importante (bonne activité) contre «*Escherichia coli*» (plus 12 mm) et une zone d'inhibition plus au moins faible pour «*Listeria monocytogenes*» et «*Salmonella Typhimurium*» (figure 1). Ces résultats montrent aussi d'une façon globale une activité plus importante pour l'extrait de la variété Gabsi par rapport à la population locale de Médenine surtout contre les bactéries «*Listeria monocytogenes*» et «*Salmonella Typhimurium*».

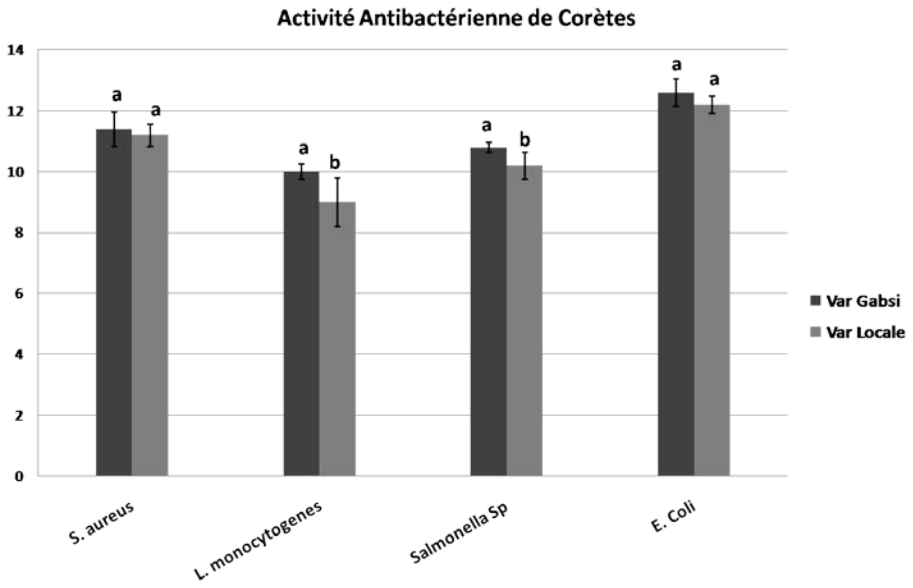


Figure 1: Activité antimicrobienne des extraits de *Corchorus olitorius* L.

Cette activité antibactérienne est due à la présence de certains composés dont les acides phénols, les flavonoïdes et les tannins qui sont présents dans les extraits de la corète. Ces composés phénoliques sont réputés d'avoir une grande action antibactérienne et antifongique. Les molécules bioactives comme par exemple les phénols s'attaquent aux membranes des microorganismes (détruisent les liaisons osidiques entre les composés du péptidoglycane) puis à leurs enzymes (action sur les groupements amines des protéines) les empêchant ainsi de se multiplier et de proliférer (Benabid et Bendal, 2017).

4. CONCLUSION

Dans cette étude, différents extraits de *C. olitorius* ont servi de source de composés phénoliques présentant des caractéristiques intéressantes. En plus, les extraits de corète ont montré un large spectre d'activité antibactérienne. L'activité potentielle de différents extraits est fortement liée aux acides phénoliques et aux composés flavonoïdes, identifiés à l'aide d'une analyse LC-MS. En conclusion, les extraits de C. *olitorius* peuvent remplacer les substances antioxydantes chimiques grâce à leur bonne capacité antioxydante. Par conséquent, les extraits de *C. olitorius* pourraient avoir le potentiel de servir d'agents de conservation biologiques.

REFERENCES

- Ben Friha F.L. (2008) Analyse de la diversité génétique et symbiotique des populations naturelles tunisiennes de Medicago truncatula et recherche de QTL liés au stress salin. *Thèse de Doctorat en Biologie*. L'Université Toulouse III - Paul Sabatier, France.
- Ben Yakoub A. R., Abdehedi O., Jridi M., Elfalleh W., Nasri M., Ferchichi A. (2018) Flavonoids, phenols, antioxidant, and antimicrobial activities in various extracts from Tossa jute leave (*Corchorus olitorus* L.). *Industrial Crops & Products* 118 : 206–213.
- Benabid N., Bendal M. (2017). Potentiel polyphénolique et applications Biologiques de *Corchorus olitorius* L. *Master de sciences de la nature et de la vie*, Université des Frères Mentouri Constantine 1, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie : 89p.
- Bonnet P. (2015) *Corchorus Olitorius* (PROTA). *Plant Resources of Tropical Africa*. 1 (529): 1-2.

Cam M., Hisil Y., Durmaz G. (2009) Characterisation of pomegranate juices from ten cultivars grown in Turkey. *Int. J. Food Prop*. 12(2): 388.

- Chaira N., Smaali M.I., Martinez-Tomé M., Mrabet A., Murcia M.A., Ferchichi A., (2009) Simple phenolic composition, flavonoid contents and antioxidant capacities in watermethanol extracts of Tunisian common date cultivars (*Phoenix dactylifera* L.). Int. *J. Food Sci. Nutr*. 60: 316-329.

- Khennouf S. (2004) Gastropropectives of polyphenolic compounds from Quercus Suber in rats and mice. *J.Agric.Food.Chem.* 51(5) :1469-1473.
- Kiebre M., Bationo kando P., Kiebre Z., Sawadogo M., Sawadogo N., Sawadogo B., Nanema R.K., Traore R.E. (2016) Evaluation agromorphologique d'accessions de corète potagère (Corchorus olitorius. L) du Burkina Faso. *International Journal of Innovation and Applied Studies,* 1 (14): 198-209.
- Ksouri R., Megdiche W., Debez A., Falleh H., Grignon C., Abdelly. C. (2007) Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte Cakile maritima. *Plant. Physiol Bioch*, 45: 244-249.
- Menaa F., Menaa A. and Tréton J. (2014) Chapter 63: Polyphenols against Skin Aging. Polyphenols in Human Health and Disease, 1: 819-830.
- Nasri, N., Tlili, N., Ellfalleh, W., Emna, C., Ferchichi, A. Khaldi, A., Saida, T., (2010) Chemical compounds from Phoenician juniper berries (Juniperus phoenicea). *Natural Product Research*, (DOI: 10.1080/14786419.2010.523827), 25:1733-1742.
- Oszmianski J., Wojdylo A., Lamer-Zarawska E. and Swiader K. (2007) Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots. *Food Chem*. 100(2), 579-583.
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L. and Oomah, B. D. (1998) Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. Journal of Agricultural Food Chemistry 46: 4113-4117.
- Yahia Y., (2015) Variabilité morpho-phénologique, moléculaire et biochimique des populations de fève (*Vicia faba* L.) cultivées dans les régions arides tunisiennes. *Thèse de Doctorat en sciences biologiques*. Université Manar, faculté des sciences de Tunis-Tunisie.
- Yahia Y., Elfalleh W., Tlili N., Hannachi H., Loumerem M and Ferchichi A. (2013) Phytochemical contents and antioxidant activities of some Tunisian faba Bean populations. *Romanian Agricultural Research*, DII 2067-5720, RAR 2012-163.

Chemical characterization and biological study of the species *Senecio cineraria*

Zine El Abidine Ababsa[1,2]*, Wahiba Kara Ali[3], Nacira Abidli[4], Salah Akkal[2], Kamel Medjroubi[2].
[1]Department of the Sciences of the matter, Faculty of the exact sciences and nature and life, Larbi BEN M'HIDI University, Oum El Bouaghi- Algeria.
[2]Unit for the Valorization of Natural Resources, Bioactive Molecules and Physico-Chemical and Biological Analyzes, Faculty of Exact Sciences, Department of Chemistry, Mentouri University of Constantine 1-Algeria.
[3]Laboratory of Biology and Environment, Faculty of Sciences of Nature and Life, Mentouri University, Constantine1, Algeria.
[4]Department of Biology, ENS National Teacher Training School, Kouba, Algeria.
*Corresponding author: e-mail: ababsapharm@gmail.com

SAMMARY
Senecio cineraria is a perennial shrub of Mediterranean origin, belongs to the family of *Asteraceae* **(**Dupont et al., 2012), it is used in pharmaceutical preparations and in homeopathy. This study is a scientific contribution to the determination of certain phytochemicals, as well as the study of some in vitro biological activities of the methanolic extract of the plant. The analysis of the extract by colorimetric tests was revealed the presence of flavonoids, alkaloids and tannins. Qualitatively, the TLC analysis of the extract showed the presence of a multitude of flavonoid varieties. The flavonoid assay showed a significant content on the order of 60.16 mg EQ / g E. The study of the antioxidant power by the DPPH method has shown that the concentration which traps 50% of the DPPH• (IC50) radical is 0.35 mg / ml. **M**ethanol **E**xtract of ***S**enecio **c**ineraria* (MESC) revealed a significant anti-hemolytic effect compared to the positive control. This is proportional to the concentration of the extract used during the test. The antibacterial potential of the extract was confirmed on strains: *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes and Klebsielaoxytoca*, with MICs of 10 mg / ml, 20 mg / ml and 2.5 mg / ml respectively. Chronometric coagulation tests (TCK and TQ) have shown that the extract has significant anticoagulant activity.
Key words: Senecio cineraria, methanolic extract, colorimetric tests, flavonoids, TLC analysis, antioxidant power

1. INTRODUCTION
Algeria, thanks to its particular geographical situation, its vast surface and its relief, benefits from a very varied range of climates and soils, favoring the development of a rich and diversified flora. Indeed, the Algerian territory covers important plant resources. This richness and originality make the study of "fundamental" scientific interest for the knowledge and know-how in the field of ethnobotany, traditional pharmacopoeia but also an "applied" scientific interest in the field of the valorization plant genetic resources.
The cinerary maritime or the Cinnamon Sorrel, is a plant which belongs to the family of Asteraceae. This family is the largest angiosperm with 23600 species, widespread in temperate regions **(**Dupont et al., 2012).
The present work is dedicated to the phytochemical study and evaluation of biological activities of the methanolic extract of the plant Senecio cineraria, it aims to extract bioactive molecules, with the determination of certain groups, as it aims to test the biological activities of the methanolic extract especially the antioxidant, antimicrobial, anticoagulant and antihemolytic activity.

2. MATERIALS AND METHODS
2.1. Materials
2.1.1. Plant material
It consists of the methanolic extract of the aerial part of the medicinal plant *Senecio cineraria* (MESC) harvested in the region of El Kalla wilaya of Tarf, Algeria during the month of May 2016 and identified by botanist Dr. Nabila Suilah from the laboratory for the unit of natural resources,

bioactive molecule and physicochemical and biological analyzes, at Mentouri Constantine University.

2.1.2. Bacterial strains

In order to test the antibacterial potential of (MESC) in vitro, five bacterial strains are used; two Gram positive: *Staphylococcus aureus (ATCC 25923)* and *Listeria monocytogenes (ATCC 7644)* and three Gram-negative: *Escherichia coli (ATCC 25922), Klebsiella pneumonia (ATCC 700603)* and *Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853)* were used. The strains come from the Institute of Nutrition Food and Agro-Food Technology of Constantine (INATAA).

2.1.3. Blood samples

Six blood samples were collected from healthy individuals for evaluation of anti-coagulant and anti-hemolytic activity.

2.1.4. Medication

Four drugs were used as a positive control:

-Antibiotics:"penicillins" and "ofloxacin" of 10 IU concentration and 5µg respectively for antibacterial activity;

- The anticoagulant drug "Lovenox" of concentration 2000 IU for anticoagulant activity;
- Antihemolytic drug "Dicynone" concentration 250 mg for antihemolytic activity.

2.2.Methods

2.2.1. Preparation and phytochemical study of the methanolic extract of the medicinal plant *Senecio cineraria*

2.2.1.1. Preparation of the methanol extract

The aerial part (leaves, blossoms and stems) of the plant has been well cleaned and dried at room temperature and away from moisture and sunlight. Finally, the dry plant was pulverized using an electric grinder to obtain a fine powder so that it is ready for use. *The Markham method* **(**Markham, 1982) was followed for the preparation of methanolic extract; 950 g of the vegetable powder is introduced into a beaker which contains the hydroalcoholic mixture; methanol / H_2O (7:3) overnight (alcoholic maceration). This maceration is repeated 3 times with renewal of the solvent, it lasts in each case 24 hours. The methanol is then removed from the filtrate by evaporation under reduced pressure at 55°C in a Rotavapor to obtain the crude methanolic extract.

2.2.1.2. Phytochemical characterization of the plant

Phytochemical screening tests are physicochemical reactions that make it possible to characterize the presence of the main categories of natural chemicals contained in a plant and responsible for pharmacological properties. They were made based on precipitation or characteristic colorations.

- Identification of flavonoids

A few drops of $AlCl_3$ (1%) are added to 05 ml of the extract, the appearance of a yellow color indicates the presence of flavonoids (Edeaga et al., 2005).

- Identification of tannins

2 to 3 drops of the 2% $FeCl_3$ solution were added to 2 ml of the crude methanol extract. The solution obtained was rested for a few minutes. The test is considered positive if there is the appearance of a blue-black color and a precipitate **(**Karumi et al, 2004**).**

- Identification of saponins

5 ml of the crude methanol extract were mixed with 10 ml of distilled water for 2 minutes. The formation of a persistent foam after 15 min confirms the presence of saponosides (Majob et al., 2003).

- Identification of alkaloids

5ml of 1% HCl were added to 1 ml of extract. The mixture is heated in a water bath and then treated separately with the Bouchardat reagent (iodine-iodide reagent) which gives a reddish brown precipitation (Boharun et al., 1996)**.**

2.2.1.3. Determination of flavonoids

The flavonoids of the extract were quantified by the aluminum trichloride method (Koleva et al., 2002) **(**1 ml of the extract (prepared in methanol to have suitable concentrations) was added to 1 ml of the $AlCl_3$ solution (2%, in methanol). After 10 minutes of incubation, the absorbance was read at 430 nm. The concentration of flavonoids in the extracts was calculated from a calibration curve (y = ax + b) established with quercetin at different concentrations (0-40 µg/ml, each prepared in methanol) performed in the same operating conditions as the extracts will be used for the quantification of flavonoids.

2.2.1.4. Thin Layer Chromatography (TLC)

This method is based on the separation of the different constituents of an extract according to their migration force in the mobile phase, which is generally a mixture of solvents, adapted to the type of separation to be searched for, and their affinity with respect to the stationary phase, which may be a silica gel or polyamide gel. Chromatographic techniques are not sufficient to identify a product but they provide information (frontal report -R_f- and coloring) likely to guide a hypothesis of structures.

The TLC analyzes were carried out with silica gel plates, on a rigid aluminum support. The extract was deposited using a micropipette (2 µl) at reference points 1.5 cm from the lower edge of the plate. Then, the plates were placed in the development tanks in which are a suitable solvent system called mobile phase, about 0.5 cm in height. The migration was carried out by the use of seven solvent systems:

System 01: Ethyl Acetate-Formic Acid-Acetic Acid- Distilled Water (100/11/11/26).
System 02: Butanol-Acetic Acid-Distilled Water (04/01/05).
System 03: Chloroform-Acetone-Ammonia10% (80/40/18).
System 04: Acetone-distilled water (01/01).
System 05: chloroform-methanol-distilled water (65/45/12).
System 06: Butanol-Acetic Acid-Distilled Water (02/03/05).
System 07: Acetate of ethyl-Acetic acid-Formic acid (100/11/11).

For each spot we calculated the retention factor which is equal to the distance travelled by the constituent / distance travelled by the solvent. This factor makes it possible to mention preliminary information on the structure of flavone substances.

After development, the plates were dried and then visualized separately by a UV lamp at 254 and 365 nm. The frontal ratios (R_f) of the spots resulting from the separation were calculated according to the following ratio: $\mathbf{R_f = d / D}$

d: Distance traveled by the substance, **D:** Distance traveled by the solvent

2.2.2. Evaluation of in vitro biological activities of (MESC)

2.2.2.1. Evaluation of antioxidant activity

The ability of the extract to trap free radicals is determined by a colorimetric method, simple and fast; the Koleva method **(**Koleva et al., 2002) which uses the free radical 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) which, in the stable state, has a dark violet color which absorbs at 517 nm. Reduction of the DPPH • radicals with an antioxidant causes the solution to fade to pale yellow (Figure 1).

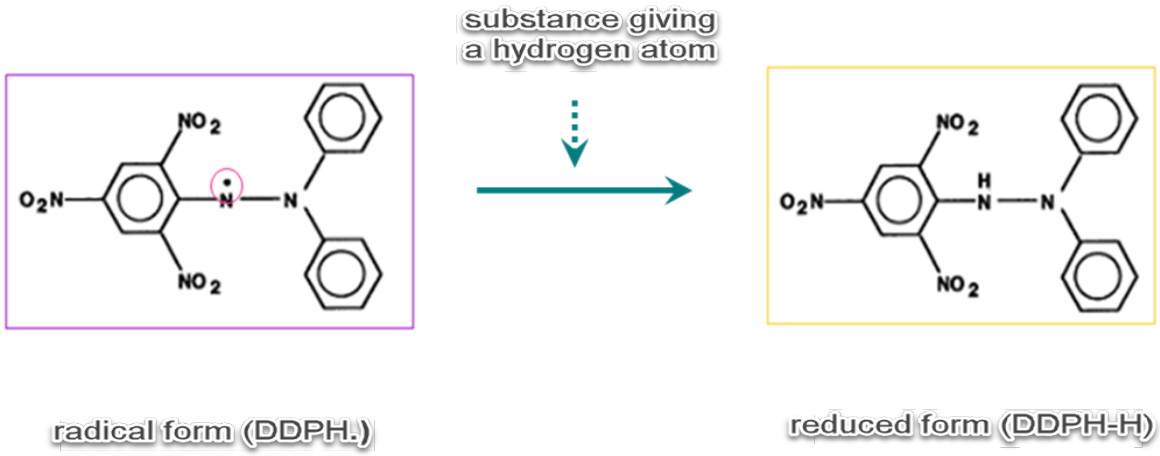


Figure 1: Reduction of DPPH • by an antioxidant **(**Molyneux, 2004)

The DPPH2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ($C_{18}H_{12}N_5O_6$) was solubilized in absolute methanol to obtain a 100 µM solution. From a methanolic stock solution of C_1 = 10 mg / ml of each extract, the following dilutions were prepared: C_2 = 100 mg / ml, C_3 = 70 mg / ml, C_4 = 50 mg / ml, C_5 = 30 mg / ml, C_6 = 20 mg / ml, C_7: 15 mg / ml, C_8 = 10 mg / ml, C_9 = 05 mg / ml.
Each volume of 1.5 ml of the methanolic solution of DPPH•, a volume of 15 µl of each prepared concentration of the extract is added. After stirring and incubation at room temperature for 15 minutes, the optical densities of the reaction mixtures are measured by the spectrophotometer at 517 nm against a blank prepared under the same conditions by methanol.
The antioxidant activity is compared to that of a commercial flavonoid which is quercetin which is in turn determined in the same way as that of the extract. The results were expressed as:

% inhibition (DPPH% = [(A_{Blanc} $A_{Extrait}$) / A_{Blanc}] x 100)

and the IC50 parameter or the effective concentration of the extract which caused the 50% loss of DPPH activity, the lower this concentration is, the higher the antioxidant effect **(**Brand-Williams et al., 2005).

2.2.2.2. Evaluation of antibacterial activity

The antibacterial activity of *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Pseudomonas aeruginosa, Echerichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* was evaluated by the diffusion technique in agar media on petri dishes. For the results showing a positive effect against the bacterial strains tested, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined on a liquid medium.

2.2.2.2.1. Disk Method -Tests of Efficiency-

- Preparation of the inoculum

The different bacterial strains were subcultured by the streak method and incubated at 37 ° C for 18 to 24 hours to obtain a young culture and well isolated colonies that were subsequently used to prepare the inoculum. The bacterial inoculum of each strain was prepared in 5 to 10 ml of sterile physiological saline from pure culture.

- Seeding

After adjusting the turbidity of the inoculum suspension, a swab is deceived into the suspension and its contents are spread over the entire surface of the Mueller-Hinton agar three times. After each application, the dish was rotated about 60°C in order to ensure a homogeneous distribution of the inoculum.

- Preparation of aromatogram disks

Sterile Wattman Number 3 paper disks 5 mm in diameter, each impregnated with the extract taken up in dimethyl sulphoxide (DMSO) at a rate of 100 mg/ml, were deposited using forceps at surface of the agar medium. The Petri dishes are first left for 30 minutes at room temperature for prediffusion of the substances, before being incubated at 37 °C. in an oven for 24 hours.

Negative controls (disks impregnated with DMSO) and positive antibiotic discs were tested. Ofloxacin (OFX) and Penicillin (P) are the antibiotics chosen because of their broad spectrum of action and their frequent use in hospital for the treatment of infections caused by most germs in our study. The experiments were performed in three repetitions.

- Incubation and reading

The diameters of the zones of inhibition (ZI) were measured around the disks after a preincubation of 30 minutes at room temperature followed by incubation in an oven at 37 °C. for 24 or 48 hours depending on the seed.

The effect of the extract results in the appearance around the disc of a translucent halo corresponding to the absence of bacterial growth. The larger the diameter of this zone, the more sensitive the strain is sensitive **(**Choi et al., 2006).

Indeed, the results were expressed on average ± SD (standard deviation). The strain having a diameter D< 8mm, 9 ≤D ≤ 14mm, 15≤D ≤ 19mm, D>20mm are considered respectively resistant (-), sensitive (+), highly sensitive (++), extremely sensitive (+ ++).

2.2.2.2.2. Determination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

MIC was determined using micro-dilution technique with Muller Hinton broth using U-bottom microplates (NCCLS, 1997).

The MIC of the (MESC) was determined according to the following protocol:

90 µl of Muller Hinton broth were distributed in all wells of the microplate, then 2. 100 µl of (MECS) were distributed in the first wells of the microplate (A_1, A_2, A_3) and then carried out the successive dilutions (100 µl of A_1 in B_1 and so on). The bacterial inoculum of *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* strains was prepared. The microplates were inoculated with 10 µl of the bacterial suspension (diluted 1/10) to obtain a final volume of 200 µl; A_6, A_7, A_8 and A_9 wells have been reserved for antibiotics (positive controls). The A_{11} and A_{12} wells respectively represent the culture control of the bacteria and the sterility control of the MH culture medium (negative controls); the prepared microplates were incubated at 37 ° C for 24 hours. After incubation, bacterial growth (expressed as turbidity) was examined in each well.

The MIC of an (MESC) with respect to a given strain will be the smallest of the concentrations showing no visible growth of germ (Bolou et al., 2011).

2.2.2.2.3. Synergy between the plant MESC studied and antibiotics

The synergistic effect of the extract with antibiotics was evaluated by the disk diffusion method described above. Antibiotic disks were impregnated with 10 µl of (MESC), then gently deposited on the MH agar seeded beforehand with a bacterial suspension of the strains tested. After incubation at 37 ° C for 24 hours, the diameters of the inhibition zones around the disks were measured in mm. The inhibition zones observed for the combinations were compared to the average of the zones of inhibition for the antibiotics tested alone. A significant difference (≥ 5mm) shows a synergistic effect **(**Saffidine, 2015).

2.2.2.3. Evaluation of in vitro anticoagulant activity (Brummel, 2002)

The anti-coagulant activity of the (MESC) was evaluated in vitro with respect to the exogenous and endogenous coagulation pathway, and this on a pool of normal plasmas released and using 2 global and chronometric tests, the Quick time (TQ) or also referred to as Prothrombin Rate (TP), and Kaolin Cephalin Time (TCK).

2.2.2.3.1. Plasma (standard) plasma pool preparation

The dislocated plasma pool is a mixture of plasma removed from untreated healthy adult volunteers, whose TQ and TCK are normal and comparable.

The blood of each volunteer was collected by venipuncture in a plastic tube on anticoagulant solution of 3.2% sodium citrate and at a rate of 1 volume for 3 volumes of blood. The blood is then centrifuged for 10 min at 3000 rpm to obtain a platelet-poor plasma

2.2.2.3.2. Evaluation of anticoagulant activity vis-à-vis the exogenous route

Anticoagulant activity against the exogenous coagulation pathway was assessed using a Quick (TK) coagulation test or prothrombin time (PT) which allows for a global exploration of the factors of the exogenous pathway of the coagulation pathway coagulation.

- Principle of the test

This test consists in measuring the coagulation time at 37 °C of a platelet-poor plasma in the presence of a mixture of tissue factors and phospholipids (thromboplastin). The factors of the exogenous pathway are thus activated and the time which elapses until the formation of the clot is measured. An extended coagulation time compared to that of the negative control explains that the (MESC) exerts an anticoagulant effect vis-à-vis this coagulation pathway.

- Experimental protocol

Effect of (MESC) on the exogenous pathway of coagulation was evaluated according to the following steps; 10 µl of the (MESC) prepared in DMSO (0.5 mg / ml) was added to 90 µl of the standard plasma, the mixture was incubated at 37 °C. for 15 min. After the incubation, coagulation was triggered by the addition of 200 µl of thromboplastin preincubated at 37 ° C for 15 min. The time elapsing until clot formation was then measured visually using the stopwatch (Brummel, 2002)**.**

II.2.2.3.3. Evaluation of anticoagulant activity vis-à-vis the endogenous pathway

The Cephalin Kaolin Time Test (TCK) is a test that can be used to explore the activity of endogenous pathway plasma factors.

- Principle of the test

This test consists in measuring the coagulation time at 37 °C of a platelet-poor plasma in the presence of a mixture of tissue factors and phospholipids (thromboplastin) and calcium. The time that elapses until clot formation is measured. An extended coagulation time compared to that of the negative control explains that the (MESC) exerts an anticoagulant effect vis-à-vis this coagulation pathway.

- Experimental protocol

The effect of (MESC) on the endogenous pathway of coagulation was evaluated according to the following steps:

10 µl of the (MESC) prepared in DMSO (0.5 mg / ml) was added to 90 µl of the platelet-poor plasma which is then incubated at 37 °C. for 15 min. After the incubation, 100 µl of a cephalin solution Kaolin were added and the mixture is then re-incubated at 37 °C. for 3 min and the coagulation is then triggered by the addition of 100 µl of an aqueous solution of 0.025 M $CaCl_2$ (Brummel, 2002)**.**

The time elapsing until clot formation was then measured visually using the stopwatch.

An anticoagulant drug (Lovenox 2000 UI) dissolved in DMSO was used as a positive control.

2.2.2.4. Evaluation of in vitro antihemolytic activity

The antihemolytic effect of EMSC was performed according to the method of (Yang et al., 2005)

2.2.2.4.1. Preparation of red blood cells

5 ml of a healthy person's blood were collected in EDTA-treated tubes and centrifuged for 5 min at 1000 rpm. The supernatant was removed and the pellet was washed three times with phosphate buffered saline (PBS) (0.2 M and pH 7.4) (Appendix n) and resuspended in saline (4%). The washing operation consisted of a series of centrifugation at 1000 rpm for 5 min of the pellet

suspension in PBS. After the last centrifugation, 0.4 ml of the pellet was added to 9.6 ml of phosphate buffered saline (0.2 M at a pH of 7.4) to obtain an erythrocyte solution of 4% hematocrit.

2.2.2.4.2. Preparation of the extract
Different concentrations of (MESC) (1 mg / ml, 0.5 mg/ml and 0.25 mg/ml) were prepared in PBS.

2.2.2.4.3. Expression of results
The percent inhibition of hemolysis was calculated according to the following formula (Miki et al., 1987): **% inhibition = (Ac - Aext / Ac) 100**
Ac: Absorbance of the negative control.
Aext: absorbance of the extract.

2.3. Statistical analysis
All experiments were done in triplicate. The results were expressed as mean ± standard deviation.

3. Results and discussion
3.1. Results of the chemical characterization of the (MESC)
3.1.1. Phytochemical Screening
Phytochemical tests consist of detecting different families of compounds existing in the studied part of the plant by qualitative characterization reactions. These reactions are based on precipitation or staining by reagents specific to each family of compounds.
The phytochemical screening carried out on (MESC) reveals the presence of several metabolites whose results are presented in Table 1.

Table 1: Results of phytochemical tests of the plant *Senecio cineraria*

Métabolites secondaires	L'observation	Résultat
Flavonoïdes	Appearance of a yellow color	++
Tanins	Appearance of a black-blue color. Absence of a precipitate	+
Saponines	Absence of a foam	-
Alcaloïdes	Appearance of a brown brown precipitate	++

(+): weakly positive test, (++): strongly positive test, (-): negative test

Phytochemical tests carried out on the (MESC) revealed the presence of flavonoids, tannins, and alkaloids. It is important to note that this is the first identification of secondary metabolites for the *Senecio cineraria* plant**.**

3.1.2. Determination of flavonoids
The quantitative study of the extract by means of spectrophotometric assays, according to the $AlCl_3$ aluminum trichloride method, was aimed at determining the total content of the flavonoids. A calibration curve (Figure 02) was drawn for this purpose, established with quercetin. Optical density measurements are made at 430 nm. The amounts of the corresponding flavonoids have been reported in milligram equivalents of quercetin per gram of extract and determined by the equation: $Y = 0.016 X + 0.238$.

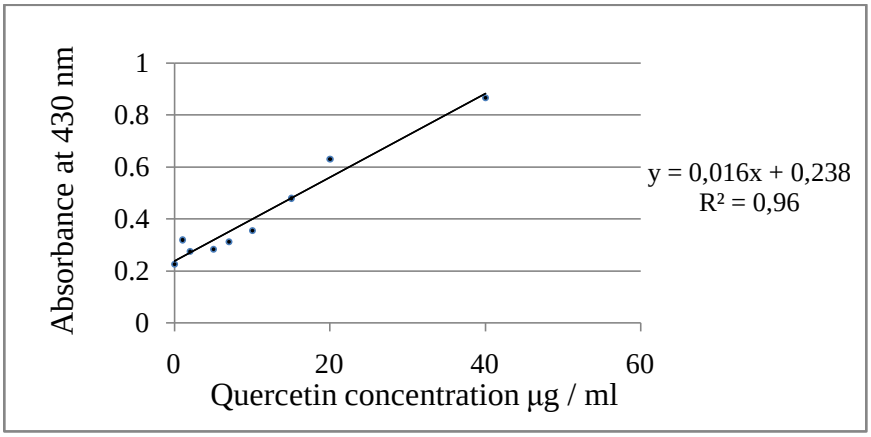


Figure 2: Calibration curve of Quercetin. Each point of the curve represents the average

The result of the determination of flavonoids in the methanolic extract of S. cineraria is estimated at a significant content in the order of 60.16 mg EQ / g E. The choice of quantifying flavonoids among the different phytochemicals results from the fact that flavonoids have very important biological activities **(**Beta et al., 2005). This considerable value in flavonoids is responsible for their analgesic, antifungal, antioxidant, antimicrobial and haemostatic properties(Kabran Guy et al., 2012).

2.1.3. Thin layer chromatography (TLC)

TLC is one of the methods for separating and rapidly identifying constituents of a given plant extract. This technique informs about the flavonoid content of plant extracts. To obtain a better separation system, we used several systems of which 07 gave results. The results of TLC are shown in Table 2.

Table 2: EMSC TLC Result by Different Solvent Systems

System	Spots	R_f	Colours of compounds	Results
System 1	02	- $\mathbf{R_f}$ = 0.22 - $\mathbf{R_{f\,2}}$ = 0.85	-Blue fluorescent white -Orange	-Terpenes, flavonoids -Flavones, quercetin
System 2	02	- $\mathbf{R_{f\,1}}$ = 0.09 - $\mathbf{R_{f\,2}}$ = 0.7	-Yellow -Dark Purple	- Myrcétine, flavones, flavonols, -Myrcétine,flavones,flavonols, substituted flavonols
System 3	01	- $\mathbf{R_f}$ = 0.13	-Violet or mauve	-Gallic acid, phenol acid
System 4	01	- $\mathbf{R_f}$ = 0.93	-Orange	-Catechin, myrcétine
System 5	01	- $\mathbf{R_f}$ = 0.96	-Orange	Anthocyanidin 3,5 diglucoside
System 6	02	- $\mathbf{R_{f\,1}}$ = 0.53 - $\mathbf{R_{f\,2}}$ = 0.82	-Violet - Yellow	-Flavones -Myrcétine
Système 7	01	-Rf = 0.26	- Yellow green	-Flavonols

Two spots were segregated from the EMSC deposits by solvent systems: 1 (ethyl acetate-formic acid-acetic acid-distilled water), 2 (butanol-acetic acid-distilled water) and 6 (butanol-acetic acid). distilled water), while a single spot was obtained by systems 3 (chloroform-acetone-ammonia) 4 (acetone-distilled water) (chloroform-methanol-distilled water) and 7 (ethyl acetate-acetic acid) - formic acid-distilled water). According to the literature, most flavonoids are not visible on the chromatography gel (cellulose) after migration, with the exception of anthocyanins appearing in orange spots and chalcones, aurones and 6-hydroxyflavonols appearing in yellow. For this reason, the chromatograms must be viewed under UV light, and the flavonoids become visible (fluorescent) under this light (Markham, 1982; Hamlat, 2006).

Based on this literature (Table 3) and according to the spot colors obtained on the chromatogram of the extract (Table 2), the existence of the following flavonoid types can be deduced: terpenes, flavonoids, flavones, quercetin, flavonols, catechin, myrcetin, substituted flavonols, gallic acid, phenol acid, anthocyanidin 3,5 di glucoside.

Table 3: Interpretation of Spot Colors in Different Classes of Flavonoids

Flavonoid Rf	Types of Flavonoids	References
0.06-0.9	terpenes	Mamyrbekova-Bekro et al. (2013)
0.03-0.97	flavonoids	Mamyrbekova-Bekro et al. (2013)
0.09	catechin	Kholkhal (2014)
0.23		Meziti (2009)
0.03-0.58	quercetin	Mamyrbekova-Bekro et al. (2013)
0.09-0.59		Meziti (2009)
0.35-0.41		Kholkhal (2014)
0.80-0.97	Anthocyanidine 3,5 diglucoside	Said et al. (2016)
0.13-0.64	Phenol acid	Kholkhal (2014)
0.00-0.5	Substituted flavonols	Said et al. (2016)
0.13	Gallic acid	Kholkhal (2014)
0.38		Meziti (2009)
0.23-0.85	Flavones	Kholkhal (2014)
0.07-0.75		Said et al. (2016)
0.5-0.75	Flavonols	Madjour (2012)
0.15-0.78		Meziti (2009)
0.04-0.41		Kholkhal (2014)

3.2. Results of biological activities

3.2.1. Determination of the antioxidant activity of (MESC) by the method of DPPH•

Since the main mechanism of antioxidant action of plant polyphenols is the trapping of free radicals, several methods have been developed to evaluate the antioxidant activity of plants by trapping synthetic free radicals in solution in polar solvents such as methanol at temperature room. The most frequently used radicals include 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2-O-azino-bis (3-ethylbenzolin-6-sulphonic acid) (ABTS).

In this study, the DPPH • method was chosen to evaluate the antioxidant activity of plant extracts because it is one of the simplest, fastest, and most effective methods because of the great stability of the DPPH radical• (Bozin et al., 2008).

In the DPPH • test, the kinetics of decolorization of this radical was monitored at 517 nm, which is due to its reduction to a non-radical form DPPH-H, by the antioxidants (AH) hydrogen donors present in the extract. As shown in the following equation:

$$DPPH^{\bullet} + AH \text{ (Flavonoïde)} \longrightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet} \text{(radical flavonoxy)}$$

DPPH• has a dark purple colour when trapped with hydrogen-containing antioxidant substances present in the plant extract, the reduced form conferred on the solution a pale yellow color, the turn towards this coloration and the intensity discoloration of the color of the free form in solution depends on the nature, concentration and potency of the anti-radical substance. For comparative purposes quercetin is used as a standard antioxidant.

The results of the antioxidant activity exerted on the free radical DPPH• by the (MESC) are expressed by the parameter IC50 (Figure 03). This parameter was used by several groups of

researchers to present their results, it defines the effective concentration of the substrate that causes the loss of 50% of the activity of DPPH• (IC50),
The lower this concentration, the higher the antioxidant effect **(**Brand-Williams et al., 2005**).** The results of this activity are shown in Figure 3.

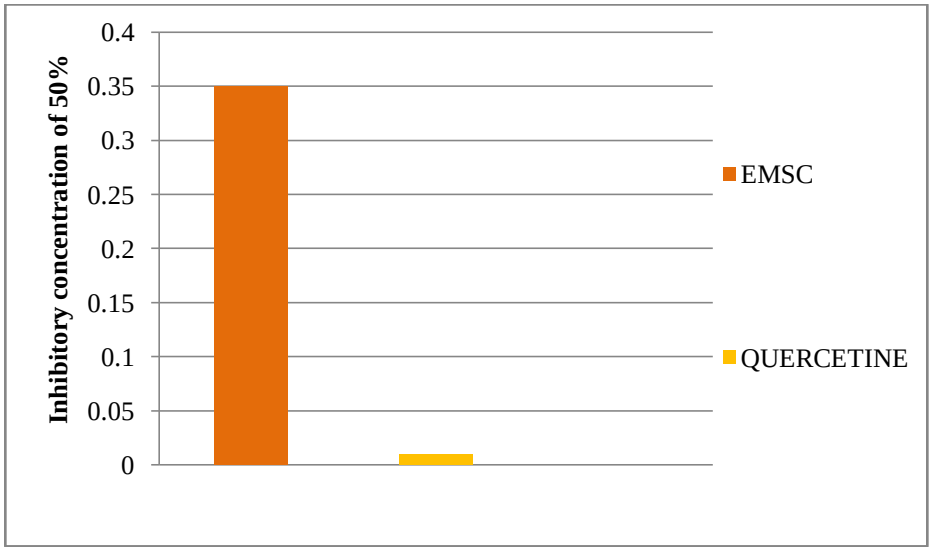


Figure 3: Concentrations of EMSC that inhibit 50% of the radical DPPH •. Each value represents the mean ± SD (n = 3).

According to the results recorded, the extract has a significant antioxidant activity, their IC50 is 0.35 mg / ml, but relatively low that of quercetin whose value of their IC50 is of the order of 0.01 mg / ml. The difference in inhibitory activity may be due to the difference in antioxidant content (polyphenols and flavonoids). In the case of phenolic compounds, the main mechanism of action is the entrapment of free radicals by the transfer of the H atom on the DPPH • then transformed into a stable molecule DPPH-H (Cristina et al., 2009).

3.2.2. Evaluation of anti-haemolytic activity

Red blood cells are among the most used cells in the evaluation of toxicity because of their availability, and the ease of their monitoring during lysis through the release of haemoglobin. In addition, the presence of a very high concentration of polyunsaturated fatty acids on the membrane and the role of oxygen transport played by hemoglobin molecules makes erythrocytes a preferred target for free radicals (Situ et Bobek, 2002).
The interaction of a cytotoxic compound with the membrane of red blood cells causes the loss of their integrity which leads to their lysis. Hydrogen chloride is widely used in evaluation tests for anti-haemolytic activity. It causes degradation of the cell membrane of red blood cells by releasing the cytoplasmic content and particularly haemoglobin (Tiwari et al., 2011).
Figure 4 shows the percentage inhibition of haemolysis in the presence of different concentrations of the methanolic extract, compared to a positive control containing intact red blood cells (in the presence of PBS).

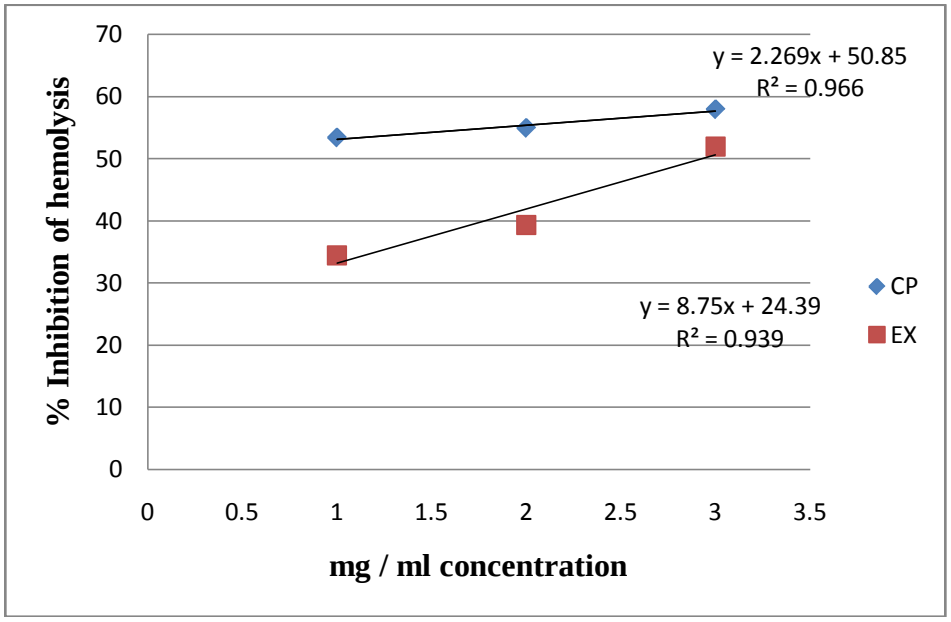


Figure 4: Curves of percent inhibition of hemolysis versus different concentrations.

According to the results obtained (Figure 5), the (MESC) induces a significant anti-hemolytic activity compared to the positive control. This is proportional to the concentration of the extract used during the test. The anti-haemolytic activity is probably due to the presence of a small amount of terpene compounds which at low concentrations play an anti-haemolytic role. These molecules promote interactions with proteins and phospholipids through their affinity with the latter which leads to a protective effect against oxidants (Silva et al., 2017).

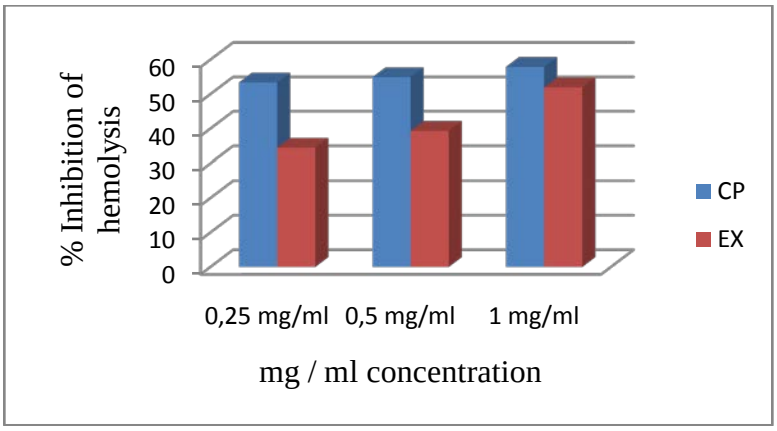


Figure 5: Histogram of percentage inhibition of hemolysis in the presence of different concentrations.

3.2.3. Evaluation of antibacterial activity

- Result of antibacterial activity tested by the disc method

The results of the evaluation of the antibacterial activity of the extract are presented below in the tables (Tables 4 and 5). The results showed an antibacterial power observed for the strains: *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes* and *Klebsiela oxytoca.*

Table 4: Determination of the zone of inhibition (ZI) of the extract of Senecio cineraria.

strains	MESC	CN	CP	CP
			P	Ofl
Escherichia coli	7.5±0.7	00	00	25
Staphylococcus aureus	09±2.8	00	14±2.8	21±0.7
Pseudomonas aeruginosa	5.25±0.35	00	11.5±2.12	20
Klebsiela oxytoca	10±1.4	00	10	25±1.4
Listeria monocytogenes	09±1.4	00	17	23.5±0.7

Table 5: Minimal inhibitory concentration

strains	***Staphylococcus aureus***			***Klebsiela oxytoca***			***Listeria monocytogenes***		
Concentrations	MESC	P	Ofx	MESC	P	Ofx	MESC	P	Ofx
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
05	-	-	+	-	-	-	+	-	-
2.5	+	+	+	-	-	-	+	+	-
1.25	+	+	+	-	-	+	+	+	+
0.625	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.3125	+	+	+	+	+	+	+	+	+

CN: disks impregnated by DMSO. CP: antibiotic discs

The inhibitory potential of the extract was confirmed by the MIC determination tests. The results in the table above show that the MIC value is 1.25 mg / ml for the *Klebsiela oxytoca* strain, 05 mg / ml for *Staphylococcus aureus* and 10 mg / ml for the *Listeria monocytogenes* strain. The most sensitive bacteria are Gram-positive bacteria. However, *Klebsiela oxytoca*, which is a gram-negative bacterium, has a low MIC value (2.5 mg / ml). The structural organization of the cell wall of Gram-positive bacteria is less complex than that of Gram-negative bacteria. Of the strains studied, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* were resistant (00 <ZI <06 mm).

The antibacterial activity of (MESC) against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Klebsiela oxytoca* may be due to the presence of alkaloids, flavonoids and tannins (Brantner et al., 1996). Whose presence is demonstrated in the methanolic extract of this plant. Phenolic compounds and quinones derived from oxidation contribute to the plant's defence against aggression as an antibacterial by binding to proteins and inactivating the enzymatic activities of microorganisms **(**Harborne et Williams, 1992). For example, the action of tannins that can inhibit the enzymatic machinery of microorganisms, have a lytic action by direct effect on their membrane or complexation certain metal ions essential for their survival, in particular iron (Milal et al., 1996). The negative result for the other bacterial species can mean the resistance of the latter vis-à-vis the (MESC) knowing that certain microorganisms can also degrade the phenolic compounds which then serve as carbon substrates and thus promote their growth.

- Test of synergy

Combination studies of medicinal substances in general, and antibiotics in particular, are more and more often described in the literature (Rosato et al., 2007). This strategy is indeed of great interest for potential clinical applications, since it makes it possible to reduce the possible side effects of

current treatments by reducing the dose of the compound used **[33],** thus also limiting the development of resistance phenomena. It is with this in mind that the (MESC) was tested in combination with penicillin and with ofloxacin on the five strains: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiela oxytoca*. The results are shown in Table 6.

Table 6: Results of the zones of inhibitions of the synergy EMSC / Antibiotic.

Strains	Extract + Penicilline		Extract + Ofloxacine	
	R_1	R_2	R_1	R_2
Staphylococcus aureus	14	14	24	22
Listeria monocytogenes	12	14	24	24
Escherichia coli	00	00	00	00
Pseudomonas aeruginosa	14	16	23	23
Klebsiela oxytoca.	11	14	26	26

There are potentiating effects, the extract / antibiotic combination is effective. With this combination, the necessary concentrations of penicillin and ofloxacin for the inhibition of strains are markedly reduced, as is the extract concentration, whereas the extract was only slightly active when used alone.

3.2.4. Evaluation of anticoagulant activity

The anticoagulant potency of the (MESC) was evaluated in vitro against the endogenous and exogenous coagulation pathways using two time tests, TP and TCK, respectively.

The TCK test is activated by the contact between the factor XII and the electronegative surface of the activator which is kaolin (substitute for collagen and connective tissue in vivo). This interaction induces the activation of factor XII and consequently the sequential activation of factors XI, IX, X and thrombin (factor II) (Gerotziafast, 2007). An extended coagulation time compared to the negative control where the sample is replaced by DMSO reflects an anticoagulant activity of the tested material. The results of anticoagulant activity are shown in Table 7 and Figure 6.

Table 7: Results of anticoagulant activity

	TQ (s)	TP (%)	TCK (s)	TCK (%)
CN	15	66.9	13.6	90.7
CP	23.3	32.16	20.3	39.9
Tests	43.6	51.3	27	26.7
Témoins	14	86.9	14.3	85.4

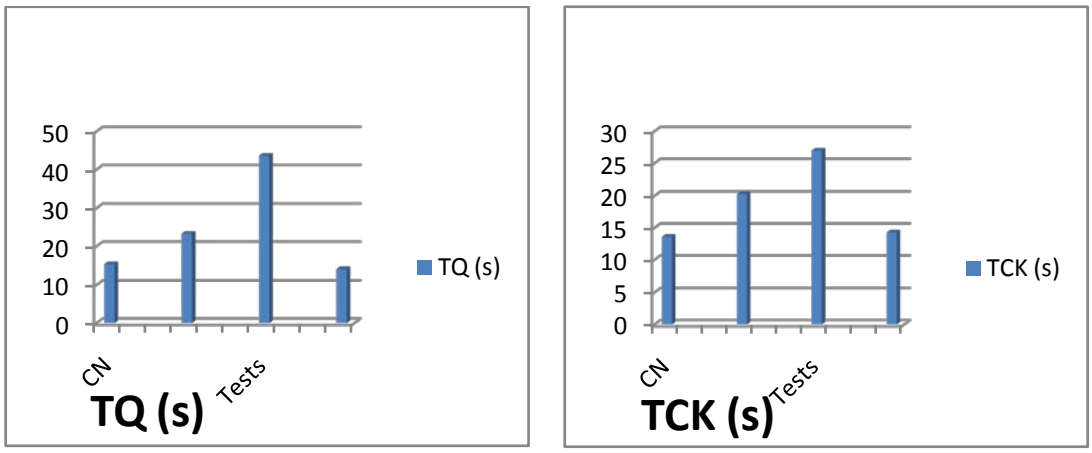


Figure 6: Histograms of TCK and TQ.

These results show that the difference is significant with the negative control. The TCK times are between 29 and 24s for the extract and the negative control time is between 13 and 15 s.
The time of Quick (TQ) or the prothrombin rate (TP) is the test which makes it possible to explore globally the exogenous pathway of coagulation where the tissue factor is the trigger of this pathway (Tripodi, 2009). The normal TQ is between 12 and 14 seconds depending on the reagents used (Caquet., 2004) and an elongation relative to the negative control reflects an anticoagulant activity of the test material vis-à-vis the exogenous pathway of coagulation.
The difference is significant between the extract and the negative control, the TQ time is between 40 and 49 (s) for the extract and the negative control time is between 14 and 16 (s).
Overall, the evaluation of the anticoagulant capacity of (MESC) established by the two coagulation timekeeping tests, TCK and TQ, shows that the extract exerts a significant anticoagulant activity with respect to the two coagulation pathways.
Recently, the discovery of medicinal plants with anticoagulant activity is rare **(**Rahman et al., 2013). The exact assignment of biological activity to a compound, or a small group of components in a plant extract is a difficult task, since the effective activity depends on several factors.

4. CONCLUSION

At present, medicinal plants are still the first reservoir of new drugs. They are considered a source of raw materials essential for the discovery of new molecules necessary for the development of future drugs. For this purpose, secondary metabolites are the subject of much research.
The present work focused on the study of some characteristics of the medicinal plant Senecio cineraria by the phytochemical study and the evaluation of their contents in flavonoids, the thin layer chromatography as well as the in vitro estimation of the anticoagulant activities, antibacterial, antioxidant and antihemolytic of this plant.
The results indicate the richness of this plant in different active secondary metabolites, whereas the quantitative analysis in flavonoid compounds and the qualitative analysis by TLC proves the richness of this plant in different classes of flavonoids which are endowed with an antioxidant power. The antimicrobial activity of plant extracts on bacterial strains was important as this plant showed remarkable activity on the three strains tested. The study of antioxidant power by the DPPH test revealed a strong antioxidant power. The study of the anticoagulant activity in vitro by the two chronometric tests, the TCK and the TQ revealed a strong anticoagulant power.
According to these results, the methanolic extract of *Senecio cineraria* induces a significant antihemolysis activity. This is proportional to the concentration of the extract used during the test. Thus, it would be interesting to extend the range of biological tests as well as the isolation and characterization of the active compounds in the various extracts in order to identify the different molecules responsible for the different biological activities of this species. plant.

All these results obtained in vitro is only a first step in the search for naturally occurring biologically active substances, an in vivo study is desirable, to obtain a more in-depth view of the biological activities of the extracts of this plant.

REFERENCES

- Beta T, Nam S, Dexter J E and Sapirstein H D. Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and Roller-Milled fractions, *Cereal Chem.* 2005; 82 : 390.
- Boharun et al. Évaluation in vitro de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens planch*. Sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium*. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège. 1996 ; 80: 772.
- Bolou et al. La résistance aux antimicrobiens : De quoi s'agit il ? Recherche sur les politiques de santé (Canada). 2011 ;1 :66.
- Bozin B, Mimica- dukic N, samojlik I and Goran A, Igic R. Phenolics as antioxydants in garlic(*Allium sativum L.,Alliaceae)*. *Food Chemistry*. 2008; 9: 115.
- Brand-Williams et al. Vitamines : Traité de nutrition artificielle de l'adulte. France Springer Verlag. 2005; 2: 127.
- Brantner A, Males Z, pepeljak S and Antolic A. Antibacterial activity of paliurusspina-christi Mill (christ's sthorn). *Journal of Ethnopharmacology*. 1996; 52: 119.
- Brummel k e, Pradis S G, Butenas S and Mann K G. Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation, Blood. 2002; 100: 152.
- Caquet., 2004. Antioxidant properties of spices, herbs and other sources. New York. Springer science, Business Media. tailored for a challenging environment. Microbiology and molecular biology reviews. 2004; 70 (2): 344.
- Choi et al. Ros Generation, Antioxidants, and Cell Death: Mitochondria and the heart, developments in cardiovascular medicine. Springer Science, Business Media. USA, 2006; 256: 99.
- Cristina et al. How to characterize a biological antioxydant free radical. Res.Comm. 2009; 32: 552.
- Dupont F and Guignard J L. Abrégés de Pharmacie « Botanique : les familles des plantes ». Elselvier MASSON De Monet de Lamarck. 2012; 15:192.
- Edeaga et al. Radioprotection against DNA damage by an extract of Indian green mussel, Perna viridis l. Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology. 2005; 26 (4): 263.
- Gerotziafast. Sur l'analyse qualitative et pharmacologique de deux plantes antihypertensives utilisées à N'gramanssabo en Côte d'Ivoire, Revue « Nature & Technologie ». Sciences Agronomiques et Biologiques. 2007;8: 9.
- Hamlat L N. Flavonoïdes et acides phenoliques de Pistacia lentiscus. Thèse de Magister. Ecole normale supérieure Kouba, Alger. 2006; 3: 153.
- Harborne B and Williams C. Advances in flavonoid research since 1992. *Photochemistry*, 2000;55: 481.
- Kabran Guy R M et al. Études sur les composés polyphenoliques en relation avec l'alimentation de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana Clem)* Université Laval Québec. 2012; 1 :11.
- Karumi et al. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart, disease, and cancer. Pharmacological review. 2004; 52(4): 673.
- Kholkhal F. La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Université Louis Pasteur (Strasbourg). 2014; 10 :17.
- Koleva et al. Extraction des huiles essentielles de thymus fontanesii et application à la formulation d'une forme médicamenteuse antimicrobienne, mémoire de magister en génie des procèdes chimiques et pharmacetiques. Université de M'hamed Bougara-Boumerdès, 2002; 9:13.
- Madjour S. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. Phytochemistry, 2012; 25: 5.
- Majob et al. Intérêt des antioxydants de l'alimentation des carnivores domestiques. Revue Med. Vet. 2003;158(4): 180.

- Mamyrbekova-Bekro J et al. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huile essentielle. Thèse de Doctorat. Lausanne Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL). 2013; 7 :52.
- Markham K R. Techniques of flavonoids identification. Academic press, London. 1982; 1: 113.
- Meziti A. Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* l'Étude in vitro et in vivo. Mémoire de magister en biochimie appliquée. Université EL-Haj Lakhdar-Batna. 2009; 65:34.
- Miki et al. The basics of oxidative biochemistry. Dans: Oxidative stress in aging. Aging Medicine. 1987; 1: 11.
- Milal k, Scalbert A and Expert D. Ironwth-holding by plant polyphénols and resistance to pathogens and rots. Phytochemestry. 1996; 42: 1551.
- Molyneux. The use of the stable free radical DiPhenyl Picryl Hydrazyl (DPPH), for estimating antioxidant activity. Songklanakarin; Journal of Science and Technology.2004; 26(2): 211.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Wayne, PA: Approved Standard, M_2–A_6, 1997; 6:12.
- Rahman et al. Evaluation du potentiel antioxydant de plantes médicinales et analyse phytochimique. Thèse de Magister. Option biochimie végétal appliquée. Université d'Oran Es-Sénia, Algérie. 2013; 17: 120.
- Rosato et al. Hémolyse et son exploration, Faculté de Médecine CHU 49000 Angers France, Hématologie biologique. 2007; 15: 72.
- Saffidine K. Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de *Carthamus caeruleus* et de *Plantago major*. Mémoire de Doctorat. Option microbiologie. Université Ferhat Abbes Sétif, Algérie. 2015;2 : 92.
- Said et al. Caractérisation et mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits phénoliques du blé dur (*Triticum durum*). Mémoire master biochimie moléculaire et santé. Université des Frères Mentouri Constantine. 2016; 41: 4.
- Silva et al. Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea Benth*. (Fabaceae). Thèse de doctorat en chimie biomolécules. Université d'Angers. 2017; 8: 63.
- Situ and Bobek. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidant from 133 indian medicinal plants. Food chemistry. 2000; 6: 938.
- Tiwari et al. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. Biol. Res. 2011; 33: 147.
- Tripodi. Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris, Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire de Magister en biotechnologie végétale. Université Mentouri-Constantine. 2009; 26: 84.
- Yang et al. Haemolytic activities and adjuvant effect of Astragalus membranaceus saponins (AMS) on the immune responses to ovalbumin in mice. Vaccine. 2005; 23(44): 5196.

Extraction assistée par champ électrique pulsé de composés intracellulaires à partir de macroalgues

Pascal Morançais[1*], James Desauté[1,2], Xiaojun Liu[2], Thomas Lendormi[2]
Nathalie Bourgougnon[1], Jean-Louis Lanoisellé[2*]
[1]Univ. Bretagne Sud, Laboratoire de Biotechnologie et Chimie Marines,
LBCM, EA3884, F-56300 Pontivy, France
[2]Univ. Bretagne Sud, UMR CNRS 6027, IRDL, F-56000 Vannes, France
*Corresponding authors: pascal.morancais@univ-ubs.fr - jean-louis.lanoiselle@univ-ubs.fr

SUMMARY
The application of pulsed electric fields (PEF) was tested on several types of macroalgae in order to increase the extraction of bioactives compounds. The extraction can be realized either by mechanical pressing or by solvent diffusion. Both processes may be enzymatic hydrolysis assisted. Three species of macroalgae were tested: green algae *Ulva* sp, red algae *Soleria* sp and brown algae *Sargassum* sp. The desired effect is electroplasmolysis, which causes the non-reversible creation of the membrane pores of macroalgae cells. The study consists in identifying the kinetics of extraction by monitoring the conductivity as a function of time for different values of PEF. The two main factors that govern the phenomenon are the electric field E (kV cm^{-1}) and the effective time t_{PEF} of treatment (= number of pulses x pulse duration). Electric field treatments of 0.7 to 3 kV cm^{-1}, with a specific energy of 1-20 kJ kg^{-1}, during a few hundred pulses and a total duration of less than 1 s were tested. Under these conditions, an enhancement of the extraction of some intracellular compounds was noticed.
Key words: macroalgae, CEP, conductivity, extraction, disintegration index, proteins

1. INTRODUCTION

Depuis les années 60, les plages bretonnes (côtes occidentales de la France) enregistrent des échouages massifs d'algues à l'approche de la saison estivale (Thao Khamsing *et al.*, 2017). Cette ressource qu'elle soit échouée ou récoltée en mer reste très importante tant en masse qu'en variété valorisable. Ce phénomène n'est pas uniquement lié à la région Bretagne mais se manifeste partout dans le monde de façon plus ou moins massive ; avec parfois des risques sanitaires liés à la fermentation de ces masses d'algues. Une multitude d'utilisations existe pour tirer profit de cette matière première. Au niveau mondial, les algues sont avant tout exploitées dans l'alimentation humaine comme légume (75%). La deuxième utilisation mondiale des algues est dans l'industrie des colloïdes (extraction des carraghénannes, alginates, …) (13 %), et enfin différentes applications (12 %) liées aux secteurs de la cosmétique et la santé (pouvoir anti-irritant, crème régénérante, médicament, …), dans l'agriculture (produits phytosanitaires, engrais, …) ou encore dans d'autres domaines très variés (biodiesel, industrie du plastique et du papier). En Europe, c'est l'industrie des colloïdes qui exploite le plus les algues (75 %) et seulement 1% des algues sont consommées en tant que légume (Person, 2010).
Différentes techniques sont utilisées pour extraire des molécules d'intérêt de ces biomasses algales : macération, broyage et ultrasons. Ces extractions se font à partir d'algues fraiches, congelées ou lyophilisées. La plupart des méthodes d'extraction sont basées sur la rupture de la paroi cellulaire. La macération d'algues est une procédure classique. Elle permet l'extraction du contenu hydrosoluble par choc osmotique. Des méthodes plus récentes existent telles que l'Extraction Assistée par Enzymes. Cette extraction est basée sur la dégradation de la paroi cellulaire par des enzymes comme des protéases, xylanases et des cellulases seules ou couplées.
La première approche de l'effet d'un champ électrique sur le vivant date de la fin des années 1960. Les prémices de la théorie de l'électroporation ont vu le jour, en 1970, lors d'une étude de l'effet des champs électriques externes sur la membrane cellulaire. L'extraction peut se faire par pressage simple ou couplée à d'autres méthodes telles que l'hydrolyse enzymatique et ou l'extraction par solvant. Récemment, les Champs Électriques Pulsés (CEP) ont été appliqués à l'échelle industrielle

sur des productions vinicoles (Perino *et al*., 2016). Mais à ce jour, peu de travaux mettent en valeur l'effet des Champs Électriques Pulsés (CEP) sur les algues marines. Il a été constaté la destruction diélectrique des cellules de l'algue *Valonia utricalis* à partir d'un potentiel de 0,85 V à 20°C (Zimmermann *et al.*, 1976).

L'effet recherché est l'électroplasmolyse qui provoque l'ouverture non réversible de pores dans les membranes des macroalgues. L'application des CEP doit se faire sur de la matière algale fraiche. En effet pour agir sur les pores cellulaires électriquement contrôlés, il est nécessaire de disposer d'une matière première fraîche. Ce critère change des extractions qui peuvent être mené sur des matières qui peuvent avoir subies des opérations de séchage (simple ou lyophilisation). De plus, pour pouvoir appliquer les CEP, il faut limiter la conductivité de la matière à traiter, ce qui conduit à des étapes de lavage à l'eau de manière à limiter la présence des sels présents en quantité dans l'eau de mer. L'application des CEP doit donc permettre de rendre poreuse la membrane des cellules des macroalgues et donc permettre l'extraction des éléments internes de la cellule.

L'objectif de cette étude est de mettre en œuvre les CEP pour extraire des molécules d'intérêt des macroalgues. Nous nous proposons de tester trois espèces de macroalgues, choisies pour être des espèces représentatives et invasives pour certaines : une algue verte *Ulva* sp, une algue rouge *Solieria chordalis*, algue brune *Sargassum muticum*.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Biomasse algale

***Ulva* sp**.

Ulva sp. Linnaeus 1753 appartient au genre des *Ulva*, de la famille des *Ulvaceae*, de l'ordre des Ulvales, de la classe des *Ulvophyceae*, du phylum des *Chlorophyta* (Guiry, 2018). Elle présente un thalle de 10 à 50 cm de hauteur et de quelques mm à 10 cm de largeur. Elle ressemble à une feuille de salade d'où, d'ailleurs, elle tire son nom « laitue de mer » (Fig. 1.a). Le thalle est formé de deux couches de cellules aux contours arrondis, ou polygonales disposées sans arrangement nets de 10 µm (Fig. 1.b) (Sabourin *et al.*, 2017).

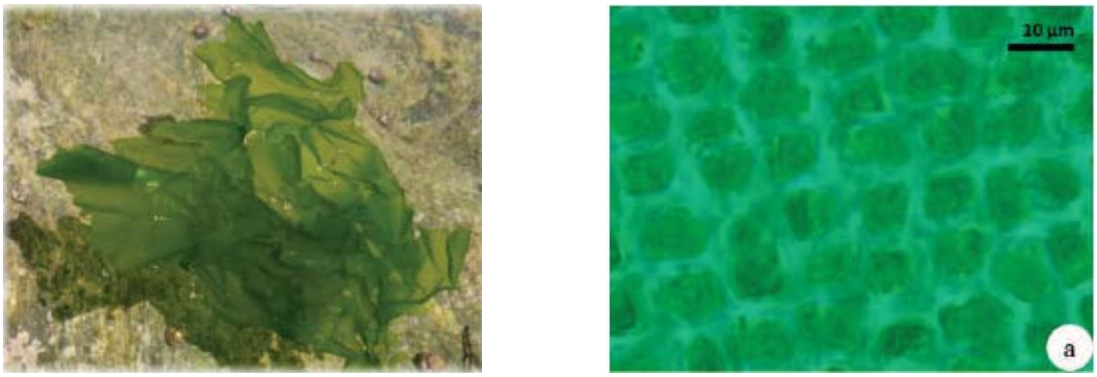


Figure 1 : Vue macroscopique (a) et microscopique (b) d'Ulva sp. Linnaeus 1753 (Hardouin, 2015).

La paroi cellulaire est majoritairement composée de cellulose. La phase matricielle est principalement constituée de polymères de polysaccharides sulfatés. Ce sont des xyloarabinogalactanes sulfatés, des glucuronoxylorhammanes, des glucuroxylorhamnogalactanes sulfatés et des ulvanes. Ils représentent 38-54 % du poids sec de l'algue. Outre ces polymères de polysaccharides, la paroi est constituée de protéines et glycoprotéines qui jouent un rôle dans la stabilisation des polysaccharides (Hardouin, 2015).

Ulva sp est constituée de 20% de protéines qui sont des molécules essentielles à la vie (transport d'ions, détoxification des cellules, participation aux réactions biochimiques…). Le taux de protéine de ces algues est proche de ceux des végétaux qui en contiennent le plus (soja par exemple).

Solieria chordalis

Solieria chordalis appartient au genre des *Solieria*, de la famille des *Solieriaceae*, de l'ordre des Gigartinales, de la classe des *Florideophyceae*, du phylum des *Rhodophtya* (Guiry, 2018). *Solieria chordalis* est une espèce de couleur rouge vif. Le thalle est un rameau de section cylindrique qui se termine en pointe, bordé de ramules de 1 à 2 cm de diamètre ressemblant aux dents d'un peigne (Fig. 2.a). Elle s'accroche à son substrat par un rhizoïde (Tourenne *et al.*, 2015). La coupe d'un thalle de *Solieria chordalis* montre une disposition ordonnée proche des coupes visibles chez les végétaux supérieurs avec au centre, des tubes creux contenant des filaments enchevêtrés [1]. On observe de grosses cellules incolores du parenchyme vers l'extérieur [2], puis vient une rangée de petites cellules corticales [3], et enfin vient l'épiderme [4] (Fig. 2.b) (Burlot, 2016).

Cette espèce se rencontre dans l'Atlantique Nord-Est, dans des milieux plutôt abrités, sur des fonds sablonneux, des graviers ou des débris de coquillage entre 1 et 15 m de profondeur (Tourenne *et al.*, 2015).



Figure 2 : Vue macroscopique (a) et microscopique (b) de Solieria chordalis (Tourenne et al., 2015 ; Burlot, 2016)

La paroi cellulaire est majoritairement composée de polysaccharides structuraux (cellulose, mannanes et xylanes). La phase matricielle est principalement constituée de polymères de polysaccharides sulfatés rattachés aux lambda carraghénanes (carraghénanes). Outre ces polysaccharides matriciels, la paroi est composée de protéines et glycoprotéines (Burlot, 2016).

Chez les algues rouges, les protéines représentent 10-50 % de leur poids sec. De plus, les algues rouges possèdent quelques acides aminés essentiels (Valine, Leucine…), en plus des trois acides aminés à l'origine de leur flaveur (acide glutamique, acide aspartique, alanine). Les sucres de réserve sont accumulés par *Solieria chordalis* (C.Agardh) sous deux formes : l'amidon et des glucides de faible poids moléculaire. Ces sucres accumulés dans l'organisme permettent de répondre à des évènements imprévus (stress dû à un changement d'environnement).

Sargassum muticum

Sargassum muticum appartient au genre des *Sargassum*, de la famille des *Sargassaceae*, de l'ordre des Fucales, de la classe des *Phaeopyceae*, du phylum des *Ochrophtya* (Guiry, 2018). *Sargassum muticum* est une algue brune présentant des thalles de grandes tailles (1 à 12 m). Son thalle souple et très coriace s'accroche à son substrat par un disque basal. Il porte de nombreuses petites vésicules de 2 à 6 mm qui servent de flotteurs pour pouvoir se maintenir droite dans l'eau (Fig. 3.a) (Chevallier *et al.*, 2011).

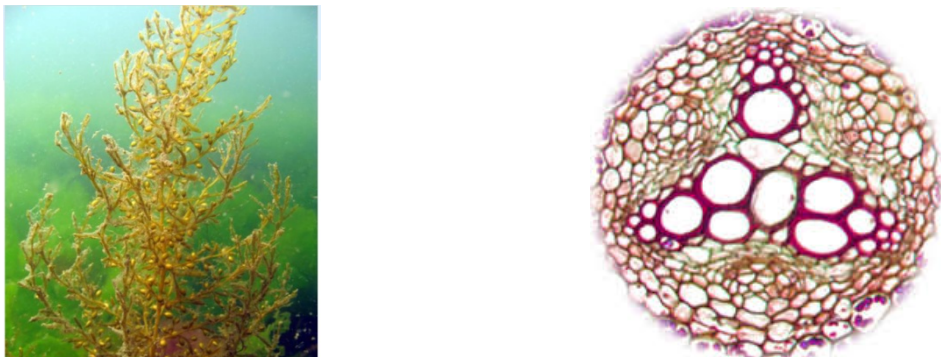


Figure 3 : Vue macroscopique (a) et microscopique (b) de Sargassum muticum (Yendo) Fensholt (Chevallier et al., 2011)

Des grosses cellules creuses au milieu du thalle sont bordées de petites cellules rondes sans disposition précise. Ces petites cellules sont bordées par une couche régulière de cellules qui forment l'épiderme (Fig. 3.b).

La paroi squelettique des cellules est composée de deux fines couches de cellulose. La paroi matricielle est composée de deux polysaccharides anioniques sulfatés (polysaccharides riches en fucose, et acide alginique). Outre ces polysaccharides, des polysaccharides de mucilage et de cuticule (alginate et laminarine) et des polysaccharides de stockages (laminarine et mannitol) forment la paroi associée souvent à des polyphénols (Puspita, 2017). Les phlorotannins sont les seuls composés de la classe des polyphénols présents chez les algues brunes. Elles représentent 1 à 15 % du poids sec (Puspita, 2017). Les phlorotannins ont une grande diversité structurale. L'ossature est constituée de la polymérisation de phloroglucinol, auquel peut se greffer des substitutions halogènes. Les phlorotannins ont des propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, antifongiques et antibiotiques (Creis, 2016). La paroi cellulosique des trois algues est décrite dans la figure 4.

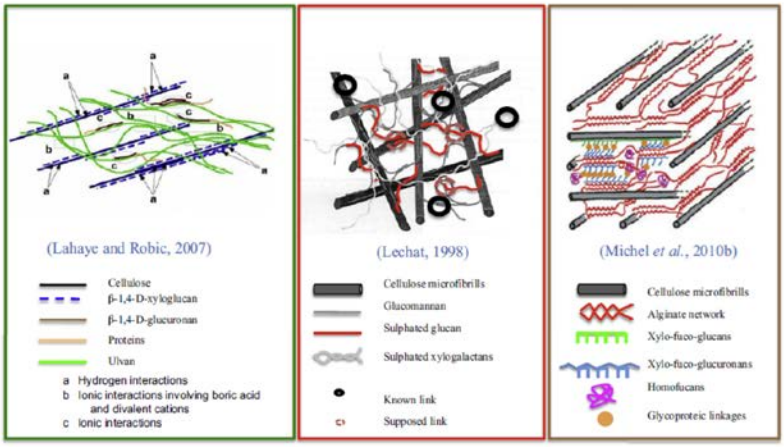


Figure 4 : Schéma comparatif des parois cellulosiques des trois algues (Hardouin, 2015 ; Burlot, 2016 ; Puspita, 2017)

2.2. Préparation des échantillons

Les algues fraiches sont nettoyées, séparées et conservées dans des bacs d'eau de mer à 3°C jusqu'à leur utilisation. Elles sont lavées deux fois à l'eau du robinet, et laissées trempées deux heures dans un bain d'eau du robinet. Le traitement est répété selon le même mode opératoire avec de l'eau ultrapure en prolongeant le bain toute la nuit à 3°C.

Après ces opérations, *Ulva* sp. est rapidement hachée dans un blender. *Solieria chordalis et Sargassum muticum* sont découpées en tronçon de 1 cm. Les échantillons sont ensuite pressés sous

forme de gâteau dans le petit cylindre de 2,1 cm de diamètre et 1 cm de hauteur servant de chambre de traitement. Sous cette forme, l'échantillon peut ensuite subir le traitement CEP. Puis, les gâteaux d'algues récupérés sont mis dans 10 mL d'eau puis centrifugés pendant 20 min à 4000 tr/min pour en extraire les molécules d'intérêt.

2.3. Dosage des protéines

La teneur en protéines hydrosolubles est déterminée par la méthode Bradford (1976). 200 µL de réactif de Bradford est ajouté à 800 µL d'échantillon. L'absorbance est mesurée à 595 nm après homogénéisation des solutions. Le standard utilisé est la Sérum Albumine Bovine (SAB), permettant de réaliser une gamme de 0 à 50 mg/L.

2.4. Champs Électriques Pulsés (CEP)

Le principe des CEP est de soumettre un produit entre deux électrodes à un champ électrique de forte intensité (kV/cm) sous forme d'impulsions courtes (de l'ordre de la µs à la ms) (Zelmat, 2017). L'application d'un champ électrique entraine une différence de potentiel au niveau membranaire, U_m. Pour de faible U_m (entre 0,2 à 1 V), les cellules forment des pores et deviennent perméables. Ce phénomène est appelé électroporation. Lorsque le potentiel U_m est plus important (0,7 à 2,2 V), les membranes des cellules sont endommagées et cela peut entrainer la lyse cellulaire (Fig. 6) (Vorobiev *et al.*, 2010). La théorie la plus acceptée expliquant la formation des pores est le modèle d'électrocompression de Zimmermann *et al.* (1976). Dans cette théorie, l'attraction des charges opposées de part et d'autre de la membrane entraine sa compression. Cette force d'électro-compression est compensée par une force élastique. Quand le champ électrique appliqué dépasse une valeur critique (E > Ecr), la force d'électro-compression devient supérieure à la force élastique, des pores se forment ou s'élargissent au cœur de la membrane (Brianceau, 2015). La cinétique d'électroporation et de destruction de cellules par CEP est décrite sur la figure 6. Après formation des pores, l'échange d'eau et de molécules entre les milieux intra et extracellulaires entraine le gonflement et la lyse des cellules (Zelmat, 2017).

L'efficacité de la technique est mesurée par l'évaluation de la conductivité électronique par l'équation suivante : $Z = (\sigma - \sigma_i) / (\sigma_d - \sigma_i)$ où σ est la conductivité électrique après traitement, σ_i est la conductivité du tissu intact et σ_d est la conductivité du tissu totalement dénaturée (Vorobiev *et al.*, 2010).

L'efficacité des champs électriques pulsés est influencée par les conditions opératoires : l'intensité du champ électrique (V/cm), la fréquence (Hz), la durée des impulsions (s), le délai entre deux impulsions (Δt en s), le temps du traitement (s), la conductivité du milieu (bulle d'air, présence d'électrolyte …), l'amplitude (V) et la forme des impulsions (sinusoïdale, rectangulaire, exponentielle …) (Vorobiev *et al.*, 2010) (Grosso *et al.*, 2015). La forme la plus efficace des impulsions, d'un point de vue énergétique et d'endommagement de la cellule, est la forme rectangulaire.

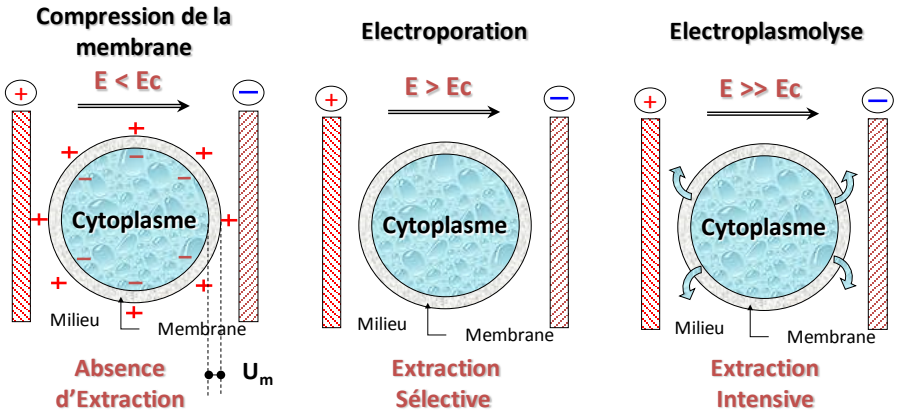


Figure 5 : Modèle d'électrocompression de Zimmermann et al.

L'appareillage CEP comprend une alimentation haute tension continue TECHNIX (SR2.5-600, Technix), un générateur d'impulsion TTi (TGP110) relié à un oscilloscope (OX 8022 20 MHz différentiel, Metrix, France), d'un modulateur de tension (AHTPM 2.5, Effitech, France), d'une cellule CEP, d'un boitier électrique et d'un impédance-mètre (U1733C, Agilent Technologies, Californie, États-Unis). L'installation peut fournir au maximum 2 500 V pour une puissance maximale de 600 W et des fréquences de 24 Hz à 240 Hz. La cellule CEP fait 2,1 cm de diamètre et 1 cm de hauteur. Les intensités des CEP, utilisées lors de cette étude, sont de 1 500 V/cm, 2 000 V/cm et 2 500 V/cm. La durée des impulsions a pour réglage 2 µs ou 4 µs et une fréquence de 25 Hz, c'est-à-dire que les impulsions sont espacées de 4 ms. Le temps de traitement CEP total pour l'extraction d'ions et l'extraction de protéines est de 60 s.
Le suivi de l'effet des CEP sur les algues se fait de 2 manières différentes :

- Suivi de la conductivité de l'échantillon qui rend compte de la fuite des électrolytes internes de la cellule et donc de l'ouverture des pores cellulaires.
- Suivi de la concentration en protéines solubles par dosage de Bradford qui rend compte là aussi de l'électroporation

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Choix des conditions opératoires

Le choix des conditions opératoires a été mené pour chaque espèce après une série d'expériences où l'on a pu observer les effets de l'intensité et de la durée des impulsions.
Pour illustrer ce propos on choisit de montrer les résultats concernant l'algue *Sargassum*. La figure 6 montre l'indice de désintégration *Z* pour différentes conditions opératoires. On remarque que la durée d'impulsion n'a pas d'influence notable, par contre l'intensité du traitement a un rôle prépondérant. En effet, la différence entre un champ à 1500 V/cm et 2500 V/cm est très significative. La durée du traitement est, elle en relation avec la complexité de la structure de l'algue.

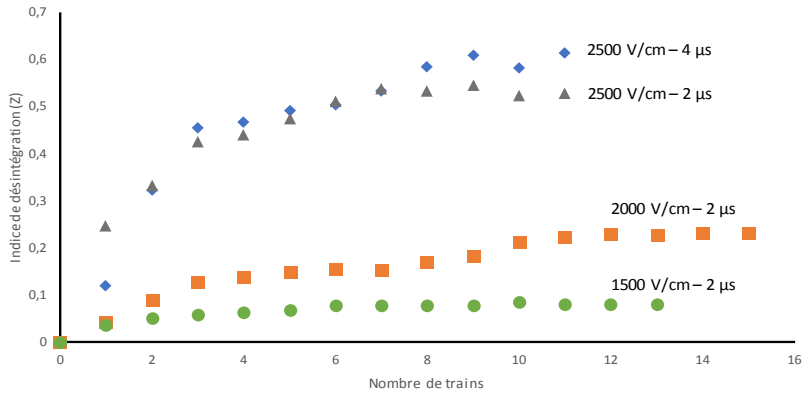


Figure 6 : Indice de désintégration Z en fonction du nombre de trains N pour Sargassum muticum. (pour des intensités de 1 500, 2 000 et 2 500 V/cm et des durées d'impulsions de 2 et 4 µs). La durée d'un train d'impulsions est égale à 10 s. F = 25 Hz

Les conditions opératoires choisies pour le reste de l'étude sont les suivantes : une intensité de 2 500 V/cm, une durée d'impulsion de 2 µs et une fréquence de 25 Hz (c'est-à-dire que les impulsions sont espacées de 4 ms). Le temps de traitement CEP total pour l'extraction d'ions et l'extraction de protéines est de 60 s.

3.2. Conductivité ionique

Concernant le suivi de l'électroporation par mesure de conductivité, l'ensemble des résultats est rassemblé dans la figure 7. Pour chacune des algues traitées, on observe un effet significatif du traitement CEP. Cependant, les résultats observés sont plus faibles pour les algues vertes et rouges et beaucoup plus marqués pour les algues brunes. Cette augmentation de la concentration en ions dans le milieu extérieur de la cellule traduit une ouverture des pores de la membrane cellulaire.

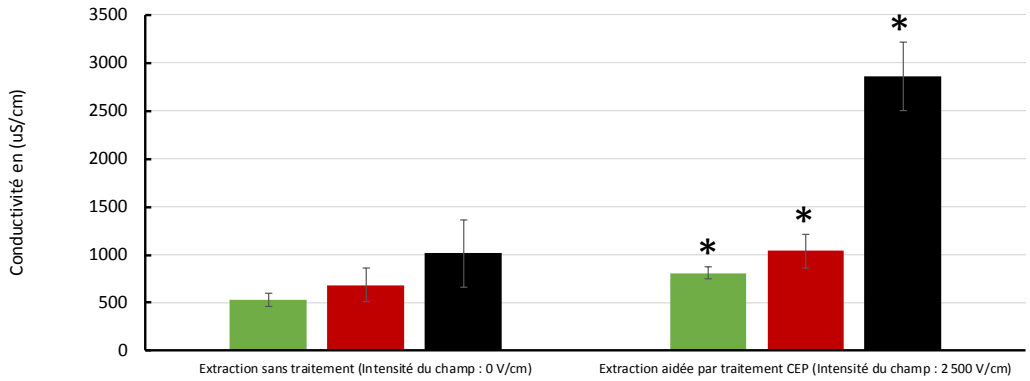


Figure 7 : Conductivité (en µS/cm) des ions des échantillons d'Ulva sp. (vert, à gauche), de Solieria chordalis (rouge, au milieu), et de Saragassum muticum (noir, à droite) ayant subis ou non le traitement. Les barres d'erreur représentent l'écart type (* différence significatif à l'extraction sans traitement à 5 %)

3.3. Concentration en protéines solubles

Le suivi de l'électroporation par mesure de la concentration en protéines solubles est montré sur la figure 8. On remarque que la variation de l'extraction est très significative pour les variétés d'algues verte et brune et beaucoup moins significative pour l'algue rouge. Ces différences sont surement liées à la structure macroscopique des algues. Il faut noter que ces protéines ne représentent qu'une faible part des protéines des algues. Les autres, liées à des structures plus importantes, ne s'extraient pas plus facilement par simple exposition à un CEP.

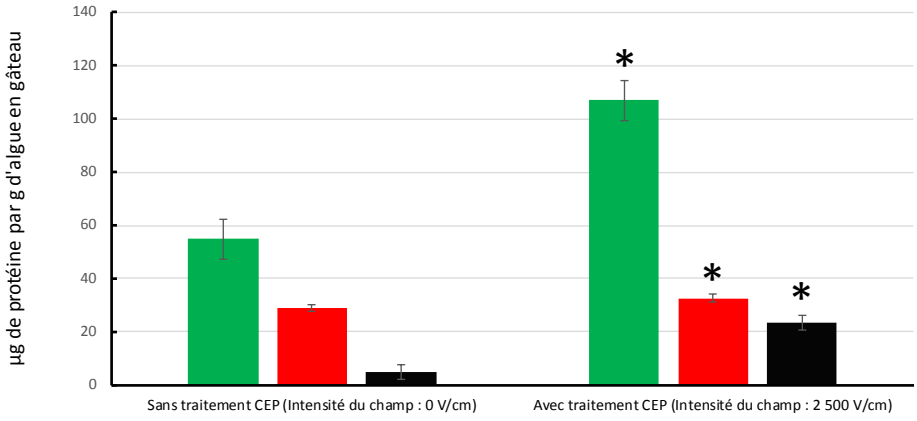


Figure 8 : Extraction des protéines (en µg par g de gâteau) de Ulva sp. (vert, à gauche), de Solieria chordalis (rouge, au milieu), et de Saragassum muticum (noir, à droite) ayant subi ou non le traitement. Les barres d'erreur représentent l'écart type (* différence significative à l'extraction sans traitement à 5 %)

4. CONCLUSION

Les résultats de cette étude sont de nature plus qualitative que quantitative. Notre propos ici était d'évaluer le potentiel d'action des CEP sur la membrane cellulaire des macroalgues marines

frâiches. La difficulté première tient à ce que la récolte et la conservation des algues se passe en milieu aqueux à forte salinité (eau de mer) ; ce qui rend l'application directe des CEP impossible en appliquant le champ avec un système d'électrode plate avec l'échantillon entre les 2 électrodes. La conductivité de l'eau de mer est trop importante, ce qui nous conduit à des séquences de lavage à l'eau et à l'eau déminéralisé de manière à diminuer cette conductivité. Ce protocole de préparation d'échantillon induit des biais dans l'extraction des électrolytes interne des cellules algales ainsi qu'une diminution des taux de protéines internes. Ceci est visible au niveau des extraits secs des algues avant et après traitement de lavage, ainsi que dans la valeur des cendres de ces mêmes échantillons.

L'ensemble des résultats obtenus confirment à la fois les résultats de la littérature sur l'Ulve et les hypothèses que nous avions formulées concernant d'autres groupes d'algues (rouge et brune). Pour chacune d'entre elles nous avons pu montrer une électroporation. Les algues vertes, d'une part, et rouges, d'autre part, que nous avons choisies ont des structures particulaires, en feuillet unicellulaire *(Ulve*) et tubulaire (*Soliera*). Ces structures peuvent expliquer que les effets des lavages ont pu être plus importants que pour *Sargassum*. En effet, les différentes séquences de lavage ont pu largement vider *Soliera* de ces électrolytes et de ces protéines solubles, ce qui est moins vrai pour *Ulva* et faible pour *Sargassum*. Néanmoins, l'effet est visible pour les trois espèces et on peut conclure que l'application des CEP modifie la perméabilité membranaire des macroalgues. Cet effet est plus spectaculaire pour *Sargassum* que pour les autres algues. Cette électroporation pourrait être de nature à renforcer l'extraction de molécules d'intérêt qui seraient liés aux membranes cellulaires des macroalgues. L'ouverture irréversible des pores sous l'action des CEP est à même de permettre une meilleure action de solvant et/ou de processus le lyse enzymatique ou chimique. Cette étude préliminaire permet d'envisager de poursuivre les travaux, plus particulièrement pour *Sargassum*.

REFERENCES

- Brianceau S. 2015, *Vers une amélioration quantitative et qualitative de l'extraction des composées phénoliques du marc de raisin rouge à l'aide d'électrotechnologies.* Thèse de l'Université de Technologie de Compiègne, 2015.
- Burlot AS. 2016, *Valorisation des métabolites d'algues proliférantes par voie enzymatique : applications dans les domaines de la nutrition et santé animale, végétale et humaine, de la cosmétique et de l'environnement*. Thèse de l'Université Bretagne Sud, 2016.
- Chevallier F, Le Granché P, Le Granché S, Dupré C. 2011, Sargassum muticum (Yendo) Fensholt. In: DORIS, 2011, [Consulté le 14 mars 2018].
http://doris.ffessm.fr/ref/specie/2013
- Creis E. 2015, *Étude de la voie de biosynthèse des phlorotannins chez les algues brunes, de la caractérisation biochimique d'enzymes recombinantes à l'étude des réponses écophysiologiques.* Thèse de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, 2015.
- Guiry MD. Algaebase ©. In: World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway, 1996-2018, [Consulté le 20 mars 2018]. http://www.algaebase.org/
- Hardouin K, Bedoux G, Burlot AS, Donnay-Moreno C, Bergé JP, Nyvall-Collén P, Bourgougnon N. 2016, Enzyme-assist extraction (EAE) for the production of antiviral and antioxydant extracts from green the green seaweed Ulva amoricana (Ulvales, Ulvophyceae). *Algal Research*, 16, 233-239.
- Perino S, Makerri C, Abert Vian M, et Chemat F. Extraction d'actif cosmétique. Site internet, In : Technique de l'ingénieur, 2016
- Person J. 2010, Algues, filières du futur. In: Adebiotech, [Consulté le 12 Mars 2018].
https://www.poletrimatec.fr/article/production_et_valorisation_de_la_biomasse_algale
- Puspita M. 2017, *Enzyme-assisted extraction of phlorotannins from Sargassum and biological activities*. Thèse de l'Université Bretagne Sud, 2017.
- Sabourin N, Huet S, Lamare V, et Verlaque M. 2017, Ulva sp. groupe intestinalis Linnaeus 1753, In: DORIS, [Consulté le 14 mars 2018]. http://doris.ffessm.fr/ref/specie/3093

- Thao Khamsing W, Ceci-Renaud N, et Marcus V. 2017, Marées vertes et fréquentation touristique. In: Analyse, Service de l'économie, de l'évaluation, et de l'intégration du développement durable (SEEIDD), Ministère de l'Environnement, de l'Énergie et de la Mer.
- Tourenne M, Lamare V, et Verlaque M. Solieria chordalis (C. Agardh) J. Agardh, 2015, In : DORIS [Consulté le 14 mars 2018]. http://doris.ffessm.fr/ref/specie/3596
- Vorobiev E, Lebovka N, Lanoisellé J-L. 2010, Champs électriques pulsés (CEP). In: Eco-Extraction du Végétal : Procédés innovants et solvants alternatifs. Dunod, 3, 5189.
- Zelmat A. Analyse des effets du champ électrique pulsé haute tension sur le tissu cellulaire : Application à la pomme de terre. Thèse, Université des Sciences et de la Technologie d'Oran, 2017.
- Zimmermann U, Pilwat G, Beckers F, Riemann F. 1976, Effect of external electrical fields on cell membranes. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 3, 58-83.

Etude des caractéristiques physico-chimiques de noyaux de dattes

Essya Bensmida[a,d], Aida Ben Hassen[b], Maher Sghairoun[c], Aurore Richel[d], Nicolas Jacquet[d], Abdelwaheb Chatti[a]

[a]Laboratoire de Traitement et Recyclage des Eaux, Centre de Recherche et des Technologies des Eaux (CERTE) Technopole de Borj-Cédria (Tunisie)

[b]Laboratoire de Maîtrise de l'Energie Eolienne et de Valorisation Energétique des Déchets (LMEEVED), Centre de Recherche et des Technologies des Eaux (CERTE) Technopole de Borj-Cédria è (Tunisie)

[c]Laboratoire d'Aridoculture et Cultures Oasiennes Institut des Régions Arides (IRA), Medenine (Tunisie).

[d]Laboratoire chimie biologique industriel, unité de biomasse et technologies vertes de Gembloux Agro-Bio Tech (Belgique)

e-mail : essyabensmida@gmail.com

RESUME

Le fruit du palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*) est l'un des fruits les plus abondants au monde. Des centaines de variétés ayant différentes textures, couleurs et saveurs sont disponibles pour la valorisation et l'adoption dans des opérations de transformation des aliments. Cependant, plusieurs recherches ont mentionné l'importance nutritionnelle des noyaux de dattes. Dans ce contexte, ont a essayé d'étudier les caractéristiques physico-chimiques des graines de dattes qui ont montré une grande richesse en protéines qui atteint 5.77% par rapport à la matière sèche et une teneur en matière grasse proche de 8% avec une composition qui montre une dominance de l'acide oléique qui dépasse 40%. Les graines de dattes constituent un sous-produit excédentaire du traitement des fruits de dattes et son exploitation dans l'alimentation humaine et animale fournirait un avantage économique.

Mots-clés : palmier dattier, noyaux de dattes, protéines, matière grasse.

1. INTRODUCTION

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*) est l'un des palmiers les plus cultivés au monde. Sa culture s'étend de l'Afrique du Nord au Moyen-Orient (Barreveld, 1993). Il a une bonne tolérance aux climats froids et chauds. Le fruit est composé d'un péricarpe charnu et d'une graine représentant entre 10 et 15% du poids du fruit de la datte (Hussein et al., 1998; Almana et Mahmoud, 1994; Besbes et al., 2004; Al Farsi et al., 2007, Al Farsi et Lee, 2008; Elleuch et al., 2008).

L' objectif de cette étude est d'évaluer la composition chimique des graines de dattes 'Daglat Nour' cultivés dans la région kébili du sud Tunisien ainsi que la composition en acides gras de la fraction lipidique.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Matériel étudié

Les noyaux de dates de la variété 'Daglat Nour' sont lavés et séchés à température ambiante puis broyés à une granulométrie de l'ordre de 0.5 mm.

2.2. Propriétés physico-chimiques

Le taux d'humidité est déterminé après séchage à l'étuve à 105°C.

Le taux de cendres a été déterminé par calcination dans un four à moufle Nabertherm (contrôleur B180). Les échantillons ont été préalablement séchés pendant 24 heures à 105 °C. La calcination a ensuite été effectuée en suivant une rampe de température de 2 heures puis maintenue 4heures à 575 °C.

2.3. Taux de protéines

Le taux de protéine est déterminé par le dosage de l'azote par la méthode Kjeldhal. La méthode Kjeldahl consiste à transformer l'azote organique en azote minéral (minéralisation), puis à déplacer l'ammoniac du sel d'ammonium obtenu (distillation) pour le neutraliser par une solution acide de

titre connu (dosage). La teneur en protéines brutes du produit est obtenue en multipliant la valeur obtenue lors de la détermination de la teneur en azote par le facteur 6.25.

2.4. Teneur en Matières grasses

Les lipides libres ou liés aux protéines sont extraits à froid par le chloroforme-méthanol méthanol (2:1, v/v) et purifiés par lavage de la phase organique avec une solution saline (NaCI, 0,72%) selon le principe de la méthode de Folch et al (1957).

2.5. Dosage des acides

La composition en acides gras est déterminée par CPG sur des extraits au BF3/methanol. On obtient des esters méthyliques à partir des acides gras méthanolysés par un mélange BF3/méthanol. L'extrait est purifié par lavage de la phase organique avec une solution saline (NaCI, 0,72%).

2.6. Détermination des extractibles :

La méthode soxhlet permet d'extraire les composants solubles dans l'eau (sucres non structuraux, composant azotés, fertilisants) et dans l'éthanol (chlorpyhlle, cires, matières grasse, résines, tanins, pigments, gommes) .

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Composition physicochimique des noyaux de 'Daglat Nour'

Le tableau 1 résume la composition physicochimique et biochimique des noyaux de dattes de la région kébili du sud Tunisien. La teneur en eau est de l'ordre de 5.24%, des résultats identiques de la teneur en eau (entre 3.14 et 5.19%) ont été rapportées par Al-Farsi et Lee (2008). Par contre, des teneurs plus élevées ont été obtenues par Hamada et al. (2002) et Besbes et al. (2004) qui ont rapporté des teneurs en eau variant de 9,4 à 8.6% et de 7.1 à 10.3% sur des cultivars tunisiens et émiratis, respectivement.

La teneur en matières sèches est de 94.75%. Ainsi, selon Boudechiche et al. (2009), le taux de la matière sèche des variétés de noyaux de dattes algériennes varie de 81 à 93%.

Le taux de protéines est de 5.78% , elle est de 8.59 % selon M. Khali et al (1998). D'après Barreveld (1993), le taux de protéines brutes varie de 5 à 7% MS ; des teneurs identiques ont été rapportées par Salim and Ahmed (1992) et Abou-Ela et al. (1995).

Tableau 1 : Composition physicochimiques des noyaux 'Daglat Nour'

Compposant		Pourcentage (%)
Matière sèche		94.751
Humidité		5.249
Cendre		1.354
Proteine		5.782
Lipides		7.778
Extractibles	A l'eau	11.07
	A l'ethanol	9.36

3.2. Composition en acides gras des noyaux de 'Daglat Nour'

Le profil en acides gras des noyaux a montré que les acides gras les plus abondants noyaux des variétés de dattes étudiés sont les acides oléique et laurique de valeurs 40.98 % et 27.16% respectivement, suivis par les acides myristique (11.11%), palmitique (8.95%) et linoléique (8.54%). Cependant, les acides stéarique, caprique et caprylique ont été retrouvés à de faibles quantités (Tableau 2).

Rahman et al. (2007) ont rapporté que l'huile des noyaux de dattes est une huile oléique-laurique, les acides oléique et laurique sont les acides gras majeurs. D'autres travaux menés par Besbes et al. (2004), Al-Hooti et al. (1995) et Emna et al. (2008) ont rapporté qu'en plus de ces deux acides, les acides linoléique, palmitique et myristique sont également majoritaires.

Tableau 2 : Composition en acides gras des noyaux de dattes étudiés.

Biomasse	Acide Gras	Pourcentage (%)
Noyau	Acide caprylique (C8)	0,31
	Acide caprique (C10)	0,62
	Acide laurique (C12)	27,16
	Acide myristique (C14)	11,11
	Acide palmitique (C16)	8,95
	Acide stéarique (C18)	2,32
	Acide oleique (18:1)	40,98
	Acide linoléique (18:2)	8,54

4. CONCLUSION

Les graines de palmier dattier constituent une excellente source de composants d'aliments en tenant compte de leurs teneure en protéines, en lipides. Le profil en acides gras a montré que l'huile de noyaux de dattes est une huile oléique-laurique, C'est une huile relativement stable du point de vue composition en acides gras saturés, monoinsaturés et polyinsaturés, ce qui représente un avantage pour l'alimentation humaine et permet d'envisager l'utilisation des farines de noyaux de dattes pour couvrir les différents besoins nutritionnels et métaboliques de l'homme.

REFERENCES

- Abou-Ela S, El-Hendawy M, Sherif SY, Tewfik ES, Attia A (1995). CIHEAM-Options Méditerranéennes, 57-61.
- Al Farsi M, Alasalvar C, Al-Abid M, Al-Shoaily K, Al-Amry M, Al-Rawahy F (2007). Compositional and functional characteristics of dates, syrups, and their by-products. Food Chem., 104, 943-947.
- Al Farsi M, Lee CY (2008). Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. Food Chem., 108, 977-985.

Al-Farsi M, Lee CY (2008).Nutritional and functional properties of dates: A review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 48, 878-887.

- Al-Hooti S, JiuanS, Quabazard H (1995). Studies on the physico-chemical characteristics of date fruits of five UAE cultivars at different stages of maturity, Arab Gulf Journal of Scientific Research, 13, 553-569.
- Almana HA, Mahmoud RM (1994). Palm date seed as an alternative source of dietary fibre in Saudi bread. Eco. Food Nutr., 32, 261-270.
- Barreveld WH (1993). Dates palm products; FAO agricultural services bulletin No. 101. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, M-17, ISBN: 92-5-103251 103253.
- Besbes S, Blecker C, Deroanne C, Drira NE, Attia H (2004). Date seeds chemical composition and characteristic profiles of the lipid fraction. Food Chem., 84, 577-584.
- Boudechiche L, Araba A, Tahar A, Ouzrout R (2009). Etude de la composition chimique des noyaux de dattes en vue d'une incorporation en alimentation animale, Live Stock Research for Rural Development, 21, 1-11.
- Elleuch M, Besbes S, Roiseux O, Blecker C, Deroanne C, Drira ND, Attia H (2008). Date flesh: Chemical composition and characteristics of the dietary fibre. Food Chem., 111, 676-682.
- Emna BS, Trigui LM, Thabet SR, Hammami M, Lotfi M (2008). Chemical composition of pulp and pits. International Journal of Food Science and Technology, 43, 2033-2037.
- Folch J, Lees M, Sioane-Staniey GA (1957). A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., 266, 497-509
- Hamada JS, Hashim IB, Sharif AF (2002). Preliminary analysis and potential uses of date pits in foods. Food Chem., 76, 135- 137.

- Hussein AS, Alhadrami GA, Khalil YH (1998). The use of dates and date pits in broiler starter and finisher diets. Bioresour. Technol., 66, 219-223.

Salim S, Ahmed A (1992). Protein and amino acid contents of some Saoudi Arabian date palm seeds (Phoenix dactylifera L.), Arab Gulf J. Scient. Res., 10, 1-9.

- Rahman MS, Kasapis S, Al-kharusi NSK, AlMarhubi IM, Khan AJ (2007). Composition characterization and thermal transition of date pits powders, Journal of Food Engineering, 80, 1-10.

Authentication of Nineteen Tunisian Extra Virgin Olive Oil cultivated under arid conditions based on Phenolic and Fatty acid Contents

Amal Omri[1,2], Sofiane Abdelhamid[1], Mohamed Ayadi[1], Mariem Gharsallaoui[1], Amira Araouki[1], Mohamed Gouiaa[12], Cinzia Benincasa[3]

[1]Olive Institute, Rue de l'Aéroport, B.P 1087 - 3000-Sfax – Tunisia

[2]High Agronomic Institute of Chott Mariem, University of Sousse, 4042 Sousse, Tunisia

[3]Council for Agricultural Research and Economics - Research Centre for Olive, Citrus and Tree Fruit - via Li Rocchi, 87036 Rende (CS) – Italy

SUMMARY

The extra virgin olive oil (EVOO) and olives are the key sources of biophenols and unsaturated fatty acids in the Mediterranean diet. The aim of this work was to characterize EVOOs from nineteen varieties cultivated in the South of Tunisia (Boughrara-Sfax) in terms of their fatty acids and phenolic profiles. Dhokar Nafti and Fougi Gtar scored the highest contents of total phenols that exceeded 1010 mg per kg of oil. The lowest values were recorded for the varieties Zalmati and Rakhmi with 224.99 and 223.2 mg per kg of oil respectively. Principal component analysis (PCA) was accomplished according to the phenolic contents. It allowed distinguishing four groups of cultivars. For the fatty acid profiles, the gas chromatography permitted the identification of thirteen fatty acids for all the samples. Significant differences were detected depending on cultivars ($p< 0.05$). The concentration of oleic acid was the most important and reached 80.66 g per 100g and 79.19 g per 100 g of the total fatty acid composition for the varieties Rakhmi and Boudaoud respectively. The contents of linoleic acids were above 20g for the variety Meski Tunis and palmitic acid fraction reached 19.8 g for Dhokar Nafti. These results constitute a data bank that can be used to authenticate the varietal origin of Tunisian EVOOs.

Keywords: Virgin olive oil, Authenticity, Tunisian cultivars, Phenolic compounds, Fatty acids

RESUME

L'huile d'olive extra vierge (EVOO) et les olives sont les principales sources de biophénols et d'acides gras insaturés dans le régime alimentaire méditerranéen. L'objectif de notre travail était de caractériser les huiles de dix-neuf variétés cultivées dans le sud tunisien (Boughrara- Sfax) en termes de leurs compositions en acides gras et de leurs profils phénoliques. Dhokar Nafti et Fougi Gtar ont enregistré les teneurs les plus élevées en phénols totaux dépassant 1010 mg par kg d'huile. Les valeurs les plus basses ont été réservées pour les variétés Zalmati et Rakhmi avec 224,99 et 223,2 mg par kg d'huile, respectivement. L'analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée en fonction de la composition phénolique et des différents polyphenols détectés. Cette ACP a permis de distinguer quatre groupes de cultivars. Pour la composition acidique, la chromatographie en phase gazeuse a permis d'identifier treize acides gras pour tous les échantillons. Des différences significatives ont été détectées en fonction des variétés ($p <0,05$). La concentration en acide oléique était la plus importante et atteignait 80,66 g pour 100 g et 79,19 g pour 100 g de la composition totale en acides gras des variétés Rakhmi et Boudaoud, respectivement. La teneur en acide linoléique était supérieure à 20 g pour la variété Meski Tunis et la fraction d'acide palmitique atteignait 19,8 g pour Dhokar Nafti. Ces résultats constituent une banque de données pouvant être utilisée pour authentifier l'origine variétale des huiles extra vierges tunisiennes.

Mots-clés: Huile d'olive vierge, Authenticité, Variétés tunisiennes, Composés phénoliques, Acides gras.

1. INTRODUCTION

L'huile d'olive vierge (VOO) a démontré qu'elle était caractérisée par des propriétés saines, grâce à son profil d'acides gras monoinsaturés, ses phénols et ses multiples composants mineurs aux propriétés biologiques (Piroddi et al., 2017).

Les polyphénols sont des composants importants car ils permettent la caractérisation organoleptique de l'huile (Cimato, 1990). D'aprèse Mulinacci (2001), ces composés ont montré des propriétés antimicrobiennes, hypolipidémiques, hypocholestérolémiantes et anticancérigènes.

Ces polyphénols ont un effet antioxydant par lequel ils sont capables de bloquer l'autoxydation des acides gras insaturés et d'inhiber le phénomène de rancissement oxydatif de l'huile d'olive (Chimi, 1990).

De nombreux facteurs affectent la composition de l'huile d'olive vierge et Cimato (1990) a affirmé que le cultivar joue un rôle important dans la qualité de l'huile d'olive. Chaque variété semble conserver son propre rythme de biosynthèse des lipides, ce qui influence le taux de plusieurs composés de l´huile (El Antari et al., 2003).

La Tunisie, pays du sud de la Méditerranée et le quatrième parmi les pays les plus potentiels au monde en matière de production, présente une grande richesse en huile d'olive.

Le patrimoine oléicole tunisien renferme un assortiment assez riche de variétés (Karray et al., 2009). Dans ce travail, nous nous sommes intéressés par l'étude des fractions phénoliques et de la composition en acides gras de dix-neuf monovariétés d'huiles d'olive tunisiennes. Notre objectif était d'établir une base de données qui caractérise les variétés d'huile d'olive appartenant à notre patrimoine oléicole et qui l'enrichisse.

2. MATERIELS ET METHODES

- Echantillonnage des fruits et extraction de l'huile

L'échantillonnage a été réalisé pendant la campagne agricole (2016-2017). La cueillette des olives de dix-neuf variétés tunisiennes a été faite à la main. Ces variétés se localisent à la Collection nationale «Boughrara-Sfax» dans le sud de la Tunisie sous des conditions arides. Tous les échantillons présentaient le même degré de maturation. L'indice de maturité était d'environ 3 et il a été calculé en évaluant subjectivement la couleur de 100 olives choisies au hasard à partir de chaque échantillon. Plus de la moitié des fruits étaient caractérisés par une couleur rougeâtre ou violette.

L'extraction des huiles d'olive de 2 kg d'olives fraîches et non endommagées s'est déroulée directement après la récolte, à l'aide d'un système d'extraction de laboratoire à trois phases ; broyeur-malaxeur-centrifugeur.

- Détermination de la composition phénolique

La procédure de détection des fractions phénoliques a été réalisée par un système HPLC (Agilent 1100) selon la méthode d'analyse d'extraction et de quantification décrite par le conseil oléicole internationale (IOC, 2009).

- Détermination de la composition acidique

La détermination de la composition qualitative et quantitative en acides gras de dix-neuf variétés étudiées était basée sur la méthode analytique décrite dans (European Economic Community, 2000) en utilisant un chromatographe en phase gazeuse.

- Analyses statistiques

L'analyse statistique des données obtenues a été réalisée à l'aide du programme statistique MINITAB version 18 (Minitab Inc.). L'identification des différences entre les groupes a été

évaluée à l'aide d'une ANOVA et du test post-hoc de Tukey permettant des comparaisons multiples avec une signification statistique à un niveau de confiance de 95% ($p < 0,05$).

Et afin d'examiner la structure des données des différentes fractions phénoliques, une analyse multivariée a été réalisée sur la base d'une analyse en composantes principales (ACP) à l'aide de XLSTAT, 2018.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

- Teneur en polyphénols

Les profils phénoliques de dix-neuf échantillons des huiles d'olives extra vierges monovariétaux tunisiens ont été définis et 18 fractions de polyphénols ont été détectées.

En accord avec les études précédentes de Ben Hassine (2015), les dérivés de sécoiridoïde étaient les phénols les plus abondants dans tous nos échantillons évalués. L'oleuropéine est le principal présentateur de secoiridoïdes. La concentration en ce composé phénolique a varié entre 21,92 mg/kg pour Zarrazi Zarzis et 168,24 mg/kg pour Souabaa Aljiaa. L'hydroxytyrosol est un alcool simple conjugué pour former des dérivés d'oleuropéine (Miho et al., 2018). Sa concentration a varié de 1,03 mg par kg pour Rakhmi à 28,28 mg par kg pour Fougi Gtar.

Pour la concentration en tyrosol, nous avons enregistré des valeurs allant de 3,8 mg par kg pour Chemlali Tataouine à 55,59 mg par kg pour Barouni. Pour les phénols totaux, des différences significatives ont été enregistrées pour les 19 variétés étudiées (Figure1).

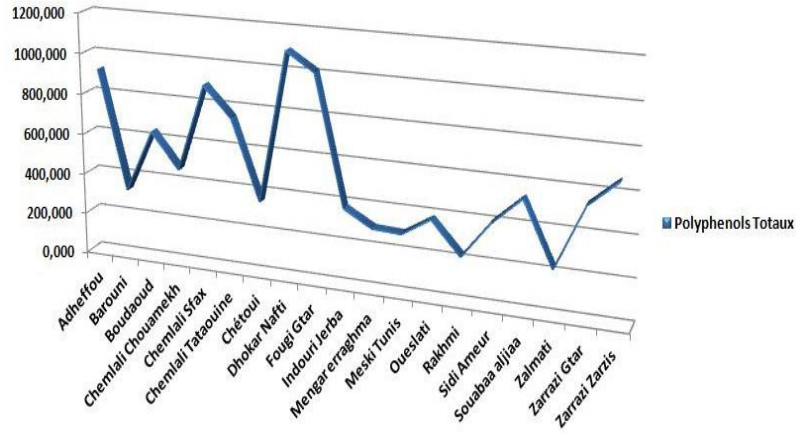


Figure 1: Concentration des échantillons des huiles d'olives étudiés en polyphénols totaux

Dhokar Nafti et Fougi Gtar ont obtenu les teneurs les plus élevées, dépassant 1010 ppm. Les valeurs les plus basses ont été enregistrées pour les variétés Zalmati et Rakhmi avec 224,99 ppm et 223,2 ppm, respectivement.

- Analyses des composantes principales

L'analyse en composantes principales (ACP) a été appliquée pour faciliter la classification de nos échantillons et identifier les groupes de cultivars ayant des profils phénoliques similaires. Elle a été réalisée à l'aide de XLSTAT, 2018. Les deux premiers facteurs de composantes principales ont expliqué 48,08% de la variance totale (F1: 27,68%; F2: 20,39%).

Suite à cette Analyse en Composantes Principales, il a été possible de représenter simultanément dans l'espace des facteurs à la fois les observations (fractions phénoliques) et les variables (différentes variétés).

La distribution de nos échantillons sur les axes des première et deuxième composantes principales (Figure 2) a permis de distinguer quatre groupes de cultivars. Le premier groupe était formé de trois variétés; Chemlali Sfax, Souabaa Aljiaa et Chemlali Tataouine. Le second comprenait sept variétés présentant des similitudes selon leur composition

phénolique. Ces variétés étaient Rakhmi, Oueslati, Mengar Erraghma, Zalmati, Barouni, Meski Tunis et Chétoui.

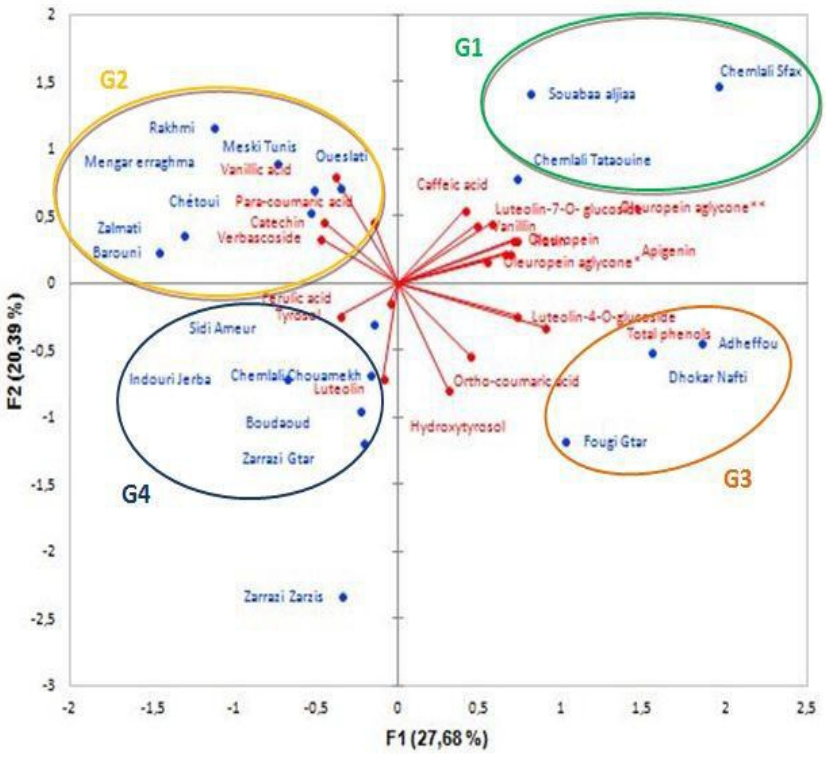


Figure 2: Biplot de la distribution des scores pour les échantillons des huiles d'olives de dix-neuf cultivars en fonction de la composition phénolique, F1(27,68%) et F2 (20,39%)

Pour le troisième groupe, nous avons trouvé les variétés suivantes; Adheffou, Dhokar Nafti et Fougi Gtar. Et enfin, les variétés Sidi Ameur, Indouri Jerba, Chemlali Chouamekh, Boudaoud et Zarrazi Gtar ont été regroupées en un quatrième groupe. On peut observer que la variété Zarrazi Zarzis ne présente aucune similitude avec les quatre groupes tout en présentant une corrélation positive avec la lutéoline.

- Concentration en acides gras

Treize acides gras ont été identifiés et quantifiés pour des échantillons d'huile d'olive appartenant à dix-neuf cultivars. Les acides gras présentant des fractions majeures dans la composition acidique des huiles ont été les suivants ;

- L'acide gras monoinsaturé : acide oléique (C18:1) ;
- L'acide gras di-insaturé : l'acide linoléique (C18:2) ;
- L'acide gras saturé : acide palmitique (C16:0)

Les résultats obtenus ont été illustrés dans la figure 3 et des différences significatives ont été détectées en fonction des cultivars.

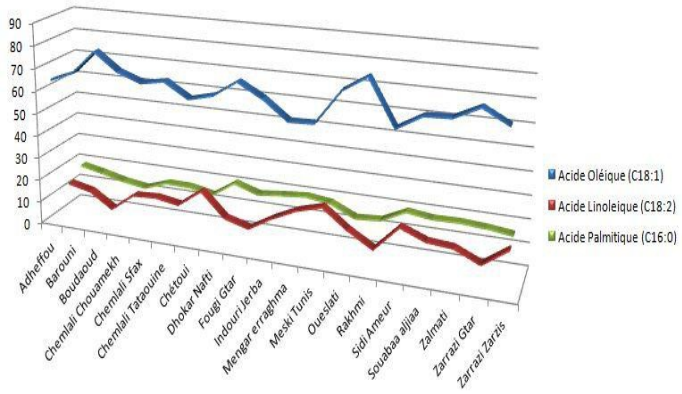


Figure 3: Composition en acides gras des huiles d'olives des dix-neuf variétés étudiées (A. Oléique, A. Linoléique et A. Palmitique)

La concentration en acide oléique était la plus importante et atteignait 80,5% et 79% de la composition totale en acides gras des variétés Rakhmi et Boudaoud respectivement. Les pourcentages d'acide linoléique étaient supérieurs à 20% pour la variété Meski Tunis et la fraction d'acide palmitique atteignait 19,8% du total des acides gras pour la variété Dhokar Nafti.

4. CONCLUSION

D'après notre étude, il paraît clairement que concernant la composition en acides gras et la richesse en composés phénoliques, les limites établies par le conseil oléicole international (International Olive Council, 2012), ont été respectées pour la totalité des échantillons d'huile d'olive extraits de dix-neuf variétés tunisiennes. Les teneurs en phénols et en acides gras étaient en faveurs des variétés Dhokar Nafti, Fougi Gtar, Boudaoud, Rakhmi et Adheffou.

Ces résultats constituent une banque de données pouvant être utilisée pour authentifier l'origine variétale des huiles d'olive extra vierges tunisiennes.

REFERENCES

- Chimi H. (1990). Autooxydation des huiles d´olives: Rôle des composés phénoliques. Rev. Fr. Corps Gras, n°11/12: 363-368.
- Cimato A. (1990). La qualité de l'huile d'olive vierge et les facteurs agronomiques. Olivae, 31: 20 - 31.
- El Antari A., El Moudni A. et Ajana H. (2003). Étude de la composition lipidique de deux compartiments du fruit d´olive (pulpe et amande) de six variétés d´oliviers cultivées au Maroc. Olivae, 98: 20-28

- International Olive Council. 2012. “International Trade Standard Applying To Olive Oils and Olive- Pomace Oils International Trade Standard Applying To Olive Oils and Olive-Pomace Oils.” (3):1–17.

- Karray B., Msallam M., Ksantini M., Mahjoub Boujnah D., Grati Kamoun N. (2009). Programmes et acquis de recherches pour la rénovation de la filière huile d’olive et l’amélioration de ses performances.

- Mulinacci N., Romani A., Galardi C., Pinelli P., Giaccherini C., Vincieri F. (2001). Polyphenolic content in olive oil waste waters and related olive samples. J. Agr. Food Chem., 49(8):3509-14.

- Piroddi M., Albini A., Fabiani R., Giovannelli L., Luceri C., Natella F., Rosignoli P., Rossi T., Taticchi A., Servili M., Galli F. (2017). Nutrigenomics of extra-virgin olive oil: A review. BioFactors, 43(1), 17–41.

Drying of food products in an air impingement dryer using intermittent conditions

Wajdi Ben Khalifa, Virginie Boy*, Yves Lemée, Lucie Drévillon,
Thomas Lendormi, Jean-Louis Lanoiselle*
Univ. Bretagne Sud, UMR CNRS 6027, IRDL, F-56300 Pontivy, France
*Corresponding authors: virginie.boy@univ-ubs.fr; jean-louis.lanoiselle@univ-ubs.fr

SUMMARY
Preservation techniques are of major importance to ensure the safety from products to consumers. For instance, thermal drying is one of the main preservation techniques for agricultural and food products. The operation of drying aims to improve the storage, the transportation and to facilitate the subsequent products processing. However, the agricultural production around the world shows a loss from 50 % to 70 % for fruits, mainly due to the absence of relevant preservation techniques.
The proposed study is devoted to the drying operation of apple slices (*Malus domestica 'Gala'*) and mango cubes (*Mangifera indica L. 'Kent'*) whose the moisture content was reduced from 90 % to 30 % in wet basis (w/w). Drying kinetics were investigated in an air impingement dryer using intermittent conditions. The intermittent drying is a discontinuous process composed of drying time (τ_{ON}) and tempering time (τ_{OFF}). The tempering times enable the diffusion of moisture from the interior toward the surface of the product. Both effects of drying time and tempering time were studied. Intermittent and continuous drying were compared. The obtained results are promising since the effective drying time was shortened by more than 40 % and 50 % for apple and mango, respectively, using intermittent conditions compared to the continuous ones. The optimized intermittent drying conditions were a drying time of 10 s and a tempering time of 30 s, 45 s or 60 s. These results show a potential saving with regard to the energy consumption of the dryer.
Keywords: Air impingement drying, apple, continuous and intermittent conditions, food, mango, tempering period

RÉSUMÉ- Séchage de produits alimentaires par jets d'air impactants en fonctionnement intermittent.
Les techniques de conservation sont d'une importance capitale pour garantir la sécurité des produits de la production aux consommateurs. Par exemple, le séchage thermique est une des principales techniques de conservation des produits agricoles et alimentaires. L'opération de séchage vise à améliorer le stockage, le transport et à faciliter la transformation suivante des produits. Cependant, la production agricole mondiale affiche des pertes de 50 % à 70 % pour les fruits, principalement à cause de l'absence de techniques de conservation pertinentes.
L'étude proposée est dédiée à l'opération de séchage de tranches de pomme (*Malus domestica 'Gala'*) et de cubes de mangue (*Mangifera indica L. 'Kent'*) dont l'humidité en base humide (m/m) a été réduite de 90 % à 30 %. Les cinétiques de séchage ont été étudiées sur un prototype de sécheur à jets d'air impactants en fonctionnement intermittent. Le séchage intermittent est un procédé discontinu composé de périodes de séchage (τ_{ON}) et de périodes de pause (τ_{OFF}). Les périodes de pause permettent la diffusion de l'humidité de l'intérieur vers la surface du produit. L'influence du temps de séchage et du temps de pause sur le temps effectif de séchage a été étudié. Les résultats obtenus sont prometteurs car le temps effectif de séchage a été réduit de plus de 40 % et 50 % pour la pomme et la mangue en utilisant le mode intermittent optimisé (τ_{ON} = 10 s et τ_{OFF} = 30 s, 45 s et 60 s) comparé au mode continu.
Mots-clés: Aliment, fonctionnement continu et intermittent, mangue, période de pause, pomme, séchage par jets d'air impactants

1. INTRODUCTION

The demand for food products is considerable in terms of both quantity and quality. The developments in the fields of agriculture and food industry attempt to respond to the consumers' ever-increasing demand.

In the case of fruits and vegetables, the harvest period only lasts for a few months. The seasonal nature of fruits and vegetables and the disparity between the areas of production and consumption have triggered some problems that need to be resolved. These problems are particularly related to the storage, to the transportation and to the products processing.

The drying process is one of the solutions considered to enhance the product preservation. For instance, the operation of drying aims to prolong the storage time, to increase the volume transported and to facilitate the products processing. However, although the drying process has been used for thousands of years, such as the sun drying, the agricultural production around the world shows a loss from 50 % to 70 % for fruits, mainly due to the absence of proper preservation techniques (Yaldys *et al.*, 2001).

For 25 years, numerous innovative drying processes have been developed. Air impingement technology has been set up in order to intensify the conventional hot air drying process. Air impingement drying has been so far empirically implemented in industries. The intermittency is up to now used for long intermittency time *i.e.* cycles of several minutes.

To our knowledge, the coupling air impingement / intermittency is innovative since this process has not been the subject to any scientific studies. Moreover, the coupled process helps to reduce significantly the dryers' energy consumption according to the quality of food products.

The objective of this paper was to study the drying kinetics of apples and mangoes using a prototype of air impingement dryer able to function with intermittency. Different active drying periods (τ_{ON}) and tempering periods (τ_{OFF}) will be applied. The effect of the intermittency will be compared with a continuous drying.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Samples

This study was carried out using apple (*Malus Domestica 'Gala'*) and mango (*Mangifera indica L. 'Kent'*). Apple was chosen since it does take part in the manufacturing of many food products. Furthermore, apple is cultivated in numerous countries (Velić *et al.*, 2004). For mango, the choice was made on its increasingly growing presence in the international market in the past few decades, particularly in Europe and in the United States (Villa-Corrales *et al.*, 2010). Mango is the world's second most heavily consumed tropical fruit after banana.

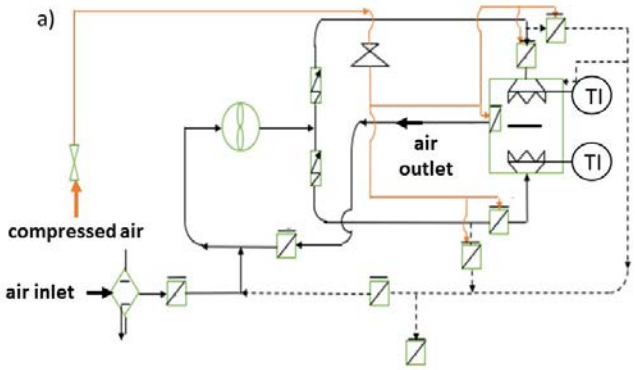
Apples and mangoes were bought in a local supermarket (Pontivy, France) and were stored in a refrigerator (3°C). The moisture content of fresh apple was (7.8 ± 0.5) kg kg^{-1} in dry basis (w/w), corresponding to (88.6 ± 0.7) % in wet basis (w/w). Similarly, the moisture content of fresh mango was (5.6 ± 0.4) kg kg^{-1} in dry basis (w/w), corresponding to (84.8 ± 0.9) % in wet basis (w/w).

In this study, apple slices (4 mm thick) and mango cubes (10 mm side) were cut using a vegetable slicer. During the sample preparation, the skin of fruits was not removed.

2.2. Desorption isotherms

Desorption isotherms were measured in a climatic chamber (KBF 115, 0 – 95 %, 0 – 100°C, Binder, Wevelgem, Germany) at 40°C and 70°C on a relative air humidity range from 90 % to 5 %. For each temperature, five samples of about 20 g were weighted using a precision balance (Acculab ALC-110.4, accuracy 10^{-4} g, Sartorius, Göttingen, Germany) until the equilibrium with the surrounding air was reached (constant mass). Samples were equilibrated for a period running from 3 days to 2 weeks depending on the operating conditions. The mass of the dry matter was evaluated by drying in an oven at (105 ± 2) °C for 24 hours.

Desorption isotherms were modeled with the GAB (Guggenheim-Anderson-de Boer) model (Van den Berg, 1984) since this model has been applied successfully to various foods (Kiranoudis *et al.*, 1993 and 1997). The equation for the GAB model is as follows:



b)

Size	800 × 220 mm
Distance nozzle - nozzle	50 mm
Average width of slots	3 mm
Percentage of free area	4 %
Nozzle to sample distance	25 mm

c)



$$M_{eq} = \frac{M_0 C_g a_w K}{\left(1 - K a_w\right)\left(1 - K a_w + C_g K a_w\right)} \quad \text{Eq. 1}$$

where M_{eq} is the equilibrium moisture content in dry basis (w/w) (kg kg^{-1}), M_0 is the monolayer moisture content (kg kg^{-1}) in dry basis (w/w), C_g is the Guggenheim constant which corresponds to the heat of sorption of the monolayer (–), a_w is the water activity (–) and K is the factor correcting which takes account the sorption properties of multilayers (–).

Figure 11. Experimental device a) Schematic diagram of the prototype of air impingement dryer; b) Design parameters of jets; c) Zoom on air jets setup.

2.3. Air impingement dryer

A prototype of air impingement dryer (CIMS Company, Sablé-sur-Sarthe, France) was used (**Fig. 1**). Air flow was circulated through a centrifugal fan (COMELEC P312, Belcodene, France) set to a rotational velocity of 2520 rpm. The prototype of dryer has the particularity to operate in a continuous mode, which means that the air flows without interruption at the surface of the product (continuous black line, **Fig. 1a**). This prototype can be also used in the energy-efficient intermittent operation, which means that the air is sent at the product surface for a limited period of time (active drying period, t_{ON}), then the air is deviated for a while to allow the moisture content to migrate towards the surface (tempering period, t_{OFF}). This operation was performed with pneumatic dampers powered by compressed air (continuous orange line, **Fig. 1a**). In intermittent operation, the air flow was deviated from the upper and lower ducts (dashed black line, **Fig. 1a**). Part of the deviated air flow was re-injected in the drying chamber (1540 × 1060 × 1140 mm) to maintain enough temperature and pressure during the tempering period. The diameter of the upper and lower ducts coming into the two plenums was of 250 mm. On each plenum, a rig was placed in order to perform impingement jets. The rig was composed of triangular nozzles punched of rectangular slots (**Fig. 1b** and **c**). The air flow which was passed through the slots was directed perpendicularly to the sample surface. The samples were disposed in the center of a tray (metal grid).

Baskets (100 × 110 mm) were used in order to place the samples at the interior to prevent them from flying away during the drying process (**Fig. 1c**). The tray was composed of 3 baskets each containing 4 apple slices (total thickness of 16 mm) and 3 baskets filled with 2 rows of superimposed of mango cubes (total thickness of 20 mm). The initial mass of both products in the basket was about (50.0 ± 0.3) g.

The experiments were carried out at the moderate temperature of 55°C. Different drying time (10 s and 15 s) and tempering time (30 s, 45 s and 60 s) were studied. The results were compared with those obtained in a continuous mode.

During any experiment, both the temperature and the humidity under the nozzles were measured as well as the temperature within the drying chamber.

The six baskets were successively placed on the tray with a delay of 1 min. The mass of each sample was measured in a discontinuous manner using a precision balance (Acculab ALC-110.4, accuracy 10^{-4} g, Sartorius, Göttingen, Germany).

From the mass obtained by weighing, the moisture content in wet basis (w/w), M_{wb}, was calculated as follows:

$$M_{wb} = \frac{m(t) - m_{dm}}{m(t)} \times 100 \qquad \text{Eq. 2}$$

where $m(t)$ is the mass of the sample measured (kg) at time t (s) and m_{dm} is the mass of the dry matter (kg) obtained after drying in an oven at (105 ± 2) °C for 24 hours.

The moisture content in dry basis (w/w), M_{db}, was determined from the following expression:

$$M_{db} = \frac{m(t) - m_{dm}}{m_{dm}} \qquad \text{Eq. 3}$$

3. RESULTS AND DISCUSSION

Fig. 2 and 3 represent the average values of desorption isotherms at 40°C and 70°C for apple and mango, respectively. The shape of the isotherms is a sigmoid (s-shaped) characteristic of macroporous products such as food products (Iglesias and Chirife, 1982). For a constant water activity, the equilibrium water content decreases as the temperature rises, the effect is noticeable for a water activity between 0.6 and 0.05. This phenomenon is commonly assigned to a decline in the number of active sites due to chemical and physical changes caused by the increase in the temperature (Rizvi, 1995).

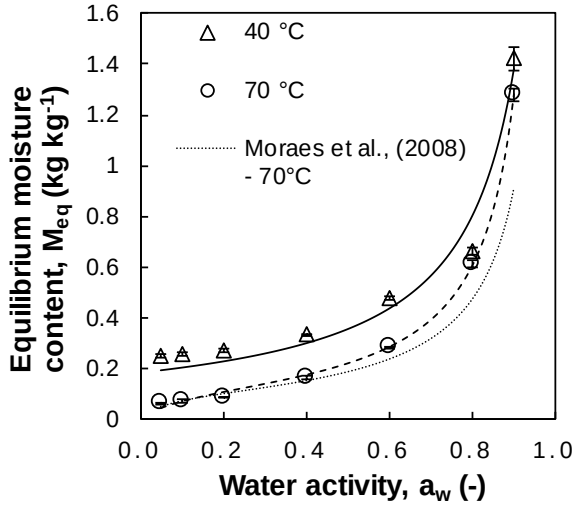


Figure 2. Desorption isotherms of apple at 40°C and 70°C. Symbols: experiments; lines: modeling from the GAB model.

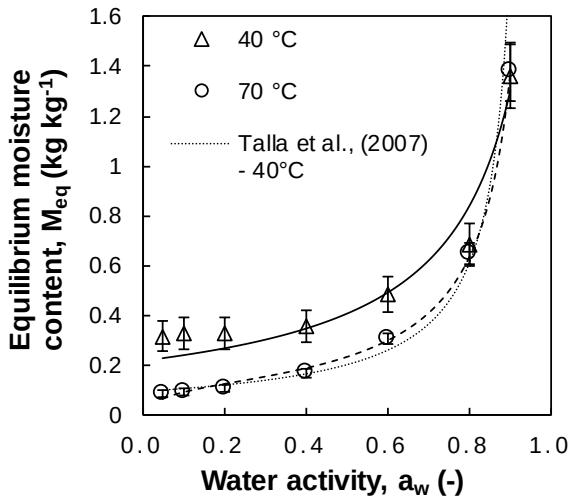


Figure 3. Desorption isotherms of mango at 40°C and 70°C. Symbols: experiments; lines: modeling from the GAB model.

The average curves modeled by the GAB model are plotted (Fig. 2 and 3) and the corresponding parameters are reported in Table 2. The greatest deviations are systematically observed at low water activity values (a_w < 0.2) at 40°C.

Table 2: Estimated GAB parameters.

	40°C			70°C		
Apple	M_0 (kg kg^{-1})	C_g (–)	K (–)	M_0 (kg kg^{-1})	C_g (–)	K (–)
	0.185	$2.18 \cdot 10^4$	0.96	0.120	10	1.01
	40°C			**70°C**		
Mango	M_0 (kg kg^{-1})	C_g (–)	K (–)	M_0 (kg kg^{-1})	C_g (–)	K (–)
	0.220	$2.45 \cdot 10^4$	0.92	0.123	23	1.01

For both fruits, the estimated parameters M_0 and C_g decrease when the temperature increases whereas the parameter K increases slightly with the temperature (Table 2). The goodness of fit was assessed using four criteria, namely adjusted R^2, X^2, $RMSE$ and RSS. For all the data, the corresponding values are comprised between 0.919 – 0.999 for adjusted R^2, 0.000 – 0.012 for X^2, 0.012 – 0.082 for $RMSE$ and 0.048 – 0.001 for RSS. The GAB model was found satisfactory to predict the desorption isotherms. Furthermore, the estimated GAB parameters were compared with other values issued from the literature and a good agreement is found for apple at 70°C whereas a significant difference is observed for mango at 40°C (Fig. 2 and 3).

Fig. 4 and 5 present the moisture content in wet basis (w/w) versus the effective time of drying, which is the real time spent by the samples under the air flow, for apple and mango. On these graphs, two drying periods (τ_{ON} = 10 s and 15 s) are compared for a constant tempering period (τ_{OFF} = 60 s). Results obtained for a continuous drying are also added for comparison.

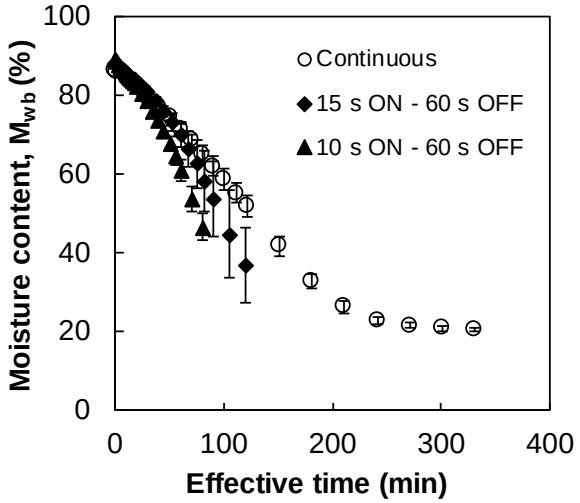


Figure 4. Moisture content in wet basis, M_{wb}, versus the effective time of drying for apple. Influence of the drying period, τ_{ON}, on the drying kinetics.

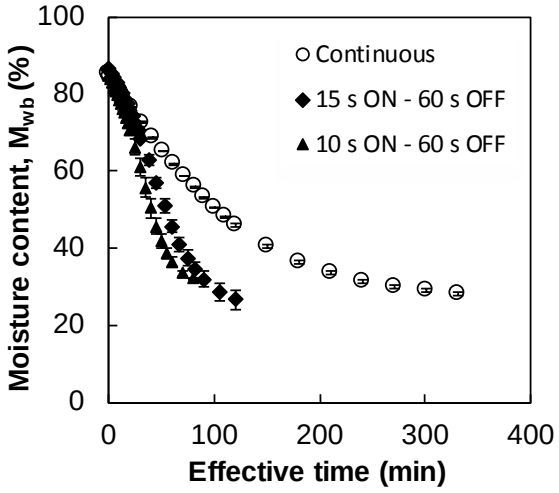


Figure 5. Moisture content in wet basis, M_{wb}, versus the effective time of drying for mango. Influence of the drying period, τ_{ON} on the drying kinetics.

As expected, the moisture content in wet basis (w/w) declines continuously with time. This decrease is more pronounced in intermittent operation compared to the continuous one. For apple, the time required to reduce the moisture content from (88.6 ± 0.7) % to a final (44.5 ± 2.4) % in wet basis is of 80, 105 and 150 min for 10/60, 15/60 and continuous operations (**Fig. 4**). In the same way for mango, the time required to diminish the moisture content from (84.8 ± 0.9) % to a final (32.7 ± 1.2) % in wet basis are of 70, 90 and 240 min for 10/60, 15/60 and continuous operations (**Fig. 5**). These results can be compared with others available in the literature in a continuous mode. For apple, Sacilik and Elicin (2006) have reported that 4 hours in a conventional hot air dryer are

necessary to reach a residual moisture content of 11 % in wet basis at 60°C and 0.8 m s^{-1}. In the same way for mango, Tetang Fokone *et al.* (2016) have also reported that 6 hours and 40 min are needed to reach a residual moisture content of 28 % in wet basis at 60°C and 0.6 m s^{-1}. In this paper, higher residual moisture contents are gained most likely due to the stack of different layers (unfavorable case). However, in our conditions, the shortest drying period (τ_{ON} = 10 s) leads to better performances.

Thus, for an optimized drying period of 10 s, different tempering periods (τ_{OFF}) were applied, namely 30 s, 45 s and 60 s. Fig. 6 and 7 depict the moisture content in wet basis (w/w) versus the effective time of drying for apple and mango. Results obtained for a continuous drying are also added for comparison.

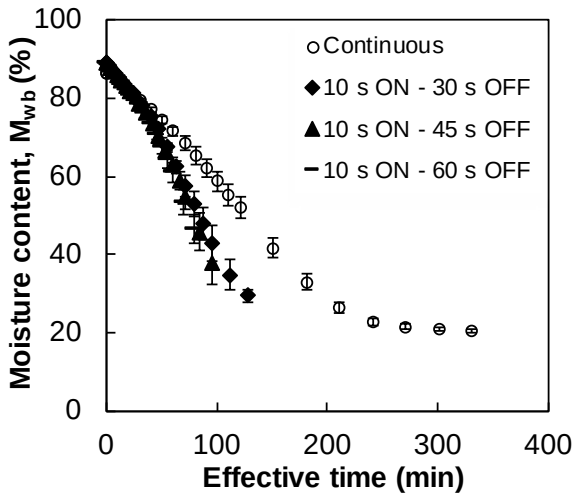


Figure 6. Moisture content in wet basis, M_{wb}, versus the effective time of drying for apple. Influence of the tempering period, τ_{OFF}, on the drying kinetics.

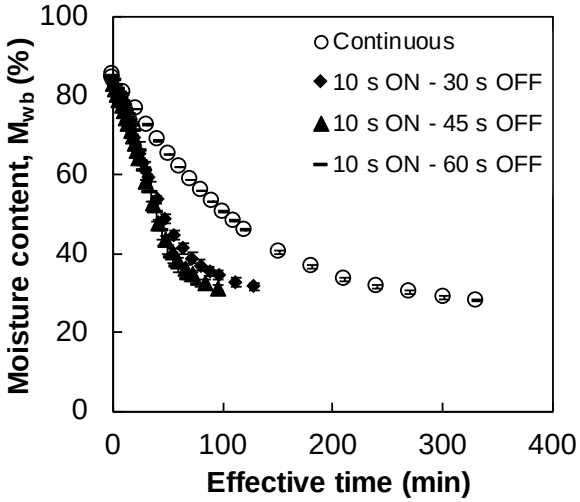


Figure 7. Moisture content in wet basis, M_{wb}, versus the effective time of drying for mango. Influence of the tempering period, τ_{OFF}, on the drying kinetics.

For both fruits, the drying kinetics are improved by using intermittent conditions compared to the continuous one. For apple, the time required to reach a residual moisture content of (46.5 ± 1.3) % in wet basis (w/w) is of 88 min for 10/30, 84 min for 10/45, 80 min for 10/60 and 136 min for continuous operation (Fig. 6). While for mango the values are of 56 min for 10/30, 44 min for 10/45, 40 min for 10/60 and 101 min for continuous operation to gain a residual moisture content of (49.0 ± 1.8) % in wet basis (w/w) (Fig. 7). In both cases, the effective drying time is almost identical regardless of the tempering period, which means that, in our conditions, the use of 30 s, 45 s and 60 s of tempering periods allows to achieve the same performances. These results are very promising since, for the conditions studied, the effective drying time is shortened by 60 min for apple using intermittent mode compared to the continuous one (136 min), which corresponds to a reduction of more than 40 %. In the same way for mango, the drying time is reduced by 50 min using the intermittent mode compared to the continuous one (101 min), which represents a time saving of 50 %.

4. CONCLUSIONS

This study was focused on the influence of the intermittency on the drying kinetics of apple and mango. Desorption isotherms were also determined at 40°C and 70°C in a wide range of water activity (0.05 – 0.9). The GAB model was found appropriate to represent the desorption isotherms. In the investigated conditions, the intermittency had a significant influence on the drying time. The

optimized intermittent conditions were evaluated and they were of: 10 s of drying time (τ_{ON}) and 30 s, 45 s or 60 s of tempering periods (τ_{OFF}). At 55°C, the drying time was reduced of more than 40 % for apple and of 50 % using optimized intermittent conditions compared to the continuous one. This time saving represents a significant gain on the energy consumption of the prototype of the air impingement dryer.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge CIMS Company (Sablé-sur-Sarthe, France) for providing the support and the funding. The authors would also like to thank the Professor K. Allaf (Université La Rochelle, LaSIE UMR CNRS 7356) for his scientific accompaniment.

REFERENCES

- Iglesias HA, Chirife J. 1982. Handbook of food isotherms. Water sorption parameters for food and food components. Academic Press, New York, USA, pp. 360.

- Kiranoudis CT, Maroudis ZB, Tsami E, Marinos-Kouris D. 1993. Equilibrium moisture content and heat of desorption of some vegetables: *Journal of Food Engineering*, **20**, 55-74.
- Kiranoudis CT, Tsami E, Maroulis ZB, Marinos-Kouris D. 1997. Drying kinetics of some fruits: - *Drying Technology*, **15**, 1399-1418.
- Moraes MA, Rosa GS, Pinto LAA. 2008. Moisture sorption isotherms and thermodynamic properties of apple Fuji and garlic: *International Journal of Food Science and Technology*, **43**, 1824-1831.
- Rizvi SSH. 1995. Thermodynamic properties of foods in dehydration. In: Engineering properties of foods. Rao, MA, Rizvi, SSH. Eds, Marcel Dekker, New York, USA, pp. 223-389.
- Sacilik K, Elicin, AK. 2006. The thin layer drying characteristics of organic apple slices: *Journal of Food Engineering*, **73**, 281-289.
- Talla A, Jannot Y, Nkeng GE, Puiggali JR. 2007. Experimental determination and modeling of sorption iostherms of tropical fruits: banana, mango and pineapple: *Drying Technology*, **23**, 1477-1498.
- Tetang Fokone, A, Edoun, M, Kuitche, A, Zeghmati, B. 2016. Experimental drying kinetics of mango slices (*Mangifera indica L.*) *Amelie* under intermittent conditions: *International Journal of Thermal Technologies*, **6**, 203-210.
- Van den Berg C. 1984. Description of water activity of foods for engineering purposes by means of the GAB model sorption. Engineering and Foods. Elsevier Science, New York, USA, pp. 119-131.
- Velić D, Planinić M, Tomas S, Bilić M. 2004. Influence of airflow velocity on kinetics of convection apple drying: *Journal of Food Engineering*, **64**, 97-102.
- Villa-Corrales L, Flores-Prieto JJ, Xamán-Villlaseñor, JP, Garcia-Hernandez E. 2010. Numerical and experimental analysis of heat and moisture transfer during drying of Ataulfo mango: *Journal of Food Engineering*, **98**, 198-206.
- Yaldys O, Ertekin C. 2001. Thin layer solar drying of some vegetables: *Drying Technology*, **19**, 583-597.

Continuous treatment of bacteria by Pulsed Electric Field (PEF)

Florent Struyven, Xiaojun Liu, Virginie Boy, Yves Lemee, Thomas Lendormi, Philippe Mandin*, Jean-Louis Lanoiselle*
Univ. Bretagne Sud, UMR CNRS 6027, IRDL, F-56300 Pontivy, France
* philippe.mandin@univ-ubs.fr ; *jean-louis.lanoiselle@univ-ubs.fr

SUMMARY
This study is based on an emerging athermal process as an alternative to conventional thermal treatment for inactivation of bacteria. It is an electrical treatment, by Pulsed Electric Field (PEF), whose objective, in addition to pathogenic bacteria inactivation, is to reduce the energy consumption and allow a continuous treatment. The pasteurization efficiency of different bacterial strains has been evaluated using trials in batch mode, which enabled to validate the models proposed by the literature (Barbosa-Cánovas and Sepúlveda, 2005). A numerical model was created to simulate the PEF action of a continuous processing chamber. Thanks to the developed model, it is possible to determine the number and intensity of electrical pulses received by the bacteria passing through a continuous treatment chamber, as a function of input parameters such as the flow rate, the electric field intensity and the frequency of pulses, or the distance between the electrodes. The inactivation models, validated in batch mode, were included in the new model. The next step is an experimental validation of the numerical model by performing tests on a continuous bench-scale with the aid of a high-voltage generator (25 kV), thus paving the way for an overall system optimization.
Key words: Hygienization, Pulsed Electric Field, Numerical modelling, Continuous treatment, Bacteria

RESUME- Traitement continu des bactéries par champs électriques pulsés (CEP). Cette étude est basée sur un processus athermique émergent en tant qu'alternative au traitement thermique conventionnel pour l'inactivation des bactéries. Il s'agit d'un traitement électrique, par Champs Électriques Pulsés (CEP), dont l'objectif, en plus de détruire les bactéries pathogènes, est de réduire la consommation énergétique et permettre un traitement continu. L'efficacité de la pasteurisation de différentes souches bactériennes a été évaluée sur des essais en mode discontinu, ce qui a permis de valider les modèles proposés par la littérature (Barbosa-Cánovas et Sepúlveda, 2005). Un modèle numérique a été créé pour simuler le traitement par CEP dans une cellule fonctionnant en continu. Grâce au modèle développé, il est possible de déterminer le nombre et l'intensité des impulsions électriques reçues par les différents groupes de bactéries traversant une chambre de traitement en continu, en fonction de paramètres d'entrée tels que le débit, l'intensité du champ électrique et la fréquence des impulsions, ou la distance entre les électrodes. Les modèles d'inactivation, validés en mode batch, ont été inclus dans le nouveau modèle. L'étape suivante consiste à valider expérimentalement le modèle numérique en réalisant des manipulations sur un banc d'essai continu à l'aide d'un générateur haute tension (25 kV), ouvrant ainsi la voie à une optimisation globale du système.
Mots-clés: Hygiénisation, Champ électrique pulsé, Modélisation numérique, Traitement en continu, Bactéries

1. INTRODUCTION

Pulsed Electric Field (PEF) hygienization technology is a non-thermal technology based on the use of electric fields to inactivate and control populations of pathogen microorganisms in food products or the substrates of biogas plants. It involves the application of short pulses of a few microseconds with a high intensity of electric field (10 – 50 kV cm^{-1}).

This innovative electrical process is an alternative to traditional heat treatment with respect to the energy efficiency improvement and the achievement of a continuous processing. In addition, the electric field has a volumetric effect, ensuring a rapid and homogeneous application of pasteurization in the entire product treated, unlike thermal processes whose effects are limited to exchanges by convection and conduction.
PEF has the ability to make the bacterial membrane permeable. This electroporation will cause the loss of cell content towards the extracellular medium, resulting in the death of the bacteria. This phenomenon is due to an increase in transmembrane electrical potential that induces the attraction of the opposite electrical charges (Angersbach et al., 2000). The electroporation takes place in the bacterial cell membrane. In order to kill or inactivate microorganisms, the substrates must be submitted to a critical electric field with a minimum effective treatment time.

2. BATCH EXPERIMENTATION

In order to control and monitor the continuous treatment, preliminary experiments were performed in batch mode to validate models describing bacterial inactivation.
They were carried out on small volumes in electroporation cuvettes (1 mm Gap-90 µL, VWR, Belgium) in which the electric field was considered uniform. They made it possible to determine the parameters of the models, and to have a better knowledge of the operational conditions studied.
In order to optimize the power consumption of the system, it is necessary to determine which electrical parameters are adequate to achieve a sufficient inactivation effect on bacteria. To achieve this, we measured the evolution of bacterial concentrations as a function of effective PEF treatment time and the electric fields applied to the microorganisms. To quantify the change in the number of microorganisms before and after the treatment, the spread plate method on the selective media was used.

3. CONTINUOUS BENCH-SCALE

The continuous bench-scale is composed of 12 treatment chambers connected in series by flexible tubes (Fig. 1). The fluid circulates through a peristaltic pump. The PEF generator transmit simultaneously the electrical impulses to the 12 treatment chambers. The fluid treated by a chamber dives into a water bath to cool from ohmic heating. Each treatment chamber is made up of two aluminium alloy parts serving as anode and cathode, which are electrically insulated by a polyoxymethylene (POM) washer.



Figure 1: Block of the 12 PEF processing chambers constituting the continuous bench-scale

4. Numerical modelling of the continuous processing

The numerical modelling was carried out using the ANSYS Fluent software (Pennsylvania, US) to simulate the distribution of the different quantities used as input variables for the inactivation models within each treatment chamber (Fig. 2). This allowed us to visualize both the distribution of the electric field and of the temperature (Fig. 3). This tool could perform parametric calculations to look for the optimal settings for parameters such as the pulse frequency or the electrodes spacing in order to obtain the most effective treatment.

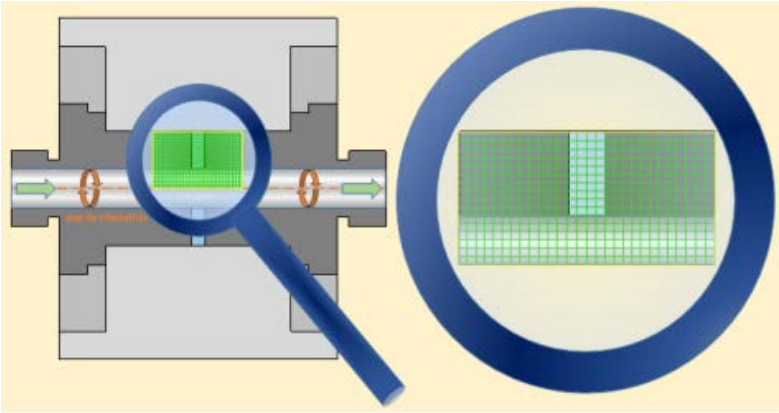


Figure 2: Localization diagram of the ANSYS-FLUENT modeling

The multiphysics model uses the fluid mechanics equations, the heat equation and the Laplace's equation for the electrical part (Gerlach et al., 2008; Buckow e al., 2012). A relationship between the electrical conductivity and the temperature was determined in batch mode. Since the electric potential field cannot be determined without the temperature-dependent electric conductivity, and the joule effect cannot be determined without the calculation of the electric potential gradient, there is a strong coupling between the heat equation and the Laplace equation (Fig. 4). The viscosity of the water has been assumed to be constant and temperature independent, in order to simplify the calculation of the velocity field. This results in a Poiseuille flow. This considers a simple coupling between the heat equation and the Navier-Stockes' equations (Fiala et al., 2001). The flow rate in the pipe was limited to maintain a laminar regime. The target bacteria were supposed to move with the fluid, i.e. no diffusion or collision.

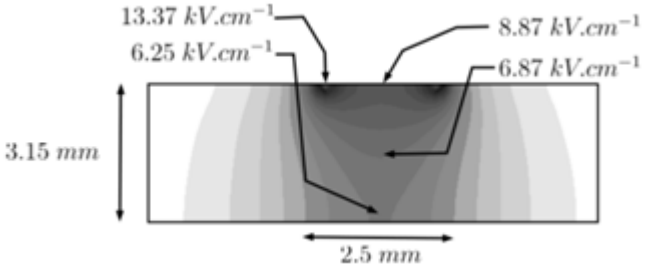


Figure 3: Example of electric field distribution for a voltage of 3.3 kV between the electrodes.

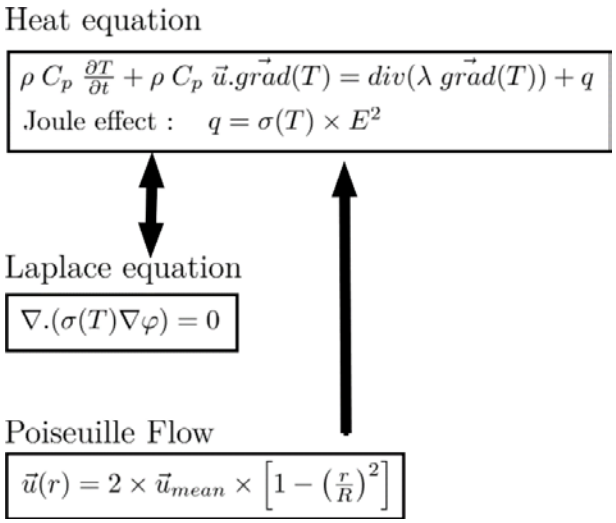


Figure 4: Coupling between the heat equation, the Laplace equation and the velocity field equation for a Poiseuille flow.

FLUENT's DPM (Discrete Phase Model) module was used to simulate the movement of bacteria. The model counted the number of pulses received by groups of bacteria passing through the treatment chamber and recorded the corresponding intensity of the electric field suffered. The final objective is to estimate the surviving fraction of the treated bacteria leaving the treatment chamber.

5. EXPLOITATION OF THE NUMERICAL MODEL

The hypothesis of a Poiseuille flow was established: the flow velocity depends only on the radius of the treatment chamber. The residence time of the bacteria in the treatment chamber increases as they approach the tube walls. In addition, as the electric field is more intense near the walls, the treatment is most effective. Bacteria in the centre of the tube will be less influenced by the PEF treatment.
By modifying parameters such as the pulse time, the frequency, the inter-electrode distance, the voltage, and the flow rate, the numerical model provided information on the optimal operational setting of electrical flow parameters (Fig. 5 & 6).

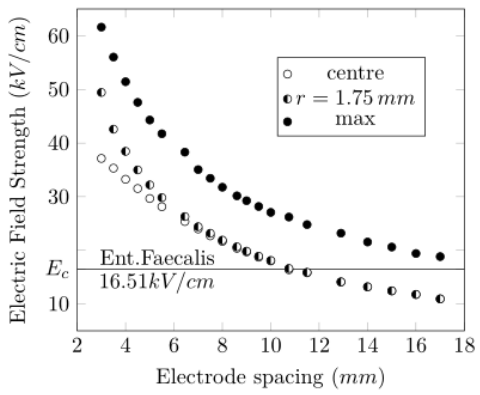


Figure 5: Example of parametric calculation value of the electric field obtained for a voltage of 22 kV as a function of the distance between the electrodes

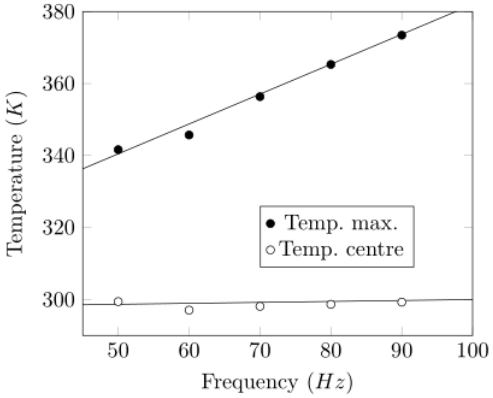


Figure 6: Example of parametric calculation temperature in the treatment chamber as a function of frequency (average fluid flow velocity=0.01 m/s, voltage= 9000 V, pulse time=4 µs)

6. CONCLUSION

The batch experiments validated the parameters of the bacterial destruction models provided in the literature. Numerical modelling of a continuous treatment makes it possible to determine the number of pulses received by a group of bacteria passing through a treatment cell and to record the intensity of the electric fields suffered. The link between continuous treatment parameters and bacterial destruction models has to be experimentally validated in the near future.

REFERENCES

- Angersbach A, Heinz V, Knorr D. 2000. Effects of pulsed electric fields on cell membranes in real food systems:. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1, 135-149.
- Barbosa-Cánovas GV, Sepúlveda D. 2005. Present status and the future of PEF technology. In: Novel Food Processing Technologies, pp. 1-44.
- Buckow R, Semrau J, Sui Q, Wan J, Knoerzer K. 2012. Numerical Evaluation of Lactoperoxidase Inactivation During Continuous Pulsed Electric Field Processing:. *AIChE* J., 28, 1363-1375.
- Fiala A, Wouters P, Bosch E, Creyghton Y. 2001. Coupled electrical-fluid model of pulsed electric field treatment in a model food system, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2, 229-238.
- Gerlach D, Alleborn N, Baars A, Delgado A, Moritz J, Knorr D. 2008. Numerical simulations of pulsed electric fields for food preservation: A review: *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 408–417.

Développement préférentiel des pousses feuillées sur Deux milieux de culture *in vitro* chez l'olivier (*Olea europeae* L.)

[1]Benderradji Laid, [2]Elhadef Elokki Lydia [1]Messaoudi Noura, [1]Djebri Fatima Zohra
[1]Département SNV, Faculté des Sciences, Université M'Sila, Algérie
[2]Département de Biologie et d'Ecologie végétale, Faculté des Sciences de la nature et de la vie, Université Ferhat Abbes, Sétif1, Algérie
Email: benderradjilaid@yahoo.fr

RESUME
La micro-propagation, ne permet pas seulement la mise à disposition rapide des nouvelles variétés, mais elle deviendra aujourd'hui un outil important et une technique très utilisée pour l'évolution et l'amélioration de l'arboriculture en générale et plus particulièrement des vergers oléicoles. Sur un matériel juvénile composé de trois variétés très répandues en Algérie et réparties essentiellement en Oranais à l'Ouest Algérien (Variété, Sigoise), au Centre du pays (Variété, Chemlel) et au constantinois à l'Est Algérien (Variété, Grosse de Hamma). Il a été possible d'obtenir, à partir de bourgeons axillaires et de micro-boutures de ces trois variétés, un taux de multiplication très intéressant, dont on a enregistré la meilleure production des pousses feuillées chez la variété Grosse de Hama et la variété Sigoise en présence de la substance minérale et les vitamines du milieu de culture MS (Murashigue et Skoog, 1962) additionnée de 1mg.l^{-1}de Benzyl-amino-purine (BAP) + 1mg.l^{-1}d'Acide Naphtalène Acétique (ANA) et chez la variété Chemlel en présence de la substance minérale et les vitamines du milieu de culture B5 (Gamborg et *al.*, 1968) additionnée de 0.25mg.l^{-1}de Kénitine (Kin) +1mg.l^{-1}d'Acide Indole Butyrique (AIB). De plus, la substitution du saccharose souvent utilisé par du fructose a amélioré significativement le taux de multiplication chez l'olivier (*Olea europeae* L.).
Mots-clés: Auxine, fructose, micro-propagation, milieu de culture, *Olea europeae* L.,

SAMMARY
Micro-propagation is not only allows for rapid availability of new varieties, but it will become an important tool and an interest technique commonly used for the evolution and improvement of trees cultivation in general and more particular in olive orchards. For a juvenile material composed of three varieties very extensive in Algeria and distributed mainly in Oranais in Western Algeria (Variety, Sigoise), in the Center of the country (Variety, Chemlel) and Constantinois in the East of Algeria (Variety, Grosse of Hamma), it has been possible to obtain, from axillaries buds and micro-cuttings of these three varieties, a very interesting multiplication rate, of which the best production of leafy shoots has been recorded in the Grosse of Hama variety and the Sigoise variety. In the presence of the mineral substance and the vitamins of the MS culture medium (Murashigue and Skoog, 1962) supplemented with 1mg.l^{-1} of Benzylamino- purine (BAP) + 1mg.l^{-1} of Naphtalène Acetic acid (NAA) and in the variety Chemlel in presence of the mineral substance and vitamins of B5 culture medium (Gamborg et al., 1968) supplemented with 0.25 mg.l^{-1} of Kenitine (Kin) + 1 mg.l^{-1} of Indole Butyrique Acid (IBA). In addition, the substitution of sucrose often used by fructose significantly improved the multiplication rate in the olive tree (Olea europeae L.).
Key words: Auxin, fructose, micro-propagation, culture medium, Olea europeae L.

1. INTRODUCTION

En Algérie, le verger oléicole occupe 164.000ha et produit entre 10 et 20.000 tonnes d'huile, dont la consommation moyenne nationale est de 13 kg/habitant/an, à savoir, 12kg sous forme de graines et 1kg sous forme d'huile. L'olivier constitue à l'échelle nationale une principale essence fruitière, et par conséquent, l'oléiculture revêt une importance socio-économique certaine. Ce secteur aide à la fixation de la population en milieu rural en procurant de l'emploi et se considère comme une source d'entrée de devises en participant activement à l'exportation (M.A., 1992). Le profil variétal est constitué essentiellement de trois variétés très connues en Algérie, à savoir Chemlal, Sigoise et

Grosse de Hamma. Cette faible diversité variétale contraste avec la diversité des milieux de production. Il existe bien sûr des variétés populations très rustiques et très adaptées aux conditions pédoclimatiques de leur milieu d'implantation mais qui sont peu étudiées. Cela est due à la conception du verger oléicole, qui est vue en général comme un reboisement beaucoup plus qu'une source de revenus à entretenir, l'utilisation de techniques culturales et de production très sommaires et traditionnelles, sur un verger très épars et le plus souvent situé sur des terres très accidentées, l'absence, jusqu'à un passé récent d'une politique d'orientation et d'encouragement de la production oléicole et l'absence de mise à disposition des oléiculteurs de plants sains de variétés productives et adaptées.

Les nouvelles techniques de reproduction ou de multiplication, si elles sont maîtrisées peuvent rendre de grands services dans le domaine de l'extension du verger oléicole sur des terres où l'intensification de la production est possible (P.N.D.A., 1994). Notre étude est une contribution à la maîtrise de la culture *in vitro* de l'olivier (*Olea europeae* L.), qui est considéré comme la plus ancienne culture fruitière (D.S.A., 2014). La variété la plus répandu est « Chemlal », dont l'objectif de ce travail est d'étudier la diversité biologique de l'olivier à travers les potentialités qu'englobe cette variété comme source économique importante et de déterminer les différentes techniques d'amélioration de la dite variété.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est la variété Chemlal, qui est une variété à petit fruit, produisant une huile fine d'excellente qualité très appréciée (Amirouche, 1977), (Figure 1).

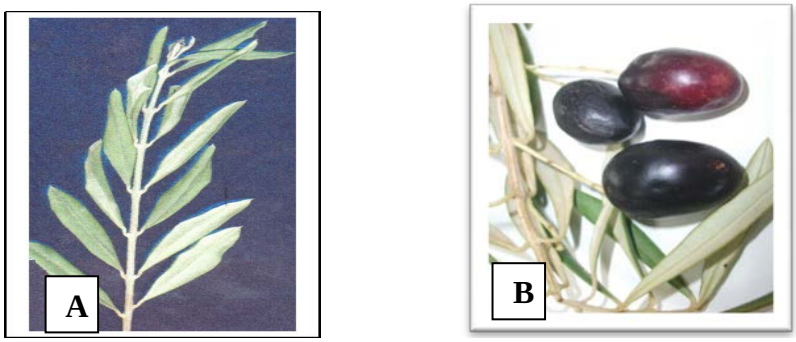


Figure 1. Variété Chemlal : (A) Rameau feuillé ; (B) Rameau fructueux

2.2. Conduite de l'essai

L'étude menée au laboratoire, porte sur l'aptitude à la régénération préférentielle *in vitro* sur deux milieux de culture , de micro-boutures de l'olivier (*Olea europeae* L.) de plusieurs provenances, à savoir : El Hamel (P1), Ouled Sidi Brahim (P2) et Ouled Bedera (P3)*;* dont la technique utilisée est celle de l'embryogenèse somatique à travers un protocole expérimental mis en place et qui est constitué de trois facteurs inclus dans un dispositif en blocs avec trois répétitions. Les facteurs sont la variété avec une seule modalité, Chemlal (Chem)**;** le milieu de culture avec deux modalités, Murashigue et Skoog (MS) et Gamborg (B5); et la combinaison hormonale avec deux modalités, [Benzyl-Amino-Purine (BAP) + Acide Naphtalène Acétique (ANA)] et [Kenitine (Kin) + Acide Indole Butyrique (AIB)] précédé par l'auxine 2,4 D., à différentes concentrations pour l'induction des cals (Tableau 1). Le tube de culture, constitue l'unité expérimentale sur laquelle les mesures sont effectuées75jours après le début de l'expérience, qui ont portées sur le taux de contamination et de réussite des explants ensemencés, la surface des cals, estimée par la formule : S C = 0.5 x L (longueur du cal) x l (largeur du cal) x 3.14 (Dale et Deambrogio, 1976), l'indice du feuillage (Fll), de la croissance en hauteur (Ht, mm) de l'explant et de la matière fraîche (MF) accumulée par l'explant déterminée par la formule suivante: MF = PFt75 - PFt0 [d'où MF = matière fraîche (g), PFt75 = poids frais à la date 75j (g), PFt0 = poids frais au début de l'expérience (g)].

Les boutures ont été transporté au laboratoire où elles ont été lavées par trois fois avec de l'hypochlorite de sodium à 10 % pendant cinq minutes chaque fois pour assurer une meilleure

désinfection. Les boutures sont ensuite découpé en micro-boutures de 2cm de long portant chacune deux bourgeons axillaires au fin d'ensemencement qui est faite sous bec de bunsen dans des conditions poussées d'asepsie dans les tubes de cultures contenant chacun 10 ml de milieu de culture (MS ou B5) stérilisé à l'aide d'un autoclave de paillasse à 121°C pendant 30 minutes, dans des tubes coulés auparavant (Tableau 1), puis sont mis dans une chambre de culture à une température de 22 ± 3°C, une photopériode de 16h de lumière et 8h d'obscurité sous une intensité lumineuse de 60µmol.m-²s-¹. Les explants à bon développement végétatif sont acclimatés avant leur transfert sous serre vitrée dans un sol reconstitué de sable, de tourbe et de terre à part égale (1: 1: 1 volume), dans de pots de dimensions 8.5 x 7.5cm. On irrigue avec une solution nutritive constituée de 5ml de macro plus 2.5 micro-éléments dans 200ml d'eau distillée.

Tableau 1. Milieux de culture [MS & B5], concentrations de [2,4 D. g l^{-1}] et combinaisons hormonales utilisés

Milieu de culture	**MS**			**B5**		
Macroéléments	MS			B5		
Micro éléments	MS			B5		
Vitamines, Fe-EDTA	MS			B5		
Fructose (g. l^{-1})	30			20		
Agar (g. l^{-1})	8			8		
pH	5.8			5.8		
2.4 D (mg. l^{-1})	4	8	12	4	8	12
BAP (mg. l^{-1}) + ANA (mg. l^{-1})	1+1			1+1		
Ken (mg. l^{-1}) + AIB (mg. l^{-1})	0.25 + 1			0.25 + 1		

2. 3. Analyse statistique des données

Les données ont été traitées par l'analyse de la variance à l'aide du logiciel STAT BOX version 6,3. Les moyennes des variables mesurés ont été groupées par le Test de Newmen-Keuls, au seuil de probabilité de 5%.

3. Résultats

3.1. Régénération *in vitro*

3.1.1. Taux de contamination

Le taux de contamination reste dans les limites acceptables, il est compris entre 01.23, 01.85 et 02.47 % respectivement selon la provenance des micro-boutures, à savoir, El Hamel, Ouled Bedera et Ouled Sidi Brahim (Figure 2). A titre de comparaison Sadder., (2002) rapporte des taux de contamination allant jusqu'à 45% en culture *in vitro* de l'olivier.

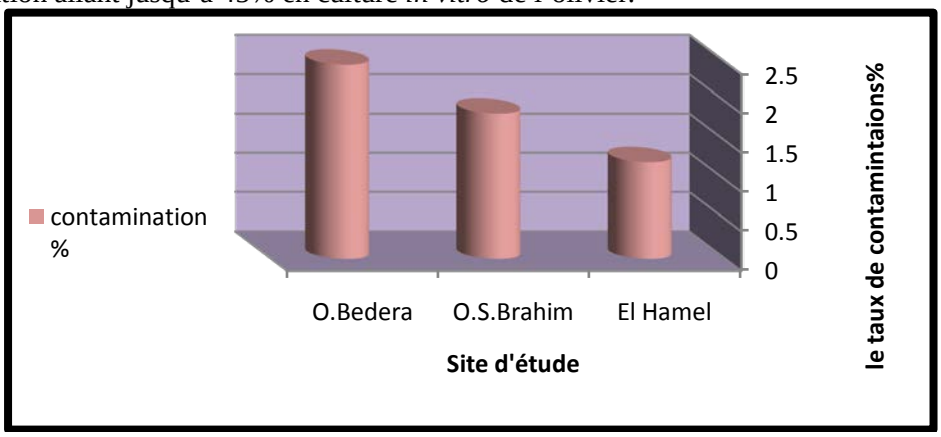


Figure 2. Taux de contaminations dans différents sites d'étude.

3.1.2. Effet du milieu de culture et de 2, 4 D., sur l'induction des cals

La réponse à la culture *in vitro* des micro-boutures de la variété « Chemlal » en provenance de trois sites mentionnés ci dessus se manifeste par la formation des cals dans les deux milieux de culture Gamborg (B5) et Murashigue et Skoog (MS) additionnés de différentes concentrations de l'auxine 2,4 acide di-chloro-phénoxy-actique (2,4 D.). Le comportement calogène des explants vis-à-vis le milieu de culture diffère selon la provenance des micro-boutures et la concentration adéquate qui est (4 mg. l^{-1}) qui a favorisé la calogenèse d'une manière très remarquable. (Tableau 2).

Tableau 2. Valeurs moyennes des variables mesurées par génotype et par site d'étude

Variété	Chemlal					
Provenance des explants	El-Hamel (P1)		Ouled Sidi Brahim (P2)		Ouled Bedera (P3)	
Milieu de culture	B5	MS	B5	MS	B5	MS
Explants ensemencés	54	54	54	54	54	54
Efficacité d'induction de cals						
[2,4D. mg. l^{-1}]	Calogenèse (%)					
C1 = 0	89	75	80	74	65	60
C2 = 4	90	77	80	75	67	62
C3 = 8	79	67	75	65	56	56
C4 = 12	56	50	50	45	45	44
Moyen de la calogenèse (%)	**78.5**	**67,25**	**71.25**	**64,75**	**58.25**	**55,5**
[2,4D. mg. l^{-1}]	Surface de cals (mm^2)					
C1 = 0	76,81	52,31	65,91	50,24	42,86	26,65
C2 = 4	83,82	58,61	67,12	56,67	56,12	31,69
C3 = 8	54,71	31,55	48,98	30,65	20,94	17,61
C4 = 12	31,10	25,90	23,55	18,29	16,78	13,07
Moyenne de surfaces de cals (mm^2)	**61,47**	**42,09**	**51,39**	**38,96**	**34,17**	**22,25**

Globalement, les résultats obtenus montrent que le milieu B5 est meilleur pour l'induction des cals comparativement au milieu MS. En effet, le développement des cals est plus intéressant dans le milieu B5. Il est à noter que les boutures en provenance du site d'El-Hamel se comportent mieux avec les milieux de culture *in vitro* tant pour le taux d'induction de cals que sur la base de développement dans l'espace comparativement au site d'Ouled Bedera, alors que le même paramètre calculé est en position intermédiaire pour le site d'étude d'Ouled Sidi Brahim, dont on a enregistré respectivement un taux moyen de calogenèse de 78.5% en milieu B5 contre 67.25% en milieu MS ; 58.25% en milieu B5 contre 55.5% en milieu MS et le positionnement intermédiaire qui est de 71.25% en milieu B5 contre 64.75% en milieu MS. Il est apparu qu'en présence de 2,4 D., à des concentrations différentes, l'induction des cals a enregistré des différents pourcentages moyens mais plus élevés (78.5 %, 71.25% et 58.25%) dans le milieu B5 comparativement au MS où les pourcentages enregistrées étaient (67,25%, 64,75% et 55,5%) dans les trois régions El Hamel, Ouled Sidi Brahim et Ouled Bedera respectivement (Figure 3).

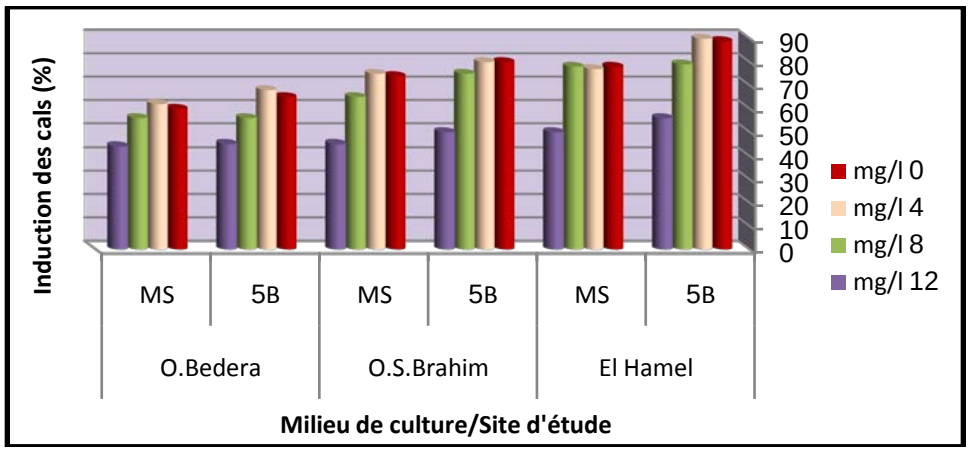


Figure 3. Effet de milieu de culture et de 2,4D sur l'induction des cals

3.1.3. Effet de la nature du milieu de culture sur (Fll), (HT) et (MF)

Le développement du feuillage, de la hauteur et de l'accumulation de la matière fraiche est très marqué chez tous les explants ensemencés des trois provenances, à savoir El Hamel, Ouled Sidi Brahim et Ouled Bedera. Le milieu de culture (B5) se révèle comme étant le plus satisfaisant à la demande nutritionnelle des explants. Il convient mieux à l'initiation foliaire, au développement en hauteur et à l'accumulation de la matière fraîche (Figure 4).

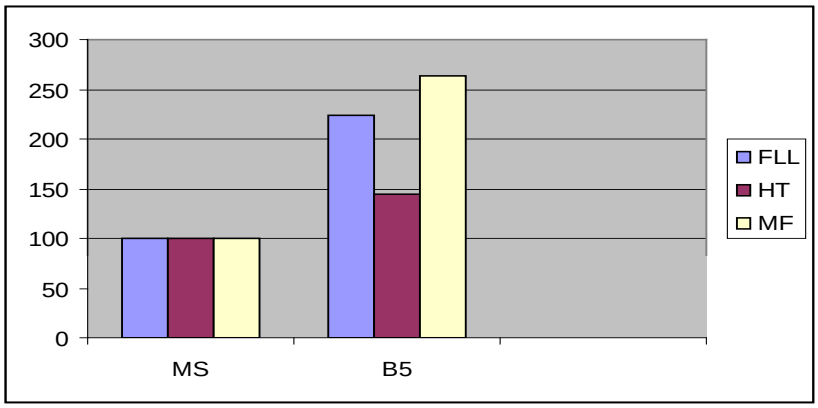


Figure 4. Effet de la nature du milieu de culture sur l'expression des variables mesurées (Fll, Ht et MF) [valeurs du MS prise comme indice 100]

3.1.4. Effet du milieu de culture et de 2,4 D., sur la surface des cals

La surface de cals est variable selon la concentration de l'auxine 2,4 D., et le milieu de culture utilisé. Généralement, la surface moyenne des cals est mieux développée en présence de différentes concentrations de 2,4 D., dans le milieu B5, dont on a enregistré 61.47, 51.39 et 34.17 mm^2 comparativement au milieu MS en présence toujours de 2.4 D., où on a enregistré une surface moyenne des cals atteignant 42.09, 38.96 et 22.25 mm^2, respectivement, chez les explants de provenance des trois régions (El Hamel, Ouled Sidi Brahim et Ouled Bedera). Il est à signaler que la concentration $4mg.l^{-1}$ 2,4 D., est la meilleur le bon développement des micro-boutures et par conséquent d'émission d'importante surface des cals. Les cals obtenus dans les deux milieux ont été de couleur blanche et se sont développés presque en totalité. Cependant, certains d'entre eux sont d'un aspect non compactés alors que d'autres sont restés bien liés. Ces résultats confirment ceux de (Cure et Mott, 1978 ; Wernicke et Brettelle 1982). (Figure 5).

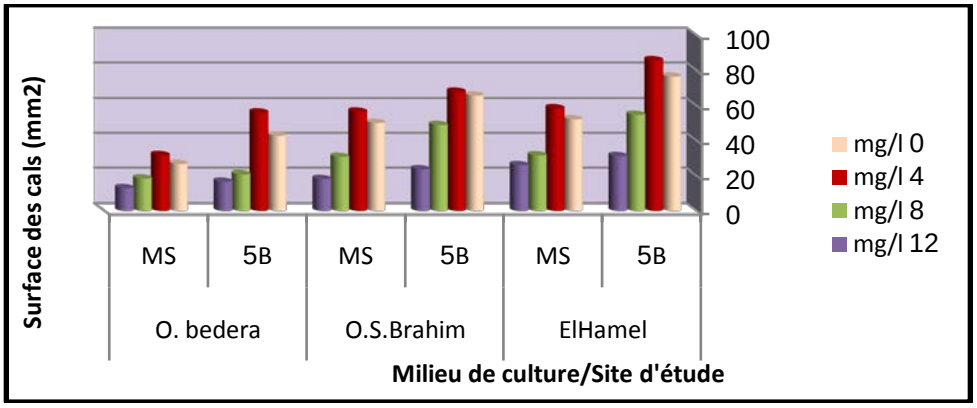


Figure 5. Effet 2,4 D., sur la surface des cals des génotypes de trois sites d'études.

L'analyse de la variance des deux facteurs (taux de la calogenèse et surface de cals) est égale P = 0,004 ≤ 0, 01 (hautement significatif), dans les micro-boutures de la région d'El Hamel et d'Ouled Sidi Brahim qui correspondent au groupe homogène A. (Tableau 3). Ainsi, l'analyse de la variance révèle un effet (Provenance et concentrations d'auxine) P = 0,0009 ≤ 0,001 très hautement significatif. Les cals développés dans les deux milieux se sont montrés globalement plus réactionnelles, ils ont été compacts et de couleur blanchâtre.

Tableau3. Moyennes du taux de la calogenèse (% cals) et de la surface des cals (SC) des explants exprimés au cours de l'expérience, sous l'effet des différents traitements

Facteurs	Induction de cals	Surface de cals
	Effet milieu	
B5	**69.33 [a]	*49.01 [b]
MS	**62.50 [a]	*34.43 [b]
	Effet provenance	
El Hamel	***72.87[a]	***51.78 [a]
O. S. Brahim	***68.00 [a]	***45.17 [a]
O. Bedera	*56.87 [b]	*28.21 [b]
	Effet hormone	
C1	***73.83[a]	***52.48 [a]
C2	***75.16 [a]	***59.00 [a]
C3	***66.33 [a]	**34.07 [b]
C4	**48.33 [b]	**21.44[b]

*, ** et *** significatif, hautement significatif et très hautement significatif.
Moyennes suivies par la même lettre ne sont pas différentes significativement selon le test NK'S

L'augmentation permise par B5 comparativement au MS, est de 69.33% pour l'induction des cals, 49.01mm2 pour la surface des cals au bout de 75j (Figure 5).
Ces résultats sont conformes à ceux rapportés dans la littérature concernant les différentes réponses des variétés au type de milieux de culture et aux hormones. Rokba et *al.*, (2000), rapportent des réponses variétales très différentes aux milieux de culture utilisés ainsi qu'aux différentes concentrations d'hormones. Ils mentionnent que la variabilité des réponses des variétés est aussi liée au stade végétatif de récolte des boutures à ensemencer. Dans la présente étude le matériel végétal collecté au cours de la période qui s'étend de Juin à Août répondait le mieux à la conduite *in vitro*. Ceci s'explique par le fait qu'au mois d'été, les oliviers sont en pleine période de croissance active et les tissus végétaux collectés au cours de cette période contiennent plus de réserves facilement utilisables et que mettent à profit les bourgeons pour se développer, une fois mis dans les conditions adéquates comme celles qu'ils trouvent *in vitro*. Sadder (2002), rapporte aussi des différences de comportement des micro-boutures issues de différentes parties de la plante. Il a expliqué le bon

comportement des boutures issues de la collecte du mois d'été par le fait qu'elles contiennent plus de réserves nutritives qui permettent aux explants de s'adapter peu à peu aux conditions de la *culture in vitro*.

4. Conclusion

Au terme de cette étude et à travers les résultats obtenus, on a constaté que pour la culture *in vitro*, La composition du milieu de culture joue un rôle très important dans la phase de la calogenèse. Les deux milieux B5 et MS additionnés de la concentration hormonale de 2,4D (4 $mg.l^{-1}$) a permis d'obtenir les meilleurs taux d'induction des cals et les meilleures surfaces des cals par rapport aux concentrations plus élevées (8 et 12 $mg.l^{-1}$). On peut affirmer que le milieu B5 est nettement mieux plus pour l'embryogenèse somatique de l'olivier, ce résultat concorde avec celui de (Rugini., 1988). Le milieu B5 est bénéfique d'avantage à l'embryogenèse somatique (Rugini, 1986 ; Mencuccini 1992). En effet on constate que la particularité de réponse peut être du au site de provenance des boutures (Abousalime et al., 1993). En effet la concentration de $4mg.l^{-1}$ dans les deux milieux B5 et MS s'est montré globalement la plus active à la culture *in vitro* par rapport aux autres concentrations, Ces résultats, montrent que l'ajout du régulateur de croissance à faible concentration, en particulier la 2,4 D., au milieu de culture pour l'induction de cals, favorise la formation des cals embryonnaires. Chaudhry et Qu., (2000) mentionnent que le 2.4 D., est généralement la meilleure auxine qui favorise l'induction des cals chez les graminées, elle stimule la calogenèse à faibles doses chez la variété Chemlal et l'inhibe à des doses élevées. Ces résultats confirment ceux de Gunckel et al. (1972). Le débourrement des cals embryogènes dans les deux milieux s'est réalisé dans la 4ème semaine chez la variété Chemlal, cela concorde avec les résultats qui sont obtenus par Yakoub et al . (2000).

5. Remerciements

Nous remercions la direction des forets, de l'environnement et les services agricoles de la wilaya de M'Sila, ainsi les propriétaires privés des vergers oléicoles pour leurs aide et leurs soutien quand à la réalisation de ce travail.

Déclaration de conflit d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêts.

REFERENCES

- Amirouche M. (1977). Contribution à la caractérisation des principales variétés d'olivier cultivées en Kabylie, par l'analyse des données biométriques et morphologiques. Mémoire de Magister. Int. Nat. Agr., El-Harrach. 47p.
- Abousalim A., Walai L., Slaoul K. (1993). Effet du stade phénologique sur l'enracinement des boutures semi-ligneuses de l'olivier en tablettes chauffantes. *Olivae*, 46: 30–37.
- Chaudhry A., Qu R. (2000). Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf type *Bermuda grass*: Effects of 6-benzyladenine in callus induction medium. *Plant Cell Tissue. Org. Cult*, 60: 113 - 120.
- Cure W.W, Mott R.L. (1978). A comparative anatomical study of organogenesis in cultured tissues of maize, wheat and oats. *Physiol. Plant. 42:* 91-96
- Dale P.J., Deambrogio E. (1976). A comparison of callus induction and plant regeneration from different explants of (*Hordeum vulgare* L.) *Z. P flanzenzuecht*, 94: 65- 77.
- D.S.A. (2014). Direction des services d'Agriculture.
- Gamborg O.l., Miller R., Ojiama K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res*, 50: 151-158.
- Gunckel J.E., Sharp W.R., Williams B.W., West W.C., Drikwater W.E. (1972). Root and shoot initiation in sweet potato explants as related to polary and nutrient media variations. *Bot Gaz* 133, 254-262
- Rugini E. (1988). Somatic embryogenesis and plant regeneration in olive (*Olea europaea* L.). *Plant Cell Tiss. Org*, 14: 207–214.

- Rugini E., (1986). Olive (*Olea europaea* L.). In: Bajaj Y.P.S. (Ed.), Biotechnology in agriculture and
forestry. *Tress I. Springer-Verlag*. Germany, 5: 253–26.
- Rokba Z.A., Loxou V.K., Lionakis S.M. (2000). Regeneration of olive (*Olea europaea* L.) *in vitro*, In *Proc 1st meeting on biotechnology*, Geisenheim, Germany, pp 25-26.
- Sadder M.T. (2002). *In vitro* establishment of olive (*Olea europaea* L.) Using still liquid medium and callus culture. *Dirasat Agricultural Sciences*, 35: 19-24.
- Murashigue T., Skoog F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissus Cultures. *Physiologia Plantarum,* 15: 473-497.
- Mencuccini M., Luchetti M. (1992). Coltura di protoplasti isolati do differenti tissuti di cultivar di olivo (*Olea europaea* L.), Giornate Scientifishe, Ital. Hortic. Soc., Ravello - (SA), Italia, C*ell Tissue. Org. Cult,* 60: 113 - 120.
- M.A., (1992). Ministère de l'Agriculture.
- P.N.D.A. (1994). Plan National de Développement Agraire.
- Wernicke W., Brettelle R. (1982). Morphogenesis from cultured leaf tissue of *Shorgum bicolor*-culture initiation. *Protoplasma* 111, 19-27
- Yakoub S., Bounaly J., Barque J.P., Bennadji A., Gaouar A. (2000). Morphogenèse *in vitro* du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) et de l'olivier (*Olea Europeae* L. var. Chemlal). Thèse de doctorat d'état en biologie végétale. Univ. M. Mammeri Tizi-Ouzou, pp 180-191.

Spontaneous genetic erosion of date palm (Phoenix dactylefera L.) in Boussaâda's Oasis(Algeria) and plant biotechnology techniques uses for its regeneration

Benderradji Laid[1,3], Chahredine Sadek[2], Kellou Kamel[3]
[1]Natural and Life Sciences Department, Faculty of Sciences, Mohamed Boudiaf University-M'sila, Algeria
[2]Department of Basic Education, Faculty of Natural and Life Sciences, Jijel University, Algeria
[3]Genetics, Biochemistryand Plant Biotechnology végétale, Constantine university, Algeria
Email: gbenderradjilaid@gmail.com

RESUME
Le palmier dattier (*Phoenix dactylefera* L.) est une espèce tampon des régions arides et semi-arides. Néanmoins, aujourd'hui, les palmeraies sont menacées, non seulement sur le plan climatique, mais aussi sur le plan de la diversité variétale, comme la disparition de variétés et une faible production et/ou même un rejet nul servant principalement à la multiplication végétative qui peut être utilisée comme source d'explants dans la culture de tissu *in vitro* par différentes techniques de biotechnologies végétales entre autre l'embryogenèse somatique. Cette situation se traduit par une grave érosion génétique (Belguedji, 2002). L'objectif de ce travail est donc de contribuer à la conservation des ressources génétiques et de sélectionner des cultivars adaptés à telles conditions existent dans ces régions. L'étude vise à utiliser des techniques de culture tissulaire *in vitro* pour régénérer le verger phénicicole et faire revivre l'oasis de Boussaâda à travers la création des micro-oasis, dans le cadre d'une convention scientifique et technique entre institutions de recherche afin de préserver ce patrimoine génétique dont les variétés sont spécifiques à la région qui sont entrain de se dégradé et même de disparaître. Les résultats indiquent que la culture des palmiers est un axe important qu'on doit développé dans la palmeraie de Boussaâda en introduisant des variétés plus appropriées et plus rentables pour une bonne diversification des cultivars pour fin d'améliorer la production des dattes.
Mots-clés: Palmier dattier, Palmeraies, rajeunissement, culture de tissus, sélection

SAMMARY
The date palm (Phoenix dactylefera L.) is a buffer species in arid and semi-arid regions. Nevertheless, today, palm groves are threatened not only in terms of climate, but also in terms of varietal diversity, such as the disappearance of varieties and low production and / or even zero discarding, mainly used for vegetative propagation. which can be used as a source of explants in tissue culture in vitro by different techniques of plant biotechnology, among others somatic embryogenesis. This situation results in serious genetic erosion (Belguedji, 2002). The objective of this work is therefore to contribute to the conservation of genetic resources and to select cultivars adapted to such conditions exist in these regions. The study aims to use in vitro tissue culture techniques to regenerate the phenic orchard and revive the oasis of Boussaâda through the creation of micro-oasis, within the framework of a scientific and technical convention between research institutions so to preserve this genetic inheritance whose varieties are specific to the region which are being degraded and even disappearing. The results indicate that palm cultivation is an important axis that must be developed in the Boussaâda palm grove by introducing more appropriate and profitable varieties for a good diversification of cultivars in order to improve the production of dates.
Key words: Date palm, Palm groves, Rejuvenation, Tissue culture, selection

1. INTRODUCTION

In Algeria, there are thirty thousand date palm since "French occupation period", but recently, it has only 7000 trees" (CRSTRA-Biskra, 2014). This decrease is mainly due to lack of cultivation space and several factors threatening the oasis. This study focuses on fundamental cultural footprint, but also tourist economy in the splendid Algerian Sahara. Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) is a species of great socio-economic interest. It is the main axis of agriculture which provides the

main food and financial resource of people in these regions. However, palm groves are subject to severe genetic erosion and environmental threats which is manifested by the disappearance of many cultivars, leading to the depletion of date palm genetic resources (Bougerfaoui, 1998).
Through this study, we have choose a large uses variety in the region namely "Mech-Degla", that it could be regenerated by tissue culture technique such as somatic embryogenesis using a several basic culture media: Murashigue and Skoog (1962), Gamborg et *al.* (1968) and Ghautheret (1957) abbreviated, respectively, MS, B5 and KNOP supplemented with 3 concentrations of 2.4, Dichlorophenoxy acetic acid (5, 10 and 20 mg/l).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Study area

Each palm grove or micro-oasis namely: Nakhara's micro-oasis, Khachbt Mimoun's microoasis, Hmaïd's micro-oasis and Btom's micro-oasis, contains a large number of date palm cultivars.

2.2. Methodology

Somatic embryogenesis technique of *in vitro* tissue culture was applicant to regenerate date palm (*Phoenix dactylefera* L.) rejection of Mech-Degla cultivar. After explants prepared, and culture media (Murashigue and Skoog, 1962; Gamborg et *al.*, 1968; Gautheret, 1957) sterilized, explants were incubated in growth chamber at average Temperature (25°C ± 2), photoperiod 16 h day/8h night under white light lamps

3. RESULTS AD DISCUSSION

3. 1. Inventory

The inventory made at the 4 study sites made it possible to determine several cultivars with a different number of plants. According to the study carried out by Bennaceur and Benderradji (2016), the inventory carried out in this region leads to the determination of a large number of cultivars scattered on each micro-oasis, and therefore, it should be noted that a micro-oasis of Nakhara, extended on the border of the valley of Boussaâda with a total surface of 10 hectares, it contains 25 parcels comprising 595cultivars. In Micro-oasis of Khachbat Mimoun, located in the North-west of Boussaâda, with the census of 21 parcels approximately which contains 540 palms including various cultivars. In Micro-oasis of Hmaid, located in the North-east on the right bank of the Boussaâda's valley where the source of irrigation is "Seguia Haouata", there are 562 palms spread over 17 plots. In Micro-oasis of Btom, which is the largest area in the palm grove of Boussaâda, it is located northeast of the valley next to the area of Hmaid, there are 411 palm trees.
It should be noted that the Boussaadiya variety is abundant in all the study sites. This can be interpreted by adapting this variety to environmental constraints on the one hand and secondly because this variety is specific to the region which gives it some tolerance to different biotic and abiotic stresses existing in the region (Figure 1A-D).

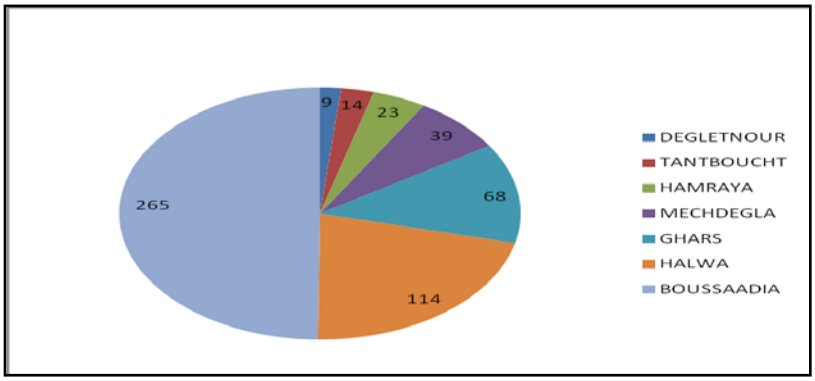


Figure 1 (A) : Nom et Nombre des variétés existantes dans la Micro-oasis Nakhara

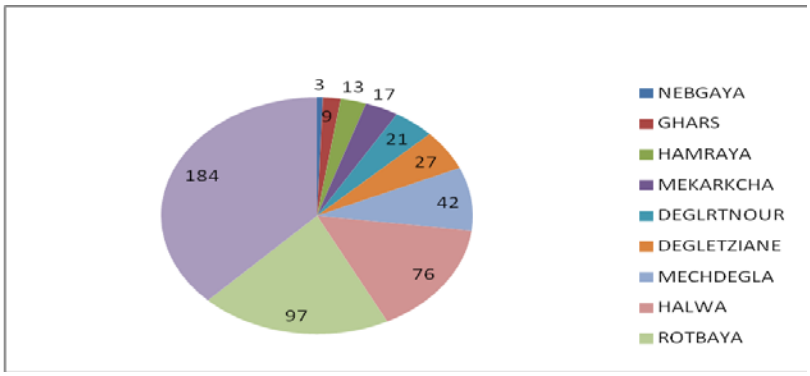


Figure 1(B) : Nom et Nombre des variétés existantes dans la Micro-oasis Khachbat Mimoun

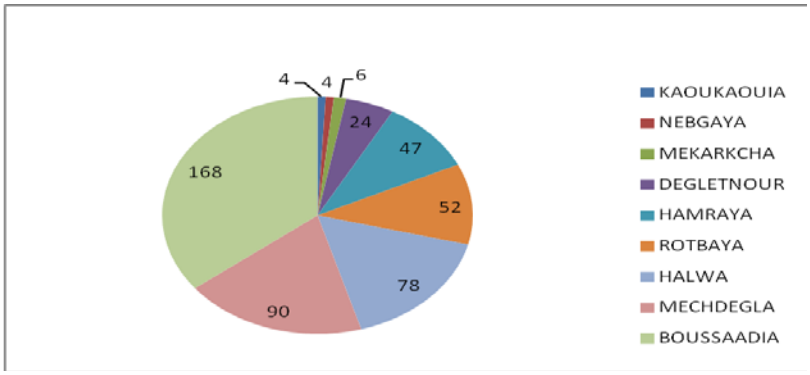


Figure 1(C) : Nom et Nombre des variétés existantes dans la Micro-oasis Hmaid

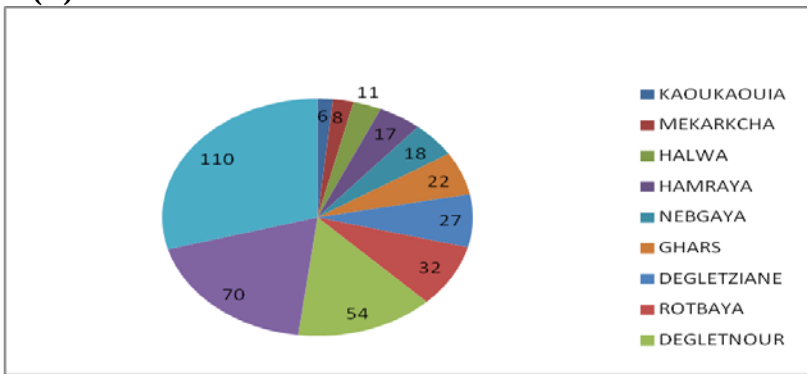


Figure 1 (D) : Nom et Nombre des variétés existantes dans la Micro-oasis Btom

3. 2. *In vitro* regeneration

It showed that all culture media can regenerate explants in addition of 5 mg/l of 2.4D compared to high levels of 2.4D such as 10 & 20 mg/l. So, date palm rejection able to regenerate entire plantlets according to the activation cells division (Table 1 and Figure 2A & B).

Table 1: Culture media and growth regulator used

Growth Regulator	Culture medium		
2,4-D (mg/l)	**MS**	**B5**	**KNOP**
5	+	+	+
10	-	-	-
20	-	-	-

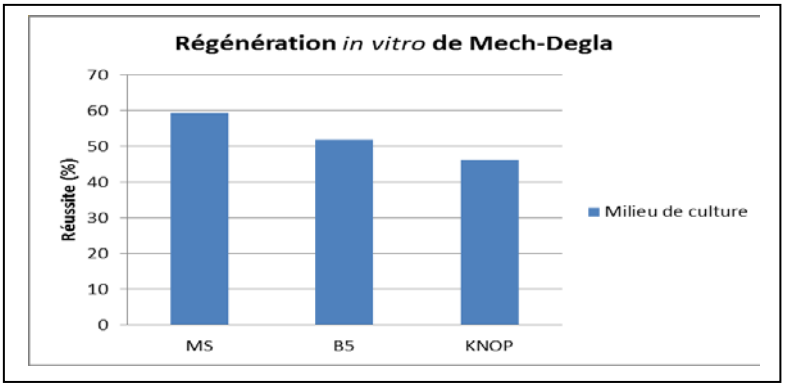


Figure 2 (A): *In vitro* regeneration of Mech-Degla cultivar (successful rate)

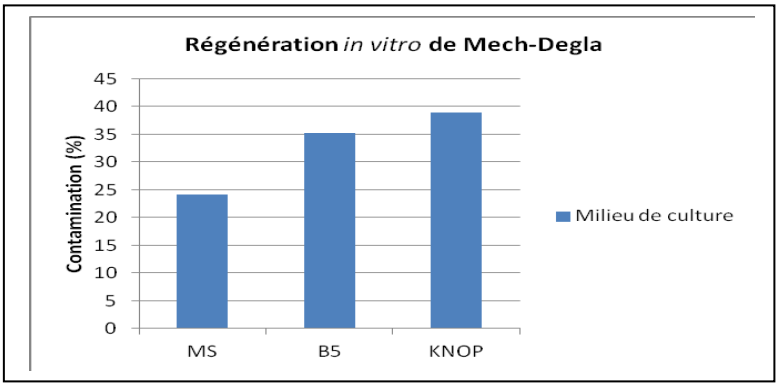


Figure 2 (B): *In vitro* regeneration (Contamination rate)

4. CONCLUSION

Results indicate that plant growing is an important axis that needs to be developed in the oasis by introducing varieties to select the most suitable and profitable for a good diversification of cultivars and consequently the improvement of production. Date palms of Boussaâda have varietal diversity and a very important nutritional value in Algeria.

The study was devoted to making inventory to establish a census of palms existed in the region of Boussaâda and contribution to the regeneration of this species by somatic embryogenesis. The inventory was made in four micro-oases, namely, Nakhara, Khachbt Mimoun, Hmaid and Btom, which showed that the oasis of Boussaâda still retains an important diversity. It should be noted also that a development of explants of the heart of rejection is recorded indifferently in media MS, B5 and KNOP supplemented with 5 mg / l 2,4-D. compared to the concentrations 10 mg / l and 20 mg / l of 2, 4D.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Forestry, Environment and Agricultural Services Department of the governorate of M'sila for their help and support in carrying out this work.

REFERENCES

- Bougerfaoui M. (1998). Vitrification and its effect on tissue culture of date palm. Proceeding de la conférence sur le palmier dattier organisé par le "Réseau de Recherche et Développement du Palmier dattier" ACSAD, Marrakech, Maroc, 16 -18 février 1998, pp: 230-236.
- Belguedji M. (2002). Les ressources génétiques du palmier dattier : Caractéristiques des cultivars dans les palmeraies du Sud-Est Algérien. 3D-Documents-Débats-Dossiers.

- Bennaceur M., Benderradji L. (2016). Phoeniciculture in the M'sila region: Current situation and methods of improvement, Master thesis in Plant biotechnology and meta-genomics, Faculty of Sciences- M'sila University (June 2016), 47p.
- C.R.S.T.R.A. (2014). Centre de Recherche Scientifique et Technique sur les Régions Arides, Numéro spéciale, ISSN : 1112-3273 http://www.crstra.dz
- Thosio M., Folke S. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue culture, *Physiologhia plantarum*, vol 15, pp: 473- 497.
- Gautheret R.J. (1957). Histogenesis in plant tissue cultures. J. Nat. Cancer Inst., 19, 555-573.
- Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. (1968). Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells. Ex. Cell. Res., 50, 15-158.
- Murashigue T., Skoog F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissus Cultures. Physiologia Plantarum, 15, 473-497.

Scarification des grains et régénération des plantules *in vitro* sous stress salin et thermique chez (*Retama sphaerocarpa*)

[1]Laid Benderradji, [1]Noura Messaoudi, [2]Lydia Elhadef Elokki, [3]Faiçal Brini
[1]Département des Sciences de la Nature et de la Vie, Faculté des Sciences, Université de M'sila, Algérie
[2]Département de Biologie et d'Ecologie végétale, Faculté des Sciences de la nature et de la vie, Université Ferhat Abbes- Sétif1
[3]Laboratoire de protection et d'Amélioration de plantes, Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS), Université de Sfax, Tunisie
Email: benderradjilaid@yahoo.fr

Résumé
Cette étude a été réalisée dans le laboratoire de biotechnologie végétale de l'Université Mohamed BOUDIAF-M'sila, elle a pour objectifs d'évaluer la pré-germination des graines sous l'effet de réactifs chimiques, tels que l'acide sulfurique pur (H_2SO_4, 1.96), et de connaître la capacité de régénération des plantules entières de (*Retama sphaerocarpa*), qui est une légumineuse endémique et un fourrage pastoral des régions semi-arides. Des graines ont été collectées dans la région de Boussaâda puis sont stockées pour une année avant la réalisation de l'expérimentation pour la maturité et le développement des embryons utilisés comme matériel végétal en culture *in vitro*. De nombreux milieux de culture différents tels que KNOP, Murashigue et Skoog (MS) et Gamborg (B5) ont été utilisés avec et sans acide 2.4, Acide dichloro-phénoxyacétique à différentes concentration sous l'effet du stress salin et thermique. Afin de démontrer les contraintes abiotiques affectant cette espèce, divers paramètres tels que le nombre de feuilles transmises (NF), la longueur des pousses (LP), la longueur des racines (LR) et l'efficacité du traitement chimique dans le cadre d'une scarification à l'acide sulfurique (H_2SO_4, 1.96). Les résultats montrent que le traitement chimique est un facteur bénéfique pour la germination. Il a été noté que le milieu KNOP était le meilleur pour la régénération des plantules. Le stress salin à 5 g/l et celui thermique à 35°C ont des effets de croissance importants sur les plantules de *Retama sphaerocarpa*, respectivement.
Mots-clés: Germination des graines, milieu de culture, *Retama sphaerocarpa*, régénération des plantules, stress salin, stress thermique.

SAMMARY
This study was carried in plant biotechnology laboratory of Mohamed BOUDIAF University-M'sila. Aims of this work are to evaluate seeds pre-germination under chemical reagent effects, such as pure sulfuric acid ($H_2SO_{4,\ 1,\ 96}$) and then to recognize the ability to regenerate entire plantlets of Retama sphaerocarpa, which is an endemic legume and pastoral forage of semi-arid regions. Seeds were collected from Boussaâda region, one year old, before experimentation realization in order to complete full development of embryos used as plant material on in vitro culture. Many different culture media such as KNOP, Murashigue and Skoog (MS) and Gamborg (B5) where used within and without 2.4 -Dichloro-phenoxy-acetic acid for many different concentration under effects of salt and thermal stress for showing the abiotic constraints influence on various parameters like number of transmitted sheets (NS), length of shoots (LS), length of roots (LR) and the effectiveness of chemical treatment within sulfuric acid ($H_2SO_{4,\ 1,\ 96}$) scarification. Results show that chemical treatment is a beneficial factor for germination and it's noted that KNOP medium was the best culture medium for plantlets regeneration. Both of salt stress at 5g/l and thermal stress at 35°C have a significant growth effects on the seedlings of Retama sphaerocarpa respectively.
Key words: culture medium, Retama sphaerocarpa, seed germination, salt stress, plantlets regeneration, thermal stress.

1. INTRODUCTION

Le genre *Retama* est parmi les légumineuses des zones arides et semi arides, il est très répandu en Algérie par trois espèces, à savoir, *Retama monosperma* qui croit sur le littoral et les dunes côtières, *Retama raetam* et *Retama sphaerocarpa* qui couvrent les régions sahariennes (Quezel et Santa, 1962). Les études phytochimiques ont montré que ces espèces sont très riches en métabolites secondaires, justifiant ainsi, leurs diverses applications en médecine traditionnelle comme anti-inflammatoires, anti-tumorales, cicatrisantes et sédatives. La difficulté de germination naturelle des graines du genre *Retama,* à cause de la sécheresse des régions steppiques et la dureté tégumentaire, mène au déclin de ces espèces. Cependant, beaucoup de ces plantes ont été reproduites *in vitro* avec succès, soit par organogenèse soit par embryogenèse somatique (Debnath, 2005). Notre étude est une contribution d'utilisation des méthodes modernes de micro-propagation en vue d'une production de plants pour sauvegarder ces espèces. Dans ce cadre nous avons utilisé la méthode de l'embryogenèse somatique et opter à la détermination des milieux de cultures appropriées pour la germination *in vitro* des graines et par la suite la régénération des plantules de l'espèce « *Retama sphaerocarpa* » et étudier l'effet de la salinité et de la température afin d'y mettre en application un protocole solide et efficace pour la régénération *in vitro* de cette espèce.

2. MATERIEL ET METHODES

2. 1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé (*Retama sphaerocarpa*) a été collecté de la région de Boussaâda dans la wilaya de M'sila (Algérie), sous forme de gousses renfermant des graines matures de cette espèce dans le but de tester leur pouvoir germinatif et l'aptitude à régénérer des plantules entières sous conditions contrôlées. Ces graines sont de forme assez globulaire, de couleur noir, à taille ne dépassant 2mm de long.

2.2. Milieux de culture

Trois milieux de culture, KNOP, Murashigue et Skoog (MS) et Gamborg (B5), ont été utilisés dans cette étude. (Tableaux 1, 2 et 3).

Tableau 1. Composition chimique du milieu KNOP (Gautheret, 1957).

Ingrédients	$CaNO_3$	KNO_3	$MgSO_4$	KH_2PO_4	$FeSO_4$
Quantité (mg/l)	1	0.25	0.25	0.25	0.05

Tableau 2. Composition chimique du milieu de Murashigue et Skoog (1962)

Macro éléments	**mg/l**	**Micro éléments**	**mg/l**	**Inorganiques**	**mg/l**	**Organiques**	**mg/l**
NH_4NO_3	1650	KI	0.83	$FeSO_4.7H_2O$	27.8	Myo-Inositol	100
KNO_3	1900	H_3BO_3	6.2	$Na_2EDTA.2H_2O$	37.3	Acide Nicotinique	0.5
$CaCl_2.2H_2O$	150	$MnSO_4.4H_2O$	22.3			Pyridoxine-HCl	0.5
$MgSO_4.7H_2O$	250	$ZnSO_4.7H_2O$	8.6			Thiamine-HCl	0.1
KH_2PO_4	170	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25			Glycine	2
		$CuSO_4.5H_2O$	0.025				
		$CoCl_2.6H_2O$	0.025				

Tableau 3. Composition chimique du milieu de Gamborg et *al.,* (1968)

Macro éléments	**mg/l**	**Micro éléments**	**mg/l**	**Inorganiques**	**mg /l**	**Organiques**	**mg/l**
KNO_3	2500	$MnSO_4.H_2O$	10	$FeSO_4.7H_2O$	27.8	Myo-Inositol	100
$CaCl_2.2H_2O$	150	$ZnSO_4.7H_2O$	2	$Na_2EDTA.2H_2O$	37.3	Acide Nicotinique	1

$(NH_4)_2.SO_4$	134	H_3BO_3	3			Pyridoxine-HCl	1
$MgSO_4.7H_2O$	250	KI	0.75			Thiamine-HCl	10
$NaH_2PO_4.H_2O$		$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25			Glycine	10
		$CuSO_4.5H_2O$	0.025				
		$CoCl_2.6H_2O$	0.0125				

2.3. Protocol expérimental

2.3.1. Stérilisation, scarification et germination des graines

La stérilisation des graines se fait par trempage dans l'éthanol (70%) pendant 70 secondes puis transférées dans une solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl, 6%) pendant 15 minutes et rincer à l'eau distillée stérile par trois fois successives pour une durée de 10 minutes chaque fois. Les graines sont ainsi misent dans une boite de pétri pourvu d'une solution d'eau distillée stérile pour fin d'ensemencement. Les instruments d'ensemencement (pinces, scalpels, bistouris…), sont stérilisés par température à sec dans un étuve ventilé de 180 à 200°C pendant 30 minutes. La scarification des graines se fait à l'aide d'un traitement chimique par un trempage dans une solution concentrée d'acide sulfurique H_2SO_4 concentré à 96% pendant 30 minutes, puis sont rincées abondamment à l'eau distillée stérile. La germination est effectué en utilisant des graines mûres, entières et intactes dans des boites de pétri tapissées d'une double couche de papier filtre (Whitman N°1), humecté par l'eau distillée stérile pendant 72h à l'obscurité totale et à la température ambiante. Après la phase de gonflement, il est considéré comme ayant germées lorsque les radicules des graines deviennent visibles.

2.3.2. Ensemencement des graines

L'ensemencement des graines germées se fait dans différents milieux de cultures stérilisés et coulés auparavant dans des boites de pétri stériles qui sont misent dans une chambre de culture à conditions contrôlées (T° = 22 ± 3C° et photopériode de 16h lumière /8h obscurité). Les plantules régénérées issue de la germination sont transférées dans les milieux (KNOP, MS et B5), sous stress salin (0, 5, 10 et 15g/l NaCl) pendant 4 semaines et sous stress thermique à l'aide une étuve ventilée à 180°C dont on a exposé les plantules à (25, 30, 35 et 40°C) pendant 3 heures. Les plantules sont ainsi incubées dans une chambre de culture aux mêmes conditions contrôlées qu'auparavant.

2.3.3. Indice de sensibilité (IS) au stress

Afin de confirmer l'aptitude à tolérer le sel et/ou la température chez *Retama sphaerocarpa*, nous avons procédé au calcul de l'indice de sensibilité (IS) pour les trois paramètres, à savoir, le nombre de feuilles (NF) émis, la longueur de la tige (LT) et la longueur des racines (LR). L'indice de sensibilité correspond à l'écart entre les plantules traitées et témoins. Il est calculé selon la formule suivante : $\mathbf{IS = [(\mathit{P}s - \mathit{P}t)/\mathit{P}t] \times 100,}$ avec (Ps = Plantes stressées), la valeur du paramètre mesuré chez la plante soumise au stress salin ou thermique et (Pt = plantes témoins), la valeur du même paramètre chez les plantes témoins (Slama, 1982). Plus l'indice de sensibilité (IS) est négatif, plus la variété est sensible.

2.4. Analyse statistique des données

Les données ont été traitées par l'analyse de la variance, en utilisant le logiciel STAT-BOX 6,4. Une analyse de la variance à été utilisée pour le traitement des résultats en faisant comparer les moyennes par le test Newman-Keuls au seuil de 5%.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Résultats

3.1.1. Taux de germination

Globalement, le taux de germination atteint 90% dans le milieu KNOP et 50% dans les milieux (KNOP + 2.4D, MS, B5, et B5 + 2.4D) alors que dans le milieu MS +2.4D, le taux ne dépasse guère 40%. (Figures 1 & 2 (A, B et C) ; Tableau 4).

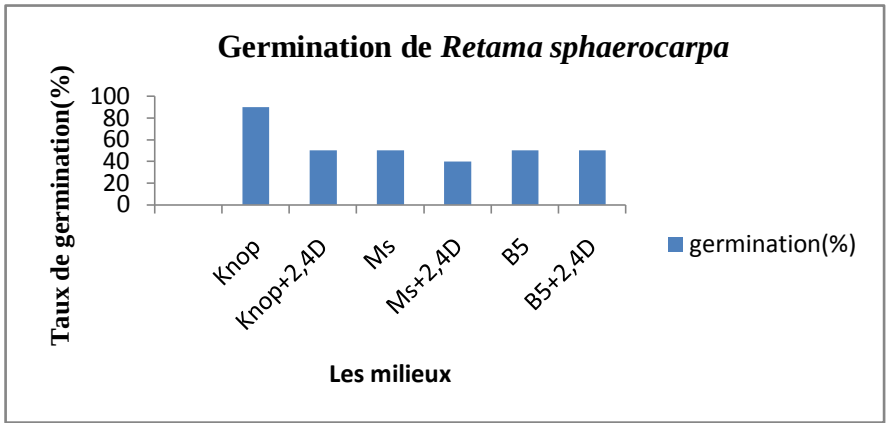


Figure 1. Effet des milieux de culture sur la germination des graines de *Retama sphaerocarpa* (KNOP, MS, et B5)

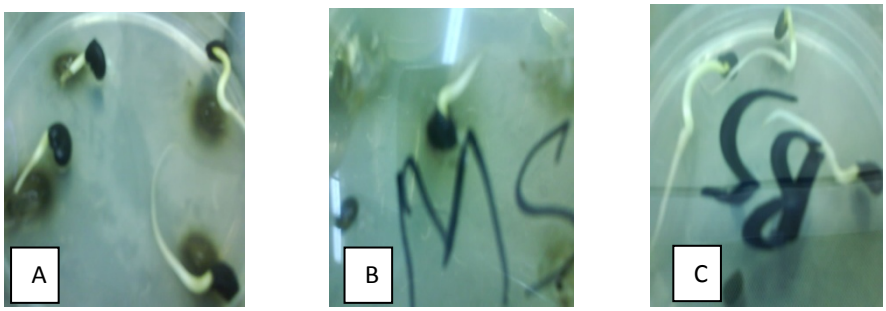


Figure 2. Graines germées dans les milieux (KNOP, MS, et B5) (A, B et C) respectivement) (Cliché, L. BENDERRADJI, 2017)

3.1.2. Taux de contamination

Le taux de contaminées des graines est très marqué dans le MS suivie de B5 et KNOP avec un taux de 23.3, 16.7 et 13.3%, respectivement (Figure 3 et Tableau 4).

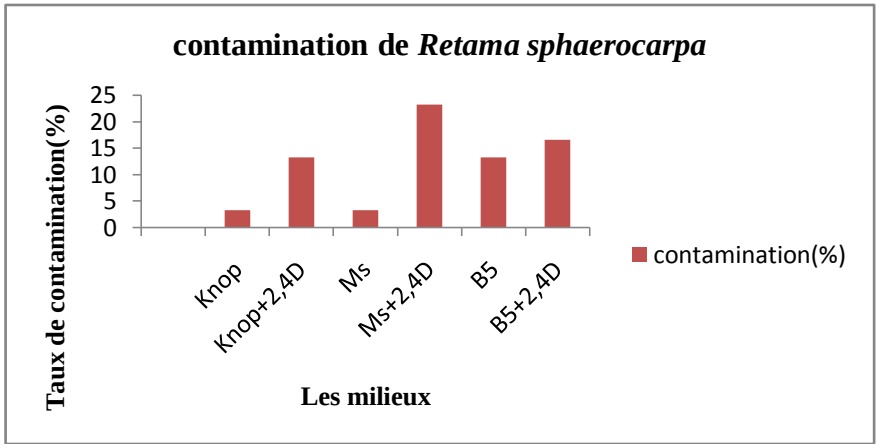


Figure 3. Effet des milieux de culture sur la contamination des graines de *Retama sphaerocarpa*

Tableau 4. Valeurs moyennes des variables mesurées

Espèce	***Retama sphaerocarpa***											
Milieu de culture	**KNOP**				**MS**				**B5**			
NGI	30				30				30			
NGC	1				1				4			
C (%)	3.3				3.3				13.3			
N GG	27				15				15			
G (%)	90				50				50			
NF	2.3	4.0	5.3	5.6	2.0	2.6	3.0	4.0	2.0	2.3	2.3	2.3
LT	3.0	3.5	4.3	4.3	2.5	3.1	3.6	3.6	1.4	1.4	2.0	2.2
LR	16.0	18.3	20.3	21.0	7.3	9.5	9.8	8.6	2.5	2.7	2.7	3.0
NR	10.6	12.3	13.0	13.3	7.3	9.0	10.3	12	5.3	6.0	6.3	7.0

Nombre de graines incubées (NGI), Nombre de graines contaminées (NGC), % de contamination (C%), Nombre de graines germées (NGG), % de germination (G%), Nombre de feuilles (NF) par génotype, Longueur de la tige (LT), Longueur de la racine (LR) et Nombre de racines (NR).

3.1.3. Efficacité de la calogenèse

En présence de 2.4D, l'induction des cals est presque nulle dans le milieu MS (6.6%), comparativement au B5 (30.3%) le milieu KNOP s'est avéré le mieux pour l'induction des cals (40%). La calogenèse s'est exprimée par la surface qu'atteint les cals, elle s'est avérée plus importante dans le milieu KNOP (0.8 mm^2) suivie par le milieu B5 (0.4 mm^2) et en fin dans le milieu MS (0.12 mm^2) (Tableau 5).

Tableau 5. Valeurs moyennes des variables mesurées (génotype et milieu de culture utilisé

Espèce	***Retama sphaerocarpa***		
Milieux testés	**KNOP+2.4D**	**MS+2.4D**	**B5+2.4D**
Nombre de graines incubées	30	30	30
Nombre de graines contaminées	4	7	5
Contamination (%)	13.33	23.33	16.66
Nombre de graines germées	15	12	15
Germination (%)	50	40	50
Nombre de graines formant cal	12	2	10
Calogenèse (%)	40	6.66	30.33
Surface de cal (mm^2)	0.8	0.12	0.4

3.1.4. Effet du milieu de culture sur la croissance

3.1.4.1. Effet sur le nombre de feuilles

La moyenne du nombre de feuilles enregistré après une semaine est de 2.2 et 2 dans le milieu KNOP ; MS et B5, respectivement. Après 2 semaines, on a eu une augmentation moyenne en nombre de feuilles de 4, 2.5 et 2.2 dans le milieu KNOP, MS et B5, respectivement. Après la 3ème et la 4^{éme} semaine, le nombre de feuilles ne cesse d'augmenter dans le milieu KNOP et MS atteignant ainsi 6.8 et 4, respectivement, comparativement au nombre de feuilles dans le milieu B5 qui reste stable (Figure 4).

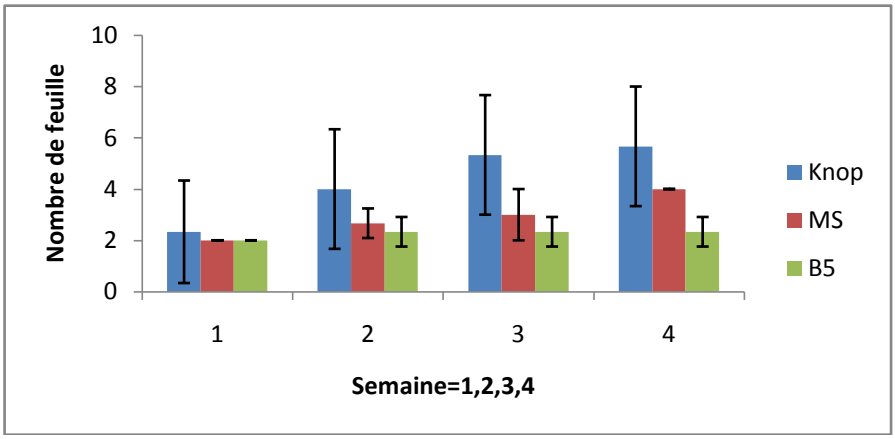


Figure 4. Effet des milieux de culture (KNOP, MS, B5) sur le nombre de feuilles de *Retama sphaerocarpa.*

L'analyse de la variance montre un effet milieu de culture et temps d'application très hautement significatif et effet interaction (milieu x temps) hautement significatif (Tableau 6).

Tableau 6. Paramètres de croissance en fonction du milieu de culture et du temps d'application.

PC / FE	NF	LT	LR	NR
Milieu de culture	0^{***}	$0{,}00036^{***}$	0^{***}	$0{,}00224^{**}$
Temps d'application	0.00001^{***}	$0{,}09431^{ns}$	$0{,}21281^{ns}$	$0{,}34739^{ns}$
Interaction Milieu x temps	0.00459^{**}	$0{,}99^{ns}$	$0{,}81808^{ns}$	$0{,}98707^{ns}$

PC : Paramètres de croissance, FE : Facteurs étudiés, NF : Nombre de feuilles, LT : longueur de tige, LR : Longueur de racine, NR : Nombre de racine, n. s : non significatif,* : significatif, ** : hautement significatif, *** : très hautement significatif.

3.1.4.2. Effet sur la longueur de la tige

L'élongation de la tige est variable selon le milieu de culture utilisé et le temps d'application de la culture. La longueur de la tige après une semaine atteint 3, 2.5 et 1.4 cm dans le milieu KNOP, MS et B5 respectivement. Après une deuxième semaine, la longueur atteint 3.5, 3.3 et 1.5 cm, respectivement, dans les trois milieux KNOP, MS et B5. En troisième semaine et après atteindre 4.5, 3.5 et 2.3 cm dans les trois milieux KNOP, MS et B5, l'augmentation de la longueur de la tige est arrêtée (Figures 5 et 6).

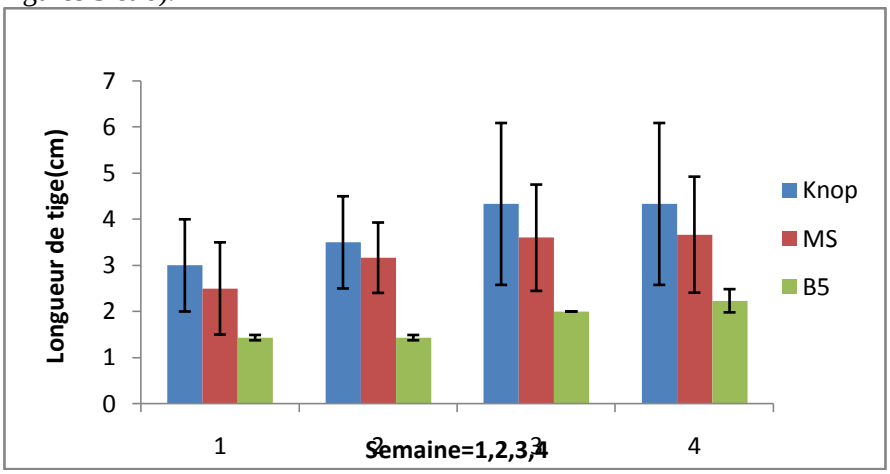


Figure 5. Effet des milieux de culture sur la longueur de la tige de *Retama sphaerocarpa*.



Figure 6 . La croissance *Rétama sphaerocarpa* dans different milieux (Cliché, L. BENDERRADJI, 2017)

L'analyse de la variance révèle un effet milieu de culture très hautement significatif, et un effet temps d'application et interaction (milieu x temps) non significatif (Tableau.6).

3.1.4.3. Effet sur la longueur des racines

La longueur des racines s'est bien développée pendant la deuxième semaine et que les meilleures valeurs moyennes sont obtenues dans le milieu KNOP (21 cm), comparativement aux milieux MS (10 cm) et B5 (2 cm). Après la troisième semaine, on a enregistré un arrêt de développement de la longueur des racines dans les milieux MS et B5, contrairement au milieu KNOP où la longueur a atteint 23 cm (Figure 7).

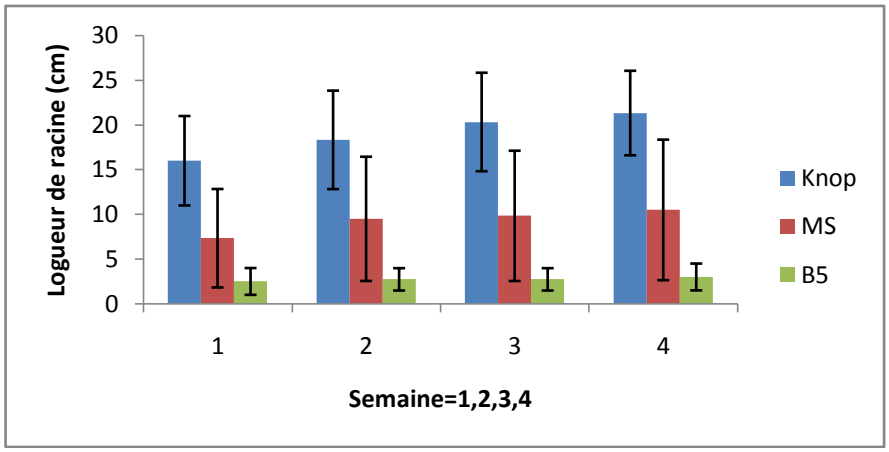


Figure 7 . Effet des milieux de culture sur la longueur de racines de *Retama sphaerocarpa*.

L'analyse de la variance révèle un effet milieu de culture très hautement significatif et un effet temps d'application et interaction (milieu de culture x temps) non significatif (Tableau 6).

3.1.4. 4. Effet sur le nombre de racines

Le nombre de racines augmente après 4 semaines et atteint 13 racines dans le milieu KNOP. En effet, dés la 1ère première semaine, les vitro plants produisent 11 racines comparativement au milieu MS et B5 où on a enregistré 7 racines. Après la quatrième semaine, le nombre de racines atteint 14 et 13 racines dans les milieux KNOP et MS, respectivement (Figure 8).

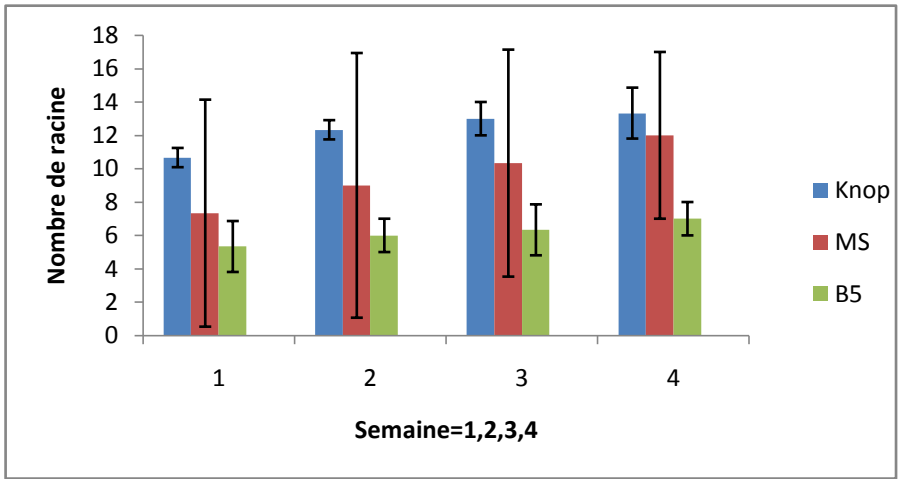


Figure 8 . Effet de milieux de culture (KNOP, MS, B5) sur la longueur des racines de *Retama sphaerocarpa.*

L'analyse de variance révèle un effet milieu de culture hautement significatif, et un effet temps et un effet interaction (milieu x temps) non significatif. (Tableau 6).

3.1.5. Effet de stress thermique sur la croissance de *Retama sphaerocarpa*

3.1.5.1. Effet sur le nombre de feuilles

Le nombre de feuilles développées en 25°C est très important dans les trois milieux (Figure 8). A 30°C et dans le milieu KNOP, une moyenne de 6.5 est enregistrée, alors que dans MS le nombre est de 7.4 et dans le milieu B5 le nombre atteint 7. A 35 et 40°C nous avons remarqué une décroissance dans le milieu KNOP et MS avec une moyenne de 5 et 3, respectivement. Le nombre est 7 dans le milieu B5 à 30°C (Figure 9).

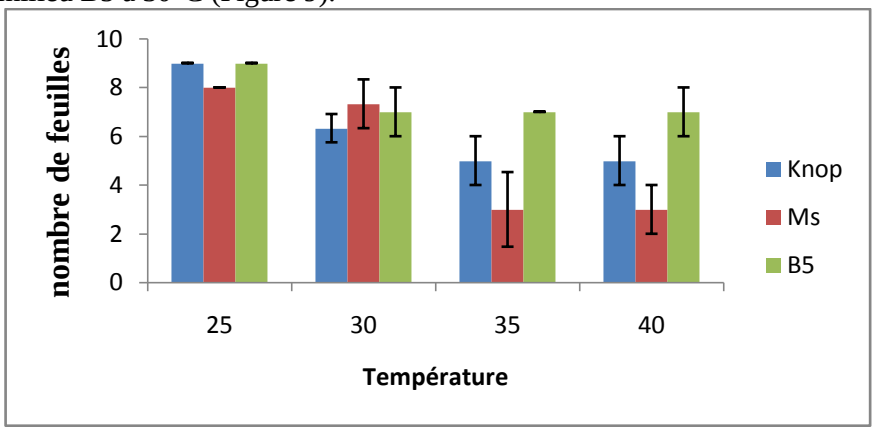


Figure 9. Effet de stress thermique sur le nombre de feuille de *Retama sphaerocarpa*.

L'analyse de variance révèle un effet milieu de culture et température hautement significatif sur le nombre de feuille et un effet interaction (milieu x température) significatif (Tableau 7).

Tableau 7 . Analyse de variance des paramètres de croissance par rapport au milieu de culture et température.

PC / FE	NF	LT	LR	NR
Milieu de culture	0.00411**	0,17363^{ns}	0.00001***	0,00113**
Température (°C)	0.00207**	0,00075***	0,01009*	0,23628^{ns}
Interaction Milieu x Température (°C)	0.04651*	0,0892^{ns}	0,84459^{ns}	0,87606^{ns}

PC : Paramètres de croissance, FE : Facteurs étudiés, NF : Nombre de feuilles, LT : longueur de tige, LR : Longueur de racine, NR : Nombre de racine, n. s : Non significatif,* : Significatif, ** : Hautement significatif, *** : Très hautement significatif.

3.1.5.2. Effet sur la longueur de la tige

La longueur de tige augmente dans 25 et 30°C. On remarque que la longueur de tige est plus petite, atteignant 2, 2.3 et 2.5 cm, respectivement dans les milieux KNOP, MS et B5 à 40°C (Figure 10).

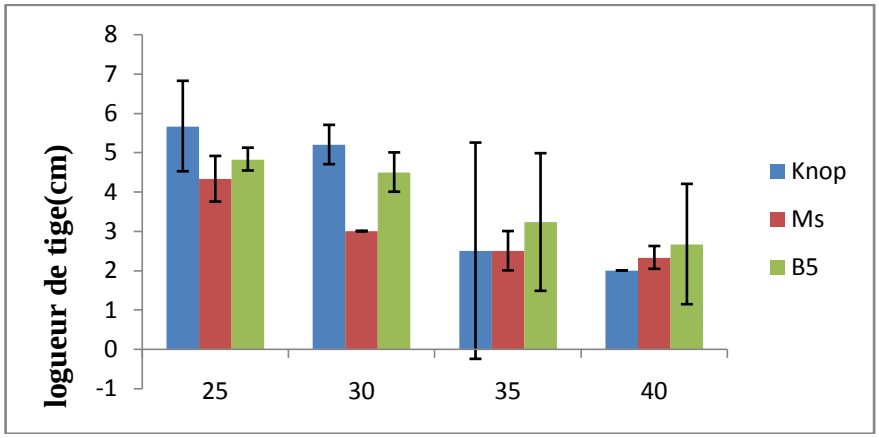


Figure 10: Effet de stress thermique sur la longueur de tige de *Retama sphaerocarpa*.

L'analyse de la variance indique un effet milieu de culture et interaction (milieu x température) non significatif et un effet température hautement significatif (Tableau 7).

3.1.5.3. Effet sur la longueur des racines

La longueur des racines atteint 17 cm dans le milieu KNOP et 7, 12 cm dans les milieux MS et B5 dans la température 25°C et atteint 12 et 6 cm dans le milieu KNOP et B5, et 3 cm dans le milieu MS à 30 et 35°C**.** A 40°C la longueur est légèrement influencé, dans le milieu KNOP par contre dan le milieu MS et B5, elle atteint 3 et 4 cm, respectivement (Figure 11).

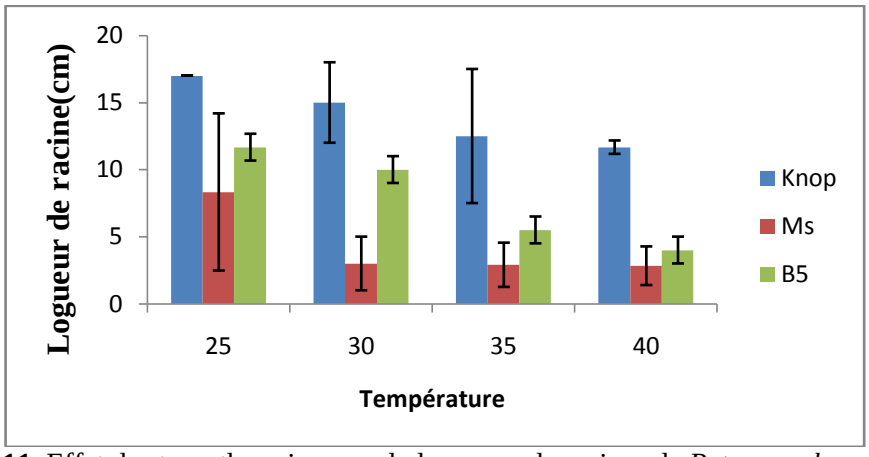


Figure 11. Effet de stress thermique sur la longueur de racines de *Retama sphaerocarpa.*

L'analyse de la variance nous montre effet milieu de culture très hautement significatif et un effet temps d'application de T° significatif et un effet interaction (milieu de culture x temps d'application de Température) non significatif. (Tableau 7).

3.1.6. Effet du stress salin sur la croissance de *Retama sphaerocarpa*

3.1.6.1. Effet sur le nombre de feuilles

Le nombre de feuille se développe normalement dans le témoin. Le sel influe à partir de la concentration de 5 g/l. La moyenne du nombre de feuilles est de 3.5, 3.9 et 4.1 dans le milieu KNOP, MS et B5, respectivement. Pour 10 g/l, la moyenne est de 5 dans le milieu KNOP, mais dans MS et B5, la moyenne est de 2. Avec la concentration 15g/l, la moyenne KNOP et MS est de (2) et dans le milieu B5 est 1.8 (Figure 12).

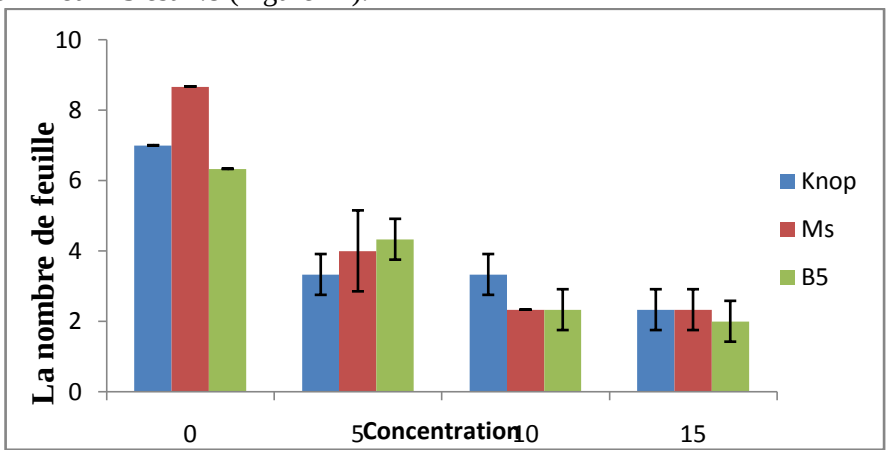


Figure 12. Effet du stress salin sur le nombre de feuille de *Retama sphaerocarpa*.

L'analyse de la variance indique un effet concentration NaCl très hautement significatif, et un effet milieu de culture et interaction (milieu de culture x concentration) non significatif (Tableau 8).

Tableau 8. Paramètres de croissance par rapport au milieu et concentration en NaCl.

PC / FE	NF	LT	LR	NR
Milieu de culture	0.037816^{ns}	$0{,}0299^{*}$	0.01246^{*}	$0{,}00335^{**}$
Concentration NaCl	0^{***}	$0{,}0001^{***}$	0^{***}	$0{,}45739^{ns}$
Interaction Milieu x [NaCl]	$0.\ 45224^{ns}$	$0{,}06879^{ns}$	$0{,}00135^{**}$	$0{,}98909^{ns}$

PC : Paramètres de croissance, FE : Facteurs étudiés, NF : Nombre de feuilles, LT : Longueur de la tige, LR : Longueur de racine, NR : Nombre de racine, n. s : Non significatif,* : Significatif, ** : Hautement significatif, *** : Très hautement significatif.

3.1.6.2. Effet sur la longueur de la tige

La longueur de la tige se développe normalement dans les trois milieux pour le témoin (0 g/l). Avec la concentration 5 g/l, elle est influencé surtout dan le milieu MS qui atteint 2 cm. Cependant, dans 10 g/l et 15g/l elle est influencé dans le milieu KNOP, MS et B5 (Figures 13 et 14).

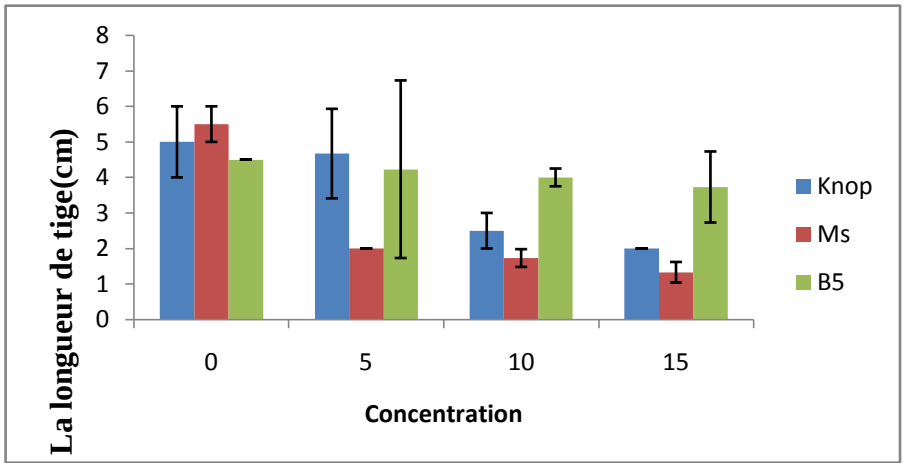
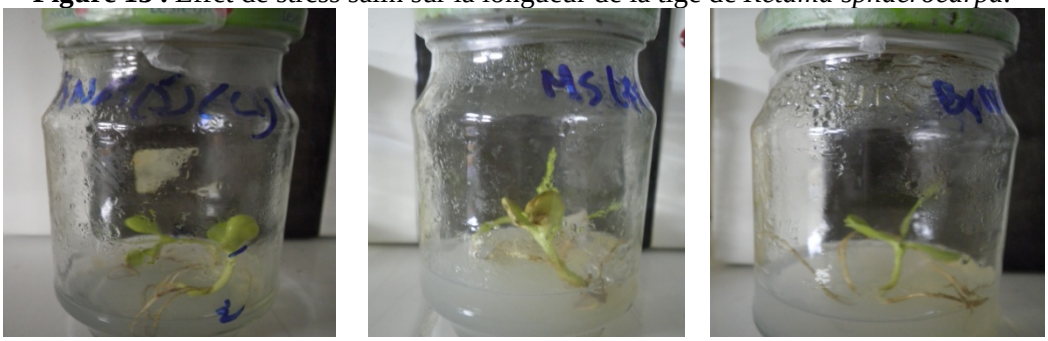


Figure 13 . Effet de stress salin sur la longueur de la tige de *Retama sphaerocarpa*.



KNOP **MS** **B5**

Figure 14. Effet du stress salin sur la croissance de *Rétama sphaerocarpa* (Cliché, L. BENDERRADJI, 2017**)**

L'analyse de la variance montre un effet milieu de cultures significatives et un effet concentration très hautement significatif et un effet interaction (milieu de culture x concentration) non significatif (Tableau 8).

3.1.6.3. Effet sur la longueur des racines

La longueur des racines est influencée par le stress salin surtout dans la MS à concentration de 5 g/l, elle atteint 3 cm et dans 10 g/l et 15 g/l, la longueur est influencée aussi dans les trois milieux de culture (Figure 15).

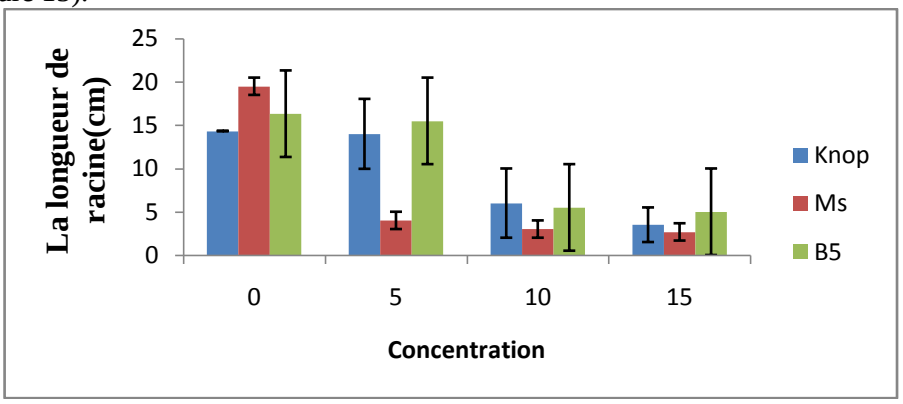


Figure 15. Effet du stress salin sur la longueur de racine de *Retama sphaerocarpa*.

L'analyse de la variance révèle un effet milieu de culture, significatif et un effet concentration très hautement significatif et un effet interaction (milieu de culture x concentration) hautement significatif (Tableau 8).

3.1.7. Indice de sensibilité (IS)

L'examen des valeurs de l'indice de sensibilité (IS) montre que la sensibilité au sel et à la température dépend étroitement de la concentration saline et le degré de température. On a remarqué que les plantules sont sensible quant le degré de température ou les concentrations salines augmentent dans les trois milieux. Nous avons constaté aussi que la longueur des racines dans le milieu MS est la plus sensible au stress salin. Dans le stress salin les plantules dans le milieu MS sont les plus sensibles par rapport aux autres plantules (Tableau 9).

Tableau 9. Variation de l'indice de sensibilité au sel et à la température estimé sur la base de nombre de feuille, longueur des tiges et longueur des racines.

	NaCl g/l				**Température °C**			
	0	5	10	15	25	30	35	40
G/S/P	Valeur d'indice de sensibilité							
***Rs* /SS_NF**	0	-57.13	-57.13	-71.43	0	-25.00	-37.50	-100.0
***Rs* /SS_LT**	0	-06.60	-50.00	-60.00	0	-55.90	-55.91	-64.37
***Rs* /SS_LR**	0	-02.30	-58.13	-75.58	0	-11.76	-26.47	-31.34
***Rs* /ST_NF**	0	-55.55	-77.78	-77.78	0	-12.50	-62.50	-62.50
***Rs* /ST_LT**	0	-63.64	-68.55	-75.82	0	-30.72	-42.26	-46.19
***Rs* /ST_LR**	0	-79.48	-84.62	-100.0	0	-63.99	-65.19	-66.00

G/S/P = Génotype/Stress/Paramètre, Rs = *Retama sphaerocarpa*, SS = Sress salin, ST = Stress thermique, NF = Nombre de feuilles, LT = Longueur de tiges, LR = Longueur de racines

3.2. Discussion

3.2.1. Effet de milieux de culture sur la croissance de *Retama sphaerocarpa*

Dans le milieu KNOP, la majorité des plantules ont marqué un important développement surtout entre 3ème et 4ème Semaine, les meilleures valeurs de la longueur des tiges sont obtenues après 3 semaines et elles sont de 4.5 cm. Pour le milieu MS, on a enregistré une croissance accrue pendant la 3ème et la 4ème Semaine, cela s'est matérialisé par des valeurs de 3.8 cm de longueur de la tige, Ces résultats rejoignent les résultats de Belguendouz (2012) qui montrent que le milieu MS présenté privilège pour la croissance des racines et des tiges.

3.2.2. Effet de stress salin et thermique sur la croissance de *Retama sphaerocarpa*

Les résultats montrent que la salinité affecte la croissance et le développement de *Retama sphaerocarpa in vitro*. Une variabilité de réponse a été mise en évidence selon les concentrations de NaCl appliquées. Ce résultat conforme ceux de de Hamrouni et *al.* (2008) qui montrent que la salinité affecte la croissance et le développement de la vigne *in vitro* et la variabilité de réponse a été mise en évidence selon le génotype testé et les concentrations appliquées en NaCl.

3.2.3. Indice de sensibilité (IS) au stress

Les résultats obtenus au cours de notre étude, mettent en évidence une similarité de réponse chez (*Retama sphaerocarpa*) pour l'ensemble des paramètres étudiés quand il s'agit d'un stress salin sévère (10 et 15g/l) ou thermique (35 et 40°C). Par contre une différence de la réponse au stress salin et thermique chez (*R. sphaerocarpa*). Les résultats indiquent que cette espèce est sensible aux stress salin et thermique au-delà de 5g/l NaCl et de 30°C (Tableau 9). L'apport de NaCl dans le milieu de culture réduit la longueur des racines des plantules quelque soit la concentration utilisée. A 5, 10 et 15g/l NaCl et dans les hautes températures, la croissance des plantules est inhibée. L'examen des valeurs de l'indice de sensibilité (IS) montre que la sensibilité au sel dépend étroitement de la concentration saline et du génotype (Tableau 9). Le paramètre IS discrimine mieux le génotype étudié dans les différents milieux de culture. L'IS n'est significative qu'au stress moyen et sévère et cela pour les deux types de stress appliqué.

4. CONCLUSION

La difficulté de germination des graines de *Retama sphaerocarpa* à cause de la sécheresse des régions arides et semi-arides et la dureté tégumentaire, nous a encouragé à utiliser de nouvelles techniques de biotechnologies végétales à travers l'utilisation des différents milieux de culture qui ont permis de réussir la régénération *in vitro* des espèces récalcitrantes afin de sauvegarder les espèces en voie de disparition. La détermination de milieux de culture les plus approprié, pour la germination *in vitro* des graines et la régénération des plantules est l'un des outils nécessaire pour la réussite des cultures. Les résultats obtenus dans notre étude suggèrent que le milieu KNOP composé de faible quantités et concentrations des sels minéraux a assuré les besoins nutritifs de *Retama sphaerocarpa* ce que suggère que cette espèce n'est exigeante et peut vivre dans des milieux pauvre en sels minéraux, et que ce milieu est le plus adéquat tant pour la germination que pour la régénération par rapport aux deux autres milieux étudiés. Le milieu B5 s'est avéré le moins favorable pour la régénération de cette espèce et ceci est jugé par les valeurs les plus faibles des moyennes des paramètres étudiés. L'application du stress salin et thermique engendre un effet dépressif sur la croissance des plantules, ce qui influe sur le devenir de la plante.

REMERCIEMENTS

Nous remercions la direction des forets, de l'environnement et les services agricoles de la wilaya de M'Sila, pour leurs aide et leurs soutien quand à la réalisation de ce travail.

REFERENCES

- Belguendouz A. (2012). Essai de substitution des milieux de culture en micro-propagation et la physiologie de la micro-tubérisation de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.). Mémoire de magister. Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, 124p.
- Debnath M. (2005). *In Vitro* Plantlet Production System for *Chlorophytum borivilianum*. A Rare Indian Medicinal Herb, 92nd Indian Science Congress Association, Ahmadabad, 106- 107.
- Gautheret R.J. (1957). Histogenesis in plant tissue cultures. J. Nat. Cancer Inst., 19, 555-573.
- Gamborg O.l., Miller R., Ojiama K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res, 50: 151-158.
- Hamrouni L., Ferjani A., Abdelly C., Ghorbel A. (2008). La culture *in vitro*: un moyen rapide et efficace pour sélectionner des génotypes de vigne tolérant à la salinité. Biologie et Pathologie Végétales, 331, 152-163.
- Murashigue T., Skoog F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissus Cultures. Physiologia Plantarum, 15, 473-497.
- Slama F. (1982). Effet du chlorure de sodium sur la croissance et la nutrition minérale : Étude comparative de six espèces cultivées. Thèse de doctorat, Faculté des sciences de Tunis, université Tunis 2, 214 p.
- Quezel et Santa (1962). Nouvelle flore de l'Algérie. Tome I. 1165 p.

2-Oxoglutarate alleviates growth inhibition and oxidative stress caused by zinc toxicity in *Lepidium sativum* plants

Chiraz Chaffei Haouari, Rihab Ben Fattoum, Ahlem Ben Khedher and Houda Gouia
Unité de Recherche ‘‘Nutrition et Métabolisme Azotés et Protéines de Stress’’ UR 99/09-20, Faculté des Sciences de Tunis, Université Tunis El Manar, 2092 Tunis, Tunisie

SUMMARY
The interaction between zinc and 2-oxoglutarate was investigated in *Lepidium sativum* plants. Seedlings were treated with 1 mM 2-Oxoglutarate associated to different concentrations of ZnSO4. The potential mechanism by which 2-oxoglutarate alleviates zinc toxicity was investigated, to understand the interaction between two elements, one a carbohydrate metabolite and another toxic metal. Zinc treatments caused a dramatic reduction in plant growth, such as dry weight and chlorophyll concentration. Evidence that Zn causes the overproduction of ROS in plants came from an increase in malondialdehyde (MDA) level parallel to Zn concentration in both roots and shoots. 2-oxoglutarate supplied clearly alleviated zinc toxicity, which was reflected in a significant increase in plant biomass and chlorophyll concentration and a marked decrease in MDA and proline levels. Zinc uptake was suppressed by 2-oxoglutarate. Furthermore compared with control, Zn-treated plants had significantly higher activities of superoxide dismutase (SOD), whereas, catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), and glutathione reductase (GR) activities were significantly increased by Zn addition. 2-Oxoglutarate supplementation restored and enhanced the functional activity of these enzymes as compared to Zn-alone-treated plants. These results suggest that 2-oxoglutarate supplementation in *Lepidium sativum* cultured proved to be inhibitory for Zn uptake and beneficial for the plant’s survival.
Key words: *Lepidium sativum*, zinc, 2-oxogularate, oxidative stress.

1. INTRODUCTION

Water pollution by heavy metals has become acute in recent years because metal ions from natural, domestic and industrial sources tend to concentrate in the organic residue at the sewage treatment works. The problem return to the non-degradability of inorganic pollutants like heavy metals which are hazardous when discharged into a water body (Dixit et al., 2015; Ojedokum and Bello, 2016; Ayangbenro and Babalola, 2017). However, water pollution constitutes a risk of agricultural soils contamination through irrigation. It is well suggested that excess concentrations of heavy metals in soils such as zinc have caused the disruption of natural aquatic and terrestrial ecosystems (Aydynalp and Marinova, 2009; Singh and Prasad, 2015). Several studies have interested to different plant species playing a major role in phytoremiodiation. However, those plant species has abnormally high capacities of trace element removal from water (Sardans et al., 2008; Barazesh et al., 2018). Each authors (Muzino et al., 2013; Naicker et al., 2016) have shown that there is a relation sheep between metal concentrations of hyperaccumulator plants and the water column. It has been previously documented that zinc stress resulted in more severe growth inhibition (Roohani et al., 2013; Feigl et al., 2015; Ong et al., 2015), yet abiotic stress of zinc on the ROS levels regenerated is known. Thus, it is imperative to elucidate whether the zinc leads to a further influence on antioxidant enzymes on plants growth and survivor.

In the present research, we focused principally on the zinc effect alone and the interaction of Zn and 2-oxoglutarate on growth, the level of lipid peroxidation of membranes and several antioxidant enzymes activities include superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPX) and glutathione reductase (GR). In our data, we demonstrated that the ability of *Lepidium sativum* plant to moderate Zn toxicity still important regardless 2-oxoglutarate addition of nutrient solution.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Plant material and growth conditions

Seeds of *L. sativum* were germinated in petri dishes in the dark. Seedlings were transferred and grown under continuous aeration in a nutrient solution containing KH_2PO_4, 0.5 mM; $Ca(NO_3)_2$, 1.25 mM; KNO_3, 2mM; $MgSO_4$, 0.5 mM; Fe-K-EDTA, 50 µM ; $MnSO_4 4H_2O$, 5 µM; $ZnSO_4 7H_2O$, 1 µM; $CuSO_4 5H_2O$, 1µM ; H_3BO_3, 30 µM ; $(NH_4)_6\ Mo_7O_{24} 4H_2O$, 1 µM. Plants were grown in a growth chamber under controlled conditions: a 16h-light (150 µmol m^{-2} s^{-1})/8h dark cycle, 23°C (light) /18°C (night) and 65% relatively humidity. After six weeks, part of seedlings was maintained grown in control condition. The other seedlings were transferred on nutrient solution containing $ZnSO_4$ (0, 200, 750µM) in absence or in presence of 1 mM 2-oxoglutarate. Treatment period was limited to only five days.

2.2. Determination of metal content

Cadmium contents was analyzed by digestion of dried samples with an acid mixture ($HNO_3/HClO_4$, 4/1 v/v). Metal concentrations were determined by atomic absorption spectrophotometry (Perkin-Elmer, AAnalyst 300).

2.3. Lipid peroxide determination (MDA)

Lipid peroxide was determined by measuring the concentration of thiobarbituric acid-reacting substances (TBARS), as described by Li et al (2013). The leaves were homogenized in 5 % (w/v) trichloroacetic acid (TCA). After centrifugation, a sample of the supernatant was added to 20 % TCA containing 0.5 % (w/v) thiobarbituric acid (TBA). The mixture was incubated at 95 °C for 30 min. The concentration of thiobarbituric acid reacting substances was calculated using an extinction coefficient of 155 $mM^{-1}cm^{-1}$.

2.4. Chlorophyll content

Chlorophyll content was determined by the method of Arnon (1949). The absorbance of a sample was read at 645 and 663nm.The pigment concentrations were calculated by equations allowing a simultaneous determination of Chlorophyll.

2.5. Enzyme essay

Total SOD (EC 1.15.1.1) activity was measured spectrophotometrically at 560 nm according to Beyer and Fridovich (1987), based on the inhibition of the photochemical reduction of nitro blue tetrazolium (NBT). One unit of enzyme activity was defined as the quantity of SOD required for 50 % inhibition of NBT reduction. Total CAT (EC 1.11.1.6) activity was assayed in presence of H_2O_2, according to Chaparro-Giraldo et al (2000), by monitoring the decline in absorbance at 240 nm, as H_2O_2 was consumed. Enzyme activity was calculated using the extinction coefficient of 40 mM^{-1} cm^{-1} for H_2O_2. Total APX (EC 1.11.1.11) activity was assayed in the presence of ascorbate by following the decline in absorbance of the oxidized ascorbate at 290 nm, according to Chen and Asada (1989). Enzyme activity was calculated using the extinction coefficient of 2.8 mM^{-1} cm^{-1} for ascorbate. Activity of GPX (EC 1.11.1.11) was measured by monitoring the $H_2O_2^-$ dependent oxidation of reduced guaiacol at 470 nm (Anderson and Davis, 2004). One unit was defined as the enzymatic amount which oxidizes 1 µM guaiacol min. Total GR (EC 1.6.4.2) activity was determined by following the rate of NADPH oxidation, as measured by the decrease in the absorbance at 340 nm (Cheng et al., 2015).

3. RESULT AND DISCUSSION

In this study, it was shown that uptake and bioaccumulation of zinc in leaves and roots of *Lepidium sativum* was often enhanced regardless presence of 2-oxoglutarate in nutrient solution (Fig. 1). Nevertheless presence of high dose of ZnSO4 (750µM) resulted significantly reduction of Zn^{2+} content in foliar tissues. Previous studies examined the bioaccumulation of Cu, Zn, Ni and found that high amount of those heavy metals could be accumulated by *L. Sativum* (Kara 2005; Kovaciket al., 2009; Balkhair and Ashraf, 2016).

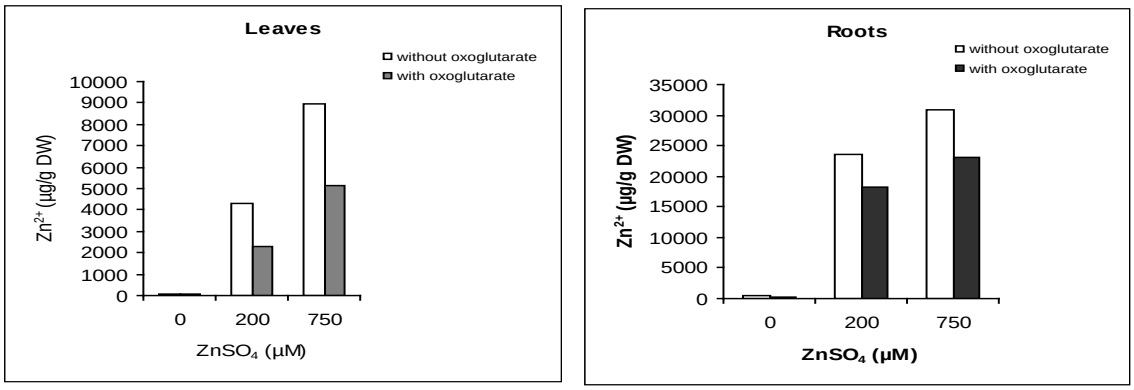


Figure 1. Variation of Zn^{2+} content in leaves and roots of *Lepidium sativum* in the presence or absence of 2-oxoglutarate in the medium culture.

In comparison with $ZnSO_4$ alone, the combination of 2-oxoglutarate and Zn treatments led to significant decline in metal accumulation in leaves and roots were as found between Zn treatments and control (Fig. 1). Growth inhibition caused by $ZnSO_4$ application affect negatively the dry weight production in leaves (Fig 2A) and roots (Fig. 2B) of *L. sativum* plant. This inhibition seemed to be the result of mineral nutrition perturbation. However, rate of uptake and distribution of Zn^{2+} in plants treated with both $ZnSO_4$ stress, may be responsible for mineral deficiencies/imbalance and depression of the plant growth (Hafeez et al., 2013; Weisany et al., 2014; Samreen et al., 2017). In other hand, presence of Zn alone significantly affects total chlorophyll content (Fig. 2C). However, the combined Zn + 2-oxoglutarate caused significant increase in this photosynthetic pigment with growth. It seems that, the nutritional disorders and the lost of nutrient availability caused by zinc stress (McCauley et al., 2011; Sharma et al., 2013; Noulas et al., 2018), resulted in reduction in biosynthesis of each photosynthetic pigments. On the whole, the inhibiting effect of $ZnSO_4$ on growth of treated plants decrease increased with rise of 2-oxoglutarate added in nutrient culture.

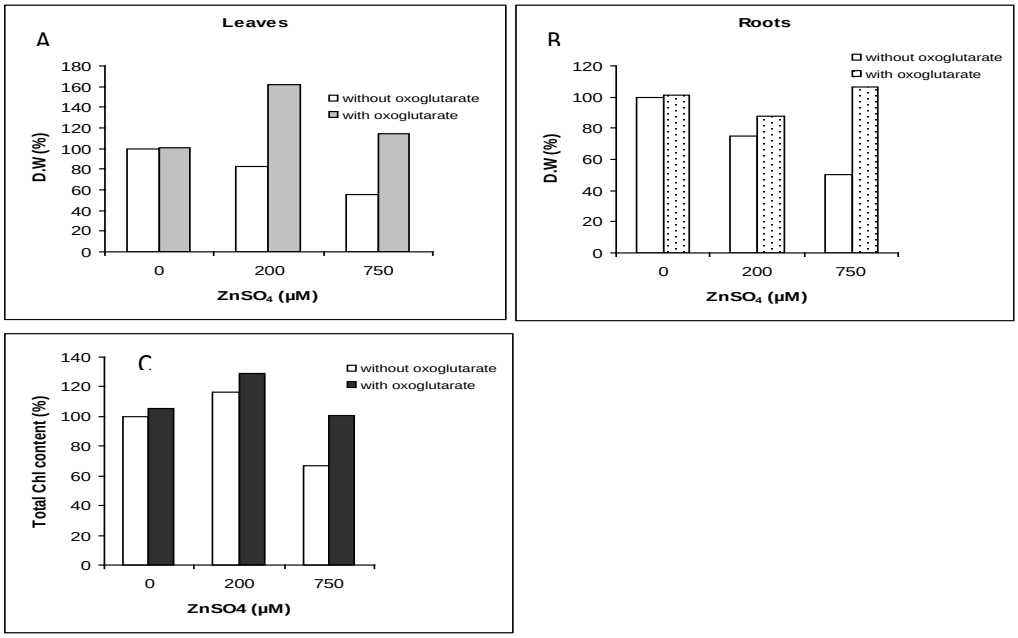


Figure 2. Variation of dry weight production in leaves (A) and roots (B) and total chlorophyll content (C) of *L. sativum* under $ZnSO_4$ stress condition in the presence or absence of 2-oxoglutarate in the medium culture.

It has been identified that 2-oxoglutarate was an important determinant of $ZnSO_4$ concentration in crops (Cakmak and Kutman, 2018). It was reported that Zn^{2+} uptake was limited when plants grew in soils with higher 2-oxoglutarate content (Xue et al., 2017).
Although these is an inconsistency between experiments using soil or hydroponic solution. In our work regardless that hydroponics cultures were conducted, we found that *L. sativum* typically accumulated relatively high heavy metal amounts independently of stress applied. However, this specie saved its ability to take up and accumulate Zn^{2+} in combined treatment conditions ($ZnSO_4$ + 2-oxoglutarate), but showed senescence symptoms earlier than in Zn-treated ones. In another hand, it is well demonstrated that increase in ROS engender mitochondrial membrane lipid peroxidation, which can cause damage to these organelles. Even so, in our data we showed that membrane lipid peroxydation was enhanced by presence of $ZnSO_4$ alone in leaves and roots (Fig. 3). But, when the combined $ZnSO_4$ + 2-oxoglutarate treatment was applied a moderation in lipid peroxidation level was detected and level of this parameter decreased with addition of 2-oxoglutarate.

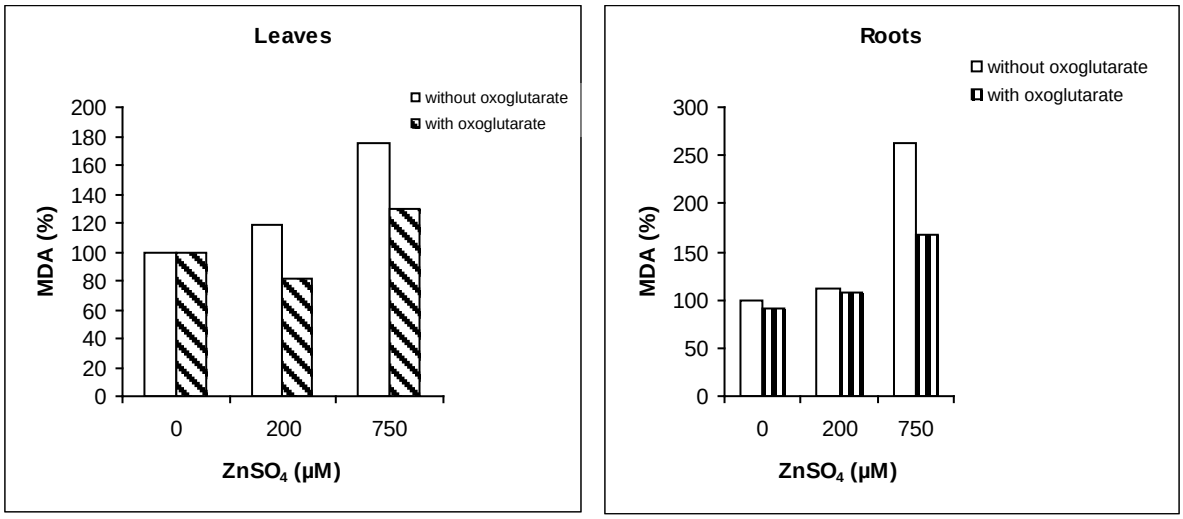


Figure. 3. Variation of MDA content in leaves and roots of *Lepidium sativum* in the presence or absence of 2-oxoglutarate in the medium culture under $ZnSO_4$ stress condition.

We can suggest that Zn^{2+} complexation or immobilization process were activated. Since mineral nutrient was unbalanced by presence of $ZnSO_4$ (Saleh and Maftoun, 2008; DalCorso et al., 2014; Preman et al., 2015). Synthesis of different constituent of defence system was blocked in plant under zinc stress conditions (Kant et al., 2015; Gonzalez-Bosh, 2018). Activation of antioxidative defense systems began by stimulation of superoxyde dismutase enzyme (SOD), both in leaves and roots under zinc stress, especially at 750µM of $ZnSO_4$ (Fig. 4A and 4B). But, this stimulation was significantly moderated in plants simultaneously treated by ZnSO4 and 2-oxoglutarate. Implication of SOD enzyme in plant tolerance was evident (Gaber, 2010; Ighodaro and Akinloye, 2017). Catalase activities (CAT) were not significantly changed at 200µM of $ZnSO_4$, while it were strongly inhibited at 750µM of heavy metal, both in leaves (Fig. 4C) and roots (Fig. 4D).
Concurrently to SOD after combined treatment (Zn + 2-oxoglutarate) exposure, a more increase in CAT activity and the start of visual toxicity symptoms, was more pronounced in those plants. This confirms SOD role played in alleviation of oxidative stress by scavenging ROS from cell compartment.

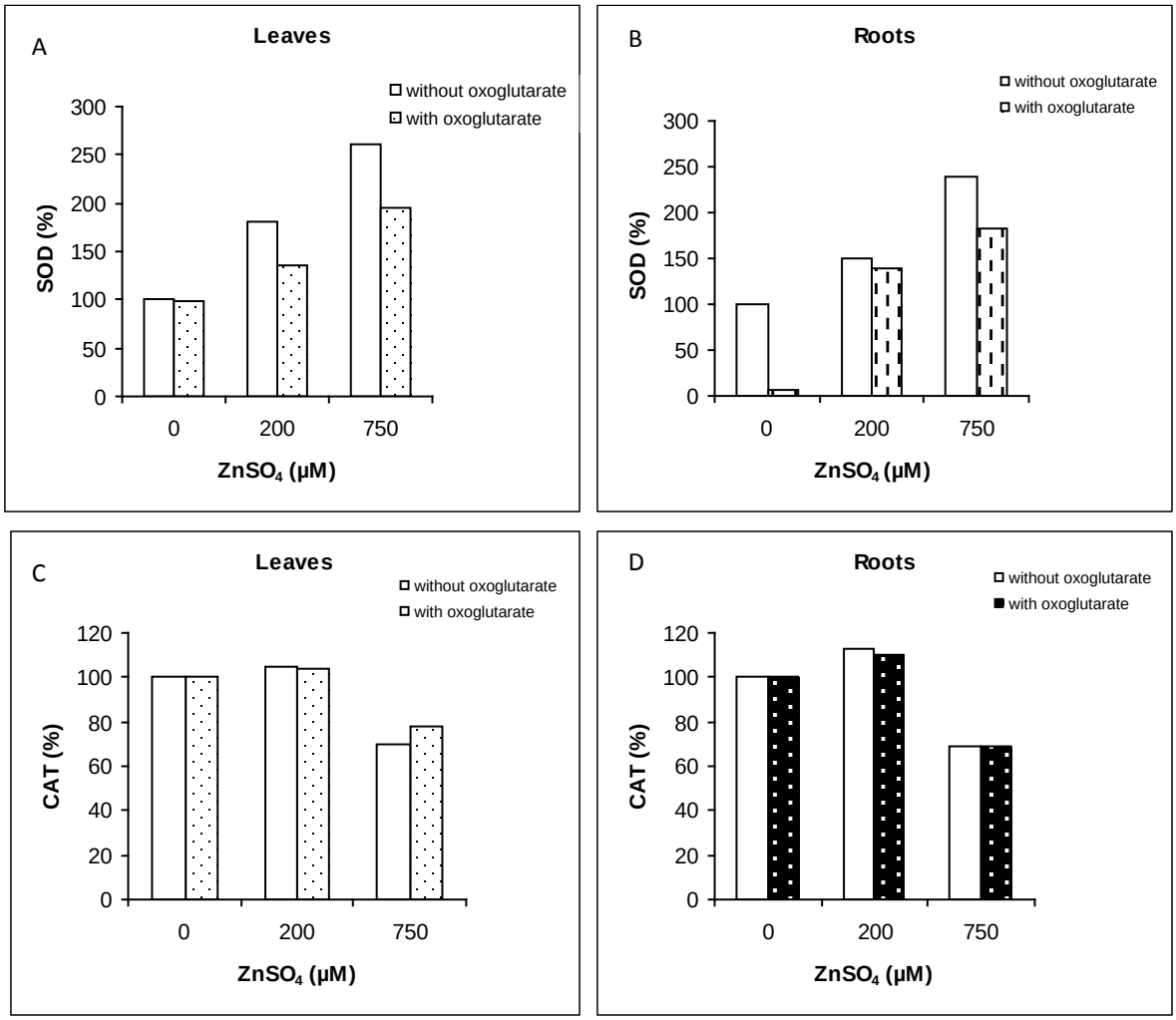
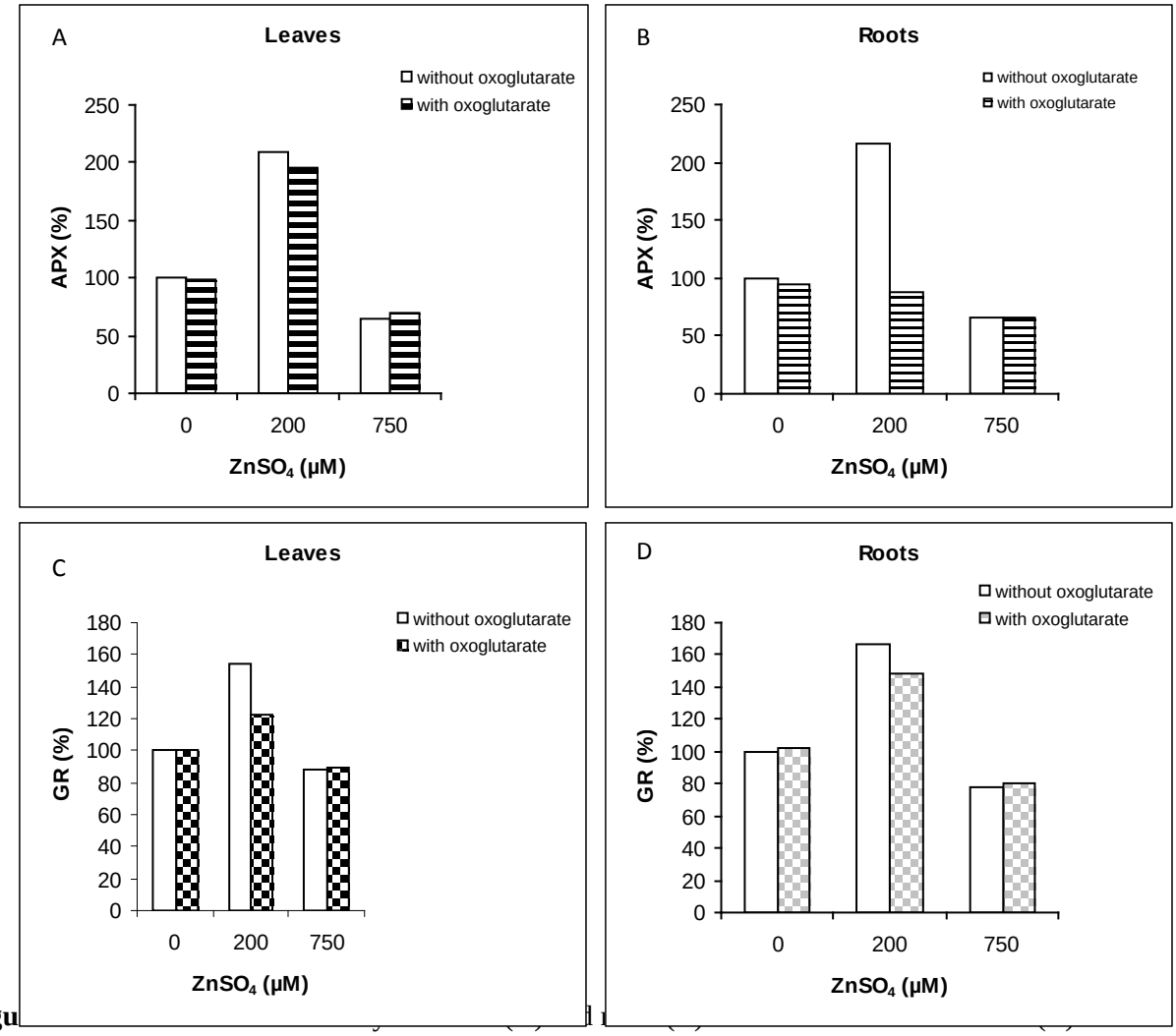


Figure. 4. Variation of SOD activity in leaves (A) and roots (B) and CAT activity in leaves (C) and roots (D) of *L. sativum* in the presence or absence of 2-oxoglutarate in the medium culture under $ZnSO_4$ stress condition.

In second stage, ascorbate-glutathione cycle intervened with the other enzymes such as ascorbate peroxydase (APX) and glutathione reductase (GR) to control and re-establish the homeostatic equilibrium of the redox status in cells (Das et al., 2015; Hernandez et al., 2015; Sofo et al., 2015). Since participation of those enzymes in ROS scavenging was suggested (Emamerdian et al., 2018), our data shown that changes of APX and GR activities (Fig. 5). In leaves and roots, where APX and GR were stimulated by $ZnSO_4$ with a lower dose such as 200µM. However, a significant decrease of APX (Fig. 5A and B) and GR (Fig. 5C and D) activities with a higher dose of Zn SO_4 (750µM). Application of both $ZnSO_4$ and 1 mM of 2-oxoglutarate moderated them. Since both treatment simultaneously applied, moderated a mineral nutrition perturbation, different important trace elements were not available (Sing et al., 2016). As consequence, deficiency of different prosthetic groups (Fe, Cu/Zn or Mn) essential for catalytic action of SOD (Hansch and Mendel, 2009; Fukai and Ushio-Fukai, 2011; Li et al., 2018). These results put out major key role of SOD affecting all the other different enzymes of defence system (Birben et al., 2012; Ighodaro and Akinloye, 2017; Wang et al., 2018).



Figu [illegible] roots (D) of *L. sativum* in the presence or absence of 2-oxoglutarate in the medium culture under $ZnSO_4$ stress condition.

5. CONCLUSION

According to our investigations, we can conclude that in *Lepidium sativum* seedlings, zinc toxicity causes oxidative damage, as indicated by the accumulation of lipid peroxidation products. Differential responses of antioxidant enzymes in plant organs to Zn treatment are seen. It seems that only leaves and roots SOD levels, but not CAT, APX and GR, increased in response to all doses of $ZnSO_4$. Growth moderation under combined treatment condition ($ZnSO_4$ + 2-oxoglutarate) reflected the amelioration of defence system. Infact, SOD and CAT activities were stimulated by $ZnSO_4$ and stimulation degree rise with 2-oxoglutarate addition. More that, enzymes APX and GR involved in ascorbate-gluthatione cycle, showed a diminution in dynamics in presence of a higher dose of $ZnSO_4$ and inhibition degree was highly moderated with 2-oxoglutarate.

REFERENCES

- Anderson JV, Davis DG. 2004. Abiotic stress transcript profiles and acticity of glutathione transferase, glutathione peroxidase and glutathione reduictase in Euphiria esula:. Physiol. Plant: **120**(3), 421-433.
- Arnon DI. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoxidase in *beta vulgaris*: Plant physiology:. **24**, 1-15.
- Ayangbenro AS, Babalola O. 2017. A new strategy for heavy metal polluted environments: a review of microbial biosorbents:. International J. Env. Resea: **14(**94), 1-16.
- Aydynalp C, Marinova S. 2009. The effects of heavy metals on seed germination and plant growth on alfafa plant (*Medicago sativa*):. Bulgarian J. Agr. Sci: **15**(4), 347-350.
- Barazesh JM, Prasse C, Wenk J, Berg S, Rumuca CK, Sedlak DL. 2018. Trace element removal in distributed drinking water treatment systems by cathodic H_2O_2 production and UV photolysis:. Envi. Sci. Technol : **52**, 195-204.
- Belkhair RS, Aschraf MA. 2016. Fiel accumulation of heavy metals in soil and vegetable crop irrigation with sewage water in western region of Saudi Arabia:. Saudi J. Biol. Sci: **23**, 32-44.
- Beyer WF, Frdovich JR. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions:. Annal. Bioch: **161**(2), 559-566.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Omer-Kalayci MD. 2012. Oxidative stress and antioxidant defence:. World Allergy Organization J.: **5**(1), 9-19.
- Cakmak I, Kutman UB. 2018. Agronomic biofortification of cereals with zinc, a review:. European J. Soil. Sci: 69, 172-180.
- Chaparro-Giraldo A, Barata RM, Chabregas SM, Azevedo RA, Silva-Filho MC. 2000. Soybean leghemoglobilin targeted to potato chloroplasts influences growth and development of transgenic plants:. Plant. Cell. Rep: **19**, 961-965.
- Chen GX, Asada K. 1989. Ascorbate peroxidase in pea leaves: occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties:. Plant Cell Physiol: **30**, 987-998.
- Cheng MC, Kol K, Chang LC, Kuol WC, Chen GH, Piao T. 2015. Increased glutathione contributes to stress tolerance and global translational changes in Arabidopsis:. The Plant. J.: **83**, 926-939.
- DalCorso G, Manara A, Piasentin S, Furini A. 2014. Nutrient metal elements in plants:. Metallomics: **6**(10), 1770-1780.

Das P, Nutan KK, Singla-Pareek SL, Pareek A. 2015. Oxidative environment and redox homeostasis in plants: dissecting out significant contribution of major cellular organelles:. Frot. Environ**: 2**(70), 1-11.

- Dixit R, Malaviya D, Pandiyan K, Singh UB, Sahu A, Shukla R, Singh BP, Rai JP, Sharma PK, Lade H, Paul D. 2015. Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: an overview of principles and criteria of fundamental processes: Sustainability:. **7(**2), 2189-2212.
- Emamverdian A, Ding Y, Xie Y, Sangari S. 2018. Silicon Mechanisms to Ameliorate Heavy Metal Stress in Plants:. Biomed. Res. Int: 1-10.
- Feigl G, Lehotai N, Molnar A, Ordog A, Rodriguez-Ruiz M, Palma JM, Corpas FJ, Erdei L, Kolbert Z. 2015. Annals Bot.: **116**, 613-625.
- Fukai T, Ushio-Fukai M. 2011. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases:. Antioxidant Redox Signal: **45**(6), 1583-1606.
- Gaber MA. 2010. Antioxidative defence under salt stress:. Plant Signal. Behav: 4, 369-374.
- Gonzalez-Bosh C. 2018. Priming plant resistance by activation of redox-sensitive genes:. Free Radical Biol. Med: **122**, 171-180.
- Hafeez B, Khanif YM, Saleem M. 2013. Role of Zinc in Plant Nutrition- A Review/. Amer. J. Exp. Agric.: **3**(2), 374-391.
- Hansch R, Mendel RR. 2009. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl):. Current Opinion in Plant Biology: **12**(3), 259-266.

- Hernandez LE, Sobrino-Plata J, Montero-Palmero BM, Carrasco-Gil S, Flores-Caceres ML, Ortega-Villasante CO, Escobar C. 2015. Contribution of glutathione to the control of cellular redox homeostasis under toxic metal and metalloid stress:. J. Exp. Bot: **66**(10), 2901-2911.
- Ighodaro OM, Akinloye OA. 2017. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX), their fundamental role in the entire antioxidant defence grid:. Alexandria J. Med: **586(**5), 585-595.
- Kant MR, Jonckheere W, Knegt B, Lemos F, Schimmel BC, Villarroel CA, Ataide LMS, Dermauw W, Glas JJ, Zgas M, Janssen A, Van Leeuwen T, Schuurink RC, Sabelis MW, Alba JM. 2015. Mechanisms and ecological consequences of plant defence induction and suppression in hervivore communities:. Annals of Bot: **115**, 1015-1051.
- Kovacik J, Klejdus B, Kadukov K, Ajbackor M. 2009. Physiology of *Matricaria chamomilla* exposed to nickel excess:. Ecotox. Env. Safety: **72**, 603-609.
- Li FT, Qi JM, Zhang GY, Lin LH, Fang PP, Tao AF, Xu JT. 2013. Effect of Cadmium Stress on the Growth, Antioxidative Enzymes and Lipid Peroxidation in Two Kenaf (**Hibiscus cannabinus** L.) Plant Seedlings:. J. Integra. Agricu.: **12**(4), 610-620.
- Li Y, Kong X, Chen J, Liu H, Zhang H. 2018. Characteristics of the Copper,Zinc Superoxide Dismutase of a Hadal Sea Cucumber (Paelopatides sp.) from the Mariana Trench:. Marine Drugs: **16**(169), 1-150.
- McCauley A, Jones C, Jacobsen J. 2011. Plant nutrient functions and deficiency and toxicity symptoms:. Nutrient Management: **9**, 1-16.
- Muzino T, Emori K, Ito SI. 2013. Manganese hyperaccumulation from non-contaminated soil in *Chengiopanax sciadophylloides* franch and its correlation with calcium accumulation:. Soil Sci. Plant. Nutri: **59**(4), 591-602.
- Naicker C, Kindness A, Pillay L. 2016. Identification of chelidonic acid as the predominant ligand involved in Ni aptake in the hyperaccumulator *Berkheya coddii*: J. Che: **69**, 201-207.
- Noulas C, Tziouvalekas M, Karyotis T. 2018. Zinc in soils, water and food crops:. J. Trace Elements in Med.: **49**, 252-260.
- Ojedokum AT, Bello OS. 2016. Sequestration heavy metals from waster using cow dung: Water Ressources and Industry:. **13**, 7-13.
- Ong CI, Walker MJ, McEwan AG. 2015. Zinc disrupts central carbon metabolism and capsule biosynthesis in Streptococcus pyogenes:. Scientific Reports: **5**, 1-10.
- Preman S, George M, Jhon PS. 2015. Effect of combined application of nutrients on growth and yield of irrigated rice:. J. Tropical Agricu: **53(**2), 217-221.
- Roohani N, Hurrell R, Kelishad R, Schulin R. 2013. Zinc and its importance for human health, an integrative review:. J. Res. Med. Sci: **18**(2), 144-157.
- Saleh J, Maftoun M. 2008. Interaction effects of NaCl levels and zinc sources and levels on the growth and mineral composition of rice :. J. Agri. Sci. Technol: **10**, 325-336.
- Samreen T, Shlah HU, Ullah S, Javid M. H. 2017. Zinc effect on growth rate, chlorophyll, protein and mineral contents of hydroponically grown mungbeans plant (**Vigna radiata**): Arabian J. Chem.: **10**(2), 1802-1807.
- Sardans J, Penuelas J, Estiarte M. 2008. Warming and drought change trace element bioaccumulation patterns in a Mediterranean shrubland:. Chemosphere : 70, 874-885.
- Sharma A, Patni B, Shankhdhar D, Shankhdhar SC. 2013. Zinc-an indispensable micronutrient:. Physiol. Mol. Biol. Plant: **19**(1), 11-20.
- Sing S, Parihar P, Singh R, Singh VP, Prasad SM. 2016. Heavy metal tolerance in plants, role of transcriptomics, proteomics, metabolomics and ionomics:. Font. Plant. Sci: **6**, 1-30.
- Singh A, Prasad SM. 2015. Remediation of heavy metal contaminated ecosystem: an overview on technology advancement:. Int. J. EnvironSci. Technol : **12**, 353-366.
- Sofo A, Scopa A, Nuzzaci M, Vitti A. 2015. Ascorbate Peroxidase and Catalase Activities and Their Genetic Regulation in Plants Subjected to Drought and Salinity Stresses:. Int. J. Mol. Sci: **16**, 13561-13578.
- Wang Y, Branicky R, Noê A, Hekimi S. 2018. Superoxide dismutase, dual role in controlling ROS damage and regulating ROS signalling:. J. Cell. Biol: **217**(6), 1-14.

- Weinsany W, Sohrabi Y, Heidari G, Siosemardeh A, Badakhan H. 2014. Effects of Zinc Application on Growth, Absorption and Distribution of Mineral Nutrients Under Salinity Stress in Soybean (*Glycine Max* L.):. J. Plant. Nutr.: **37**(14), 2255-2269.
- Xue R, Shen Y, Marschner P. 2017. Soil water content during and after plant growth influence nutrient availability and microbial biomass:. J. Soil. Sci: **17**(3), 702-715.

Rôle du monoxyde d'azote dans l'amélioration de la tolérance de *Lepidium sativum* cultivé en présence du $ZnSO_4$

Chiraz Chaffei Haouari, Ahlem Ben Kedher et Houda Gouia
Unité de recherche : nutrition et métabolisme azoté et protéines de stress om du laboratoire, Dép de Biologie, Faculté des Sciences de Tunis-Université Tunis El Manar.
Email: Chiraz_ch2001@yahoo.fr

RESUME
Ce travail visait à savoir l'effet du monoxyde d'azote (NO) chez des plantules de *Lepidium sativum* cultivées en présence de $ZnSO_4$. En raison de leurs propriétés anti-oxydantes, une attention particulière a été portée au NO dont l'application exogène permet d'envisager son utilisation pour améliorer la capacité de tolérance aux fortes doses de $ZnSO_4$ (300 et 750 µM) par les plantes. Des perturbations physiologiques et biochimiques sont observées chez *Lepidium* en présence du $ZnSO_4$ et indiquent que les plantes cultivées en présence de métal accumulent de fortes teneurs en sucres, protéines et proline parallèlement à une accumulation endogène des ions NH_4^+ et des ions Zn^{2+} au niveau des feuilles et au niveau des racines. Les résultats de l'activité protéolytique, montrent une forte stimulation sous contrainte métallique. En revanche l'application exogène de 300 mM de NO a modéré les effets toxiques du ZnSO4, par une amélioration remarquable des paramètres de croissance, en parallèle, une diminution des teneurs des ions Zn^{2+} accumulées, un abaissement des teneurs en ammonium, en sucres et en proline et de l'activité protéasique. En conclusion, le monoxyde d'azote pourrait être un élément contribuant fortement à la tolérance au zinc chez cette espèce.
Mots-clés: ZnSO4, NO, croissance, Sucres, Proline, protéase.

1. INTRODUCTION

Les métaux sont parmi les plus anciens toxiques connus, ceci est lié à leur usage ancien. Une caractéristique importante des métaux au plan toxicologique est qu'ils ont la capacité de réagir dans les processus biologiques après la perte d'électron(s). Ils présentent en outre la particularité d'être à faible dose pour nombre d'entre eux essentiels dans le métabolisme, mais ils peuvent devenir toxiques à dose plus élevée. Par exemple, le zinc (Zn), à la concentration du millimolaire, est un oligo-élément qui intervient dans de nombreuses réactions enzymatiques (déshydrogénases, protéinase, peptidase) et joue un rôle important dans le métabolisme des protéines, des glucides et des lipides (Kabata-Pendias, 2004). Les plantes sont, au cours de leur vie, en constante interaction avec leur environnement. Elles sont confrontées à différents types de stress influant sur leur physiologie (Potocka and Szymanowski, 2018). Au cours de l'évolution, l'ensemble de ces contraintes a conduit à la mise en place de réponses de défense efficaces permettant une meilleure adaptation des plantes à leur environnement (Pandey et al., 2017). En effet, les plantes disposent d'un éventail de défense, allant de barrières morphologiques constitutives à la mise en place de mécanismes cellulaires spécifiques.

L'exposition aux métaux lourds se traduit souvent par une synthèse de métabolites divers tels que la proline et les glucides (Ramakrishna and Gokare, 2011). De plus, la proline, outre son rôle reconnu d'osmoticum, ce métabolite permettrait d'éliminer ou de réduire la production d'espèces toxiques de l'oxygène. Ainsi que des plantes traitées avec le NO, accumulent plus de proline que chez les plantes traitées par le métal seulement, ce qui explique l'effet améliorateur de monoxyde d'azote. Des résultats similaires ont été observé chez *Triticum aestivum* traité par le l'aluminium (Zhang et al., 2008).

De nos jours, l'application de monoxyde d'azote (NO), constitue une approche biologique récente pour l'amélioration de la tolérance des plantes (Singh et al., 2013). C'est dans ce contexte que le présent travail est réalisé, il vise à l'étude du rôle cible de monoxyde d'azote (NO) dans la tolérance de *Lepidium sativum* en condition de stress métallique induit par le zinc.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Conduite des cultures

Le matériel végétal concerné par cette étude est *Lepidium Sativum L*. Les graines sont désinfectés, puis rincées abondamment à l'eau distillée et sont mises à germer à température ambiante et à l'obscurité. Cinq jours après la germination, les plantules sont repiquées et alimentées de solution nutritive. Après 20 jours de culture sur milieu nutritif de base, les plantules de cresson alénois sont placées dans des seaux contenant des solutions nutritives de composition différente selon les traitements. Les récoltes sont effectuées après 5 jours de traitement. Les échantillons sont ensuite pesés pour la détermination de leur matière fraîche (MF) puis placés dans l'étuve à 60°C pendant 3 jours et repesés pour déterminer la masse de matière sèche (MS). Une partie des échantillons est conservée à -80°C pour les expériences de dosage enzymatique ou de certains métabolites.

2.2. Dosage du zinc

A partir de la matière sèche préalablement broyée, 25 mg de matière sèche sont déposées dans des piluliers et soumis à une attaque à l'acide nitroperchlorique ($HNO_3/HClO_4$) à chaud. Après refroidissement, les résidus sont solubilisés par une solution d'acide nitrique (HNO_3) 7%. Le dosage est réalisé sur les minéralisas à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption atomique Perkin Elmer Analyst 300.

2.3. Dosage du sucre soluble

La méthode utilisée pour le dosage des sucres solubles est celle décrit par Rizhsky et al, 2004. Après extraction, les échantillons sont placés dans un bain-marie à 70°C pendant 30 minutes. Après refroidissement, les échantillons sont centrifugés, le surnageant est prélevé, et ajouté à une solution d'anthrone dans des tubes à essai, mis dans un bain marie à 100°C pendant 10 minutes, puis directement placés dans la glace. La lecture est faite à 640 nm.

2.4. Dosage de la proline

La matière sèche (25 mg) broyée à l'aide de 1 ml d'acide sulfosalicylique 3%, est ensuite centrifugée à 12000 g pendant 20 minutes à 4°C. Le dosage est réalisé en mélangeant 500 µl de l'extrait, 500 µl d'acide sulfosalicylique, 1 ml d'acide acétique concentré et 1 ml de ninhydrine. Le mélange est incubé au bain-marie à 100°C pendant 1 heure, refroidis à 4°C, puis le contenu est mélangé avec 2 ml de toluène. La lecture spectrophotométrique est effectuée à 520 nm sur la phase supérieur contenant la proline (Bates et al., 1973).

2.5. Dosage de l'ammonium

L'extraction est réalisée selon la méthode de Hortensteiner (2002), chaque échantillon de 200 mg de MF préalablement congelée dans l'azote liquide est broyée dans un mortier à 4°C en présence de H_2SO_4 (0,3 mM). Le broyat est centrifugé pendant 20 min à 3000 et à 4°C. Le surnagent obtenu est placé dans la glace. L'ammonium est quantifié selon la méthode de Berthelot modifiée par Weatherburn (1967). Les résultats sont exprimés en µmol $NH_4^+.g^{-1}$ MF.

2.6. Dosage de l'activité protéasique

La mesure de l'activité protéasique est réalisée selon la méthode de Brouquisse et al, 1998, en utilisant une solution d'azocaséine comme substrat. L'extraction est effectuée dans un tampon phosphate de potassium (100mM, pH: 7,4) contenant de l'EDTA (10mM) et de la cystéine (7,5mM). Après centrifugation à 12000g, le surnageant est utilisé dans le milieu d'incubation constitué de tampon phosphate de sodium (50mM Na-citrate/Na-phosphate, pH: 5,5), d'azocaséine (1% P/V). Après 2h d'incubation à 40°C, la réaction est interrompue par l'addition de 2ml d'acide perchlorique (12%) (V/V). Les tubes contenant les mélanges sont ensuite placés dans la glace pendant 10 min. Les mélanges sont centrifugés pendant 15 min à 10000g. L'absorbance des acides aminés diazotés de l'azocaséine libérés par protéolyse est lue à 340nm. Les résultats sont exprimés en unité/g MF.

3. RESULTATS

3.1. Effets du zinc sur la croissance

L'étude de l'effet de zinc sur la croissance des plantes de *Lepidium sativum*, montre que la production de la biomasse au niveau des feuilles et des racines est affectée par les différentes doses de zinc. A l'issue des 5 jours d'exposition au zinc, les plantes manifestent dans leur quasi-totalité une réduction de la biomasse sèche des parties aériennes et racinaires par comparaison aux plantes non traitées (Fig. 1).

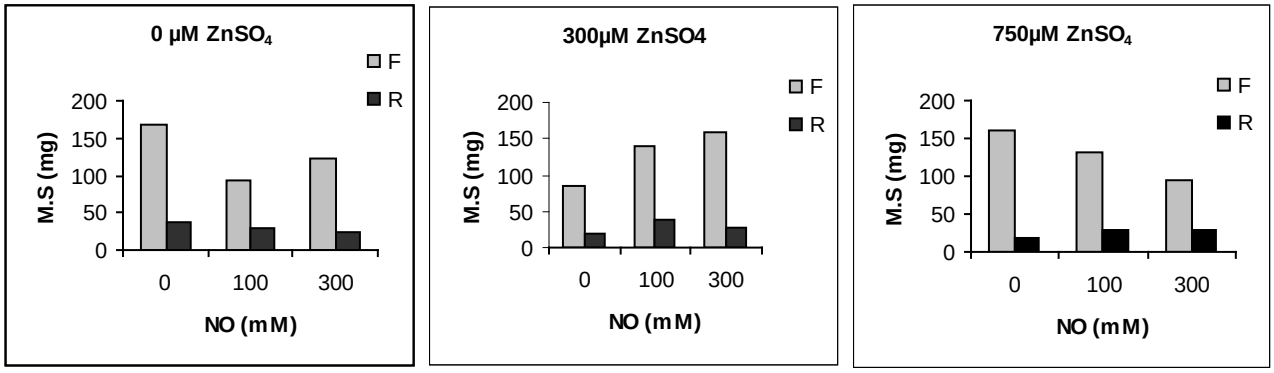


Figure 1. Variation de la production de la matière sèche au niveau des feuilles et des racines chez des plantes de *Lepidium sativum* traités avec 0, 300 et 750 µM de Zn^{2+} en présence du monoxyde d'azote (NO) (0, 100, 300 mM).

Cet effet dépressif du zinc est plus marqué au niveau des feuilles qu'au niveau des racines, respectivement pour les doses de 300 et 750 µM de $ZnSO_4$ par rapport au témoin (Fig. 1). L'application exogène de NO entraîne une augmentation significative de la matière sèche des feuilles et des racines comparativement aux plantes traitées seulement par le métal. Cette amélioration est plus importante avec 300 mM de NO (Fig. 1). On observe une augmentation régulière de l'accumulation de Zn^{2+} en fonction de l'augmentation de la concentration du métal dans le milieu de culture (Fig. 2). Les teneurs accumulées en Zn^{2+} sont plus importantes au niveau des racines qu'au niveau des feuilles. L'ajout de NO dans le milieu de culture, en présence de $ZnSO_4$, entraîne une diminution de la teneur en Zn^{2+}. Au niveau des racines, en présence de 300 mM NO. Cette diminution est de l'ordre de 17 et 40%, respectivement, par rapport à celles des plantes traitées uniquement avec 300 µM et 750 µM $ZnSO_4$.

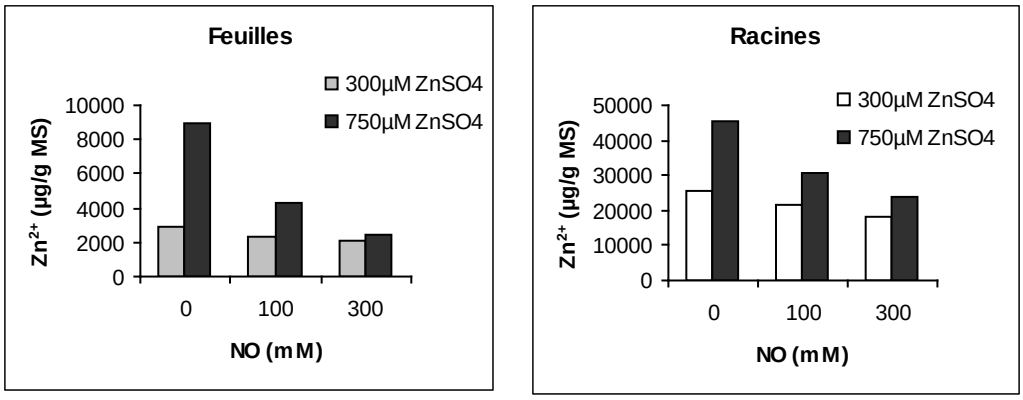


Figure 2. Variation de la teneur en zinc au niveau des feuilles et des racines chez des plantes de *Lepidium sativum* traitées avec de Zn^{2+} en présence du monoxyde d'azote (NO).

3.2. Effets du zinc sur les teneurs en certains métabolites

3.2.1. Les teneurs en sucres solubles

D'après la figure 3, le traitement métallique avec le zinc pendant 5 jours induit une importante accumulation des sucres chez les plantes de *Lepidium sativum*.

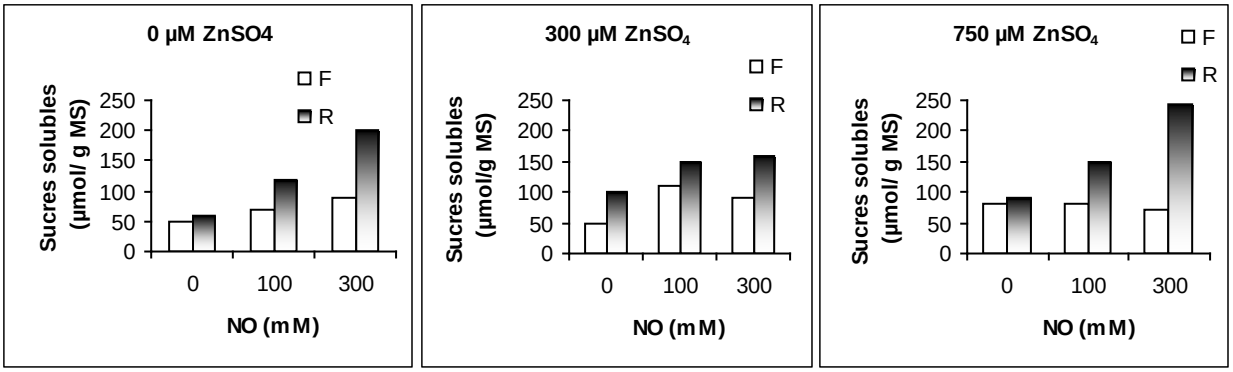


Figure 3. Variation de la teneur en sucres solubles totaux au niveau des feuilles et des racines chez des plantes de *Lepidium sativum* traitées avec de $ZnSO_4$ en présence du monoxyde d'azote.

Ainsi, chez des plantes traitées par 300 µM $ZnSO_4$, on note une augmentation de la teneur en sucres au niveau des racines, alors que sa variation au niveau des feuilles est non significative en comparaison avec le témoin. Chez les plantes traitées par 750 µM $ZnSO_4$, la teneur en sucres solubles totaux a augmenté significativement au niveau des feuilles et des racines par rapport au témoin.

Après l'application de 300 mM NO aux plantes traitées avec $ZnSO_4$, la teneur en sucres solubles a augmenté de 120% et 60% au niveau des feuilles et des racines respectivement par rapport aux plantes traitées uniquement par 300 µM de zinc et de 30% et 154% respectivement pour les feuilles et les racines par rapport aux plantes traitées seulement avec 750 µM de zinc.

3.2.2. Les teneurs en protéines totales solubles

La variation de la teneur en protéines solubles au niveau des feuilles et des racines chez *Lepidium sativum* traités par des doses croissantes de $ZnSO_4$ et/ou NO pendant 5 jours sont représentées dans la figure 4.

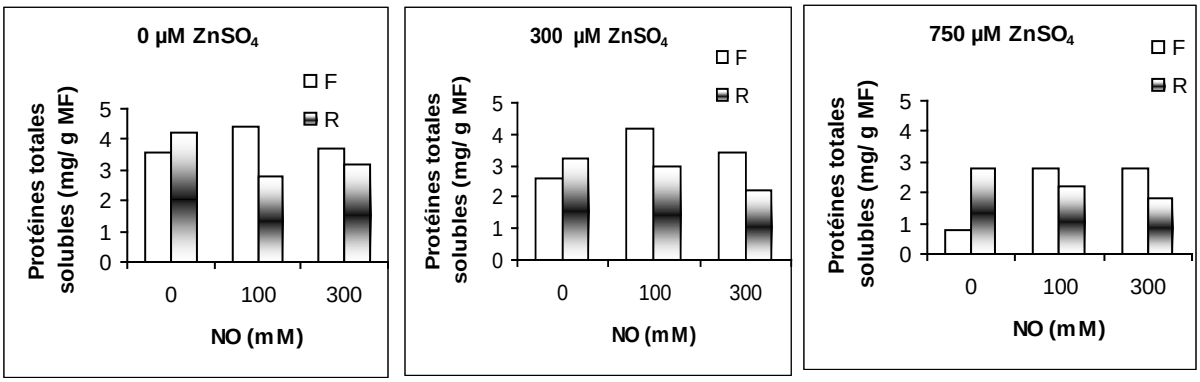


Figure 4. Variation de la teneur en protéines totales solubles totaux au niveau des feuilles et des racines chez des plantes de *Lepidium sativum* traitées avec 0, 300 et 750 µM de Zn^{2+} en présence du monoxyde d'azote.

Ainsi, on note une augmentation réduction de la teneur en protéines solubles en fonction de l'augmentation de la dose de $ZnSO_4$ dans le milieu de culture. Cette réduction est de l'ordre de 44% et 24% par rapport au témoin respectivement au niveau des feuilles et des racines chez les plantes traitées par 300 µM de $ZnSO_4$. En revanche, en présence de 750 µM ZnSO4, la réduction de l'ordre de 81 et 56%, respectivement, au niveau des feuilles et des racines (Fig. 4). L'addition de 300µM de NO, induit une augmentation de la teneur en protéines solubles par rapport aux plantes traitées seulement par le zinc au niveau des deux organes.

3.2.3. Les teneurs en proline

Chez les plantes de *Lepidium sativum*, l'examen de la figure 5 montre qu'il y a une accumulation importante de la proline aussi bien au niveau des feuilles qu'au niveau des racines des plantes traitées par le $ZnSO_4$. Ainsi, on note une augmentation graduelle en fonction de l'augmentation de la dose du métal dans le milieu de culture. Les plantes traitées par 750 µM $ZnSO_4$, montrent une augmentation de l'ordre de 63 et 51%, respectivement, au niveau des feuilles et des racines par rapport au témoin. La combinaison de traitement métallique avec le monoxyde d'azote (NO) essentiellement avec la dose 300 mM, permet d'augmenter la teneur en proline aussi bien au niveau foliaire qu'au racinaire (Fig. 5).

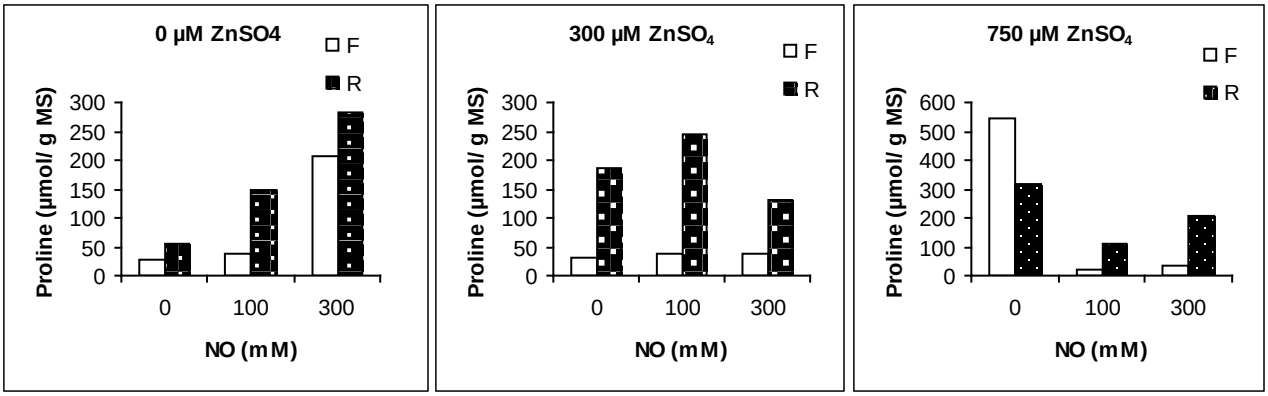


Figure 5. Variation de la teneur en proline au niveau des feuilles et des racines chez des plantes de *Lepidium sativum* traitées avec 0, 300 et 750 µM de Zn^{2+} en présence du monoxyde d'azote (NO) (0, 100, 300 mM).

3.2.4. Les teneurs en ammonium

Les variations de la teneur en ammonium (NH_4^+) au niveau des feuilles et des racines de *Lepidium sativum* suite aux différents traitements sont représentées par la figure 6.

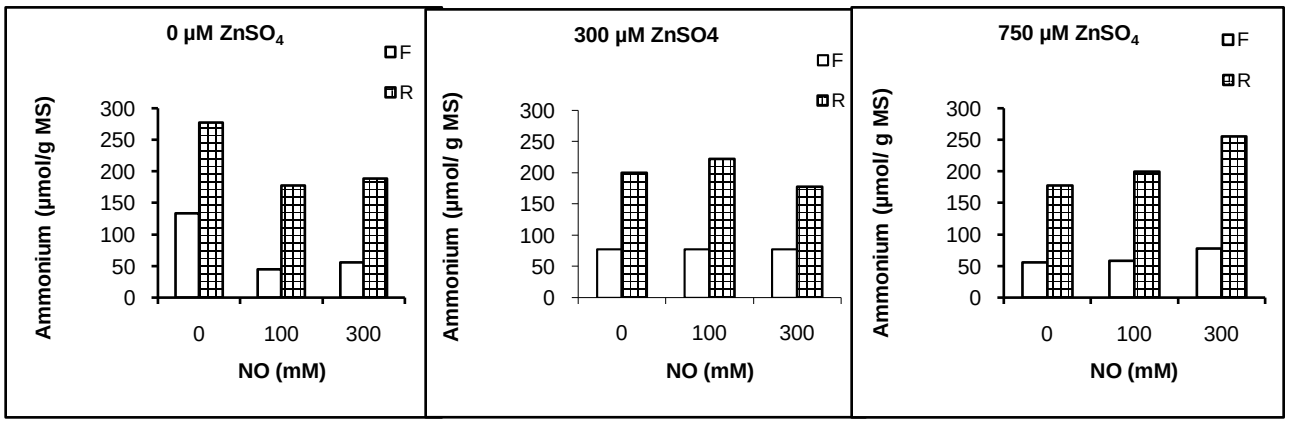


Figure 6. Variation de la teneur en ammonium au niveau des feuilles et des racines chez des plantes de *Lepidium sativum* traitées avec 0, 300 et 750 µM de Zn^{2+} en présence du monoxyde d'azote (NO) (0, 100, 300 mM).

Chez les plantes traitées par le zinc seulement, on note une augmentation de la quantité d'ammonium. L'addition de 300µM $ZnSO_4$ au milieu nutritif produit une élévation en ions NH_4^+ de 105% et 25% respectivement au niveau des feuilles et des racines par rapport au témoin. De même pour la concentration 750 µM $ZnSO_4$, cette augmentation est d'ordre de 169% et 59% respectivement au niveau des feuilles et des racines. La combinaison des traitements avec le monoxyde d'azote (NO), réduit significativement l'effet stimulateur engendré par le zinc sur la teneur en ammonium (Fig. 6).

3.2.5. Réponse de l'activité protéasique

Les variations de l'activité spécifiques des protéases au niveau des feuilles et des racines au cours de stade végétatif des plantes de cresson alénois sont représentées dans la figure 7. Chez les plantes de *lepidium sativum*, le traitement métallique induit une stimulation de l'activité protéasique. Cette induction s'accentue avec l'augmentation de la dose du métal dans le milieu de culture. Ainsi, le traitement avec 300µM $ZnSO_4$, induit une augmentation de l'activité de l'enzyme de l'ordre de 33% et 27% par rapport à celle du témoin, respectivement, au niveau des feuilles et des racines.

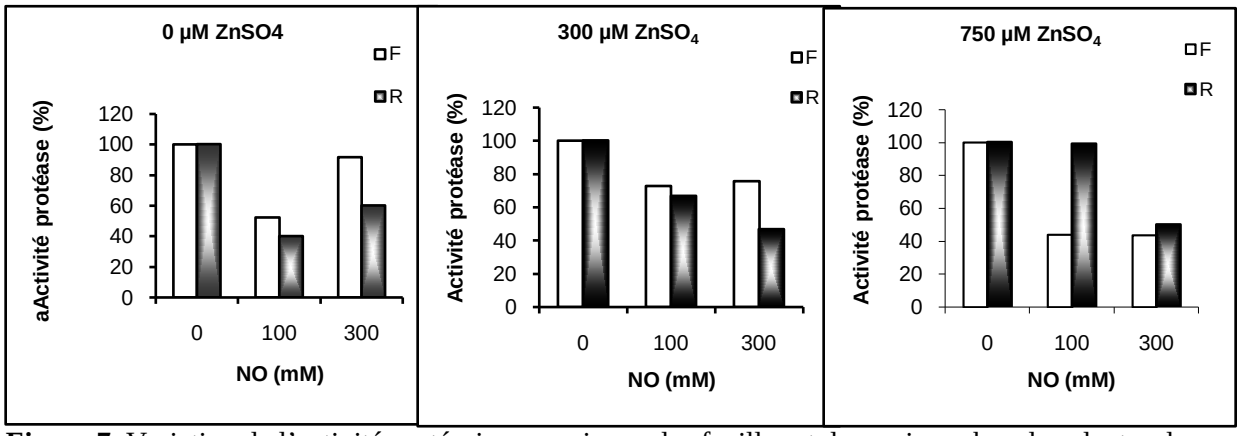


Figure 7. Variation de l'activité protéasique au niveau des feuilles et des racines chez des plantes de *Lepidium sativum* traitées avec 0, 300 et 750 µM de Zn^{2+} en présence du monoxyde d'azote (NO) (0, 100, 300 mM). Les résultats sont exprimés en % des témoins (F : 600.1 Unité/ mg Protéine ; R : 83.33 Unité/ mg protéine).

Chez les plantes traitées par 750 µM $ZnSO_4$, on note une stimulation de l'activité de la protéase de l'ordre de 42% et 47% respectivement au niveau des feuilles et des racines par rapport au témoin. En revanche, l'application de monoxyde d'azote (NO), essentiellement avec la dose 300 mM, en combinaison avec le zinc réduit l'activité de la protéase et donc minimise la dégradation des protéines et la libération de l'ion ammonium. Cette modération est plus importante avec la dose 300 µM de $ZnSO_4$.

4. DISCUSSION ET CONCLUSION

Les résultats ont montré que l'application de $ZnSO_4$ provoque l'apparition de symptômes visuels de toxicité (une chlorose au niveau des feuilles et par une réduction de la taille de la plante. Ces effets sont plus marqués avec la concentration 750µM. Parallèlement aux symptômes visuels observés, les résultats, concernant la variation de la production de la biomasse sèche, ont montré une inhibition de la croissance. Ces résultats s'accordent avec ceux trouvés chez *Lablab purpureus* (Myrene et al., 2012) et *Brassica juncea* (Prasad et al., 1999). En revanche, les résultats montrent que l'ajout des concentrations croissantes de monoxyde d'azote (NO) induit, une amélioration de la croissance des plantes de *Lepidium sativum*. Ces résultats sont en accord avec d'autres études

rapportés chez d'autres espèces (Beligni et Lamattina., 2000; Welhua and Liu, 2008). L'accumulation de zinc est principalement racinaire ce qui explique la réduction enregistrée au niveau des racines qui est plus prononcée qu'au niveau des feuilles. Le système racinaire constituerait donc un organe de stockage du métal. Mais on assiste aussi à une translocation dans les parties aériennes, on peut dire donc que *lepidium sativum* serait intéressante pour la phytoextraction des sols contaminés par le zinc. L'application de NO, modifie le profil de distribution de Zn et induit une diminution des ions Zn^{2+} dans les différents organes de la plante.

L'exposition aux métaux lourds se traduit souvent par une synthèse de métabolites divers tels que la proline et les glucides. Nos résultats montrent une augmentation significative de la teneur en sucres solubles au niveau des feuilles et des racines de *Lepidium sativum* en fonction de l'augmentation de la dose du métal dans le milieu de culture. De plus, les résultats montrent aussi une accumulation importante de la proline. Outre son rôle reconnu d'osmoticum, la proline permettrait d'éliminer ou de réduire la production d'espèces toxiques de l'oxygène. En outre, les plantes traitées avec NO, accumulent plus de proline, ce qui explique l'effet améliorateur de monoxyde d'azote. Des résultats similaires ont été observé chez *Triticum aestivum* traité par le l'aluminium (Zhang et al., 2008).

D'autre part, le traitement par Zn induit aussi une accumulation de l'ammonium au niveau des différents organes de la plante. Cette accumulation est plus marquée dans les racines que dans les feuilles. Cette augmentation endogène en NH_4^+ peut être due à une accélération des processus de dégradation et de remobilisation des protéines à la suite de l'induction des activités protéasiques. Ces résultats sont confirmés avec les travaux de Chaffei et al., 2006 chez la tomate.

Lorsque le NO est additionné dans le milieu de culture, la teneur en NH_4^+ est plus faible que celle induite par le métal tout seul. Ce comportement est expliqué par la diminution de l'activité protéasique chez les plantes qui ont subi un traitement combiné. Ces résultats sont prouvés chez *Oriza sativa* traités par le cadmium (Yi Ting et al., 2004).

En conclusion, ces données montrent que l'application exogène de monoxyde d'azote peut atténuer les perturbations induites par le stress métallique et trouver une utilisation pratique en protégeant les plantes contre les dommages oxydatifs, conduisant à une meilleure tolérance au métal.

REFERENCES

- Bates LS, Waldren RP, Teare ID. 1973. Rapid determination of free praline for water-stress studies:. Plant and Soil, **39**(1), 205-207.
- Beligini MV, Lamattina L. 2000. Nitric oxide stimulates seed germination and et etiolation inhibits hypocotyls elongation, three light-inductible responses in plants: Planta:. **210**, 215-221.
- Brouquisse R, Gaudilière JP, Raymond P. 1998. Induction of a carbon starvation related proteolysis in whole maize plants submitted to light/dark cycles and to extended darkness: Olant Physiology :. **117**(4), 1281-1291.
- Chaffei C, Akira S, Masclaux-Daubresse C, Ghorbel MH, Gouia H. 2006. Implication du glutamate, de l'isocitrate et de la malate déshydrogénases dans l'assimilation de l'azote chez la tomate stressée par le cadmium:. Comptes Rendus de Biologie: **329**, 790-803.
- Hortensteiner S. 2002. Nitrogen metabolism and remobilization during senescence : Journal of Experimental Botany :. **53**(370), 927-937.
- Kabata-Pendias A. 2004. Soil plant transfer of trace elements an environmental issue: Geoderma:. **122**(2-4), 143-149.
- Myrene DR, Devaraj VR. 2012. Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in bean under zinc stress: African Crop Science Journal:. **20**(1), 17-29.
- Potocka I, Szymanowski-Pulka J. 2018. Morphological responses of plant to mechanical stress:. Annals of Botany: 1-13.
- Prasad KVSK, Paradha P, Sharmila P. 1999. Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxiciry in *Brassica juncea*: Environmental and Expermental Botany:. **42**, 1-10.
- Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V, Davletova S. 2004. When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress:. Plant physiology, **134**, 1683–1696.

- Saurabh P, Dhrendra F, Aakrati A, Tushita S, Donald J, Tanushri K, Yogesh KN, Sandeep A, Malireddy KR. 2017. Abiotic stress tolerance in plants, myriad roles of ascorbate peroxidase:. Front Plant Science: 8, 1-13.
- Singh Gill S, Hasanuzzaman M, Nahar K, Macovei A, Tuteja N. 2013. Importance of nitric oxide in cadmium stress tolerance inn crop plants:. Plant Physiol and Biochemistry: **63**, 254-261.
- Weatherburn MW. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia: Anal of Chemistry:. **39**(8), 971-974.
- Welhua Q, Liu-Min F. 2008. Nitric oxide signaling in plant responses to abiotic stresses: Journal of Integrative Plant Biology:. **50**(10), 1238-1246.
- Yi Tang H, Ching Huei K. 2004. Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves:. Plant Growth Regulation: **42**, 227-238.
- Zhang H, Li YH, Wang SH, Zhang FQ, Hu KD. 2008. Effects of exogenous nitric oxide donor on antioxidant metabolism in wheat leaves under aluminium stress:. Russian Plant Physiology:. **55**, 469-474.
- Ramakrishna A, Gokare AR. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants:. Plant Signaling and Behaviour: **6**(11), 1720-1731.

Contribution à l'amélioration des paramètres morphométriques du développement chez les vitroplants de *Stevia rebaudiana* Bert. au cours de la micropropagation

Emna Jedidi[1*], Kaouther Ben Mahmoud[2], Noura Jemai[2], Olfa Ayari[1], Ahmed Jemmali[2]
[1]Laboratoire d'horticulture, Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie, Tunis, Tunisie
[2]Laboratoire de protection des végétaux, INRAT, Tunis, Tunisie
*Email: jedidi.emy@gmail.com

RESUME
Stevia rebaudiana fait partie de la famille des astéracées. Elle est caractérisée par la présence du stéviol, riboside qui est un édulcorant à pouvoir acalorifique qui peut constituer un sucre alternatif notamment pour les diabétiques. Cependant, sa multiplication difficile limite l''extension de sa culture, puisque ses graines ont un faible pouvoir germinatif. Afin de permettre une plus large diffusion de cette espèce très convoitée, il va falloir penser à une méthode de multiplication plus performante comme la micropropagation qui a déjà été tentée avec des résultats plus ou moins satisfaisants.Ce travail décrit un protocole élaboré dans notre labo en vue d'améliorer le potentiel de propagation in vitro de cette plante par l'utilisation de deux milieux de culture de base MS et DKW qui ont été modifiés selon les phases de culture.
L'amélioration de la phase de prolifération est obtenue par la mise en culture de segments nodaux à partir de la partie médiane de la tige dans le milieu de base MS additionné de 1mg/l de BAP avec un nombre moyen de 4 nœuds par pousse axillaire. Pour la phase d'enracinement, il est préférable qu'elle soit réalisée sur le milieu DKW additionné de 0.5mg/l d'AIB où on a obtenu un taux de rhizogenèse de 100% avec un développement racinaire plus important par rapport au milieu MS.
Mots-clefs: Enracinement, milieu de culture, prolifération, *Stevia rebaudiana* Bert.

SAMMARY
Stevia rebaudiana Bertoni (*Asteraceae*). contains in its leaves sweeteners such as stevioside and rebaudioside, which it is commercially valuable. The natural stevioside can be an alternative sugar especially for diabetics. Conventional propagation of stevia is restricted by the low viability of its seeds due to self incompatibilty, which causes the production of sterile seeds. In order to allow a wider dissemination of this highly coveted species, it will be necessary to think of a more efficient multiplication method such as micropropagation which has already been tried with more or less satisfactory results. This work describes a protocol developed in our lab to improve the *in vitro* propagation potential of this plant through the use of two basic culture media MS and DKW that have been modified according to the culture phase.
The improvement of the proliferation phase is obtained by culturing nodal segments from the middle part of the stem in the MS base medium supplemented with 1 mg / l of BAP with an average number of 4 nodes per axillary shoot. For the rooting phase, it is preferable that it be carried out on DKW medium supplemented with 0.5 mg / l of AIB, where a rate of rhizogenesis of 100% has been obtained with a greater root development relative to the MS medium. .
key words: *Stevia rebaudiana* Bert., micropropagation, rhizogenesis, culture media.

1. INTRODUCTION

Stevia rebaudiana (*Stevia rebaudiana* Bertoni) est un arbuste pérenne, de la famille des *Asteraceae* est native du Paraguay et de l'Amérique du Sud. Elle se développe dans les climats tropicals et subtropicals (Sreedhar *et al*., 2008). Cette plante est aussi appelée ‘‘feuille sucrée "aux USA, ou encore " l'herbe sucrée" au Paraguay. *Stevia rebaudiana* est considérée comme une plante importante en raison de son composé actif présent dans les feuilles appelé glycosides de stéviol. Les feuilles de Stevia contiennent des glycosides tels que les steviosides et les rebaudiosides, 200 à 300 fois plus sucrants que le saccharose ou le sucre de canne (Geuns, 2003).
La Stévia a été introduite en tant que culture dans un certain nombre de pays, pour sa richesse en stévioside, diterpène glycoside qui forme la plus grande partie des molécules d'édulcorant

présentes dans les feuilles. Le stévioside est hautement recommandé pour le diabète, l'hypoglycémie, l'hypertension artérielle et l'obésité, car il n'est pas métabolisé. De plus, la Stévia fournit d'autres propriétés thérapeutiques telles que des anti-hyperglycémiques, des anticancéreux, des anti-hypersensibles (Jagatheeswari et Ranganathan, 2012) etc. ....

Le très faible pourcentage de germination des graines de Stevia (Ramirez- Mosquada et Iglesisas -Andrew, 2016a) limitait son utilisation pour la culture à grande échelle. Par ailleurs, la propagation par graines produit des populations moins homogènes, ce qui entraîne des variations des niveaux d'édulcorant (Ramirez- Mosquada et Iglesisas -Andrew, 2016b). La propagation par bouturage est également limitée en raison du nombre moins élevé d'individus pouvant être obtenus simultanément à partir d'une seule plante (Ramirez- Mosquada et Iglesisas-Andrew, 2016b). Par conséquent, pour surmonter les obstacles mentionnés ci-dessus, la micropropagation avait été recommandé pour obtenir des plantules robustes et acclimatées contre diverses contraintes environnementales (Ramirez- Mosquada *et al.*, 2016)

Différents travaux de micropropagation de S. rebaudiana ont été réalisés (Ali *et al*., 2010; Khalil *et al*., 2014; Ramírez-Mosqueda *et al.*, 2016). Cependant, ils ont signalé de faibles taux de propagation et de reproductibilité, ainsi que des temps de culture longs qui peuvent entraîner de multiples malformations chez les plantules propagées *in vitro* (Das *et al*., 2011).

Le présent travail est une contribution à l'amélioration des paramètres morphométriques du développement chez les vitroplants de *Stevia rebaudiana* Bert. au cours des différentes phases de la micropropagation.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel Végétal

Le matériel végétal utilisé est issu de touffes de *Stévia rebaudiana* préalablement multipliées, au laboratoire de culture *in vitro* de l'Institut National de Recherche Agronomique de Tunisie. Ces pousses sont maintenues sur un milieu MS (Murashigue et Skoog, 1962) additionné de 0.1 mg/l de BAP montrant une ramification abondante sans aucun signe d'enracinement.

2.2. Effet du milieu de culture

Les explants constitués de monotiges comportant deux nœuds (1.5cm) sont transférés dans des bocaux du type Leparfait et sont mis en culture sous une photopériode de 16h/8h à une intensité lumineuse de l'ordre de 4000 Lux fournie par des lampes « Osram daylight » à 25°±2C.

Deux milieux de cultures ont été utilisés dans les différents essais d'optimisation à savoir le milieu de Murashigue et Skoog MS (1962) noté M1 et celui de Driver et Kuniyuki DKW (1984) M2. Ces différents milieux sont additionnés de 30 g/l de saccharose et de 6.5 g/l d'agar et leur pH est ajusté à 5.7.

2.2.1. Etude de l'effet d'une cytokinine

La Benzylaminopurine (BAP) est ajoutée au milieux de multiplication sans hormones MS et DKW, à la dose de 1 mg/l. On note le milieu M3 (MS+ 1 mg/l BAP) et M4 (DKW+ 1 mg/l BAP).

2.2.2. Etude le l'effet des auxines

Afin d'évaluer la capacité rhizogène de *Stévia rebaudiana* Bert. nous avons étudié l'effet de l'ajout de l' acide indole-3- butyrique (AIB) et de l'acide indole-3- acétique (AIA) à une concentration respective de 0.5mg/l aux milieux MS et DKW.

2.3. Paramètres mesurés

Les notations observées après un mois de subculture ont portés sur différents paramètres qui sont :

- Pour la phase de multiplication: la hauteur de la pousse principale, le nombre moyen de pousses axillaires, le nombre moyen de nœuds par pousse axillaire, la longueur moyenne de la pousse axillaire.

- Pour la phase d'enracinement: le nombre moyen de racines par pousse et la longueur moyenne des racines.

2.4. Analyse statistique

Les données sont analysées au moyen du logiciel STATISTICA (version IX) (statSoft France, 2010). L'analyse de la variance ANOVA à un seul ou plusieurs facteurs moyennant le test de Newman-Keuls est utilisée pour comparer les moyennes relatives aux réponses des explants. Le seuil de signification de 5% est admis pour toutes les analyses.

3. RESULTATS

3.1. Influence du milieu de base sur les paramètres de développement de la partie aérienne lors de la phase de prolifération

3.1.1. Aspect quantitatif

Pour la hauteur de la pousse principale après un mois de subculture, l'analyse de la variance a montré une différence hautement significative au seuil de 5% entre les hauteurs moyennes mesurées. Le milieu M1 (MS) sans hormones a donné des pousses dont la hauteur est restée constante avec une taille réduite. Par contre, le milieu M2 (DKW) sans hormones a donné des pousses bien développées en hauteur avec une moyenne de 8 cm (Fig.1).

Le milieu MS dépourvu d'hormones (M1) fourni le nombre moyen le plus élevé en bourgeons axillaires avec une moyenne de 1.48 pousses par explant, alors que les explants cultivés sur le milieu DKW(M2) donnent un faible nombre moyen de bourgeons axillaires qui est de l'ordre de 0.32 pousses par explant (Fig.1).

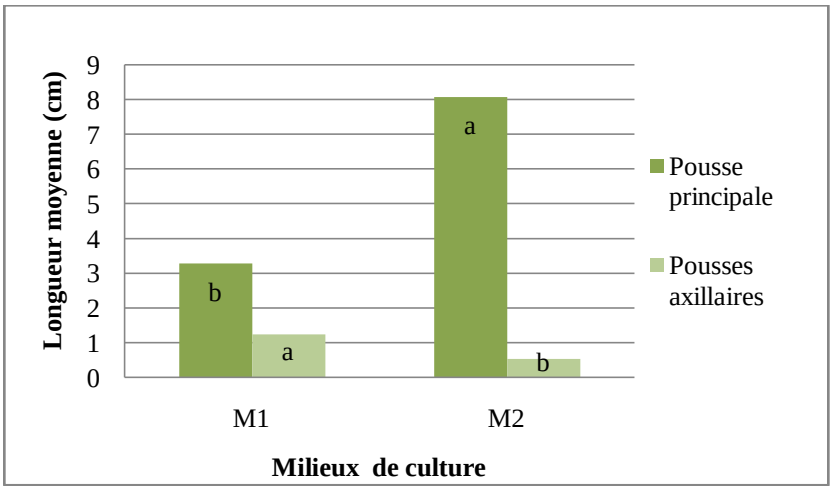


Figure1: Influence du milieu de culture sur les paramètres de développement *Stévia rebaudiana*, lors de la phase de la multiplication. M1 : MS sans hormones ; M2 : DKW sans hormones. Les moyennes qui ne sont pas suivies de la même lettre sont significativement différentes au seuil de 5% selon le test de Duncan.

La longueur moyenne de ces pousses axillaires varie d'une façon significative en fonction du milieu de culture (Fig. 2). En effet, le milieu M1 a donné les pousses axillaires les plus longues (1.25 cm). Le milieu DKW, par contre, a développé des pousses axillaires courtes de 0.32 cm en moyenne.

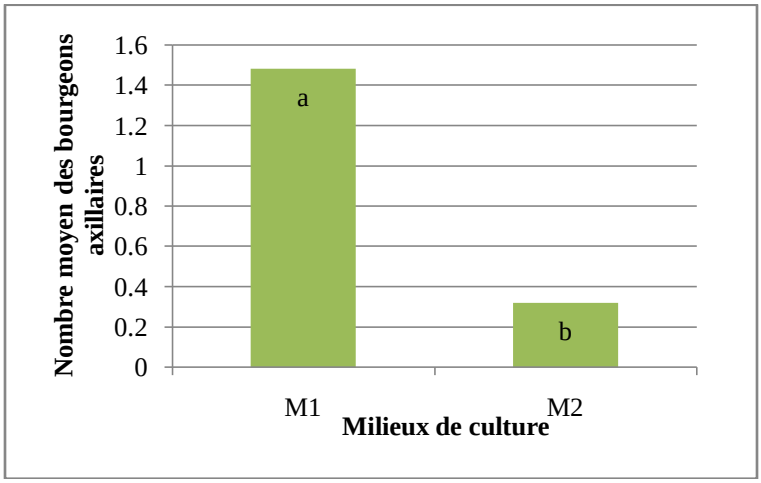


Figure 2: Influence du milieu de base sur le bourgeonnement axillaire *in vitro* des explants de *Stévia rebaudiana* après quartes semaines de culture. M1 : MS sans hormones ; M2 : DKW sans hormones.
Les moyennes qui ne sont pas suivies de la même lettre sont significativement différentes au seuil de 5% selon le test de Duncan.

Cette différence n'a pas touché le nombre moyen de nœuds par pousse où on note une différence non significative en fonction du milieu de culture de base au seuil de signification Pr > 0.05. Le milieu M1 a donné un nombre moyen de nœuds égale à 1.12, qui est légèrement supérieur à celui produit dans le milieu M2 (0.85 nœuds par pousse).

3.1.2. Aspect morphologique

Le milieu MS a donné des pousses ramifiés, avec de petites feuilles enroulées et cassantes (Fig. 3a) alors que le milieu DKW nous a donné des vitroplants vigoureux avec des feuilles allongées de couleur vert foncée(Fig. 3b) recouvertes de fins poils laiteux.(Fig. 3c)

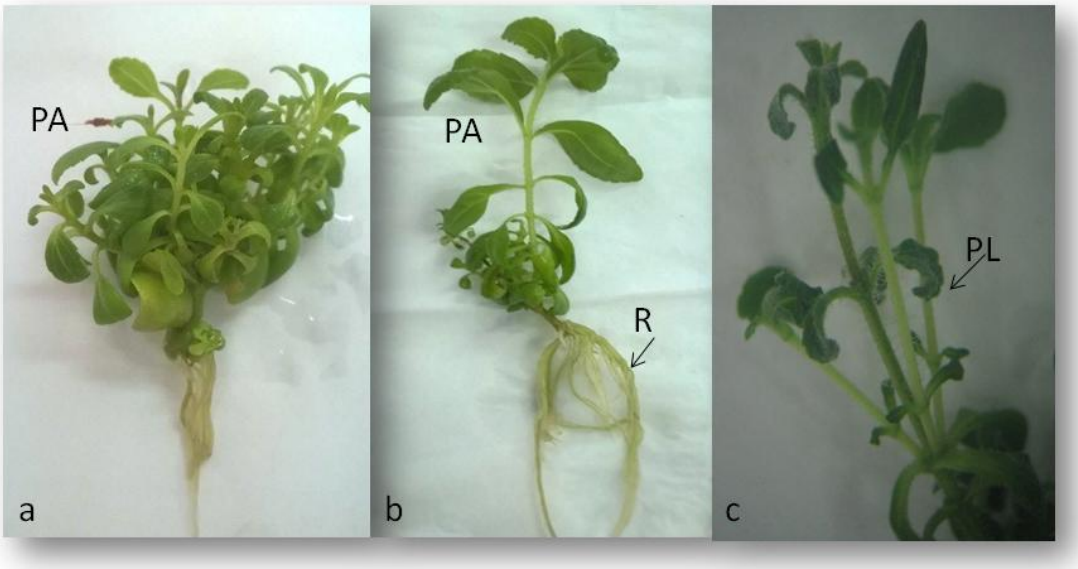


Figure 3. Aspect morphologique des explants issus du milieu MS (a) et du milieu DKW(b,c). PA: Partie aérienne; R: Racines; PL: Poils laiteux.

3.2. Etude de l'effet des cytokonines

La comparaison des moyennes montre que la hauteur moyenne des pousses diffère des milieux contenant ou pas des cytokinines. Cette différence a été significative pour le milieu MS alors que pour le milieu DKW l'ajout de la BAP n'a pas d'effet sur l'élongation de la pousse principale.
La différence entre le nombre moyen de pousses axillaires en fonction des milieux de culture utilisés a été hautement significative entre le milieu M3 et les milieux M1, M2 et M4, ces derniers présentent un nombre moyen de bourgeons axillaires variant de 1.1 à 1.67, alors que le milieu M3 présente 7.2 bourgeons par pousse(Fig. 4).
La présence de BAP dans le milieu de culture affecte significativement le nombre moyen des nœuds par pousse axillaire et leurs longueur moyenne (Fig. 4).

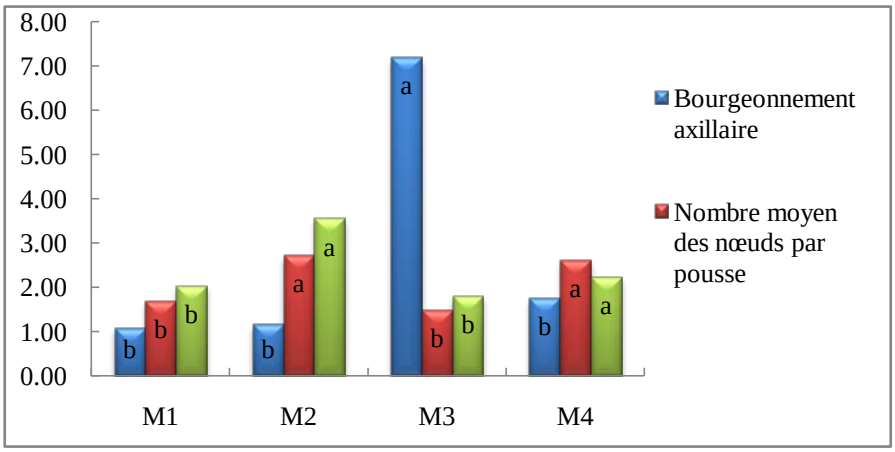


Figure 4: Effet de la BAP sur le bourgeonnement axillaire, le nombre moyen des nœuds par pousse axillaire et la longueur moyenne des pousses *in vitro* des explants de *Stévia rebaudiana*, après un mois de subculture. M1: MS. M2: DKW.M3: MS+1mg/l BAP; M4: DKW+1mg/l BAP. Les moyennes qui ne sont pas suivies de la même lettre sont significativement différentes au seuil de 5% selon le test de Duncan

3.3. Effet des auxines sur la phase d'enracinement

Les résultats montrent que les vitroplants cultivés sur les milieux M1, M2, M3 et M4 atteignent un taux d'enracinement de 100%, ce qui montre qui confirme que le milieu DKW est propice à l'enracinement *in vitro* de *Stévia rebaudiana* quelque soit le type d'auxine utilisé. Pour le nombre moyen de racines obtenues par vitroplant, l'analyse de la variance dégage une différence significative des effets des milieux sur ce paramètre (Tableau 1). Le milieu additionné de 0.5 mg/l d'AIB (M3) a favorisé la formation du nombre le plus élevé de racines qui atteint 18.96 par vitroplant.
Les milieux additionnés de 0.5 mg/l d'AIA et 0.5 mg/l d'AIA +0.5 mg/l AIB provoquent respectivement la formation de 11.76 et 12.40 racines. Le milieu DKW sans hormones a provoqué le nombre moyen de racines le plus faible qui est 8.12 racines par vitroplant.

Tableau 1. Analyse de la variance de l'effet des auxines (AIA et AIB) sur le nombre moyen de racines obtenues in vitro par explant de *Stevia rebaudiana* Bert.

Milieu d'enracinement	Nombre moyen de racines par pousse.
M1	8.12 ± 0.46 (c)
M2	11.76 ± 0.70 (b)
M3	18.96 ± 0.67 (a)
M4	12.40 ± 0.55 (b)

(*) : Les moyennes qui ne sont pas suivies de la même lettre sont significativement différentes au seuil de 5% selon le test de Duncan (N= 10).

4. DISCUSSION

Les résultats de notre étude on montré que le milieu de culture utilisé à un effet direct sur les différents paramètres morphométriques lors de la phase de multiplication *in vitro* de *Stevia rebaudaina*. En effet, nous avons observé que le milieu MS est plus favorable que le milieu DKW en terme de nombre moyens de bourgeons axillaires par vitroplants et aussi pour la longueur moyenne des pousses obtenues.

Des résultats similaires ont été déjà mis en évidence chez Persian Walnut (Juglans regia L.) où le milieu DKW a causé une réduction du taux de multiplication par rapport au milieu MS (Leslie et McGranahan, 2000). Dans un autre cadre (Saadat et Hennerty, 2002) ont trouvé une différence non significative entre le milieu MS et le milieu DKW concernant la longueur moyenne des pousses axillaires.

L'ajout du BAP a confirmé le rôle qu'occupe cette hormone dans le mécanisme de l'organogénèse où elle stimule fortement la formation des bourgeons axillaires, en effet le milieu M3(MS+1mg/l BAP) a donné un nombre de bourgeons axillaires très élevé par rapport aux autres milieux, ces mêmes constatations ont été aussi signalés par Aman *et al*. (2008) et Nower (2014).

L'ajout du BAP au milieu DKW n'a presque aucun effet sur la longueur moyenne des pousses axillaires et le nombre moyen des nœuds par pousse , donnant des résultats meilleurs que le milieu MS, Ces observations ont été confirmés par Guk Kang et McMahan (2014), qui en travaillant sur Guayule (*Parthenium argentatum* Gray**)** appartenant aussi à la famille des astéracées, ont enregistrés de longues pousses axillaires sur milieu DKW .

L'aspect morphologique générale des explant multipliés dans le milieu DKW peut être expliqué par la forte concentration de ce milieu en Ca(NO3)2.4H2O dont la disponibilité permet une meilleure tenue de la tige (Sabah et Raska, 2013) vu que le calcium joue un rôle primordial dans le maintien et la rigidité de la paroi cellulaire.

Pour la rhizogenèse *in vitro*, un taux d'enracinement de 100% a été obtenu en utilisant le milieu DKW avec ou sans apport d'auxines. Cependant (Nower, 2014) a obtenu les meilleurs taux de rhizogenèse sur le milieu MS additionné d'auxines. Ce travail confirme les travaux de Ramírez-Mosqueda et Iglesias-Andreu (2016a), qui ont montré que l'utilisation de milieu de culture avec une concentration faible en sels minéraux contribue dans le développement racinaire de *Stevia rebaudina*. Par ailleurs, Miriniam *et al*. (2013), ont obtenu des résultats similaires par l'ajout de 1mg/l d'AIB.

5. CONCLUSION

Au terme de ce travail, on peut conclure que le milieu DKW sans hormones est plus favorable à la phase de prolifération de *Stevia rebaudiana* par rapport au milieu de référence MS, et que l'ajout de 1 mg/l de BAP stimule le développement des explants durant cette phase avec les deux milieux de cultures utilisés. Pour la phase d'enracinement, il est préférable qu'elle soit réalisée sur le milieu DKW additionné de 0.5mg/l d'AIB où on a obtenu un taux de rhizogenèse de 100% avec un développement racinaire plus important par rapport au milieu MS.

REFERENCES

- Ali A, Gull I, Naz S, Afghan S. 2010. Biochemical investigation during different stages of *in vitro* propagation of *Stevia rebaudiana*. *Pakistan Journal of Botany*, **42**, 2827–2837.
- Aman N, Hadi F, Khalil S.A, Zamir R, Ahmad N.2013. Efficient regeneration for enhanced steviol glycosides production in Stevia rebaudian (Bertoni). C.R.Biolo, 336, 486-492.
- Das, A., Gantait, S., Mandal, N., 2011. Micropropagation of an elite medicinal plant: *Stevia rebaudiana* Bert. *International Journal of Agricultural Research*, **6**, 40–48.
- Driver J.A, et Kuniyuki A.H. 1984. In vitro propagation of paradox walnut rootstocks . *HortScience*, **19**, 507.
- Geuns, J.M.C., 2003. Molecules of interest: stevioside. *Phytochemistry*, 64, 913–921.

- Jagatheeswari D, Ranganathan P. 2012. Studies on micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bert. *International Journal of Pharmaceutical and Biological journal Archives*, **3**, 315-320.
- Khalil SA, Zamir R, Ahmad N. 2014. Selection of suitable propagation method for consistent plantlets production in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Saudi Journal of Biological Sciences*, **21**, 566-573.
- Leslie A, Granahan Mc, Matthew A, Escobar A, Park B, Polito A, Gale H. Using GFP as a Scorable Marker in Walnut somatic embryo transformation. *Annals of Botany*, **85**, 831-835.
- Miriniam A, Patro R, Mahmoud O, Morteza E. 2013. A novel protocol for *Stevia rebaudiana* Bert. regeneration. *Journal of advanced Laboratory Research in Biology*, **4**, 16-22.
- Murashige T, Skoog F.1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant physiology*, **15**, 473–497.
- Nower A.A. 2014. *In vitro* propagation and synthetics seed s production : An efficient methods for *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Sugar technology*, **16**, 100-108.
- Ramírez-Mosqueda M.A, Iglesias-Andreu L.G, 2016a. Direct organogenesis of *Stevia rebaudiana* Bertoni using Thin Cell Layer (TCL) method. *Sugar Technology*, **18**, 424–428.
- Ramírez-Mosqueda, M.A., Iglesias-Andreu, L.G., 2016b. Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, **52**, 154–160.
- Ramirez- Mosquada M.A, Iglesias-Andrew L.G, Ramirez-Madero, G. Hernandez-Rincon, E.U. 2016. Micropropagation of Stevia rebaudiana Bert. in tempory immersion systems and evaluation of genetic fidelity. *South African Journal of Botany*, **106**, 238-243.
- Saadat Y, Hennerty M. 2002. Factors affecting the shoot multiplication of Persian Walnut (Juglan regia L.). *Sciencia Horticulturae*, **95**, 251-260.
- Sabah A.H, Rasha, M.K.2013. Biotechnological studies for improving of stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) in vitro plantlets. *Middle East Journal Of Science Research*,**14**, 93-106.
- Soliman H.I.A, Metwali E.M.R., Almaghrabi O.A.H., 2014. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Betroni and assessment of genetic stability of *in vitro* regenerated plants using inter simple sequence repeat (ISSR) marker. *Plant Biotechnology Reports*, **31**, 249–256.
- Sreedhar R.V, Venkatachalam L, Thimmaraju R, Bhagyalakshmi N, Narayan MS, Ravishankar G.A. 2008. Direct organogenesis from leaf explants of *Stevia rebaudiana* and cultivation in bioreactor. *Plant Biology*, **52**, 355–360.

Enrichissement des huiles végétales par les polyphénols des dattes parthénocarpiques de la variété Deglet nour

Hammadi Hamza[1,2], Mouna Ben Mohamed[2], Hatem Hajjem[2], Tarek Tombari[2]
[1]Laboratoire de l'Aridoculture et Cultures Oasiennes, Institut des Régions Arides, Médenine, Tunisie
[2]Département de génie des procédés agroalimentaires, ISET Kébilli, Tunisie

RESUME
Ce travail porte l'étude de l'enrichissement des huiles végétales par des extraits phénoliques obtenus à partir des dattes parthénocarpiques, non pollinisées communément appelées Sis. Les extraits éthanoliques des dattes non pollinisées (Sis) de la variété Deglet nour montrent un taux très élevé de polyphénols. Ces extraits ont été purifiés à l'aide de l'amberlite XAD16HP à base de résine. Cet adsorbant a montré une très bonne capacité d'améliorer la concentration des polyphénols qui a augmenté de 42%.
Les polyphénols des dattes Sis Deglet nour purifiés ont été utilisés comme additifs. En effet, l'enrichissement des huiles végétales par ces polyphénols à différentes concentrations a permis d'améliorer l'indice de peroxyde et l'activité antioxydante des huiles de tournesol et des huiles d'olive.
Mots-clés : Dattes non pollinisées, Polyphénols, Huile végétale, Indice de peroxyde, Activité antioxydante.

1. INTRODUCTION
Plusieurs travaux scientifiques ont mis en évidence le rôle du processus oxydatif incontrôlable induit par plusieurs entités chimiques. Ces oxydants sont à l'origine directe de différents états pathologiques tels que le vieillissement et le cancer et indirecte sur la peroxydation des lipides des denrées alimentaires. Devant cette situation la recherche des antioxydants naturels s'avère très utile pour faire face à ce danger.
En effet, les antioxydants naturels font l'objet de nombreuses recherches. Parmi eux on cite les polyphénols qui sont largement recherchés pour leurs propriétés biologiques : antioxydantes, anti-inflammatoires, antiallergiques et anti-carcinogènes. Notant que l'efficacité puissante de ces substances à stopper les réactions radicalaires en neutralisant les radicaux libres est due principalement à leurs structures phénoliques avec la présence des groupements hydroxyles.
Les dattes non pollinisées sont parmi les fruits qui sont très riches en polyphénols (Hamza et al., 2016). Notre travail consiste à extraire les extraits phénoliques des dattes non pollinisées, les purifier en vue de les utiliser dans l'enrichissement des huiles végétales.

2. MATERIEL ET METHODES
2.1. Matériel végétal
La zone originaire du matériel végétal fait partie des oasis de Nefzaoua (Délégation de Kibilli). Ce secteur représente la majeure partie des oasis continentales tunisiennes situées au Sud Ouest de la Tunisie.
Les extractions ont été conduites sur les dattes parthénocarpiques communément appelées « sis » du cultivar Deglet Nour. Un total de 1000 dattes ont été collectées au stade de maturité complète et ceci vers la fin d'un mois du Janvier. Les fruits ont été stockés à 4°C jusqu'au début d'extraction des polyphénols.

2.2. Extraction des polyphénols
Dix grammes de chaque matériel ont été pesés et suspendus dans 50 ml d'éthanol 80% et homogénéisés à l'aide d'un homogénéisateur de type MICCRA Homogenizer Disperser D-9. Par la suite, l'agitation a été faite par ultrason à l'aide de G-Sonic pendant 120 min / 80°C. A la fin la

solution a été filtrée par un papier filtre et le filtrat a été complété jusqu'à 125ml avec de l'éthanol 80%. Les extraits ont été conservés et stockés à -20°C.

2.3. Dosage

A un volume de 200µl de chaque tube de la gamme étalon ainsi que les extraits on ajoute 800µl de carbonate de sodium et 1000ul de Folin-Ciocalteu dilué dans l'eau distillée (1/10). Après 6 min à l'obscurité et à la température ambiante on a mesuré l'absorbance par le spectrophotomètre à 655 nm. Les résultats ont été exprimés en mg acide gallique par 100g de matière fraiche (mg AG/100gMF).

2.4. Purification de polyphénols par adsorption

Afin d'utiliser les polyphénols extraits dans le domaine alimentaire une étape de purification à la résine a été faite. L'adsorption définit la propriété de certains matériaux de fixer à leur surface des ions ou des molécules de façon plus ou moins réversible. Les billes utilisées ont une structure poreuse leur procurant une grande surface spécifique. Les éléments indésirables sont alors liés de façon chimique et physique aux pores. Nos extraits ont été préparés à l'aide de l'éthanol. Ce solvant a été éliminé par adsorption en utilisant l'Amberlite XAD 16HP à base de résine (Gao et al, 2018).
La préparation de l'adsorbant a été faite à l'aide de méthode Sun et al. (2013). Une masse de 20 grammes de résine ont été mise dans 100ml d'éthanol 95% avec une agitation à température ambiante pendent 16h. L'agitation a été faite à l'aide du Universal table shaker 709 avec un vitesse 120rpm. Le mélange a été filtré à l'aide d'une colonne suivi d'un rinçage avec du HCL 5% puis un rinçage avec l'eau distillé jusqu'à la neutralité. Puis un autre rinçage avec la NaOH 3% suivi d'un autre avec l'eau distillé jusqu'à la neutralité. La résine obtenue après filtration est séchée dans l'étuve à une température de 60°C pendant 24 heures.
L'adsorption des polyphénols a été faite en versant un volume de 40 ml de l'extrait de la matière fraiche dans lequel on ajoute 4g de la résine préparée. Le mélange a été ensuite mis sous agitation continue à l'aide du shaker 709 (120rpm/24h) puis filtré et le filtrat a été dosé pour déterminer la teneur en polyphénols. Le reste de résine obtenue après filtration a été rincé à l'eau pour éliminer l'excès des polyphénols. La désorption a été faite de 50ml d'éthanol 70% avec agitation 120rpm/24h. Après filtration, la concentration en polyphénols dans le filtrat a été déterminée.

2.5. Valorisation des polyphénols : enrichissement des huiles par les polyphénols obtenus

Cette étude porte sur la valorisation des polyphénols en faisant l'amélioration de deux types des huiles : huile de tournesol et l'huile d'olive. Afin d'étudier l'impact de cet ajout, des analyses de l'activité antioxydante, d'acidité et d'indice de peroxyde des huiles ont été faites.

2.6. Préparation des échantillons

On applique le même protocole pour les deux types des huiles : On a préparé quatre tubes contenant 50 ml d'huile, le premier tube est un témoin (sans polyphénols) puis des masses de 0.2, 0.4 et 0.6 mg de polyphénols ont été ajoutés aux trois autres tubes.

2.7. Caractérisation physico-chimique des huiles :

- Mesure de l'activité antioxydante

A chaque 150 µl de l'extrait on a ajouté 1850µl de DPPH. Après incubation 30min à l'obscurité, on a fait la lecture de DO à 517 nm.

- Indice d'acidité

La mesure de l'acidité a été réalisée par la méthode normalisée NF EN ISO 660. Celle-ci est réalisée par titrage de l'échantillon solubilisé dans un mélange éther éthylique / éthanol par une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium. Les résultats sont exprimés en % (m/m) d'équivalent acide oléique et puis mesuré par la quantité de potasse nécessaire à la neutralisation des acides gras libres contenus dans un gramme de corps gras.

- Indice de peroxyde

On prend 1g d'huile et on le dissoute dans 10ml de chloroforme puis on ajoute 15ml d'acide acétique avec 1ml de la solution saturé d'iodure de potassium (KI) après on met le mélange 5 min à l'abri de la lumière pour le report en fin on ajoute 50 ml d'eau distillée, la solution obtenue est titrée par le thiosulfate de sodium (Na2SO3) 0.01N en présence d'empois d'amidon. Cet indicateur coloré provoque le noircissement de la solution et la fin de dosage est marquée par la décoloration de la solution. Un essai à blanc doit être effectué dans les mêmes conditions. L'indice de peroxyde est exprimé en méq d'O2/Kg d'huile par la formule suivante : IP= (10*(V-V0))/m avec V0 : volume de la solution de thiosulfate de sodium utilisé pour l'essai à blanc, V : volume de thiosulfate titré dans l'échantillon d'huile, m: masse en gramme de la prise d'essai

3. RESULTAT ET DISCUSSION

3.1. Quantification des polyphénols

Les dattes Sis Deglet Nour ont montré une quantité de 456,25 mg AG/100gMF. Selon Telli (2009) la concentration en phénols totaux au sein des dattes pollinisées de la variété Ghars en pleine maturation est la plus faible (4.55 mg AGE/10 de poids sec). De même Hamza et al. (2016) ont montré que la pollinisation chez la variété Deglet nour a diminué le taux des polyphénols en la comparant avec les dattes non pollinisées (parthénocarpiques). Ces travaux ont montré aussi que les dattes parthenocarpiques de la variété Deglet Nour pourraient être valorisées en raison de leurs caractéristiques chimiques, fonctionnelles et technologiques. Ces fruits non pollinisés ont des caractéristiques qui les rendent difficile à la consommation fraiche en raison de leur astringence mais adaptées aux applications industrielles. Ils sont très riches en polyphenols et en polysaccharides insolubles (pectines, hémicelluloses et cellulose).

3.2. Enrichissement des huiles par les polyphénols obtenus

Devant la richesse en phénols totaux, les dattes Sis de Deglet nour ont été utilisées comme sources de polyphénols afin de les utiliser pour améliorer la qualité des huiles végétales.

Le tableau 1 résume les mesures de l'acidité, de l'indice de peroxyde et de l'activité antioxydante des huiles de tournesol et des huiles d'olive à la suite de l'addition des polyphénols avec des concentrations croissantes.

Malgré que l'acidité des huiles a augmenté en ajoutant des polyphénols, elle reste dans les normes du Codex Alimentaires (2009) (CODEX-STAN, 210-1999). Celui-ci recommande aussi que les indices de peroxyde des huiles pressées à froid ne dépassent pas 15 méq/kg. Dans notre cas, l'ajout des polyphénols a permis d'améliorer la qualité des huiles étudiées. Ceci démontre que l'enrichissement de l'huile végétale par les polyphénols semble améliorer la stabilité oxydative de l'huile cette même explication a été avancée par d'autres études confirmant que les polyphénols augmentent la stabilité des huiles (Servili et Montedoro, 2002).

Tableau 1. Acidité, indice de peroxyde et activité antioxydante des huiles enrichies en polyphénols de Sis Deglet Nour.

	Acidité (%)	Indice de peroxyde méqO2/kg	Activité antioxydante (mgAs Ascorbique / 100 g huile)
Huile de tournesol			
Témoin	0,25 d	5,10 a	20,69 d
HT + 0.2 mg	0,55 c	2,81 b	21,99 c
HT + 0.4 mg	0,7 b	1,94 c	23,60 b
HT + 0.6 mg	1,1 a	1,08 d	25,33 a
Huile d'olive			
Témoin	0,65 d	16,45 a	25,14 c
HO + 0.2 mg	0,8 c	14,28 b	28,79 b
HO + 0.4 mg	1,05 b	12,83 c	32,25 a
HO + 0.6 mg	1,15 a	10,98 d	32,43 a

Il est claire que l'activité antioxydante des huiles a été amélioré par l'addition des polyphénols des Sis des dattes Deglet Nour. Ceci est en accord avec notre travail qui a mis en évidence que l'activité antioxydante est hautement corrélée avec la présence des polyphénols.

4. CONCLUSION

Cette étude nous a permis de mettre en évidence la richesse des extraits éthanoliques des dattes parthénocarpiques en polyphénols. L'utilisation des polyphénols des dattes Sis Deglet nour dans l'enrichissement des huiles végétales a permis d'améliorer l'acticité antioxydante et les valeurs de l'indice des peroxyde. Ce qui permet de conclure que l'emploi des polyphénols des dattes pourrait avoir une application alimentaire très prometteuse.

REFERENCES

- Hamza H., Mrabet A., Jiménez-Araujo A., 2016. Date palm parthenocarpic fruits (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Deglet nour chemical characterization, functional properties and antioxydant capacity in comparsion with seceded fruits scientia horticulture volume211, Novembre 2016 pages 352-357.
- Telli A. (2009). Contribution à l'optimisation de l'extraction des polyphénols des dattes (variété Ghars) au cours de différents stades phénologiques et étude de leur activité biologique. Magistère en Biologie. Université Kasdi Merbah, Ouargla: 108p.
- Servili M. et Montedero G. 2002. Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. European Journal of Lipid Science and Technologie, 104:602-613.
- Sun, L., Y. Guo, C. Fu, J. Li and Z. Li. 2013. Simultaneous separation and purification of total polyphenols, chlorogenic acid and phlorizin from thinned young apples. Food Chem. 136(2): 1022-1029
- Gao Ningxuan, Wang Yuehua, Jiao Xinyao, Chou Shurui, Li Enhui, Li Bin, 2018. Preparative Purification of Polyphenols from Aronia melanocarpa (Chokeberry) with Cellular Antioxidant and Antiproliferative Activity. Molecules, 23 (139): 1-14.

Étude préliminaire de la dynamique de la cochenille blanche *Parlatoria blanchardi* Targ du palmier dattier dans la palmeraie de Figuig (Maroc)

Hasnaoui Amina[1*], Bellaouchi Reda[1], Rokni Yahya[1], AbouloifA Houssam[1], Hakkou Abdelkader[1], El Houmaizi Mohamed Aziz, Bechchari Abdelmajid[2], Asehraou Abdeslam[1]
[1]Laboratoire de Biochimie et Biotechnologies, Faculté des Sciences, Université Mohammed Premier, Oujda.
[2]Institut National de la Recherche Agronomique(INRA), Centre d'Oujda
*Email: astaghfir@gmail.com

RESUME
La cochenille blanche *Parlatoria blanchardi* constitue l'un des ravageurs les plus redoutables du palmier dattier au niveau des palmeraies traditionnelles de Figuig. La cochenille affaiblit considérablement les palmiers, attaque les régimes et déprécie la valeur et la qualité commerciale des dattes infestées. La mise au point d'une méthode de lutte efficace contre cet insecte repose sur la connaissance préalable de sa bioécologie et les conditions optimales de son activité prolifique. Cette étude préliminaire a pour objectif la caractérisation du degré d'infestation des palmiers deux cultivars de la région « Assiane » et « Boufeggous » par la cochenille. Les cultivars étudiés montrent des taux d'infestation élevés durant les mois d'octobre et novembre.trois éspèces de prédateurs entomophages de *Parlatoria blanchardi* ont été inventorié. Il s'agit de *Pharoscymnus ovoïdeus, Pharoscymnus numidicus et Cybocephalus palmarum.* Cette étude bien que préliminaire, nous a permis de dégager des informations très utiles sur l'écologie de la cochenille blanche qui doivent être complétées par l'étude de l'activité prolifique en fonction de l'état végétatif du palmier et les conditions des biotopes, afin de préconiser une lutte efficace et durable contre ce prédateur.
Mots clès : cochenille blanche, palmier dattier, infestation.

SUMMARY
The white cochineal *Parlatoria blanchardi* is one of the most dangerous pests of the date palm in the traditional palm groves of Figuig. This predator reduce considerably palms, attacks fruits and depreciates the value and commercial quality of infested dates. The development of an effective control method against this insect is based on the prior knowledge of its bioecology and the optimal conditions of its prolific activity. This preliminary study aims to characterize the degree of infestation of three main cultivars "Assiane", "Boufeggous" and "Aziza bouzid" by the white cochineal. The cultivars studied show high infestation rates during the months of October and November. Three species of entomophagous predators of *Parlatoria blanchardi* have been inventoried. These are *Pharoscymnus ovoïdeus, Pharoscymnus numidicus and Cybocephalus palmarum.* This study, although preliminary, allowed us to obtain very useful information on the ecology of the white scale that must be completed by the study of the prolific activity according to the vegetative state of the palm tree and the conditions of the biotopes, to preconize an effective and sustainable fight against this predator.
Key words: white cochineal, date palm, infestation.

1. INTRODUCTION

Le palmier dattier *Phoenix dactylifera* L constitue au Maroc l'une des espèces fruitières les plus anciennes ayant une grande importance écologique et socioéconomique. Ces dernières décennies, l'économie oasienne marocaine est caractérisée par un recul important de la production à cause de la conjugaison de plusieurs facteurs biotiques et abiotiques défavorables. Au Sud- Est, l'oasis de Figuig qui constitue la limite septentrionale du palmier dattier, dispose d'une trentaine de cultivars inventoriés et plusieurs 'khalts' ou 'francs' (palmier issus de semis de graines), contribuant ainsi à la richesse et à la biodiversité du patrimoine phoenicicole marocain (Hasnaoui, 2013). Cependant et à l'instar des autres zones phoenicicoles marocaines, le palmier dattier est menacé par divers

ravageurs dont la cochenille blanche (*Parlatoria blanchardi* Targ) qui colonise toutes les parties du palmier. Ce ravageur s'installe sur les folioles, le rachis, la hampe florale et même sur les fruits (Saighi et al., 2015). La contamination par cette cochenille est apparue en 1937 à Figuig puis elle a envahit toutes les palmeraies du pays (Leroy, 1958). L'insecte se nourrit de la sève de la plante hôte et injecte une toxine qui altère le métabolisme; de plus, l'encroûtement des feuilles diminue la respiration et la photosynthèse. II se trouve aussi sur les fruits dont le développement est arrêté. La cochenille peut entraîner une réduction de plus de la moitié de la production dattière, et rend les fruits inconsommables (Bounaga et Djerbi, 1990). La lutte contre ce parasite est rendue difficile par la résistance à la pénétration des insecticides que lui assure le follicule. La lutte biologique par l'utilisation de coccinelles prédatrices naturelles de la cochenille, a fait l'objet de nombreuses études. Elle a été tentée avec de bon résultats en Mauritanie (Tourneur et N'Diaye, 1971). Au Maroc, les études récentes de la dynamique de la cochenille blanche et les moyens de lutte n'ont concerné que certaines régions (palmeraies de la vallée de Draa) malgré l'envahissement évolutif de la totalité des palmeraies marocaines. L'objectif de ce travail est l'étude de l'état d'infestation par la cochenille blanche des principaux cultivars de quelques palmeraies traditionnelles de Figuig.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Caractéristiques de la zone d'étude

L'étude a débuté en janvier 2017 et suivie jusqu'à novembre 2018. Elle a été réalisée au niveau des parcelles traditionnelles irriguées par submersion et dominées par des palmiers dattier de tailles différentes de 2.5 à 3m, âgés de 9 à 10 ans. L'écartement moyen entre les palmiers est de 6.7 m. Le cultivar «Assiane » est le plus dominant en nombre de pieds, suivi par « Boufeggous», «Aziza bouzid» et «Mejhoul» en plus d'une douzaine de francs. Les sous cultures sont présentées par la luzerne, le maraîchage et certaines espèces fourragères. Des figuiers, des amandiers et des grenadiers sont cultivés à la périphérie des parcelles.

2.2. Echantillonnage

Les échantillons de folioles étudiés proviennent des cultivars «Assiane» et «Boufeggous». Nous avons prélevé deux folioles des palmes des trois parties de chaque palmier étudié : du cœur,de la couronne intérieure et de la couronne extérieure. Les 24 folioles prélevées de chaque cultivar sont mis dans des sachets en papier Kraft puis stockées à 4°C. Les folioles sont mises sous la loupe binoculaire pour le calcul du taux d'infestation avec la méthode de notation d'Euverte (1962) dont l'échelle varie de 0 à 5 (Tableau 1).

Tableau 1. Indices d'infestation du palmier dattier par la cochenille blanche

Note	Nombre de cochenille par cm^2	
0	0	Aucune cochenille
1/2	15	Quelques cochenilles
1	60	Début d'invasion
2	120	Population faible
3	190	Population moyenne
4	260	Début d'encroûtement
5	320	Encroûtement total

Les ennemis naturels de la cochenille blanche ont été chassés à vue au niveau des palmes.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Degré d'infestation selon les différentes parties du palmier

Les résultats obtenus montrent que la couronne extérieure des cultivars étudiés est plus infestée par la cochenille avec des notes variant de 3 en hiver et 5 en août, septembre, octobre et novembre. La couronne moyenne présente un faible degré d'infestation avec une note de 1. Les couronnes

externes des deux cultivars sont contaminées par un nombre élevé de femelles matures, alors que les couronnes moyennes supportent des larves mobiles. Le cœur du palmier reste indemne de toute infestation.

3.2 Evolution annuelle du taux d'infestation

Le niveau d'infestation par la cochenille blanche montre peu de différences entre les deux cultivars (Figure 1). L'effectif moyen de la cochenille blanche par cm^2 de folioles a varié de 54 à 260 individus pour le cultivar «Assiane» et de 39.5 à 260 individus pour le cultivar «Boufeggous». Cette population est qualifiée de début d'invasion au début d'encroûtement selon le barème de Laudeho (1969). Les fortes infestations sont enregistrées en octobre et novembre.

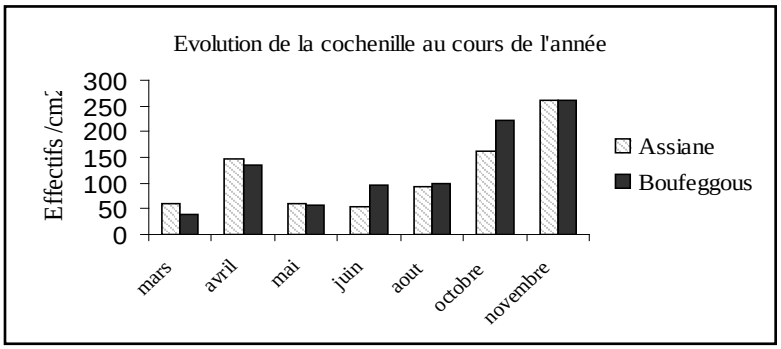


Figure 1. Evolution de la population de *Parlatoria blanchardi* en fonction de l'époque de l'année

Le degré d'infestation de la cochenille peut être conditionné par l'état végétatif du palmier et la valeur des pratiques culturales au moment de l'échantillonnage.

3.3. Les entomophages indigènes de la cochenille blanche

Les prédateurs naturels de *Parlatoria blanchardi* récoltés dans cette étude appartiennent aux espèsces suivantes : *Pharoscymnus ovoïdeus, Pharoscymnus numidicus et Cybocephalus palmarum.* Les cybocephalus sont abondants au niveau des deux cultivars (Figure 2), à n'importe quelle période de l'année. Malgré la richesse spécifique de cette entomofaune indigène, les individus présents, n'arrivent pas à limiter les pullulations de la cochenille.



Figure 2. Folioles du cultivar Mejhoul infestées par *Parlatoria blanchardi*

4. CONCLUSIONS

Ce travail a démontré une forte infestation des cultivars étudiés par la cochenille blanche *Parlatoria blanchardi*. Bien que préliminaire, cette étude est indispensable pour une bonne maîtrise de la dynamique des populations de la cochenille pour envisager ultérieurement une méthode de lutte efficace et appropriée. La présence des entomophages indigènes dans les palmeraies de Figuig est un facteur important pour envisager une lutte biologique contre ce ravageur.

REFERENCES

- Bounaga N, Djerbi M.1990. Pathologie du palmier dattier. *Options méditerranéennes.* Sér .A .n° 11.127-132.
- Euverte G .1962. Programme d'étude *Parlatoria blanchardi Targ.* Et de ses prédateurs sur la station de Kankossa. Rapport I.F.A.C.
- Hasnaoui A. 2013. Évaluation de la qualité des dattes des cultivars de la palmeraie de Figuig, concentration et caractérisation des fibres de la pulpe des écarts de tri des dattes. Thèse de doctorat. Faculté des Sciences Oujda Maroc, 213p.
- Laudeho Y. 1969. Intervention bio-écologique en Adrar mauritanien destinée à lutter contre *Parlatoria blanchardi Tenc.* (Hom. Diaspididae): acclimatation d'un prédateur coccinellidae: *chilicorus bipwtulatus* L. var. iranensis V. Nov. -Thèse de Doctorat, Université de Montpellier, 85 p.
- Leuroy P. 1958. *Le palmier dattier au Maroc*. Ministère de l'agriculture / institut français de recherches fruitières Outre-Mer (I.F.A.C).142 p
- Saigui S, Doumandji S, Belhamra M. 2015. Evaluation numérique de la cochenille blanche *Parlatoria blanchardi* Targ. 1868. Hemiptera ; Diaspididae) en fonction de la position des femelles adultes sur les foliolesdu palmier dattier dans les palmeraies des Ziban (Biscra, Algérie). *Courier du savoir*19, 41-48.
- Tourneur J C, N'Diaye A. 1971. Contrôle bio-écologique de la cochenille blanche du palmier dattier Parlatoria blanchardi, dans la régio de Tagant en Mauritanie par l'introduction de chilocorusbipustulatus. *Fruit, 30(11), 681-685.*

Valorization of pomegranate co-products: Biochemical composition and antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels

Hatem BEN MOHAMED
Arid and Oases Cropping Laboratory, Institute of Arid Regions of Médenine (IRA), Tunisia
Email: benmohamed.hatem@yahoo.fr

SUMMARY
The present work is in the perspective of the valorization of the pomegranate peels *Punica granatum* L. cv. Gabsi. The object of this study is the physico-chemical and biochemical characterization of the pomegranate peel of *Gabsi* cultivar cultivated in the region of Gabès in the south-east of Tunisia. Physicochemical and biochemical analysis showed that pomegranate peel, which corresponds to about 40% of the total fruit weight, constitutes an important source of phenolic compounds and mineral elements. The comparison of the composition of peel revealed a significant richness on mineral elements, essentially, K and Ca.
Pomegranate peel contains high level of total phenolic content with values ranging from 232.14 to 245.79 mg EAG/g DW. Likewise, our data showed a significant positive correlation was found between the antioxidant capacity and total phenolic content. Accordingly, the antioxidant activity of pomegranate peel is mainly attributable to the presence of a high content of phenolic acids, which are considered among the more powerful natural antioxidants. Therefore, this study indicates that the fruit peel of *Punica granatum* can be considered as a good source of the natural compounds with antioxidant activities that can be used in the therapeutic as well as ingredient in functional foods.
Key words: Punica granatum, Pomegranate peel, Physico-chemical and biochemical characterization, Antioxidant capacity.

1. INTRODUCTION

Pomegranate (*Punica granatum* L.) is perennial fruit specie growing well in tropical and sub-tropical regions. It is one of the oldest edible fruit species, which native of Persia and has been cultivated extensively in Asian, Mediterranean and Middle East countries. Tunisia is among the main pomegranate producer countries. Indeed, the southern oases of Gabes, located in the South East of Tunisia, occupied the first place in terms of area and production with 3000 ha and more than 35% of national production.
The pomegranate (*Punica granatum*) belongs to the Punicaceae family and is a nutrient dense food source rich in phytochemical compounds. Pomegranate fruits are widely consumed, fresh and in commercial products, such as juices, jams, and wines. Since the juice yield of pomegranates is less half of the fruit weight, very large amounts of by-product wastes, such as peels, are formed every year. The peel of the pomegranate represents almost 26%–40% of the fruit and is recognized for its many health-promoting qualities and apparent wound-healing properties (Li et al., 2006; Kaderides et al., 2019). The present work is in the perspective of the valorization of the pomegranate peels *Punica granatum* L. cv. Gabsi. Therefore, the object of this study is the physico-chemical and biochemical characterization of the pomegranate peel of Gabsi cultivar cultivated in the region of Gabes in the south-east of Tunisia.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant material

Throughout the study, we used three accessions of pomegranate cv. Gabsi (*Punica granatum* L.). Fully mature fruits were randomly picked in late October from three oases (Oudhref, Meteouia, Chenini) in the region of Gabes in the south-east of Tunisia. Fruits were stored (6 to 8°C) for a few days until used. The peels were manually separated from the fruits and cleaned. They were then sun-dried until complete dehydration. Finally, they were ground by a grinder to obtain a fine powder and sieved (Fig. 1).



Figure 1. Dried pomegranate peels (Punica granatum L.)

2.2. Physicochemical characterization of pomegranate peel

Moisture content

Fresh peels were used to determine moisture content. The Moisture content was determined after oven drying to a constant weight at 105 °C.

Ash content: Ash content was determined in muffle furnace for about 550 °C for 5-6 h, utile constant weight was obtained.

Mineral contents

Mineral ions were measured according to Zrig et al. (2011). Briefly, 0.1 g of powdered dry peel was extracted with 20 mL of 0.1 M nitric acid. After filtration, Mg, K, Na, Ca, Fe, Zn, Cu and Mn contents were determined with an atomic absorption spectrometer (Avanta, GBC, Australia).

Proteins content

The soluble protein content was determined according to the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin (BSA) as a standard.

Total phenolic content (TPC)

Briefly, 0.4 g of peel powder was extracted by maceration with 4 mL at 70°C for 30 min. The extraction mixture was centrifuged at 3000 rpm for 5 min. Thereafter, the methanolic extract was used to assess the total phenolic content and antioxidant activity.

TPC was determined according to Barreira et al. (2008) using the colorimetric method of Foline Ciocalteu. 0.5 mL of the methanol extract was mixed with 5 mL of distilled water in a test tube, followed by the addition of 0.5 mL of Foline Ciocalteu reagent, and allowed to stand for 5 min. Then, 0.5 mL of sodium carbonate solution (1%) was added. After 90 min of reaction at ambient temperature (20 ± 2°C) in dark, absorbance was read at 765 nm using a spectrophotometer (Shimadzu, Japan). TPC was calculated using gallic acid as the standard. Measurements were performed in triplicate, and results were expressed as milligram gallic acid equivalents (GAE) per gram of dry weigh.

Antioxidant activity

The free radical scavenging property of *Punica granatum* peels extracts was evaluated by spectrophotometric method using the DPPH test following the method reported by Wang et al., (2011). The percent antioxidant activities (AA%) were used to evaluate the free radical activity of the samples.

2.3. Statistical analysis: Data are reported as mean ± standard deviation (SD) of three replicates. Experimental data were subjected to analyses of variance (ANOVA) for a randomized block design using SAS statistical software version 6.12 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Where applicable, means were separated by Duncan's Multiple Range Test.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The Physicochemical characteristics of pomegranate peels of 'Gabsi' cultivar belonging to the three studied localities are reported in Table 1. The average fruit weight of pomegranate cultivars ranged between 388.27 g (Oudhref) and 522.1 g (Chenini). Peel percentages account for 34.26-37.31%. This content was comparable to that reported for Spanich pomegranate variety (Fernandes et al., 2015). It can be noticed that moisture content in peel ranged from 66.7% in Oudhref accession to 74.9% in Chenini accession.

Table 1. Some physicochemical characteristics of three selected pomegranate peels. Data of mineral content are expressed as mg/100 g of dry matter. Mean separation within lines by Duncan's Multiple Range Test ($P \leq 0.05$). Different letters indicate significant differences between accessions for a given element.

Components	Oudhref	Metouia	Chenini
Fruit weigh (g)	388.27b	471.93a	522.1a
Peel percentage (%)	36.84a	37.31a	34.26a
Moisture content (%)	66.72b	73.27a	74.91a
Ash content (%)	2.9b	4.65a	4.52a
Calcium	55.58a	45.70b	53.09a
Potassium	158.51a	179.27a	183.24a
Magnesium	17.33a	15.51b	17.48a
Sodium	58.02a	61.23a	63.11a
Iron	6.54a	2.18c	3.52b
Copper	0.56a	0.29b	0.25b
Zinc	0.83a	0.43b	0.49b

Fruits are considered as a good source of dietary minerals. The results showed that the pomegranate peels had high levels of potassium, calcium and sodium and, in contrast, very low levels of zinc, copper and iron. Potassium was the most abundant element and levels ranging from 158 (Oudhref) to 183 mg/100 g (Chenini). In addition, the contents in mineral elements observed in pomegranate peels are higher than those reported by Romelle et al. (2016) in the peels of other fruits such as apple and banana. According to Leterme et al. (2006), several factors like variety, state of ripeness, soil type, soil condition, and irrigation regime may cause variation in the mineral and trace elemental contents in different types of fruits as well as within different parts of the same fruit. Such composition confirmed the nutritional interest of pomegranate peels and allows us to consider them as an excellent source of bioelements. Indeed, magnesium and potassium may improve blood

pressure. Moreover, their high potassium content makes them a very suitable food ingredient to offset deficiencies in this mineral.

Table 2 reports protein contents, TPC values and antioxidant capacities of pomegranate peels of studied accessions. Our results show that the protein content is comparable for the pomegranate peels of three accessions. Protein contents range from 18.2 to 19.6 mg/g DM. These values are much higher than the value (7 mg/g DW) reported by Ismail et al. (2012), while are lower than the value (31 mg/ g DW) mentioned by Rowayshed et al. (2013) for Egyptian varieties.

The phenolic content can be used as an important indicator of antioxidant capacity of any product. The total phenols expressed as mg gallic acid equivalents per g dry weight (mg GAE/g DW) are highest in peel. Pomegranate peel is very rich in polyphenols (23 to 24% DW). These results show a richtness of peel in natural antioxidant. These results are in agreement with those found in previous studies (Ismail et al., 2012; Rowayshed et al., 2013; Kaderides et al., 2019). In addition, These quantities are relatively very important compared with those found in the peels of bananas, apple and orange whose contents are 74, 88.6 and 135.4mg GAE/g DW, respectively (Romelle et al., 2016).

Table 2. Proteins content, total phenolic content and antioxidant activity (AA%) in pomegranate peels. Mean separation within lines by Duncan's Multiple Range Test ($P \leq 0.05$). Different letters indicate significant differences between accessions for a given element.

Components	Oudhref	Metouia	Chenini
Protein content (mg/g DW)	19.6a	19.1a	18.2a
Total phenolic content (mg GAE/g DW)	232.14a	245.49a	239.67a
Antioxidant Activity (AA%)	85.4a	88.1a	86.7a

DPPH assay has been used widely and is a popular technique to assess the free radical scavenging activity of different plant extracts. In this study, we evaluated the antioxidant capacity in pomegranate peel using DPPH radical scavenging method and the results were expressed as the percentage of deactivation of the DPPH free radicals as shown in table 2. Our results reveal high antioxidant activity of all sample extracts. Indeed, the radical-scavenging ranges from85.4 to 88.1%. These results agree with previous works reporting high antioxidant power in pomegranate peels (Ismail et al., 2012; Romelle et al., 2016). Moreover, the present study also shows a good positive correlation (R^2=0.91) of the antioxidant potential based on the content of total phenols of the different extracts examined.

4. CONCLUSION

In recent years, the management of agriculture and agro-industrial residues has become an environmental concern and thus their recycling and valorization are encouraged. In the present investigation, pomegranate peel has shown a potential source of dietary minerals and phenolic compounds with antioxidant properties. We can conclude that this by–product of pomegranate could be used an excellent source of antioxidant in food and medicine preparation. However, further investigations are required to affirm the different biological characteristics of pomegranate peels.

REFERENCES

- Barreira J.C.M., Ferreira C.F.R., Oliveira B.P.P., Pereira J.A. 2008. Antioxidant activities of the extracts from chestnut flower, leaf, skins and fruit. *Food Chemistry*, 107: 1106–1113.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principe of protein-dye binding. Anal. Chem, 72: 248–254.

- Fernandes L., Pereira J.A., Lopéz-Cortés I., Salazar D.A., Ramalhosa E.C.D. 2015. Physicochemical changes and antioxidant activity of juice, skin, pellicle and seed of pomegranate (cv. Mollar de Elche) at different stages of ripening. Food Technol Biotechnol., 53: 397–406.
- Ismail T., Sesteli P., Akhtar S. 2012. Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *J Ethnopharmacol*, 143:397–405.
- Kaderides K., Papaoikonomou L., Serafim M., Goula A.M. 2019. Microwave-assisted extraction of phenolics from pomegranate peels: optimization, kinetics, and comparison with ultrasounds extraction. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 137: 1–11.
- Leterme P., Buldgen A., Estrada F., Londono A. M. 2006. Mineral content of tropical fruits and unconventional foods of the Andes and the rain forest of Colombia. *Food Chemistry*, 95: 644–652.
- Li Y., Guo C., Yang J., Wei J., Xu J., Cheng S. 2006. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, 96: 254–260.
- Romelle F.D., Rani P.A., Manohar R.S. 2016. Chemical composition of some selected fruit peels. *European Journal of Food Science and Technology*, 4: 12–21.
- Rowayshed G., Salama A., Abul-Fadl M., Akila-Hamza S., Mohamed E.A. 2013. Nutritional and Chemical Evaluation for Pomegranate (*Punica granatum* L.) Fruit Peel and Seeds Powders by Products. *Middle East Journal of Applied Sciences*, 3(4): 169–179.
- Wang Z., Pan Z., Ma H., Atungulu G.G. 2011. Extract of phenolics from pomegranate peels. *The Open Food Science Journal*, 5: 17-25.
- Zrig A., Tounekti, T., Vadel M.A., Ben Mohamed H., Valero D., Serrano M., Chtara C., Khemira H. 2011.Possible involvement of polyphenols and polyamines in salt toletance of almond rootstocks. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49: 1313–1322.

In vitro micropropagation attempts of the high value spice saffron (*Crocus sativus* L.)

Kaouther Ben Mahmoud[1], Jeweher Rebaii[2], Noura Jemai[3], Emna Jedidi[1], Ahmed Jemmali[1]
[1]National Institute of Agronomic Research of Tunisia, Tunisia.
[2]High School of Agriculture of Mograne, Zaghouane, Tunisia
[3]National Institute of Agronomy of Tunisia
Email: kaoutherbenmahmoud@gmail.com

SUMMARY
Saffron (*Crocus sativus* L.), a steril triploid specie in nature, is propagated by vegetative means through corms. Considering the very low propagation rate by this conventional method, micropropagation via tissue culture techniques may constitute an alternative way for its multiplication. In this regard, the present work has been realized in order to achieve an efficient protocol for this interesting specie. For axillary budding, apical and lateral buds were cultured on MS medium supplemented with different concentrations of 2.4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) and BAP (6-benzylaminopurine). They started sprouting after approximately 15 days of incubation. The best combination for buds development was 1 mg/l BAP and 1 mg/l 2.4-D. For adventituous organogenesis, corm segments were cultured on MS medium supplemented with 2,4-D or NAA in combination with BAP. Callogenesis has been observed after 2 weeks. The highest rate (80%) of callus formation was registered with 0.25 mg/l 2,4-D and 1 mg/l BAP. For shoot differentiation, calli were incubated on MS medium supplemented with various concentrations of some different plant growth regulators. BAP alone or combined with NAA was the best hormone for shoot multiplication. Corm induction has been performed on the half strength MS medium containing 30g/l of sucrose and supplemented with different combination of cytokinins (BAP, TDZ) and auxins (IAA, NAA and IBA). The best result was obtained in shoots cultured under continuous dark on half strength MS medium free from plant growth regulators.
Key words : adventituous organogenesis, axillary budding, corm, *Crocus sativus*

RESUME
Le safran (*Crocus sativus* L.) est une espèce triploïde stérile qui se multiplie par voie végétative par le bais des bulbes. Compte tenu de la lenteur de cette méthode conventionnelle de multiplication, la micropropagation via des techniques de culture des tissus peut constituer une méthode alternative. À cet égard, le présent travail a été réalisé afin de parvenir à établir un protocole efficace de multiplication pour cette espèce intéressante. Pour le bourgeonnement axillaire, les bourgeons latéraux et apicaux ont été cultivés sur un milieu MS additionné de différentes concentrations de 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique) et de BAP (6-benzylaminopurine). Ces bourgeons ont commencé à germer après environ 15 jours d'incubation. Le meilleur résultat pour le développement de ces bourgeons est obtenu en présence de la combinaison 1 mg / l de BAP et de 1 mg / l de 2,4-D. Pour l'organogenèse adventive, les segments de bulbe ont été cultivés sur un milieu MS additionné de 2,4-D ou de NAA en combinaison avec du BAP. La callogenèse a été observée après 2 semaines. Le taux le plus élevé (80%) de formation de cals a été enregistré avec 0,25 mg / l de 2,4-D et 1 mg / l de BAP. Pour la différenciation des pousses, les cals ont été incubés sur un milieu MS additionné de diverses concentrations de quelques régulateurs de croissance. Le BAP seul ou associé à l'ANA était la meilleure hormone pour la multiplication des pousses. L'induction de Corms a été réalisée sur le milieu MS/2 contenant 30 g/l de saccharose et additionné de différentes combinaisons de cytokinines (BAP, TDZ) et d'auxines (IAA, NAA et IBA). Le meilleur résultat a été obtenu chez les pousses cultivées à l'obscurité sur un milieu MS/2 dépourvu de régulateurs de croissance.
Mots-clés : Organogenèse adventive, bourgeonnement axillaire, bulbe, *Crocus sativus*

1. INTRODUCTION

Stigma of saffron (*Crocus sativus*) flower constitute the commercial product 'saffron' which is a spice of great economic value. *Crocus sativus,* a specie belonging to the family of *Iridaceae,* is a sterile triploid mutant of *Crocus cartwrightianus* (Deo, 2003).

Saffron is used for its various therapeutic purposes in medicine, food seasoning and coloring (karoğlu et al., 2007) and it is considered as the most expensive spice. It contains more than 150 volatile and aroma-yielding compounds and it also has many nonvolatile active components, many of which are caratenoids, including zeaxanthin, lycopene, and various α and ß-carotenes. Saffron's golden yellow-orange colour is primarily the result of α-crocin (Abdullaev, 2002).

Saffron is propagated conventionally by corms as the flowers are sterile and fail to produce viable seeds, so its cultivation is only possible via corm. Generally, only four to five cormlets per mother corm per season are produced. Such low multiplication rates of cormlets associated with problems of fungal infestation in fields restrain the availability of adequate planting material and hence drastically reduce propagation and development of saffron culture (Parray et al., 2012). In this context, considerable efforts have been made to improve saffron production technology (Molina et al., 2005). Application of tissue culture techniques for the propagation and genetic improvement of saffron has been emphasized by many studies (Isa and Ogasawara, 1988; Plessner et al., 1990; Sharma et al., 2008; Zeybek et al., 2012) and saffron propagation by direct and indirect organogenesis has been studied (Plessner et al., 1990 ; Blazquez et al., 2009 ; Zeybek et al., 2012).

In this report, we present a preliminary results of micropropagtion of *Crocus sativus* via direct and direct organogenesis. Different experiments concerning induction and development of shoots, corms and roots from corm explants have been reported in this paper.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Plant material and sample desinfection

Healthy saffron corms were collected from the region of Snad (southern Gafsa), situated in the south-west of Tunisia. The corms were classified into 3 lots according to their size ; L1 (1-2 cm), L2 (2.5-3cm) and L3 (4-5cm) (Fig. 1) and they were used as source of explants. For sample disinfection, the protective tunics of corms were carefully removed from the corms and then they were surface sterilized with 70% (v/v) of ethanol for 2 min followed by dipping in 0.1 % (w/v) $HgCl_2$ for 20 min. After that, the corms were rinsed three times with distilled sterile water to remove residual $HgCl_2$.



Figure 1 : classification of saffron (*Crocus sativus* L.) corms in three lots according to their seize ; L1 (1-2 cm), L2 (2.5-3cm) and L3 (4-5cm)

2.2. Explants sources

Corms of 1-5 cm in diameter were used as explant sources. All parts shown in figure 2 were used for the propagation of saffron i.e. the apical and the lateral buds were used for direct organogenesis, and the remaining parts of the corms were sliced into small sections (0.5-0.8 cm) and used for indirect oragnogenesis.

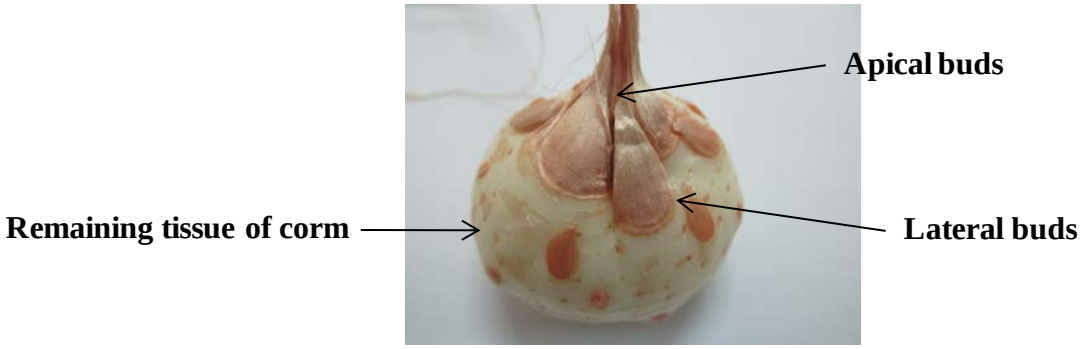


Figure 2 : Different types of explants of saffron (Crocus sativus L.) corm used for in vitro tissue culture

2.3. Nutrient media and culture conditions

In vitro micropropagtion of *Crocus sativus* L. was investigated via direct and indirect organogenesis. Various media compositions and culture conditions were designed for each set. MS media was supplemented with 3% sucrose, 100 mg/l ascorbic acid and various plant growth regulators. The pH of the media was adjusted to 5.7 by the addition of NaOH or HCl. Finally, the culture media were solidified with 0.8% plant agar and then sterilized by autoclaving at 121°C under the pressure of 1 bar for 30 min.

For axillary budding, apical and lateral buds were cultured on MS medium supplemented with different concentrations of 2.4-D (0, 0.5 and 1mg/l) and BAP (0, 0.5 and 1mg/l). Seven petri dishes containing each 5 explants were used for each treatment

For indirect organogenesis, callus induction from corm segments was performed on MS medium auditioned with 2.4-D at 0.25 mg/l combined with BAP at 0.5 or 1 mg/l. Corm parts other than apical and lateral buds were sliced into small sections and five explants were transferred into each petri dish. A number of 50 explants were used for the experiment of callus induction and growth. Explants were incubated in continuous dark for 3 months and subcultured on the same fresh medium every 4 weeks.

To initiate multiplication of the shoots, explants with induced callus were transferred to multiplication medium containing BAP (0.5 ; 1 ; 2 and 4 mg/l) alone or in combination with 0.5 mg/l NAA. These cultures were incubated under 16h/8h photoperiod for 6 months.

To induce corms and roots formation, the shoots previously obtained were cultured in half-strength MS basal medium containing 3% sucrose and auditioned with BAP (0 or 1 mg/l) and 2,4-D (0 or 1 mg/l) and incubated in the dark for 3 months.

In all experiments, explants were incubated in growth room at 25± 1°C.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Axillary budding

Apical and lateral buds were cultured on MS medium supplemented with different concentrations of 2,4-D and BAP. These buds started sprouting within approximately two weeks of culture (Fig. 3a). The best combination for bud development was 1 mg/l BAP and 1 mg/l 2,4-D. The importance of 2,4-D and BAP on direct organogenesis of saffron was reported in the literature. 2,4-D was essential for bud development *in vitro*, and it was most effective especially at 1mg/l for saffron shoot initiation (Plessner et al., 1990). Also, the requirement of BAP as cytokinin for direct organogenesis of saffron was also reported by some researchers (Himeno and Sano, 1987; Loskutov et al., 1999; Sarma et al., 1990).

Subsequent shoot development was inhibited by 2,4-D application and the best result was observed when BAP was used alone at relatively low concentration such 0.5 mg/l (Fig. 3b). Similar result was observed by Bhagyalakshmi (1999), who indicated that the presence of 2,4-D had a negative effect on further growth of shoots. Consequently, 2,4-D as an auxin could be excluded from the nutrient media to stimulate the further shoot growth.

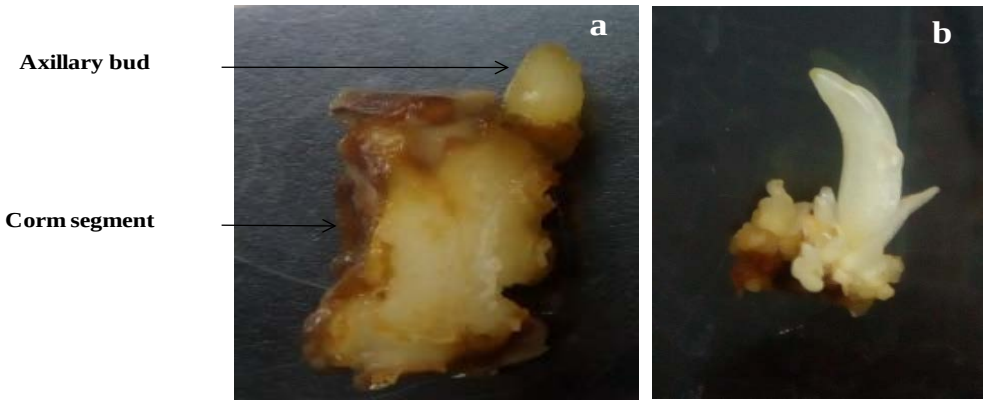


Figure 3 : (a) Axillary budding from corm segment of saffron (Crocus sativus L.) on MS medium containing 1 mg/l BAP and 1 mg/l 2,4-D after 15 days of culture, (b) Proliferation and development of shoots obtained via axillary budding after 3 subcultures on MS medium additonned with 0.5 mg/l BAP

3.2. Indirect organogenesis

Indirect organogenesis of saffron could be an important way to propagate this specie and induced calli represent a permanent source of plant material. In this context, plant growth regulators play an imperative function in various phases of the *in vitro* micropropagation of plants. In the literature on saffron indirect organogenesis, different kinds of media supplemented with different kinds and concentrations of PGRs were used (Plessner et al., 1990; Chaloushi et al., 2007; Sharifi et al., 2010; Zeybek et al., 2012).

In our experiment, we focused our experiments on two PGRs ; the 2,4-D as a strong auxin and the BAP as a most active cytokinin used in plant tissue culture. In fact, combinations between 2,4-D (0 or 0,25 mg/l) and BAP (0 ; 0,5 or 1 mg/l) were used to study their effect on the induction and growth of callus from saffron tissues (Table 1). No callus initiation was performed in the PGR-free medium. But, in PGR-containing media, calli were be observed after approximately 2 weeks of incubation (Fig. 4a and b). As shown in table 1, the callus frequency varies according to the size of the corm (source of explants) and the concentration of BAP. We note that in the presence of 0.25 mg/l BAP, the frequency increases as the size of the corm increases, the lowest frequency (62%) is recorded in the explants belonging to the lot 1 against a frequency of more than 77% in the explants of the lot 3. By contrast, in the presence of 1 mg/l of BAP, this frequency is inversely correlated with the size of the corm; it is around 74% for lot 1 against 48% for lot 3.

In general, the combination of these two PGRs in MS medium gave satisfying result concerning callus initiation and growth. This result is consistent with previous reports that showed a positive effect of different combinations of 2,4-D and BAP on the initiation of saffron callus (Plessner et al., 1990; Chen et al, 2003; Zeybek et al., 2012; Lagram 2016).

To induce adventitious shoots, developed calli were transferred on MS basal medium auditioned with BAP at higher concentrations (2 and 4 mg/l) alone or in combination with NAA and under photoperiod of 16/8 h. All combinations were able to initiate shoots from calli, and we could observed the emergence of shoots from calli after 2-3 weeks of culture. First, we noted the formation of several buds on callus (Fig. 5a), and then we observed the beginning of transformation of the buds on several adventitious shoots (Fig. 5b). Formed shoots continue to grow until they form a tufts of shoots on one explant. The tufts were then separated into several small tufts and then cultivated in the same medium for further growth. At higher concentrations of BAP, the rate of shoot induction is high (data not shown) but shoots were vitrified and leaves were white and translucide (Fig. 6). At low BAP concentration (0,5 mg/l), we obtained a satisfactory shoot induction rate with green leaves (Fig. 7). In previous study, it has been proved that BAP is one of

the most active cytokinin used in plant tissues culture to form adventitious shoots from callus (Lagram et al., 2016). It would give best results in respect of multiple shoot regeneration when it was combined with NAA (Vahedi et al., 2014)

Table 1 : Callus initiation from corm segments of saffron (*Crocus sativus* L.) cultured on MS medium containing 0,25 mg/l 2,4-D combined with BAP (0,5 or 1 mg/l) in relation to corm size

BAP concentrations (mg/l)	L1	L2	L3
0	0	0	0
0,5	62.85	74.28	77.88
1	74.28	57.14	48.57

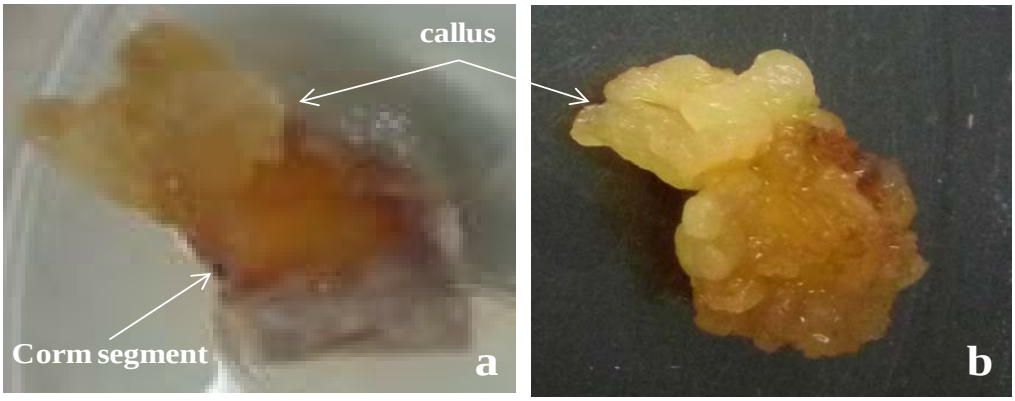


Figure 4 : Induction (a) and proliferation (b) of callus on corm segments of saffron (*Crocus sativus* L.) cultured on MS medium auditioned with 0.25 mg/l 2,4-D and 1 mg/l BAP after 2 weeks of culture

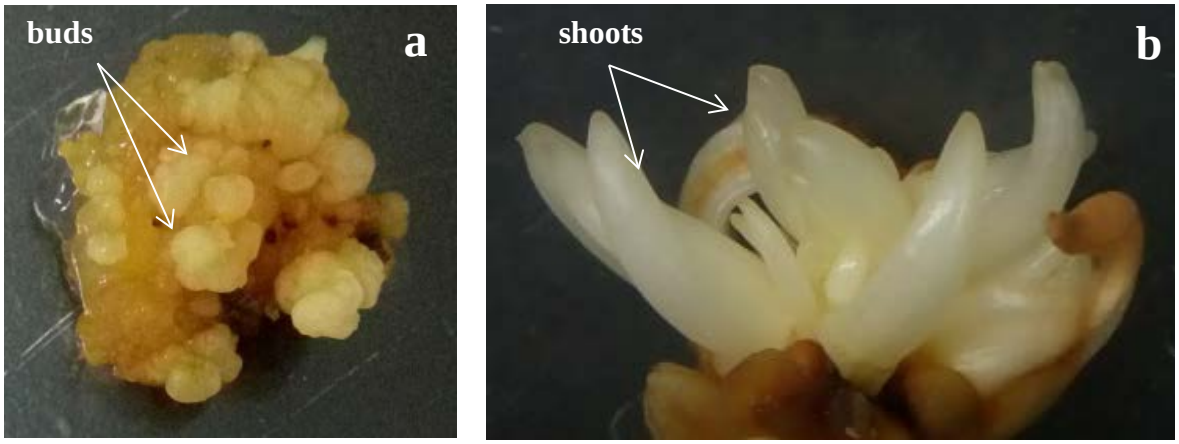


Figure 5 : (a) induction of buds from saffron callus cultured on MS medium containing 1 mg/l BAP and 0.25 mg/l 2,4-D, (b) development of buds in multiple shoots after transfer on MS medium auditioned with 0.5 mg/l BAP.



Figure 6 : Regeneration of vitrified shoots of saffron (*Crocus sativus* L.) from corm segments cultured on MS medium containing 6 mg/l BAP



Figure 7 : Regeneration of normal shoots of saffron (*Crocus sativus*) from corm segments cultured on MS medium containing 0.5 mg/l BAP

3.3. Corm and root formation

Shoots formed previously from callus were cultured in dark on MS/2 free of plant growth regulators or auditioned with at 1mg/l 2,4-D and BAP. After three months of culture, we observed three cases ; (i) no cormlet formation (Fig. 8a), (ii) cormlet formation without roots (Fig 8b) and (iii) cormlet and root formation (Fig. 8c).

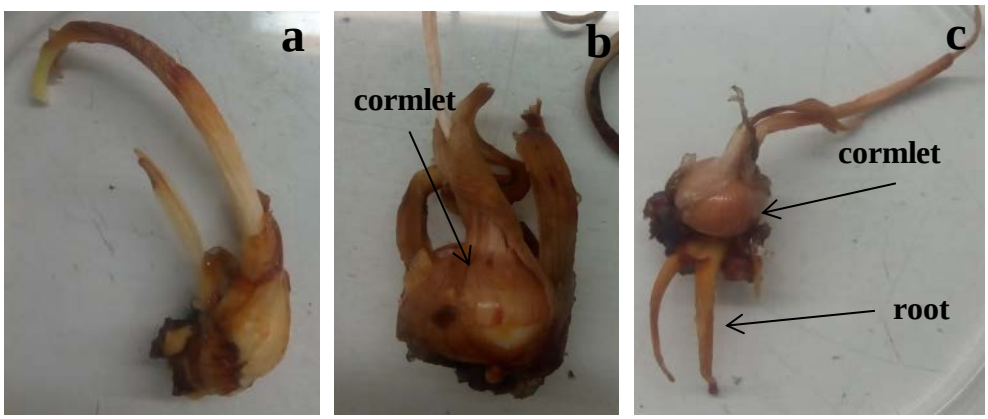


Figure 8 : Different cases observed after corm and roots formation phase on MS/2 free from plant growth regulators

As shown in table 2, there is no effect of growth regulators on the induction and formation of corms. In absence or presence of the BAP and 2,4-D in the culture medium, we obtained a percentage of around 75% corm formation. In previous study, regenerated shoots cultured on MS/2 basal medium containing BAP and 2,4-D at 1 mg/l for each showed a percentage of 50% of corm formation (Lagram et al., 2016).

In contrast, the initiation of root formation was totally inhibited by the addition of plant growth regulators in the medium; no root has been observed in presence of 2,4-D and BAP. In PGR-free MS medium, the percentage of root formation exceed 60%.

Table 2 : Percentage of corm and root formation on shoots cultured on MS/2 free from plant growth regulators or containing BAP (1mg/l) and 2,4-D (1mg/l)

	Corm formation (%)	Root formation (%)
MS/2	76,47	64,7
MS/2 + BAP (1mg/l) + 2,4-D (1mg/l)	75	0

4. CONCLUSION

To our knowledge, this work is a first report of the *in vitro* micropropagation of saffron (*Crocus sativus* L.) in Tunisia. It consists in a preliminary results on the micropropagation of saffron via direct and indirect organogenesis from cormlet segments. These trials will be further developed to establish an efficient protocol for mass multiplication of this high value spice.

REFERENCES

- Abdullaev, FI. 2002. Cancer chemo preventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). *Experimental Biology Medical*, **227**, 20-25.

Bhagyalakshmi N. 1999. Factors influencing direct shoot regeneration from ovary explant of saffron. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **58**, 205-211.

- Blazquez S, Olmos E, Hernandez JA, Fernandez-Garcia JA, Piqueras A. 2009. Somatic embryogenesis in saffron (Crocus sativus L.). histological differentaition and implication of some components of the antioxydant enzymatic system. *Plant Cell Tissue Culture*, **97**, 49-57.
- Chaloushi B Zarghami R, Abd-Mishani C, Omidi M, Agayev YM, Sardood BP. 2007. Effect of different hormanal treatments on the callus production and plant regeneration in saffron (Crocus sativus L.). *Pakistanina Journal of Biological Sciences*, **10**, 1625-1631.
- Chen S, Wang X, Zhao B, Yuang X, Wang Y. 2003. Production of crocin using Crocus sativus by two stage culture system. *Biotechnology Letters*, **25**, 1235-1238.
- Deo B. 2003. Growing saffron-the world's most expensive spice, crop and food research. *New Zealand Institure Crop Food Research*, **20**, 1-4.
- Himeno H, Sano K. 1987. Synthesis of crocin, picrocrocin and safranel by saffron stigma-like structures proliferated in vitro. Agriculture, Biology and Chemistry, 51, 2395-2400.
- Isa T, Ogasawara T. 1988. Effeicient regeneration from the callus of saffron (*Crocus sativus* L.). *Japanese Journal Breeding*, **38**, 371-374.
- Karoğlu C, Cocu S, Ipek A, Parmaksiz I, Uranbey S, Sarihan E, Arslan N, Kaya MD, Sancak C, Ozcan S. 2007. In vitro micropropagtion of saffron. *Acta horticulturae*, **739**, 223-227.
- Lagram K, Ben El Caid M, Atyane LH, Salaka L, Elboullani R, El Mousadik A, Serghini MA. 2016. In vitro shoots and micro-corms formations through indirect organogenesis of Moroccan saffron (*Crocus sativus* L.). *Acta Horticulturae*, **1184**, 97-108.
- Loskutov AV, Beninger CW, Ball TM, Hosfield GL, Nair M, Sink AC. 1999. Optimization of In vitro conditions for stigma-like structure production from half-ovary explants of Crocus sativus L. *In vitro Cell Development Biology Plant*, **35**, 200-205.
- Molina R, Valero M, Navarro Y, Garcia-luis A, Guardiola JL. 2005. Low temperature storage of corms extends the flowering season of saffron (*Crocus sativus* L.). *Journal of Horticultural Sciences and Biotechnology*, **80** :319-326.

- Parray JA, Kamili AN, Hamid R, Husaini AM. 2012. In vitro cormlet production of saffron (Crocus sativus L. Kashmirianus) and their floweringg response under greenhouse. *GM Crops and Food : Biotechnology in Agriculture and the Food Chain*, **4**, 289-295.
- Plessner O, Ziv M, Negbi M. 1990. In vitro corm production in the saffron crocus (*Crocus sativus* L.). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **20**, 89-94.
- Sarma KS, Maesato K, Hara T, Sonoda Y. 1990. In vitro production of stigma-like structures from stuigma explants of Crocus sativus L. *Journal of Experimental Botany*, **41**, 745-748.
- Sharifi G, Ebrahimzadeh H, Ghareyazie, B, Karimi M. 2008. *In vitro* cormlet development in *Crocus sativus*. *Biologia Plantarum*, **52**, 709-712.
- Sharma KD, Rathou R, Goel R, Sharma TR, Singh BM. 2008. In Vitro cormlet development in *Crocus sativus*. *Biologia Plantarum*, **52**, 709-712.
- Vahedi M, Kalantari S, Salami SA. 2014. Factors affecting callus induction and organogenesis in saffron (*Crocus sativus* L.). *Plant Tissue Culture biotechnology*, **24**, 1-9.
- Zeybek E, Onde S, Kaya Z. 2012. Improved in vitro micropropagation method with adventitious corms and roots for endangered saffron. *Open life Sciences,* **7**, 138-145.

Impact of *Streptomyces* spp. and *Glomus* spp. on growth of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) and suppression of fusarium wilt

Ghadbane Mouloud[a,b*], Benderradji Laid, Medjekal Samir [a], Belhadj Hani [b], and Harzallah Daoud[b]
[a] Department of Natural and Life Sciences, Faculty of Sciences, University of Mohamed Boudiaf-M'sila, PO Box 166 Ichebilia, M'sila, 28000, Algeria.
[b] Laboratory of Applied Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Natural and Life Sciences, University Ferhat Abbas, Setif 1 19000, Algeria.

SAMMARY
This study investigated the ability of *Streptomyces* spp. and *Glomus* spp. isolates to control the fusarium wilt pathogen of date palm (*Phoenix dactylifera* L.), *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, as well as the effect of these isolates on plant growth in the presence and absence of the pathogen. The genus *Glomus* is the most abundant fungi in rhizosphere of date palm in Biskra from Algeria. *Streptomyces* spp. BI21 showed the largest zone of inhibition against *F. oxysporum* f.sp. *albedinis* (35 ± 3 mm). In the absence or presence of the pathogen, the *Streptomyces* spp. BI21 and *Glomus* spp. A01 isolates increased all plant growth parameters of date palm. The initial results indicate the arbuscular mycorrhizal fungi and *Streptomyces* as a promising biocontrol agent for promoting growth of plants and also controlling palm date Fusarium wilt disease.
Keywords: Biocontrol, *Glomus* spp., *Streptomyces* spp., Rhizosphere, Fusarium wilt

RESUME
Cette étude a examinée la capacité des isolats de *Streptomyces* spp. et de *Glomus* spp. pour lutter contre la fusariose chez le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.), *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, ainsi que l'effet de ces isolats sur la croissance des plants en présence et en absence d'agent pathogène. *Glomus* est le genre du champignon mycorhizien le plus abondant dans la rhizosphère des palmiers dattier de Biskra en Algérie. *Streptomyces* spp. BI21 a montré la plus grande zone d'inhibition contre *F. oxysporum* f.sp. *albedinis* (35 ± 3 mm). En absence ou en présence de l'agent pathogène, les deux isolats *Streptomyces* spp. BI21et *Glomus* spp. A01 améliorent tous les paramètres étudiés de croissance du palmier dattier. Les résultats préliminaires indiquent que les champignons mycorhiziens arbusculaires et les *Streptomyces* sont des agents de lutte biologique prometteurs pour favoriser la croissance des plantes et également pour lutter contre la fusariose.
Mots clés : Lutte biologique, *Glomus* spp., *Streptomyces* spp., Rhizosphère, Fusariose

1. INTRODUCTION

Date palm (*Phoenix dactylifera* L.), a dioecious species that belongs to the Arecaceae family. It has a long history of cultivation and utilization in North Africa and the Middle East. The Bayoud disease, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa), represents a major limiting factor of date palm culture in Morocco and constitutes a serious threat to the date palm plantations in Algeria and all other countries (El Modafar, 2010).

Foa is an invasive pathogen responsible for wilt and cortical rot diseases in more than a hundred cash crops, including date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Bayoud disease, caused by this pathogen, destroyed two-thirds of date palm in North Africa, especially in Morocco (more than 10 million trees) and in the western and central parts of Algeria in 20th centuries (Shabani and Kumar, 2013).

Applying chemical pesticides is generally considered as the most effective and fastest strategy for plant disease management, however, no effective chemical product is available for Fusarium wilt in palm date. In addition, the application of chemical pesticides causes long-lasting adverse effects on ecosystems and human health (Karlidag et *al*., 2007; Sowndhararajan et *al*., 2012; Sathiyabama and Charles, 2015). The resistance of numerous pathogenic bacteria and fungi to commonly used bioactive secondary metabolites is presently an urgent focus of research, and new antifungal and antibacterial molecules are necessary to combat these pathogens (Kumar et *al*., 2011).

Hence, it is necessary for searching and developing non-hazardous biologically compatible alternatives. Such, biological control through application of microorganisms antagonistic to plant pathogens is an alternative and a sustainable strategy for plant protection. Inhibition or killing of harmful pests by biocontrol agents is biologically safe, target specific and without creating any environmental pollution (Karthik et *al*., 2015).

These fungi establish the arbuscular mycorrhizal association with roots of 80%–90% of vascular plants and provide an 87 array of benefits to ecosystems (Smith and Read, 2008). Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) live in symbiosis with most crop plants and represent essential elements of soil fertility and plant nutrition and productivity, facilitating soil mineral nutrient uptake and protecting plants from biotic and abiotic stresses (Battini et *al*., 2016). AMF can improve the growth of many plants by many pathways, known to increase nutrient uptake (Zhang et *al*., 2011), improve drought tolerance (Auge et *al*., 2015), improve salt resistance (Zhang et *al*., 2018), and reduce plant vulnerability to pathogens (Souna et *al*., 2010; Wehner et *al*., 2011; Veresoglou and Rillig, 2012). The use of plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) is a better alternative to solve this problem. They play an important role to increase in soil fertility, plant growth promotion, and suppression of phytopathogens for development of ecofriendly sustainable agriculture (Gupta et *al*., 2015).

The main objective of this study was to evaluate the effect of *Streptomyces* and AMF on growth of date palm seedlings cultivated at presence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* under controlled conditions.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Sampling and cultivation of *Streptomyces* spp. and AMF species

Streptomyces spp. BI21 and *Glomus* spp. 01 were isolated from the rhizospheric soil of indigenous legume *Astragalus gombo* Coss. & Dur. and date palm (*Phoenix dactylifera* L.) respectively growing in the desert region Biskra of Algeria (Fig. 1). *Streptomyces* spp. BI21 was maintained in yeast extract-malt extract agar medium (Ghadbane et *al*., 2015).

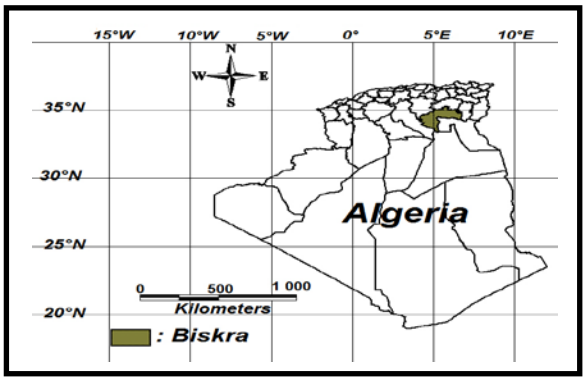


Figure 1: A map showing the sites from which the rhizosphere soil samples of *Astragalus gombo* and *Phoenix dactylifera* L. were collected

2.2. Determination of AMF root colonization

Roots from date palm (*Phoenix dactylifera* L.) were stained with trypan blue in glycerol after clearing with potassium hydroxide (Phillips and Hayman, 1970). AMF root colonization was estimated by light microscopy as described by Trouvelot et *al*. (1986). Overall frequency of mycorrhization (F%), percentage of root cortex colonization (M%) were calculated with the MycoCalc program (http://www.dijon.inra.fr/ mychintec/Mycocalc-prg/download.html).

2.3. Spore isolation and identification of AM fungi

One hundred grams of air dried soil sample was used for spore isolation. AMF spores were isolated using the wet sieving and decanting method of Gerdemann and Nicolson (1963). AM fungi were identified following the current taxonomic criteria (Schenck and Pérez 1990; Morton and Redecker 2001; Schüßler et *al*. 2001; Oehl and Sieverding 2004; Walker and Schüßler 2004), and using information from International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular–Arbuscular Mycorrhizal Fungi on the internet (http://www.invam.caf.wdu.edu). Spores were first mounted in water, and morphological characteristics were measured. Melzer's reagent and cotton blue were used in the identification.

2.4. AMF species and cultivation

Glomus spp. isolate A01 was used as inoculum for AMF colonization studies. The fungus was maintained and replicated using a monoxenic culture with transformed date palm (*Phoenix dactylifera* L.) roots according to the method established by (Declerck et *al*.,1998). Infected roots were kept growing in petri dishes containing modified Strullu-Romand (MRS) agar medium (Pérez-de-Luque et *al*., 2017). For inoculation of date palm in rhizotrons, the content of a petri dish was blended and mixed with 50 ml sterile distilled water. The concentration of spores was measured and adjusted to approximately 500–600 spores per ml, and 5 ml were added on the root of each plant in the rhizotrons.

2.5. In vitro Antagonistic Bioassay

Streptomyces spp. BI21 and *Glomus* spp. A01 were used to antagonistic bioassay against *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis.* The antimicrobial activity of isolates was performed by using the cross streak modified method (Ghadbane et *al*., 2015). ISP2 plates were prepared and inoculated with isolates by a single streak in the Petri plate and incubated at 30°C for 7 days. The plates were then inoculated with *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* by a single streak at 90° angles to *Streptomyces* spp. BI21 and *Glomus* spp. A01 strains and incubated at 24 °C of 7–10 days. Antagonism was observed by the inhibition of the test organism. All experiments were carried out in three replicates.

2.6. Production of lytic enzymes

Chitinase activity of *Streptomyces* spp. BI21 and *Glomus* spp. A01 isolates was examined using the modified method described by Gupta et *al.,* (1995) and Kawase et *al.,* (2004). The chitinase enzyme activity of the selected isolates was tested in nutrient agar medium containing 1% colloidal chitin. Chitinase production was assessed by visual examination of cleared zones developed around colonies incubated at 28 °C for 7 days. Protease activity of *Streptomyces* spp. BI21 and *Glomus* spp. A01 isolates was done as per the protocols of Bhattacharya et *al.,* (2009). Microorganisms were streaked on casein agar medium and incubated at 28 °C for 7 days. At the end of the incubation, the plates were observed for halo zone around the colonies, which indicates the presence of protease.

2.7. Determination of Potential Plant Growth Promoting traits of *Streptomyces* spp. BI21 and *Glomus* spp. A012

- Determination of indole acetic acid production

IAA production by bacterial and fungal strains was estimated based on the method of Gordon and Weber (1951) and Khamna et *al*., (2009). 500 µl of microbial culture was inoculated in 50 ml of nutrient broth added with 0.1% DL-tryptophan and incubated at 30±0.1°C for 2 days in the dark. After incubation, the bacterial cultures were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. Salkowski reagent (4 ml) was added to one ml of collected supernatant and after 30 min incubation pink color developed which indicated production of IAA. To quantify IAA, absorbance was taken at 535 nm by using UV/Visible spectrophotometer. The IAA concentration was estimated with a standard curve of IAA.

- Qualitative estimation of phosphate solubilization

Phosphate solubility was conducted qualitatively according to the method described by Franco-Correa et *al.,* (2010). *Streptomyces* spp. BI21 and *Glomus* spp. A01 isolates were spot-inoculated

onto minimal medium based on the Pikovskaya (PVK) medium described by Pikovskaya (1948). This medium contained (per liter): glucose, 10 g; $Ca_3(PO_4)_2$, 5 g; $(NH_4)_2SO_4$, 0.5 g; NaCl, 0.2 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 g; KCl, 0.2 g; yeast extract, 0.5 g; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0.002 g; and $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.002 g, supplemented with agar 10 g. The dishes were incubated at 28 °C for 7 days. A positive reaction was indicated by clear zones around the colonies.

2.8. Biological control assay

The biocontrol efficacy and growth promoting effects of *Streptomyces* spp. and *Glomus* spp. isolates were studied in growth room conditions with temperature 24 °C, 16 h light / 8 h dark photoperiod and relative humidity of 80 %. Pre-germinated seeds of date palm cultivar Daghlet Nour were grown in pots containing sand–peat-soil mixture (1:1:1 v/v/v). Soils were previously sterilized by autoclave (120 °C for 20 min) to prevent colonization by native microorganism. A fresh suspension of *Streptomyces* spp. BI21 approximately 1×10^6 CFU/ml in 1 ml , *Glomus* spp. A01 6×10^2 spores/ml with 0.01 % Tween-20 and 1 ml of *F. oxysporum* f.sp. *albedinis* approximately 1×10^5 CFU/ml were added to the planting mixture immediately before planting. Plants without *Streptomyces* spp.BI21, *Glomus* spp. A01 and *F. oxysporum* f.sp. *albedinis* served as control. Seeds were placed on the surface of the planting mix approximately 2 cm from to the pot (five seedlings per pot) and covered with a 0.5 cm layer of the sterilized sand and vermiculite mixture. Plants were fertilized weekly with a Murashige and Skoog (MS) solution Murashige and Skoog (1962), and watered as needed. The germination index and growth parameters, shoot height, shoot fresh weight, root fresh weight and root length were determined after six months. The proportion of root colonized by *Glomus* spp. A01 including frequency of mycorrhization (F%) and percentage of root colonization (M%) was determined by Trouvelot et *al*. (1986) method. The experiment was conducted with three replicates per treatment.

2.9. Statistical Analyses

All results were analyzed statistically with SAS software 9. Statistical differences between means were determined by one-way ANOVA with Duncan's multiple range with the level of significance established at $P < 0.05$.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Identification of Actinobacteria and AMF species

The actinobacteria strain was isolated from the rhizosphere of *Astragalus gombo* grown in the Biskra, Algeria. The ISP2 agar medium added with supplemented with streptomycin and amphotericin B was selected for actinobacteria isolation from rhizospheric soil samples. Actinobacteria BI21 isolate was confirmed as *Streptomyces* spp. based on morphological and cultural characteristics, according to the methods described in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Williams et *al*., 1989) and International Streptomycete Project (ISP) (Shirling and Gottlieb, 1966).

Arbuscular Mycorrhizal fungal spores were isolated from rhizosphere of date palm grown in Biskra using wet sieving and decanting technique. The structures of AMF were demonstrated in the date palm root (Fig. 2). Intercellular hyphae, hyphal coils, vesicle, arbusculate were detected in all date palm root samples observed. The vesicles are also of various shapes: oval, oblong. The presence of different mycorrhizal structures in the rhizospheric soil collected from the studied sites confirmed the mycorrhizal status of date palm, considered as a mycothrophic species (Bouamri et *al*., 2006). The roots of date palm were receptive to arbuscular mycorrhizal fungi (Khaliel and Abu Heilah, 1985). Endophytes were also observed in the roots of the date palm: septate hyphae and sclerotia in cells of the cortical parenchyma (Sghir et *al*., 2015).

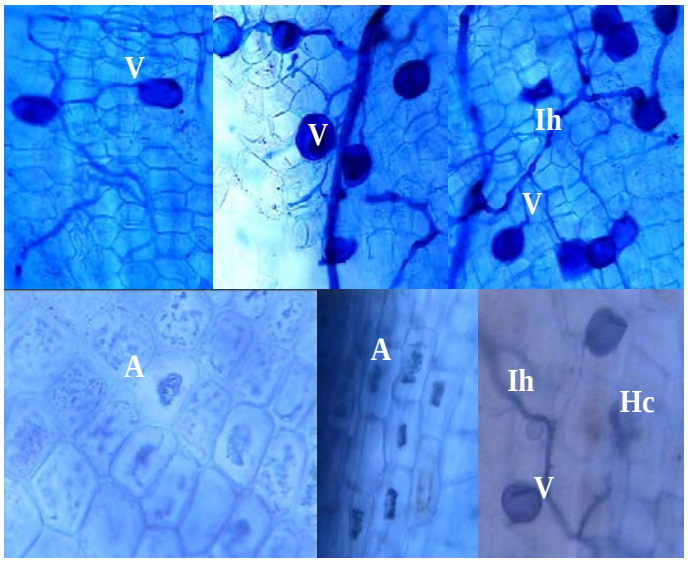


Figure 2: Anatomy of palm roots. Ih: Intercellular hyphae, Hc: Hyphal coils, V: Vesicle and A: Arbusculate.

A total of 26 morphotypes of AMF corresponding to four genera were recorded from the rhizosphere of date palm (Fig. 3). From the 26 morphotypes, a total of 10 species belong to the genus *Glomus* (Fig.4), two to the genus *Scutellospora*, four each to the genera *Gigaspora and Rhizophagus*, and six to the genus *Acaulospora* (Fig. 3). AMF belonging to the genus *Glomus* seem to be dominant in the rhizosphere of date palm in Biskra. This provides strong support for the conclusions of other workers that AMF belonging to *Glomus* tend to be dominant in arid ecosystems (Shi et *al*., 2006; Jaiti et al., 2007). The soil of the desert regions rich with endomycorrhizae provides favorable conditions for the growth and development of date palm trees by facilitating their access to minerals and water, and increased tolerance to abiotic stress conditions (drought, salinity of water or soil) and biotic (attacks of pathogenic microorganisms) (Sghir et *al*., 2014).

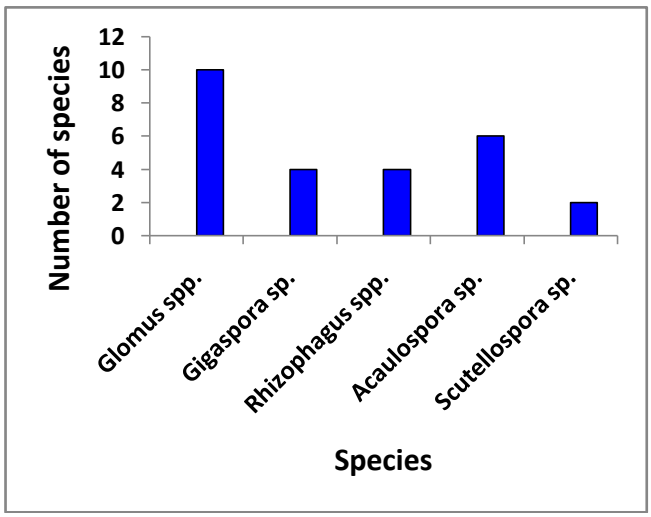


Figure 3: AMF species in 100 g in rhizospheric soil of date palm growing in Biskra.

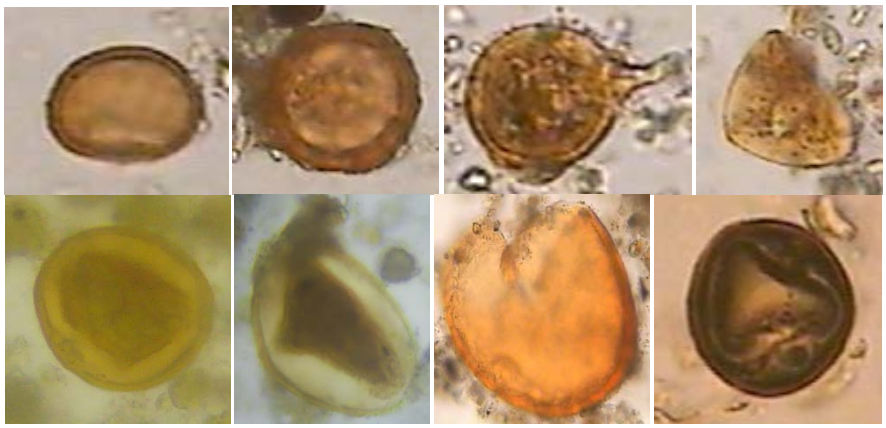


Figure 4: Spores of *Glomus spp* in the rhizosphere of date palm growing in Biskra.

3.2. Antagonisms

The actinobacteria was initially screened to determine their antifungal activity by following cross streak method. *Streptomyces* spp. BI21 strain exhibiting the ability to produce both clear zones of inhibition and metabolites against the tested pathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* ((Foa) was considered antagonistic. *Streptomyces* spp. BI21 showed highest inhibition growth against Foa with large zone of inhibition 35 ± 3 mm. However, *Glomus* spp. strain A01 appeared to have non inhibitory activity compared with Streptomyces spp. BI21 against Foa (Table 1).

Table 1: Plate assay for elucidation of functional traits of antagonistic and plant growth promoting *Streptomyces* spp. BI21 and *Glomus* spp. A01

Isolates	**Activity**				
	Chitinase	Indole acetic acid (IAA)	Protease	Phosphate solubilization	Antimicrobial
BI21	+	+	-	+	+
A01	-	+	+	+	-

- = Negative result
+ = Positive result

3.3. Chitinase and protease production by *Streptomyces* spp. BI21 and *Glomus* spp. A01

Streptomyces spp. BI21 induced complete clearance of chitin from the agar plates, even at locations up to 1,5 cm from bacterial colonies. However, *Glomus* spp. A01, was growth on the chitin agar, but no clearance of chitin. Proteolytic activity was detected for only *Glomus* spp. A01 isolate (Table 1). It has been reported that antifungal mechanism of antagonists has been attributed to the action of hydrolytic enzymes such as chitinase (Quecine et *al*., 2008) and protease (Naing et *al*., 2014).

3.4. Screening of Phosphate Solubilizing *Streptomyces* spp. BI21 and *Glomus* spp. A01

Qualitative estimation of P solubilization by *Streptomyces* spp. BI21 and *Glomus* spp. A01 isolates grown on Pikovskaya medium showed the development of a clear solubilization zone around the colony. In this study, *Streptomyces* spp. BI21 and *Glomus* spp. A01 were able to solubilize phosphate which was confirmed by appearance of largest halos around their colonies (translucent areas) in PVK agar medium (Table 1). Phosphorus is considered as growth-limiting macronutrient. Phosphate solubilizing microorganisms have been employed in agriculture and horticulture and have been considered very important due to their potential of ecological amelioration (Naik et *al*., 2008). The *Streptomyces* spp. BI21 and *Glomus* spp. A01 isolates tested seems to have the ability of solubilizing P sources in soil. Among the several potential mechanisms for phosphate solubilization

those involving the production of chelating compounds, like organic acids or by means of a modification of pH of the medium by the secretion of organic acids or protons are the more often described in the literature (Pikovskaya 1948; Richardson et *al*., 2009; Franco-Correa et *al*., 2010).The microorganism capable to solubilize phosphate offer great potential for agricultural applications as they increase the level of available P in soil for uptake by plants. The potential for phosphate solubilization of the target *Streptomyces* and *Glomus* supports future research for quantitative analysis.

3.5. Production of Plant Growth Promoting Hormone Indole Acetic Acid

The ability of *Streptomyces* spp. BI21 and *Glomus* spp. A01 to produce IAA was detected by the development of pink color in ISP2 and PDA culture medium respectively after the addition of salkowski reagent to the culture. The tow isolates were able to produce high levels of IAA (Table 1).

Interestingly, *Streptomyces* spp. strains BI21 produced highest amount of IAA as compared to *Glomus* spp. A01. Root exudates are important sources of natural tryptophan, which may enhance microbial biosynthesis of IAA and other auxins in the rhizosphere (Khamna et *al*., 2009). The level of IAA produced by such PGPR bio-inoculants will be critical in effecting beneficial root response and hence biomass productivity as well as plant cell division and proliferation (Kochar et *al*., 2011). Strains *Streptomyces* spp. and its IAA production could be recommended as useful bio-inoculants based on the plant growth parameters monitored.

3.6. Biocontrol potential and plant growth promotion assay

The effect of the actinobacteria and AMF was tested on date palm by inoculation assay in growth room conditions, using the representative isolate *Streptomyces* spp. BI21 and *Glomus* spp. A01. The biocontrol potential of these microorganisms was assessed according to their antimicrobial activity and activities of fungal cell wall degrading enzymes including protease and chitinase. The plant growth promoting potential of the strains was assessed according to their activities of solubilizing phosphate and siderophore, as well as their production of IAA. Microbial antagonists are widely used for the biocontrol of fungal plant diseases. Many species of actinobacteria, particularly those belonging to the genus *Streptomyces*, are well known as antifungal biocontrol agents that inhibit several plant pathogenic fungi and enhanced the growth of plant.

The germination rate was higher in treated seeds with *Streptomyces* spp. BI21 and *Glomus* spp. A01 in comparison to inoculated with Foa or un-inoculated control, and the lowest value for this indicator was reported in plants inoculated with Foa. This may be attributed to plant growth promoting activities. Although the germinating seeds derive most of the nutrients from reserve food material, plant growth substances like indole acetic acid, produced by *Streptomyces* spp. BI21 and *Glomus* spp. A01 may act as stimulants. A collective effect of many factors, such as production of antifungal substances (Souagui et *al*., 2015). and phytohormone (Spaepen and Vanderleyden, 2011). by strains, might be involved in increasing seed germination and controlling plant pathogenicity (Al-Askar et *al*., 2015; Sabaratnam and Traquair, 2015).

Table 2: Effect of *Strptomyces* spp. BI21 and *Glomus* spp. A01 and *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (Foa) strains on the, root length , root fresh weight, shoot height, shoot fresh weight, germination index and mortality of date palm (*Phoenix dactylifera* L.).

Strains	Root length (cm)	Root fresh weight (g)	Shoot height (cm)	Shoot fresh weight (g)	Germination index (%)	Plant mortality (%)
BI21	35 ± 3.0^{b}	3.8 ± 0.2^{b}	27.7 ± 0.6^{c}	4.1 ± 0.2^{b}	83.7 ± 3.2^{bac}	0.5 ± 0.8^{c}
A01	28 ± 2.7^{dc}	2.7 ± 0.2^{d}	25.0 ± 1.0^{d}	3.5 ± 0.2^{c}	87.7 ± 2.5^{ba}	0.8 ± 0.2^{c}
BI21+ A01	45.3 ± 3.5^{a}	4.6 ± 0.2^{a}	35.0 ± 2.0^{a}	5.1 ± 0.3^{a}	89.0 ± 2.7^{a}	0.4 ± 0.5^{c}
BI21+ Foa	29.7 ± 1.5^{c}	3.4 ± 0.3^{c}	25.0 ± 1.0^{d}	3.6 ± 0.2^{c}	$81.0\ \pm3.6^{bc}$	11.0 ± 2.7^{b}
A01+ Foa	23.3 ± 2.1^{d}	2.1 ± 0.1^{e}	21.0 ± 1.0^{e}	2.8 ± 0.3^{d}	$88.0\pm3.6b^{a}$	7.3 ± 0.6^{cb}

BI21+ A01+ Foa	37.3±2.5^{b}	4.0±0.1^{b}	30.0±1.0^{b}	4.3±0.2^{b}	80.0±5.0^{c}	10.3±1.5^{b}
Foa	12.3±2.5^{e}	0.8±0.2^{g}	8.7±1.5^{g}	1.1±0.1^{f}	20.0±5.0^{e}	97.7±2.5^{a}
Control	23.3±3.2^{d}	1.4±0.1^{f}	16.3±1.5^{f}	1.9±0.1^{e}	89.3±5.1^{d}	0.3±0.6^{c}

The values presented in the table are means ± standard errors. The same letter in the row indicates not significantly different values based on one-way ANOVA and Duncan's test ($P < 0.05$). Control: Plants without *Streptomyces* spp., *Glomus* spp. and Foa strains.

After 6 months, co-inoculation of *Streptomyces* spp. BI21 with *Glomus* spp. A01 in absence or in presence of pathogenic fungus Foa increased root fresh weight and root length, which differed significantly from control or other treatments (Table 2). Other researchers have also found that effectiveness of microbial inoculation depends on specific combinations of associated microorganisms and functional compatibility with the host (Azcón, 1993). Phytohormone production is among the mechanisms described for the rhizobacterial stimulating effect (Probanza et *al*., 1996). The date palm subjected to the dual inoculation treatment with *Streptomyces* spp. BI21 and *Glomus* spp. A01, and inoculation with these isolates alone exhibited a significantly higher shoot height and shoot fresh weight, than the non-inoculated controls or the inoculated with pathogenic fungi Foa. However, the Foa treatment caused a significant reduction in plant growth compared to the control plants or to the other treatments (Table 2). Bending et *al*., (2002), suggested that growth promotion of pine by mycorrhizas fungus and bacteria resulted from production of hormones, including indolacetic acid, which promote the formation of lateral roots. All the date palm seedlings, inoculated with *Streptomyces* spp. BI21, *Glomus* spp. A01 and Foa developed disease symptoms. Six month after BI21+Foa inoculation, 11 ± 2.65 % of the control plants died. With the application of A01 + Foa or BI21+ A01 + Foa, there was a significant reduction in plant mortality. Similar observations were reported by Morin *et al*. (1999). Beneficial rhizobacteria can directly influence the physiology of the plants and in addition to interacting directly to beneficially influence the mycorrhizal relationship and/or plant growth, specific bacteria together with AMF have been studied to create a more indirect synergism that supports plant growth including nutrient acquisition, inhibition of plant pathogenic fungi, and enhancement of root branching (Patil et *al*., 2013).

3.7. AMF colonization

The mycorrhizal colonization of the inoculated date palm is shown in Fig 5. All roots of date palm were successfully colonized by the AMF, and produced typical intraradical structures (arbuscules, vesicles, hyphae). AMF colonization rates were significantly affected by *Glomus* spp. A01, *Streptomyces* spp. BI21 and Foa and their interaction (Fig. 5).

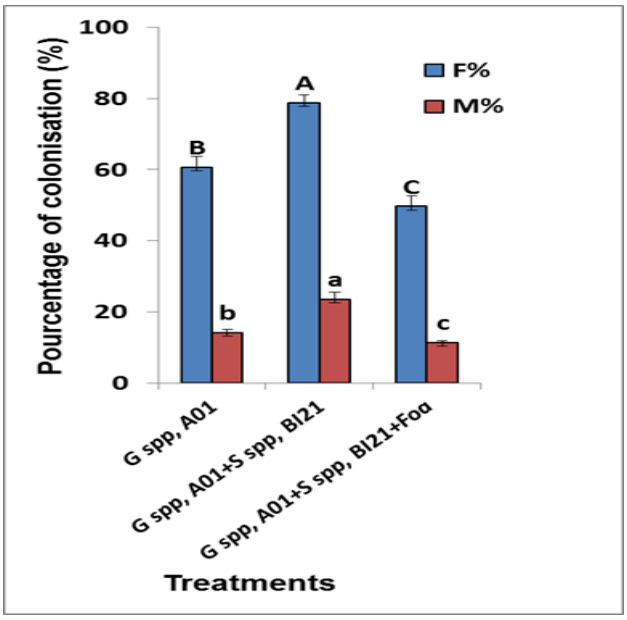


Figure 5: Frequency and intensity of root colonization by *Glomus* spp. A01 in date palm inoculated with A01, BI21 and Foa. The values followed by the same letter are not significantly different $P<0.05$ (Duncan's multiple range test).

The mycorrhizal colonization, estimated by the mycorrhizal frequency (F%) and mycorrhizal intensity (M%), showed differences between the infected and noninfected plant. As against, control plants which were grown in a sterilized soil showed no mycorrhizal colonization. The mixture of two *Glomus* spp. A01, *Streptomyces* spp. BI21, showed a significantly higher level of colonization than *Glomus* spp. A01. It is very interesting to observe that the dual inoculation *Streptomyces* spp. and *Glomus* spp. increased mycorrhizal infection. The higher proportion of mycorrhizal colonization was consistent across mycorrhizal structure such as arbuscules, vesicles and external mycelium. However, the lowest mycorrhizal dependency of date palm plants was recorded at the presence of Fao (Fig. 5). *Streptomyces* spp. BI21 stimulated the development of mycorrhizal roots after 6 months, doubling the mycorrhizal rate of roots by *Glomus* spp. A01 relative to the control (Fig. 5). Increase in mycorrhizal colonization of the roots or efficiency of mycorrhizal symbiosis caused by inoculation with bacteria was observed earlier by El-Shanshoury et *al*., (1989) and Gryndler et *al*., (2002). In natural conditions, bacteria associated with mycorrhizal fungi colonize the surface of extraradical hyphae or, at least in some fungal taxa, live in the cytoplasm as endobacteria (Bonfante and Anca, 2009).

4. CONCLUSION

In the present study, the plant growth promoting traits of *Glomus* spp. A01 and *Streptomyces* spp. BI21have been evaluated. The combinations of *Glomus* spp. A01 and *Streptomyces* spp. BI21 may increase the plant growth and resistance to pathogens. The inoculation of date palm with *Glomus* spp. A01 and *Streptomyces* spp. BI21 may help plants to obtain P and AIA which is beneficial for sustainable nutrient management and reducing the dependency on chemical fertilizers. The results confirmed the potential of applying mycorhizal and PGPR biotechnology in sustainable date palm culture in arid areas.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research. We greatly acknowledge Department of Natural and Life Sciences, Faculty of Sciences, University of Mohamed Boudiaf M'sila and Laboratory of Applied Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Natural and Life Sciences, University Ferhat Abbas-Setif, Algeria for their constant encouragement.

REFERENCES

- Al-Askar AA, Rashad YM, Hafez EE, Abdulkhair WM, Baka ZA, Ghoneem KM. 2015. Characterization of alkaline protease produced by Streptomyces griseorubens E44G and its possibility for controlling Rhizoctonia root rot disease of corn:. *Biotechnol Equip*, **29**, 457– 462.
- Auge, RM, Toler HD, Saxton AM. 2015. Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: a meta-analysis:. *Mycorrhiza*, **25**, 13–24.
- Azcón R. 1993. Growth and nutrition of nodulated mycorrhizal and non-mycorrhizal Hedysarum coronarium as a results of treatments with fractions from a plant growth-promoting rhizobacteria:. *Soil Biol Biochem*, **25**, 1037–1042.
- Battini F, Cristani C, Giovannetti M, Agnolucci M. 2016. Multifunctionality and diversity of culturable bacterial communities strictly associated with spores of the plant beneficial symbiont *Rhizophagus intraradices*:. *Microbiological Research*, **183**, 68–79.
- Bending GD, Poole EJ, Whipps JM, Read DJ. 2002. Characterisation of bacteria from *Pinus sylvestris-Suillus luteus* mycorrhizas and their effects on root-fungus interactions and plant growth:. *FEMS Microbiology Ecology*, **39,** 219–227.
- Bhattacharya A, Chandra S, Barik S. 2009. Lipase and protease producing microbes from the environment of sugar beet field:. *Indian J Agri Biochem*, **22**, 26–30.
- Bonfante P, Anca I-A. 2009. Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: A Network of Interactions :. *Annu Rev Microbiol*, **63**, 363–383.
- Bouamri R, Dalpe Y, Serrhini MN, Bennani A. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi species associated with rhizosphere of *Phoenix dactylifera* L. in Morocco:. *African Journal of Biotechnology*, **5**, 510–516.
- Declerck S, Strullu DG, Plenchette C. 1998. Monoxenic culture of the intraradical forms of *Glomus* sp. isolated from a tropical ecosystem: a proposed methodology for germplasm collection:. *Mycologia*, **90**, 579–585.
- El Modafar C. 2010. Mechanisms of date palm resistance to Bayoud disease: current state of knowledge and research prospects:. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **74**, 287–294.
- El-Shanshoury AR, Hassan MA, Abdel-Ghaffar BA. 1989. Synergistic Effect of VA Mycorrhizas and *Azotobacter chroococcum* on the Growth and the Nutrient Contents of Tomato Plants:. *Phyton*, **29**, 203–212.
- Franco-Correa M, Quintana A, Duque C, Suarez C, Rodríguez MX, Barea J-M. 2010. Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities:. *Appl Soil Ecol*, **45**, 209–217.
- Gerdemann JW, Nicolson TH. 1963. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting:. *Trans Brit Mycol Soc*, **46**, 235–244.
- Ghadbane M, Medjekal S, Belhadj H, Bounar R, Khellaf R, Benderradji L, Smaili T, Harzallah D. 2015. Biocontrol of chickpea wilt disease by *Streptomyces* sp. isolated from the rhizosphere of *Ononis angustissima* Lam.:. *World Appl Sci J*, **33**, 1414–1427.
- Gordon SA, Weber RP. 1951. Colorimetric estimation of indole acetic acid:. *Plant Physiol*, **26**, 192–195.
- Gryndler M, Vosátka M, Hrŝelová H, Catská V, Chvátalová I, Jansa J. 2002. Effect of dual inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria on growth and mineral nutrition of strawberry:. *Journal of Plant Nutrition*, **25**, 1341–1358.
- Gupta G, Parihar SS, Ahirwar NK, Snehi SK, Singh V. 2015. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Current and future prospects for development of sustainable agriculture:. *J Microb Biochem Technol*, **7**, 96–102.
- Gupta R, Saxena RK, Chaturvedi P, Virdi JS. 1995. Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potential in fungal cell wall lysis:. *J Appl Microbiol*., **78**, 378–383.
- Jaiti F, Meddich A, El Hadrami I. 2007. Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi in the protection of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) against bayoud disease:. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **71**, 166–173.

- Karlidag H, Esitken A, Turan M, Sahin F. 2007. Effects of root inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient element contents of leaves of apple:. *SciHorticult*, **114**, 16–20.
Karthik N, Binod P, Pandey A. 2015. Purification and characterization of an acidic and antifungal chitinase produced by a *Streptomyces* sp.:. *Bioresour Technol*, **188**, 195–201.
Kawase T, Saito A, Sato T, Kanai R, Fujii T, Nikaidou N, Miyashita K, Watanabe T. 2004. Distribution and phylogenetic analysis of family 19 chitinases in Actinobacteria:. *Appl Environ Microbiol*, **70**, 1135–1144.
- Khaliel A.S. and Abou-Heilah A.N., 1985. Formation of vesicular-arbuscular mycorrhizae in *Phoenix dactylifera* L., cultivated in Qassim region, Saudi Arabia:. *Pak J Bot*, **17**, 267–270.
- Khamna S, Yokota A, Lumyong S. 2009. Actinobacteria isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production:. *World J Microbiol Biotechnol*, **25**, 649–55.
Kochar M, Upadhyay A, Srivastava S. 2011. Indole-3-acetic acid biosynthesis in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Psd and plant growth regulation by hormone overexpression:. *Res Microbiol*, **162**, 426–35.
- Kumar H, Dubey RC, Maheshwari DK. 2011. Effect of plant growth promoting rhizobia on seed germination, growth promotion and suppression of Fusarium wilt of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.):. *Crop Protect*, **30,** 1396–403.
- Morin C, Samson J, Dessureault M. 1999. Protection of black spruce seedlings against Cylindrocladium root rot with ectomycorrhizal fungi:. *Canadian Journal of Botany*, **77**, 169–174.
- Morton JB, Redecker D. 2001. Two new families of *Glomales*, *Archaeosporaceae* and *Paraglomaceae*, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters:. *Mycologia*, **93**, 181–195.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture:. *Physiol Plantar*, **15**, 473–92.
- Naik PR, Raman G, Narayanan KB, Sakthivel N. 2008. Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil:. *BMC Microbiol*, **8**, 230.
- Naing KW, Anees M, Kim SJ, Nam Y, Kim YC, Kim KY. 2014. Characterization of antifungal activity of *Paenibacillus ehimensis* KWN38 against soil borne phytopathogenic fungi belonging to various taxonomic groups:. *Annals Microbiol*, **64**, 55–63.
- Oehl F, Sieverding E. 2004. *Pacispora*, a new vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal genus in the *Glomeromycetes:*. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, **78**, 72–82.
- Patil GB, Lakshman HC, Mirdhe RM, Agadi BS. 2013. Effect of co-inoculation of AM fungi and two beneficial microorganisms on growth and nutrient uptake of *Eleusine coracana* Gaertn. (Finger millet):. *Asian Journal of Plant Science and Research*, **3**, 26–30.
- Pérez-de-Luque A, Tille S, Johnson I, Pascual-Pardo D, Ton J, Cameron DD. 2017. The interactive effects of arbuscular mycorrhiza and plant growth-promoting rhizobacteria synergistically enhance host plant defences against pathogens:. *Scientific RePorts*, **7**, 1–10.
- Phillips JM, Hayman DS. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi:. *Trans Br Mycol Soc*, **55**,158–161.
- Pikovskaya RI. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species:. *Mikrobiol*, **17**, 363–370.
- Probanza A, Lucas JA, Acero N, Gutiérrez-Mañero FJ. 1996. The influence of native rhizobacteria on european alder (*Alnus glutinosa* [L.] Gaertn.) growth. I. Characterization of growth promoting and growth inhibiting bacterial strains:. *Plant Soil*, **182**, 59–66.
- Quecine MC, Araujo WL, Marcon J, Gai CS, Azevedo JL, Pizzirani-Kleiner AA. 2008. Chitinolytic activity of endophytic *Streptomyces* and potential for biocontrol:. *Lett Appl Microbiol*, **47**, 486–491.

- Richardson AE, Barea JM, McNeill AM. 2009. Prigent-Combaret C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms:. *Plant Soil*, **321**, 305–339.
- Sabaratnam S, Traquair JA. 2015. Mechanism of antagonism by Streptomyces griseocarneus (strain Di944) against fungal pathogens of greenhouse-grown tomato transplants:. *Can J Plant Pathol*, **37**, 197–211.
- Sathiyabama M, Charles RE. 2015. Fungal cell wall polymer based nanoparticles in protection of tomato plants from wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*:. *Carbohy Polym*, **133**, 400–407.
- Schenck NC, Pérez Y 1990. *Manual for the Identification of VA Mycorrhizal Fungi:*. 3rd edn: Gainesville, FL: Synergistic Publications.
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C. 2001. A new fungal phylum, the *Glomeromycota:* phylogeny and evolution:. *Mycological Research*, **105**, 1413–1421.
- Sghir F, Touati J, Chliyeh M, Touhami AO, Filali-Maltouf A, El Modafar C, Moukhli A, Oukabli A, Benkirane R, Douira A. 2014. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of date palm tree (*Phoenix dactylifera*) in Tafilalt and Zagora regions (Morocco):. *Int J Pure App Biosci*, **2**, 1–11.
- Sghir F, Touati J, Chliyeh M, Touhami AO, Filali-Maltouf A, El Modafar C, Moukhli A, Oukabli A, Benkirane R, Douira A. 2015. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of date palm tree (*Phoenix dactylifera*) in Tafilalt and Zagora regions (Morocco):. *The American Journal of Science and Medical Research*, **1**, 30–39.
- Shabani F, Kumar L. 2013. Risk Levels of Invasive *Fusarium oxysporum* f. sp. In Areas Suitable for Date Palm (*Phoenix dactylifera*) Cultivation under Various Climate Change Projections:. *PLoS ONE*, **8**, e83404.
- Shi Z Y, Chen Y L, Feng G, Liu RJ, Christie P, Li XL. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with the Meliaceae on Hainan island, China:. *Mycorrhiza*, **16**, 81–87.
- Shirling EB, Gottlieb D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species:. *Int J Syst Bacteriol*., **16**, 313–340.
- Smith SE, Read DJ. 2008. Mycorrhizal Symbiosis. Academic 978 Press, New York.
- Souagui Y, Tritsch D, Grosdemange-Billiard C, Kecha M. 2015. Optimization of antifungal production by an alkaliphilic and halotolerant actinomycete, *Streptomyces* sp. SY-BS5, using response surface methodology:. *J Mycol Médi*, **25**, 108–115.
- Souna F, Chafi A, Chakroune K, Himri I, Bouakka M, Hakkou A. 2010. Effect of Mycorhization and Compost on the Growth and the Protection of Date Palm (*Phoenix Dactylifera L.*) Against Bayoud Disease:. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, **4**, 260–267.
- Sowndhararajan K, Marimuthu S, Manian S. 2012. Biocontrol potential of phylloplane bacterium *Ochrobactrum anthropi* BMO-111 against blister blight disease of tea:. *J Appl Microbiol*, **114**, 209–218.
- Spaepen S, Vanderleyden J. 2011. Auxin and plant-microbe interactions:. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **3**, a001438.
- Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi-Pearson V. 1986. Mesure du taux de mycorhization VA d“un système radiculaire. Recherche de méthodes d”estimation ayant une signification fonctionnelle. In: Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. (Eds.), Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhiza. INRA Presse, Paris, pp. 217–221.
- Veresoglou SD, Rillig MC. 2012. Suppression of fungal and nematode plant pathogens through arbuscular mycorrhizal fungi:. *Biology Letters*, **8**, 214–7.
- Walker C, Schüssler A. 2004. Nomenclatural clarifications and new taxa in the *Glomeromycota*:. *Mycological Research*, **108**, 979–982.
- Wehner J, Antunes PM, Powell JR, Caruso T, Rillig MC. 2011. Indigenous arbuscular mycorrhizal fungal assemblages protect grassland host plants from pathogens:. *PLoS One*, **6**, e27381.
- Williams ST, Goodfellow M, Alderson G. 1989. Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943. 339AL. In: Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, Williams, S.T., M.E. Sharpe and J.G. Holt (Eds.). Williams and Wilkins Co., Baltimore. ISBN: 0-683-09061-5.

- Zhang T, Hu Y, Zhang K, Tian C, Guo J. 2018. Arbuscular mycorrhizal fungi improve plant growth of Ricinus communis by altering photosynthetic properties and increasing pigments under drought and salt stress:. *Industrial Crops & Products*, **117**, 13–19.
- Zhang T, Sun Y, Song YC, Tian CY, Feng G. 2011. On-site growth response of a desert ephemeral plant, Plantago minuta, to indigenous arbuscular mycorrhizal fungi in a central Asia desert:. *Symbiosis*, **55**, 77–84.
- http://www.dijon.inra.fr/ mychintec/Mycocalc-prg/download.html
- http://www.invam.caf.wdu.edu

Etude de la stabilité d'huile de noyaux de dattes au cours du stockage

Mouna Benmohamed[1], Hammadi Hamza[3], Sonia Boudiche[1], Tarek Tombari[2], Salwa Bornaz[1], Refki Ettaib[3]
[1]Ecole Supérieur des Industries Alimentaires, Tunis, Tunisie
[2]Institut Supérieur des Etudes Technologiques, Kébili, Tunisie
[3]Institut des Régions Arides, Médenine, Tunisie
Email: mouna_benmohamed@ymail.com

RESUME
Ce travail porte sur l'étude de la stabilité d'huile de noyaux de dattes variété «Deglet Nour». L'extraction d'huile à partir de la poudre du noyau de datte a été effectuée par deux procédés l'une par soxhlet avec de l'éther de pétrol (40°C) et l'autre par presse. L'extraction de l'huile par la méthode chimique Soxhlet a donné un rendement en huile de l'ordre de 8,8 %, en revanche, l'extraction par presse a donné un rendement de 3,5%. La stabilité d'huile pendant sept mois de stockage à la température ambiante a été suivie par des analyses physico-chimiques ; acidité, les indices de peroxyde, d'iode, de saponification et de réfraction et des analyses biochimiques ; teneur en polyphenols, chlorophylles, caroténoïdes et l'activité anti-oxydante et l'analyse de la composition acidique. Les résultats révèlent une augmentation des paramètres physico-chimiques, une diminution de la teneur en polyphénols et chlorophylles et une stabilité de la teneur en caroténoïdes et composition acidique.
Mots-clés : noyau de datte, huile du noyau de datte, stabilité

SAMMARY
This work relates to the study of the date seed oil stability of the "Deglet Nour" variety . Oil extraction from the date stones powder was done by two processes by soxhlet with petrol ether (40 ° C) and the other by press. Oil extraction by the chemical method Soxhlet have efficiency an oil of 8.8%, while press extraction yielded 3.5% of oil. Oil stability for seven months of storage at ambient temperature was followed by physico-chemical analyzes; acidity, indices of peroxide, iodine, saponification and refraction and biochemical analyzes; polyphenol, chlorophylls, carotenoids and anti-oxidant activity and acid composition analysis. The results reveal an increase in physico-chemical parameters, reduced polyphenol and chlorophylls content, and stability of carotenoid content and acidifiable composition.
Key words: date kernel, date kernel oil, stability

1. INTRODUCTION
Le palmier dattier **(***Phoenix dactylifera* L.) reste la culture dominante des zones arides chaudes, et qui presque toujours dans l'esprit du grand public occidental l'associe au concept du désert. En raison de ses utilités alimentaires, écologiques, sociales et économiques, le palmier dattier est l'arbre fruitier le plus apprécie par les populations des oasis **(**Tirichine**,** 2010**)**. Les noyaux comme sous-produits sont dans la plupart des pays producteurs de dattes jetés ou partiellement incorporés dans l'alimentation animale. Leur valorisation dans l'alimentation humaine reste très faiblement explorée, Par contre et à cause de leur richesse en protéines (2,3-6,4%), cendres (0,9-1,8%), sucres (5-6%), composés phénoliques (3120-4430 mg/100g), et matière grasse (7 à 13%) **(**AL-Farisi et al**.,** 2008**),** on peut les considérés comme une source d'alimentation humaine très importante. L'objectif de cette étude est de suivre les paramètres physicochimique et biochimique d'huile des noyaux des dattes au cours du stockage.

2. MATERIEL ET METHODES
2.1. Matériel végétal
Dans cette étude nous avons pris un lot de 12 Kg de noyaux de dattes biologiques de la variété «Deglet Nour» tunisienne, proviennent des dattes de la région de Kébili récoltés pendant le stade

« Tamar ». Ces noyaux sont nettoyés simplement par l'eau, dont, 2Kg sont broyés avec un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre de granulométrie la plus fine possible pour l'extraction par soxhlet. Pour l'extraction par presse, 10 Kg de noyaux sont concassés avec torréfaction de la moitié. La conservation se fait à l'air ambiant et dans des sachets alimentaires en plastique.

2.1.1. Extraction à chaud par soxhlet

Une prise d'essai de 250 g de poudre des noyaux de datte est introduite dans la cartouche, de soxhlet. L'huile est extraite à l'aide de l'éther de pétrole porté à l'ébullition 70°C pendant 6h. Après, la distillation du solvant est assurée par un rota vape. Pour obtenir une huile parfaitement nette, on fait une centrifugation (6000tours/min, pendant 15min) à fin d'éliminer tous les résidus.

2.1.2. Extraction à froid par presse (Presse à huile KK20 F)

Il s'agit d'une presse à vis de capacité 10 Kg/h, avec une puissance moteur égale 2KW leur dimension (largeur/longueur/hauteur) est 480*480*620mm**.** On a utilisé 5 Kg de noyaux de dattes non torréfiés.

2.2. Les analyses physico-chimiques et biochimiques

Les méthodes officielles ISO ont été utilisées pour la détermination de l'humidité (ISO 662), l'indice de peroxyde még02/Kg d'huile (ISO 3960), l'indice de réfraction (ISO 6320 : 2000), l'indice d'iode (g d'iode /100g d'huile) , Indice de saponification (mgNaOH/g d'huile) (ISO 3657: 2002) et l'acidité % d'acide oléique, la teneur en polyphénol a été déterminée selon la méthode de Gutfinger et elle est exprimée en (mg Acide gallique/Kgd'huile), l'absorbance a été mesuré à 725nm, la teneur en chlorophylle et caroténoïdes a été déterminée selon la méthode de Wolf et Mosquera Minguez et al, Le maximum d'absorption à 630,670 et 710 nm est relatif à la fraction de la chlorophylle et à 470 nm à la fraction des caroténoïdes. La détermination de la composition en acide gras totaux des huiles a été réalisée en préparant les esters méthyliques selon la norme internationale (COI/T.20/Doc. n°24). Ces esters ont été ensuite analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 L'acidité et l'indice de peroxyde

L'analyse de l'ANOVA a montré qu'il n'y a pas une différence significative (p=0.914) entre les différents huiles (HND). Ce qui provoque, que les procédés d'extraction n'ont pas un effet sur l'acidité des HND et ce qui indique que l'acidité peut dépendre à d'autres facteurs autre que le procédé d'extraction.. Les résultats montrent que l'huile extraite par soxhlet a l'indice le plus élevée par rapport à celle d'huile extraite par presse, avec des valeurs égales respectivement à 2.96méq d'O_2 actif/ Kg, et 0.99 méq d'O_2 actif/Kg. Le suivi d'acidité et l'indice de peroxyde au cours du stockage montre une augmentation de ses deux facteurs pour les deux échantillons d'huile de noyaux de dattes.

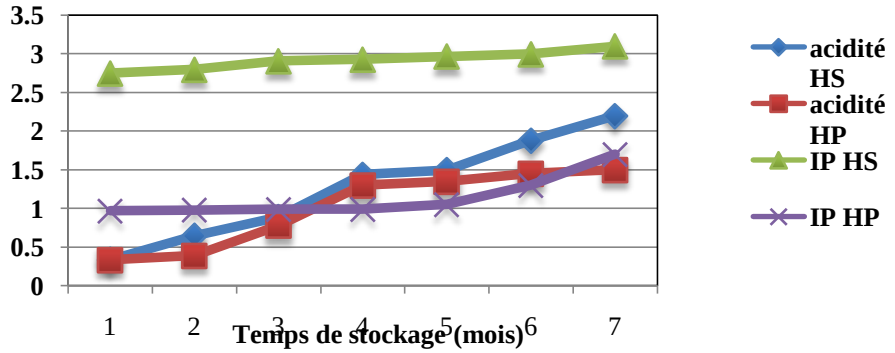


Figure 1 : Mesure d'acidité % d'acide oléique (HS : huile de soxhlet, HP : huile de presse), IP : indice de peroxyde méq d'O_2 actif/ Kg) (HS : huile de soxhlet, HP : huile de presse)

3.2. L'indice de saponification, l'indice d'iode et l'indice de réfraction

Les valeurs de l'indice de réfraction montrent, que ce paramètre est influencé par le procédé d'extraction et il est stable au cours de stockage. En donnant les valeurs respectivement égales à 1.446 pour HND extraite à chaud, et 1.454 pour HND extraite par presse. L'indice d'iode détermine quantitativement l'insaturation globale de corps gras. Plus il est élevé plus le corps gras est insaturé, (AFNOR des corps gras, 1982). Le test d'ANOVA a montré qu'il y a une différence hautement significative (p= 0.000) entre les deux échantillons des HND, l'indice d'iode augmente légèrement au cours du stockage. En effet, le procédé d'extraction a une influence sur l'augmentation de ce paramètre. L'huile obtenue par l'extraction par presse a un indice de saponification plus élevé que celui extraite par soxhlet avec des valeurs égales respectivement de 19.916, 17.41 et 15.32 mg NaOH/g.

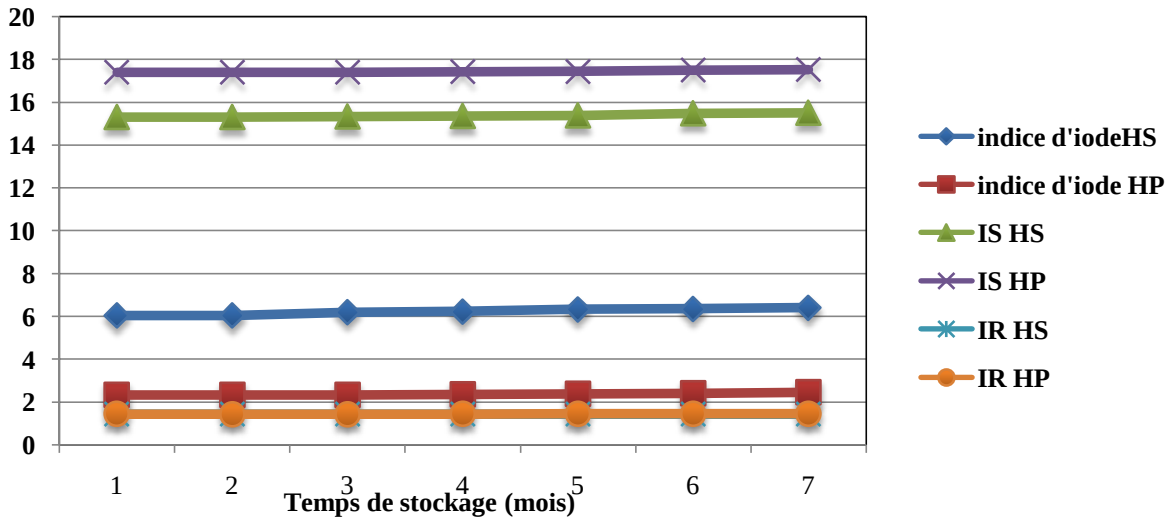


Figure 2 : l'indice d'iode g d'iode/100g huile (HS: huile de soxhlet, HP : huile de presse), IS : indice de saponification mg NaOH/g d'huile (HS: huile de soxhlet, HP : huile de presse), IR : indice de réfraction (HS: huile de soxhlet, HP : huile de presse).

3.3. Teneur en poly phénols, chlorophylle et caroténoïde

L'huile extraite par presse a une teneur en polyphénol plus importante que celui extraite par soxhlet. Un test d'ANOVA révèle une différence significative (p= 0.000) entre les deux échantillons d'huile pour la teneur en caroténoïde et en chlorophylle. Ces résultats montrent que le procédé d'extraction est un facteur important agit sur la qualité des huiles. Au cours du stockage, la teneur en polyphénol et chlorophylle diminue alors que la teneur en caroténoïde reste stable.

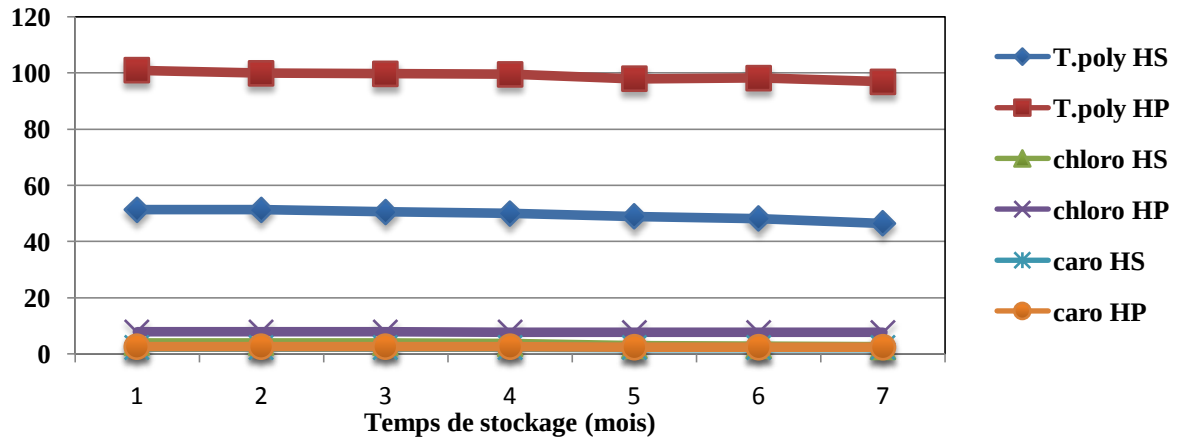
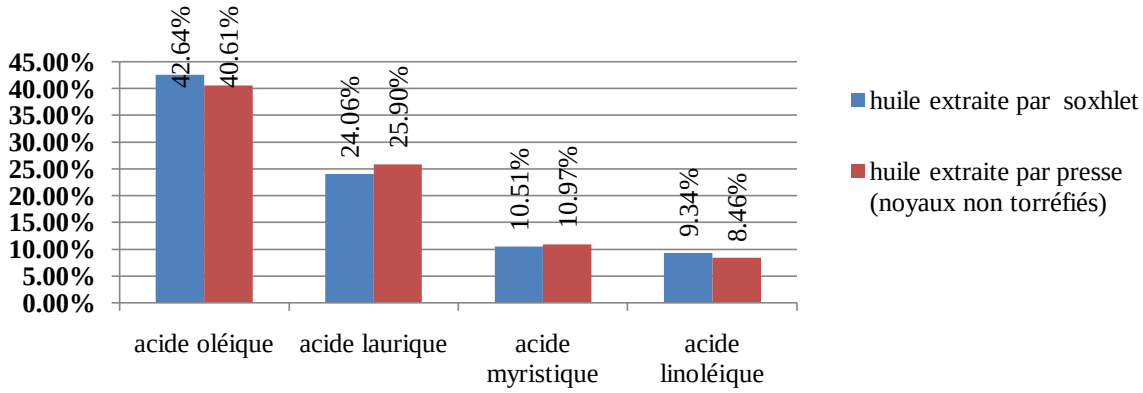


Figure 3 : teneur en poly phénols (mg d'acide gallique/kg) **(**HS: huile de soxhlet, HP : huile de presse) **;** teneur en chlorophylle (ppm) **(**HS: huile de soxhlet, HP : huile de presse) **;** teneur en caroténoïde (ppm) **(**HS: huile de soxhlet, HP : huile de presse).

3.4. Composition acidique

Les acides gras les plus abondants chez les deux échantillons d'huile sont l'acide oléique, l'acide laurique, l'acide myristique, et l'acide palmitique. L'acide le plus majeur chez les trois échantillons est l'acide oléique qui présente un critère de qualité important avec des pourcentages d'ordre de 42.22% pour l'huile extraite par presse de noyaux non torréfiés et de 42.64% pour l'huile extraite par soxhlet, suivi par l'acide laurique par un pourcentage oscille de 24.06 jusqu'à 25.9, l'acide myristique de 10.51 à 10.97%, l'acide palmitique de 8.6 à 9.19% et l'acide linoléique par un pourcentage le plus faible qui varie de 8.46 à 9.34%. Les résultats montrent que les huiles sont riches en acides gras insaturés, qui sont des acides gras essentiels.



Les acides gras les plus abondants dans l'huile des noyaux de dattes

Figure 4 : la composition acidique des échantillons d'huile du noyau de datte

4. CONCLUSION

D'après le suivie des caractéristiques physicochimique et biochimique d'huile au cours du stockage, les résultats révèlent une augmentation d'acidité, d'indice de peroxyde et d'indice d'iode, diminution de la teneur en polyphénol et chlorophylle. En revanche une stabilité de la teneur en caroténoïdes et composition acidique, l'huile du noyau de datte possède une grande stabilité. Le procédé d'extraction a un effet significatif sur la qualité d'huile.

REMERCIEMENTS

Les auteurs sont reconnaissants à la société *Nour Oasis*, huilerie *Ben Selma* et l'office national d'huile de Sfax.

REFERENCES

- Besbes S., Christophe B., Claude D., Georges L., Nour-Eddine D., Hamadi A., 2005. Heating effects on some quality characteristics of date seed oil. Food Chemistry, vol.91, 469–476.
- Gutfinger T., 1981. Polyphénols in olive oils,J.Am, Oil Chem. Soc., 58: 966-968.
- Gutfinger T., *Journal of American Oil Chemists' Society*. 58 (1981) 966
- Guerrero, Pigments Present in Virgin Olive Oil, *J. Am. Oil Chem. Soc. 67*:192–196 (1990).
- Mínguez-Mosquera, M.I., B. Gandul-Rojas, J. Garrido-Fernández, and M.L. Gallardo Wolff J-P. (1968). Manuel d'analyse des corps gras. Edition. Azoulay, Paris

Valorisation des écarts de triage des tomates géothermiques dans le sud tunisien

Refki Ettaib*, Tarek Tombari**, Mouna Ben Hammouda**, Ali ben Belgacem*, Besma Assadi*, Mouna Ben Mohamed**, Mohamed Sadok Belkhadi*
*Laboratoire d'Aridoculture et Cultures Oasiennes, Institut des Régions Arides, Médenine, Tunisie
** Institut Supérieur des Etudes Technologiques de Kébili, Kébili, Tunisie
Email : refki.ettaib1985@gmail.com

RESUME
La valorisation des écarts de triage des tomates géothermiques sous formes des plusieurs sous-produits ainsi que de mettre en évidence ses qualités nutritionnelles via des tests physico-chimiques et microbiologiques a montré que le rendement de tomate vers tomate lyophilisé est très faible qui ne dépasse pas le 3%. Les sous- produits étudiées ont des pH relativement faibles (pH<5) donc un avantage pour réduire considérablement la contamination par les microorganismes. Cette étude a montré aussi que la salinité de tomate séchée au soleil est plus élevée (4.28 ±0.06) que celle des autres conserves. D'autre coté, on constate que le degré de Brix de tomate concentrée est plus faible (1.63%), que celle de tomate témoin, séchée au soleil et lyophilisée avec une teneur, respectivement, de 2.83,7.13 et7.76%. Ainsi que le concentré de tomate permet de réduire la teneur en matière sèche en donnant une valeur plus équilibrée que celle des autres conserves. En se basant sur les analyses microbiologiques, le séchage solaire ou par lyophilisation peut réduire le risque de contamination des produits par les microorganismes et par conséquent la prolongation du délai de conservation.
Mots-clés: tomates géothermiques, physico-chimiques, microbiologiques, délai de conservation.

SAMMARY
The valorization of sorting differences of geothermal tomatoes in the form of the several by-products as well as to highlight its nutritional qualities via physico-chemical and microbiological tests has shown that the yield of tomato to freeze-dried tomato is very low which does not exceed the 3%, so this technique is unprofitable from a massive point of view compared to other techniques. The by-products studied have relatively low pH (pH <5) therefore an advantage to significantly reduce contamination by microorganisms. This study also showed that the sun-dried tomato salinity is the highest (4.28 ± 0.06) than that of other canned products. On the other hand, it is found that the degree of concentrated tomato Brix is lower (1.63%) than that of control tomato, dried in the sun and freeze-dried with a content respectively of 2.83%, 7.13% and 7.76%. Tomato concentrate reduces the dry matter content by giving a more balanced value than other canned foods. Based on microbiological analyzes, solar drying or freeze-drying can reduce the risk of microorganisms contaminating our products and consequently extending the shelf life.
Key words: geothermal tomatoes, physico-chemical, microbiological, shelf life.

1. INTRODUCTION
La géothermie est une source d'énergie qualifiée de nouvelle, douce et renouvelable ; elle a été utilisée dans plusieurs pays dans le domaine de l'agriculture pour chauffer les serres agricoles. Le chauffage des serres a commencé d'être appliqué au début de 1950 en Hollande, en Belgique et notamment dans les cultures ornementales ; les pays comme l'Italie, la France et l'Espagne ont considéré jusqu'à lors que les conditions favorables d'ensoleillement et de température ne justifiaient pas tel outil de production. Dans les années 1960, le coût de la thermie était tel que dans les installations réalisées, on cherchait à réduire le coût d'investissement sans se soucier du coût de fonctionnement auxquels conduisait le système de chauffage et de climatisation (B. Bouchekima et Y. Babi).
A l'heure actuelle, pour assurer le chauffage des serres, environ 23 pays utilisent intensivement l'énergie géothermique dans la production de fruits, légumes et fleurs sur une superficie évaluée

à700ha (Popovski, 1993). Cette technique est utilisée dans plusieurs pays. La Tunisie occupe la troisième place avec 191 ha installés dans les zones oasiennes dans le sud du pays. (GICA, 2016).
Pour combler le déficit en eau des oasis du Sud tunisien, l'exploitation de la nappe du continental intercalaire a été envisagée. Cette eau géothermique, naturellement chaude à une température entre 67 et 70°C (Hachicha et al., 2012), Les eaux géothermiques constituent une nouvelle source d'énergie pour le chauffage des cultures sous serre. Cette eau, puisée à partir de 1980 pour compléter l'irrigation des oasis, doit être refroidie. A cette fin, des cascades ont été construites, mais elles entrainent de grandes pertes d'énergie et d'eau de bonne qualité. La circulation de cette eau dans les serres permet d'assurer le chauffage des serres et de refroidir en même temps l'eau.
Le secteur des serres chauffées s'est développé très rapidement. Il a permis de promouvoir la production, de créer des emplois et d'exporter sur les marchés européens en hiver. Cette technique a démarré En 1984 pour la production de melon et de tomate de contre saison.
La création de forages dans la nappe du Continental Intercalaire pour combler le déficit en eau d'irrigation dans les oasis et permettre le développement des périmètres irrigués a été exploité pour développer un nouveau secteur agricole dans les régions oasiennes ; c'est la production des primeurs sous serres chauffées par les eaux géothermiques. En effet, dès le début de son démarrage au cours des années 80, le secteur a connu un développement rapide. Toutefois, et à fin de préparer une stratégie de développement du secteur, ce dernier a marqué une stagnation à partir de 1994 pour reprendre quelques années plus tard arrivant actuellement à 217 ha exploités Cette superficie étant répartie sur les trois principales régions géoserricoles à savoir :
La région de Gabes représentée par 23956 (t) soient 84% de la production totale, suivie par la région de Kébili représentée par 2860 (t) soient 10% de la production totale, et enfin la région de Tozeur avec 1839 (t) représentant 6% du total de la production (CTCPG ,2016).
Les principales cultures sous serres chauffées sont limitées à deux grandes familles agronomiques très rapprochées à savoir : les cucurbitacées représentées par le melon et le concombre et les solanacées représentées par les tomates.
La tomate est originaire d'Amérique du Sud, entre les régions du Chili, de l'Equateur et de la Colombie, mais sa domestication s'est effectuée dans le sud du Mexique et au nord Guatemala, formes sauvages de la "tomate cerise" (Jaramillo et al., 2007). Le Mot aztèque "tomate" signifiait simplement «fruit dodu» et les conquérants espagnols l'ont appelé "tomate". La tomate avec le maïs, les pommes de terre, le piment et la patate douce ont été introduits en Espagne au début du XVIe siècle avec les voyages de Colomb (Nestlé, 1995). Sa culture s'est ensuite propagée en Asie du sud et de l'est, en Afrique et au Moyen Orient. La production mondiale a augmenté de 35% au cours des dix dernières années et se répartit comme suit : l'Asie 45%, l'Europe 22%, l'Afrique 12%, l'Amérique du Nord 11%, l'Amérique du Sud et Centrale 8% (Leclerc et Raynal, 2014). La Tunisie est le 10ième pays producteur de la tomate à l'échelle mondiale.
Au cours de la campagne 2014- 2015, la production sous serres chauffées a atteint 28 655 tonnes dont 84 % de cette production est représentée par la tomate ; les quantités exportées ont atteint pendant cette même campagne 12031 tonnes dont 93% sont des tomates toutes catégories confondues : tomates cerises, grappes, rondes et allongées (CTCPG, 2016). En Tunisie, la culture de la tomate s'étend sur une superficie moyenne de 29 mille ha/an, offrant une production moyenne de l'ordre de 1.2 million de tonne. Cette production est issu des cultures de plein champ (Tomate de saison et tardive) et des cultures sous abri (serre froide et serre chauffées par les eaux géothermales).
La diversité culturale et la nature du fruit font de la tomate un produit qui est consommé aussi bien à l'état frais, transformé ou séché. La tomate occupe la première place au sein des cultures maraîchères occupant 25.647 ha et de production 23 741 tonnes au cours de la compagne 2015 (GICA. 2016). Sa culture sous serre connaît un grand essor dans le sud tunisien et principalement dans les régions de Gabes, Kébili et Tozeur : La tomate produite sous serre géothermique est caractérisé par une qualité gustative spécifique, due notamment à la composition minérale de l'eau et au microclimat du sud tunisien. Cette qualité a contribué au développement des exportations au fil des années ; elles sont passées de 1850 tonnes durant la compagne 2002-2003 à 23 741 tonnes durant la compagne 2014-2015(GICA. 2016). Les exportations tunisiennes des tomates proviennent essentiellement de la tomate fraîche issue principalement des cultures géothermales et de la tomate

transformée (concentré de tomate, tomate séchée…).La tomate géothermale se caractérise par une qualité gustative spécifique due notamment à la composition minérale de l'eau et au microclimat du sud Tunisien. Cette qualité a contribué au développement des exportations au fils des années. Les exportations de la tomate fraiche sont passées de 2481 tonnes durant la campagne 2004/2005 à 13981 tonnes durant la campagne 2013/2014. Les quantités exportées, timides au départ ont grimpé presque 42% en 2009/2010.Cette situation peut s'expliquer par une manque d'attention chez certains serristes pour garantir une production d'une qualité qui répond aux normes exigées sur les marchés internationaux .De plus, l'offre des légumes de primeurs(tomate) sur les marchés nationaux pendant les mois Avril et Mai est basse permettent d'un écoulement facile et aisé de la production à de prix concurrentiels

On distingue plusieurs méthodes de transformation de tomate :

- Séchage solaire

Le but du séchage des aliments est simple. Il s'agit de diminuer la proportion « d'eau libre » contenue dans l'aliment. L'eau libre est l'eau disponible pour le développement des microorganismes. Une diminution importante d'eau dans un aliment contribue donc à enrayer la prolifération des microorganismes.

La méthode la plus simple consiste à étendre les fruits et les légumes sur une surface noire et à laisser le vent et le soleil les sécher. Ce sont surtout les graines qui sont séchées de cette façon. La chaleur du soleil permet à l'eau libre contenue dans l'aliment de s'évaporer et le vent entraîne cette vapeur d'eau. L'air au-dessus du produit n'est donc jamais saturé en vapeur d'eau, ce qui facilite le séchage. L'image suivante est un schéma de cette méthode.

- Séchage par lyophilisation

La lyophilisation est une méthode de conservation des aliments .Le procédé industriel que nous utilisons aujourd'hui était autrefois appelé cryodessiccation en raison de la phase initiale de congélation. Le terme dessiccation signifie qu'on dessèche le produit et cryo signifie « froid » en grec. La cryodessiccation a été inventée en 1904 par des physiciens français. Ce n'est qu'en 1943 que le professeur Alexander Fleming proposa le terme lyophilisation appelée aussi séchage à froid, est un procédé qui consiste à retirer l'eau d'un aliment afin de le rendre stable à la température ambiante et de faciliter sa conservation. Elle utilisée principalement dans L'industrie alimentaire et l'industrie pharmaceutique. On peut décomposer la lyophilisation en trois étapes principales : Congélation : étape consiste à congeler les aliments pour que l'eau qu'ils contiennent soit transformée en glace. La température doit rester plus basse que -20 °C tout au long du processus de lyophilisation. Dessiccation primaire ou sublimation : C'est le passage d'une substance de l'état solide à l'état gazeux directement. On dessèche donc l'aliment ou le produit en le mettant sous vide : la glace devient de la vapeur et elle est récupérée. Dessiccation secondaire ou séchage final: cette étape débute par l'augmentation de La température spontanément lorsque toute l'eau a été sublimée et l'aliment est séché complètement. Une température variant entre 20 et 70 °C pendant deux à six heures permet d'amener une humidité résiduelle entre 2 et 8 %.La lyophilisation peut être utilisée pour la grande majorité des produits alimentaires: le café en poudre, le cacao en poudre (la compagnie Nestlé), des sachets de soupes et de sauces, des yogourts, des plats cuisinés et certains fruits et légumes (c'est notre cas ; la tomate géothermique). Le Tunisien serait le plus gros consommateur de tomates en conserve, parmi les populations productrices de ce fruit, dans le monde, avec une consommation annuelle individuelle estimée à 60 kg de tomates d'industrie (soit l'équivalent de 10 kg de double concentré de tomates). Ensuite, arrivent loin l'Italie avec une consommation individuelle annuelle de l'ordre de 30 kg de tomates en conserve par la suite les USA avec une consommation de 25 kg de tomates transformées. (Noureddine Aguerbi, directeur général de l'agroalimentaire au ministère de l'Industrie, dont les propos ont été rapportés par l'agence TAP). La Tunisie est le 10ème pays producteur de la tomate à l'échelle mondiale, compte 27 unités de production de tomates d'industrie. Les 24 unités opérationnelles sont implantées dans les régions de Nabeul (14), du Grand Tunis (4), de Béja, de Kairouan, du Kef et de Sidi-Bouzid (2).

2. MATERIEL ET METHODES

La zone originaire du matériel végétal fait partie de sous serre géothermique dans le sud tunisien, Ces serres sont localisées dans une batterie de serres dans le site géothermique de Bazma, situé à 4 km environ de la ville de Kébili. Abri - serres ou serres monotunnel, ont une largeur de 7 à 9,6 m, une hauteur de 2,80 à 4,7 m et une longueur de 60 m, soit une superficie couverte de 420 à 540 m^2. La variété «Elena» de tomate géothermal utilisée pour nos expériences est une produit d'arrière-saison, uniforme à peau lisse, forme arrondie, couleur rouge foncé, très charnu, de petite calibre, bonne saveur. Cette variété présente en grande quantité dans le supermarché tunisienne. Ces fruits ont été collectées puis stockées à 4°C jusqu'au début de conditionnement.

2.1. Préparation de sous-produits de tomate géothermique.

Les même étapes essentielles dans chacune des trois techniques de préparation de conserves de tomates sont illustrées dans la figure 1.

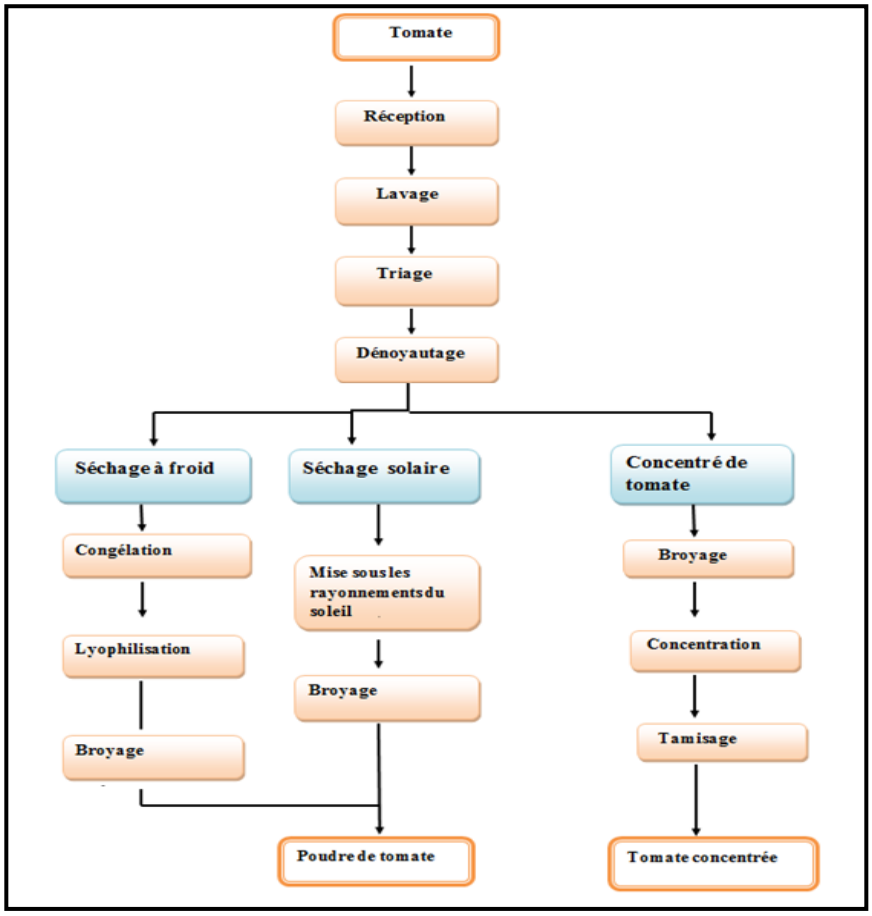


Figure 1. Les étapes de préparation des différentes conserves de tomate géothermique.

2.2. Méthodes d'analyses physico-chimiques

Le but de cette étude est de comparer la qualité nutritionnelle des quatre sous-produits de tomate géothermique vis-à-vis les paramètres suivants: pH, acidité titrable, taux de brix et cendres. Cette étude a été accomplie au niveau du laboratoire biotechnologique à l'IRA de kébili.

2.2.1. Détermination du rendement de la tomate

Le rendement de la tomate est donné par l'expression mathématique du poids du produit obtenu après séchage ou cuisson à partir du poids initial de la tomate fraiche .le rendement est calculée selon la relation suivante : Rendement(%) = (mto/mpf)) *100

Avec mto : masse de tomates obtenues et mtf : la masse de tomate fraîche.

2.2.2. Mesure du pH

La mesure précise du pH c'est la mesure de l'activité chimique des ions hydrogène H+ qui présentent sous la forme d'hydronium .Plus couramment le pH mesure l'acidité et la basicité de la solution dans un milieu aqueux à 25°C. On pèse 10 g à l'aide d'une balance numérique d'échantillon de tomate et on le met dans un bêcher et on y ajoute 9 fois son volume d'eau distillée (Préparation de solution mère). Après l'agitation, on procède à un étalonnage du pH-mètre, puis on immerge complètement la sonde dans la solution. La lecture se fait directement sur l'écran. La sonde est nettoyée avec l'eau distillée avant chaque mesure (Dossou et al., 2007).

2.2.3. Mesure de la conductivité électrique

C'est la mesure de la capacité d'eau à conduire un courant électrique qui consiste à déterminer la salinité de la tomate. Après l'agitation, on immerge la sonde dans la solution mère et on lit la valeur directement sur l'écran du conductimètre (ms).

2.2.4. Détermination de la salinité

C'est la masse de sels (composés ioniques) dissous dans 1 L d'eau c'est-à-dire leur teneur globale en sels. Elle s'exprime en g par kg d'eau. On détermine la salinité par mesure de la la conductivité en utilisant la formule suivante : Salinité = CE*0.6, avec :CE : conductivité électrique

2.2.5. Mesure de degré de Brix

Le degré de Brix est la mesure de matière sèche soluble exprimée en pourcentage. Cette mesure est fortement liée à la température de 25°C car elle influe sur l'indice de réfraction. On dépose quelque gouttes de la solution mère sur la lentille et on lit la valeur de Brix sur l'écran de refractomètre.

2.2.6. Détermination d'acidité titrable

Cette méthode consiste à un titrage de l'acidité avec une solution d'hydroxyde de sodium en présence d'un indicateur coloré (phénolphtaléine). Le but de ce dosage est de mesurer approximativement la teneur totale du produit en acides naturels par leur neutralisation dans un échantillon .Chez la tomate, l'acidité qui domine est celle de l'acide citrique avec 75 à 80% de l'acidité totale dans le produit transformée. La détermination de l'acidité titrable dans la pelure consiste à verser 5 ml de solution mère dans un bécher, et on y ajoute 15 ml d'eau distillée et 3 ou 4 gouttes de phénolphtaléine (indicateur coloré), puis on le met sous agitation tout en maintenant un chauffage.

2.2.7. Détermination de l'humidité

Elle est déterminée par dessiccation dans une étuve maintenue à105°C jusqu'à ce que le poids devient constant. La différence de poids correspond à la perte d'humidité et le résidu caractérise la teneur en matière sèche de l'échantillon. Toutes les analyses sont effectuées en triple. On a pesé 5 g de chaque échantillon en boite de pétri (poids frais) et on le met en étuve à 105°C / 1atm pendant 24h, puis on mesure les échantillon secs (poids secs). La détermination de taux d'humidité dans l'échantillon s'effectue de la manière suivante : %H=100*(poids frais –poids secs)/poids frais

2.2.8. Détermination de teneur en cendres

Lorsque l'échantillon, préalablement séché, est soumis à une incinération à 550°C, la matière organique se consume et la matière résiduelle constitue la matière minérale. Toutes les analyses sont effectuées en triple. À partir de les échantillons qui ont été séchés dans l'étuve à une température de 105°C pendant 24h, on pese 1g de chaque échantillon dans des creusets, puis on les mets dans un four à moufle à 550°C pendent 4h. Nous le laissons refroidir à l'intérieur du four pendant une demi-heure. Le résidu obtenu représente les cendres qui, par différence, donne la matière organique contenue dans l'échantillon. Le pourcentage des cendres est calculé par l'expression suivante :

%cendres = ((Mc-Mv)/ (M (v+pe)-Mv))*100

Avec :

Mc : la masse de creusets plus cendre, Mv : la masse de creusets plus vide, et M (v+pe) : masse de creusets vide et prise d'essai.

2.3. Méthodes d'analyses microbiologiques

Pour chaque échantillon, on réalise une dilution de 1/10 et ceci en mélangeant 1 ml de l'échantillon avec 9 ml de EPT. Le test utilisé est le test pétri film qui se fait 3 fois pour chaque échantillon. Après incubation, le compostage des colonies est fait directement à l'aide d'un compteur électronique des colonies.

Les coliformes sont des bâtonnets Gram négatif produisant de l'acide et des gaz par la fermentation du lactose. On a utilisé un milieu sélectif de type VRBL (violet red bile lactose), composée de sels biliaires, de cristal violet et rouge neutre, d'un agent gélifiant soluble dans l'eau froid et d'indicateur coloré facilement lisible. Le temps d'incubation est 24h et la température d'incubation est de 30°C.

2.3.1. Démembrement des colonies

Le démembrement se fait à l'aide d'un compteur de colonies, les colonies rouges gazogènes sont comptées et multipliées par facteur de dilution.

2.3.2. Détermination de levures et moisissures

Les levures possèdent une forme ovale, de contour bien défini et de couleur beige rosé à bleu vert et ne présentent pas un centre de couleur intense. Les moisissures sont des larges colonies aux contours diffus et de centre une couleur intense. C'est un milieu de culture prêt à l'emploi qui contient des éléments nutritifs, des antibiotiques, un agent gélifiant soluble dans l'eau froide et un indicateur qui facilite la lecture des résultats. Le temps d'incubation est 3 à 5 jours et la température d'incubation est égale à 25 °C. Les colonies vertes ou bien beiges sont comptées et multipliées par le facteur de dilution. Le nombre est considéré incompatible si le nombre réel est supérieur à 106.

2.3.3. Détermination d'entérobactéries

Les entérobactéries ont une morphologie habituellement typique de type bacilles à Gram négatif de 2-3 µ de long sur 0,6 µ de large, généralement, polymorphes. Les entérobactéries poussent facilement sur les milieux ordinaires en aérobiose et en anaérobiose. Leurs exigences nutritionnelles sont, en général, réduites et la plupart se multiplient en milieu synthétique avec une source de carbone simple comme le glucose. Il faut que le nombre de colonies ne dépasse pas 300 pour que le produit soit valable.

2.4. Analyse statistique

Le test ANOVA (one-way-analysis of variance) a été utilisé pour mettre en évidence l'existence d'une différence significative, en utilisant le test de Duncan à un intervalle de confiance de 95%. Toutes les analyses sont effectuées en trois répétitions et les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ±SD. Avec SD : écart type.

3. RESULTAT ET DISCUSSION

3.1 Préparation de sous-produits de tomate géothermique

La figure 2 présente les différents sous-produits de tomate géothermique (produit local) obtenues à la suite des deux types de séchage et une méthode de production de concentré de tomate. Il est à signaler que la tomate issue le séchage par le lyophilisateur montre un aspect totalement différent que les autres produits issus de séchage solaire et le concentré par cuisson. La tomate lyophiliser est de couleur rose (en poudre) et avec l'ajout d'eau devient rouge, alors que celle séchée avec solaire est plus sombre et le concentré est plus clair. Ceci est en accord avec les travaux de Nsren Alibitar (2010) qui a noté que la déshydratation à chaud provoque un changement de couleur et de composition par rapport à la matière fraiche par contre la lyophilisation est une technique trop fiable qui permet de garantir la conservation du maximum des composés alimentaire.

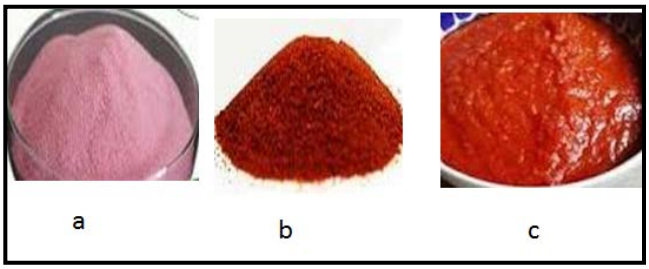


Figure 2. Les différents sous-produits de tomate géothermique. a: tomate lyophilisé, b: tomate séchée à solaire et c: concentré de tomate

3.2. Evaluation des rendements de tomate pour chaque sous-produit

Le Tableau 1 illustre le rendement de production d'un seul kilogramme vers les sous-produits étudiés en se basant sur la masse initiale (masse de produit à l'état fraiche) et la masse obtenu après nos opérations. Les résultats obtenus montrent que les conserves préparées par lyophilisation (retirer l'eau totalement du produit) a le rendement le plus faible (3%), ainsi cette technique semble être non rentable de point de vue massif par rapport aux autres techniques.

Tableau 1. Rendement de 1 kg de tomate fraîche.

Produit	Tomate lyophilisée	Tomate séchée au soleil	Tomate concentrée
Rendement (%)	3	10	16.66

3.3. Caractérisations physicochimiques de nos produits

3.3.1. pH

Les valeurs des pH situées entre 4,74 et 4,87 pour les quatre produits étudiés sont identiques. Le pH relativement faible (pH<5) est un avantage du point de vue de la stabilité. En effet, cette acidité réduit considérablement le taux et la gamme de microorganismes pouvant se développer sur le produit. Seuls les micro-organismes acidophiles, notamment les levures, les moisissures, les entérobactéries et les coliformes peuvent s'y développer puisque le pH minimum requis pour le développement de tels micro-organismes est 4,3 selon (Rozier et al., 2009), alors que le pH des produits fabriqués dépasse cette valeur (4.3). L'indice de réhydratation permet d'apprécier la quantité d'eau pouvant être absorbée pendent la préparation.

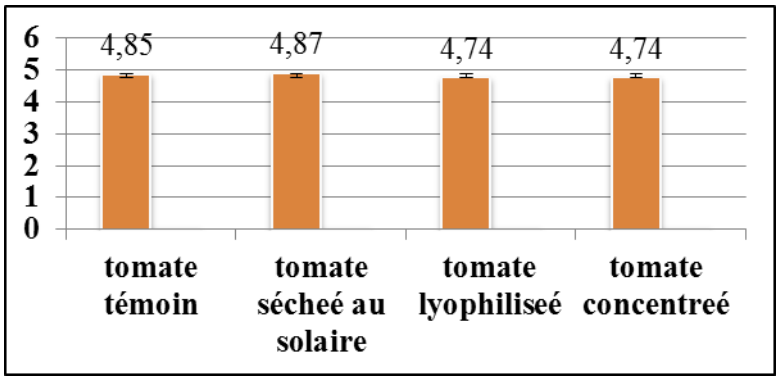


Figure 3. Diagramme de mesure de pH

3.3.2. Conductivité électrique

La figure 4 présente les valeurs de conductivité électrique mesurées pour chaque produit de conserves de tomate. D'après les résultats obtenus, on remarque que la conductivité du tomate en poudre (6.64 ms pour la tomate séchée, et 4.88 ms pour la tomate lyophilisée) est plus élevée que celle de tomate témoin et tomate concentrée. Les valeurs sont, respectivement, de 4.52±0.04, 6.64 ±0.09, 4.88 ±0.53, et 2.02±0.02.

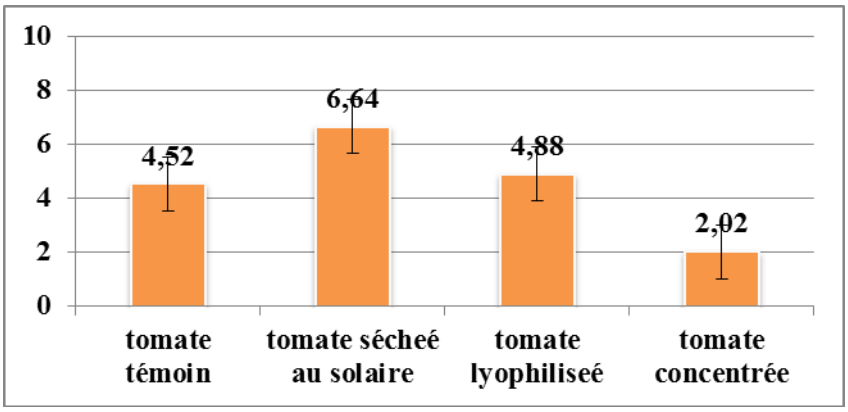


Figure 4. Diagramme des mesures de conductivité électrique.

3.3.3. Salinité

La figure 5 montre que la salinité de tomate séchée au soleil est plus élevée (4.28 ±0.06) que celle aux autres conserves. La tomate lyophilisée a une salinité plus proche (2.91±0.342) à celle de tomate témoin (2.87±0.03) par rapport aux tomates séchées au soleil et concentrées, ce qui explique que la technique de lyophilisation est une méthode efficiente que permet de garantir la conservation du maximum des composées alimentaire. La tomate concentrée a la plus faible valeur de salinité (1.29 ±0.011).

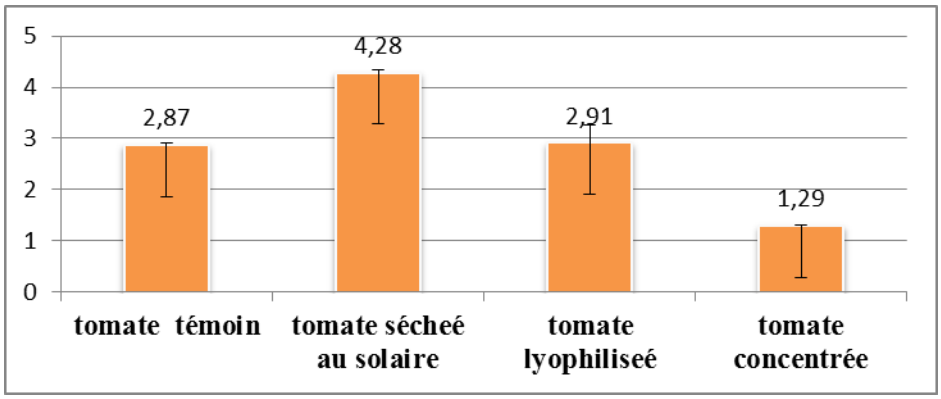


Figure 5. Diagramme des valeurs moyennes de salinité.

3.3.4. Degré Brix

D'après la figure 6, on constate que le degré de Brix de tomate concentrée est plus faible (1.63%) que celle de tomate témoin, séchée au soleil et lyophilisée avec une teneur, respectivement, de 2.83,7.13 et7.76%. L'analyse statistique montre les 4 sous-produits sont significativement différents entre eux ($p<0.05$) en terme de degré de Brix. Ainsi, le concentré de tomate permet de réduire la teneur en matière sèche en donnant une valeur plus équilibrée que celle des autres conserves.

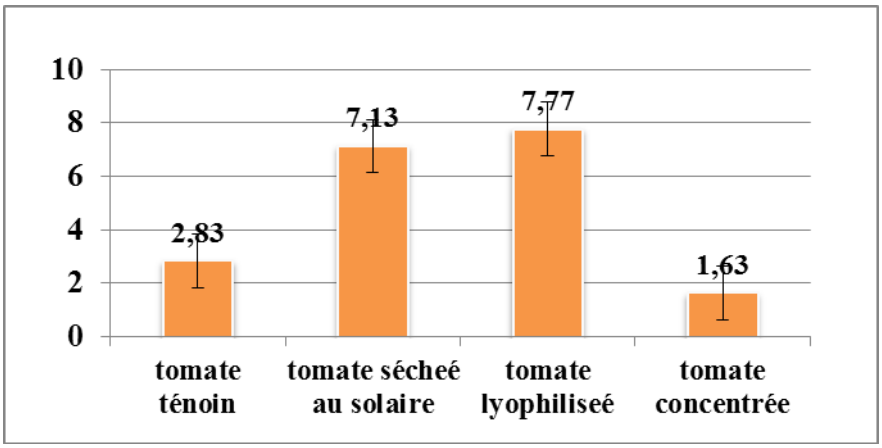


Figure 6. Diagramme des mesures de degré de Brix.

3.3.5. Dosage d'acidité

D'après la figure 7, on remarque que le séchage de tomate par lyophilisation donne une acidité de l'ordre de 5.186±0.72, et le séchage solaire de 3.886±0.34. Ainsi, ces deux techniques de séchage se caractérisent par des valeurs plus acides en les comparants avec celles d'acidité de la tomate concentrée et la tomate témoin. Ceci montre que le séchage solaire et par lyophilisation peut réduire le risque de contamination de nos produits par les microorganismes et par conséquence la prolongation de délai de conservation.

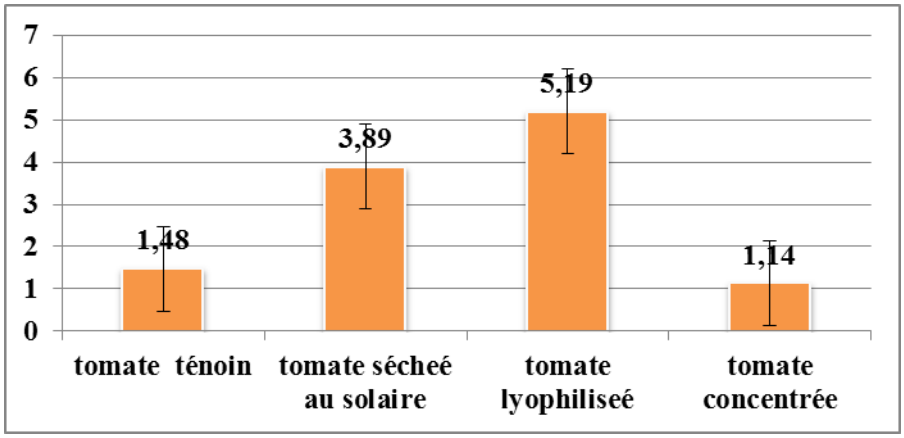


Figure 7. Diagramme de mesure d'acidité titrable.

3.3.6. Humidité

D'après la figure 8 et les analyses statistiques, on observe que le taux d'humidité de la tomate témoin (97.56±0.157) et la tomate concentrée (92.71±0.617) est très élevée par rapport aux tomates lyophilisées (92.01±0.786) et séchées (99.41±3.068). Ainsi, les quatres produits présente des différences significatives entre eux à un seuil de 5%.

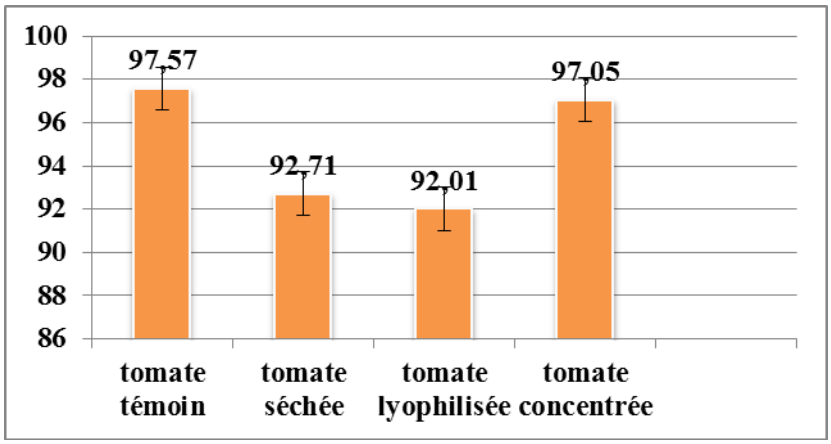


Figure 8. Diagramme de l'humidité moyenne

3 .3.7. Teneur en cendre

A partir le tableau 2 , on constate que la teneur en cendre chez la tomate lyophilisée est le plus élevée (59.2±0.95) que les autres produits, la tomate témoin (44.3±0.26), la tomate séchée (41.2±0.13) et la tomate concentrée (46.4±0.04). D'après les résultats du diagramme de l'humidité et de cendre, on constate que les produits qui ont les pourcentages d'humidité les plus faibles possèdent la teneur en cendre le plus élevée qui influence directement sur la durée de conservation. En effet, la tomate lyophilisée a la durée de conservation la plus longue que les autres produits (témoin, séchée au soleil et concentrée).

Tableau 2. Moyenne de Teneur en cendre pour chaque sous-produit.

Produit	Témoin	Tomate séchée	Tomate lyophilisée	Tomate concentrée
Moyenne de cendre	44.3±0.26	41.2±0.13	59.2±0.95	46.4± 0.04

3.4. Analyses microbiologiques

Les analyses microbiologiques visant à apprécier la stabilité des produits portent sur la flore aérobie mésophile totale, les levures et moisissures, les coliformes totaux et les coliformes fécaux. Ces germes ont été déterminés par des cultures sur milieux nutritifs synthétiques selon Leclerc et al. (2008). La flore aérobie mésophile totale permet d'estimer la charge microbienne totale de la tomate; les levures et moisissures témoignent de l'apparition de phénomènes d'altération, de décoloration ou de modification de la flaveur; les coliformes totaux et les coliformes fécaux traduisent le niveau hygiénique du produit. D'après les résultats obtenus et l'analyse des colonies de levures et moisissures nous constatons que les échantillons testés sont de très bonne qualités microbiologiques malgré que la tomate est un fruit très sensible selon la norme NF V 08-036 (2003). D'après les résultats obtenus, on remarque que les quatre échantillons de tomates sont dépourvus de coliformes et de entérobactéries ce qui montre une bonne qualité microbiologiques de nos conserves selon la norme ISO 7218 2007.

4. CONCLUSION

La tomate est la principale culture pratiquée sous serres chauffées dans le sud tunisien. Elle est considérée comme un élément clé de l'économie car une quantité non négligeable de sa production est exportée vers l'Europe durant la période froide. Par contre, on note l'absence totale de l'implantation des usines de transformation de tomate dans les régions sud de notre pays malgré l'importance de la production de tomates géothermiques dans ces régions. Dans ce cadre et pour valoriser les écarts de triage des tomates géothermiques, et de trouver des solutions alternatives pour les agriculteurs de secteur géothermique, on a essayé de valoriser les tomates géothermiques non commercialisées sous formes des plusieurs sous-produits ainsi que de mettre en évidence ses qualités nutritionnelles via des tests physico-chimiques et microbiologiques. Les analyses physico-chimiques ont montré que le rendement de tomate vers tomate lyophilisé est le plus faible (3%),

donc cette technique se montre non rentable de point de vue massif par rapport aux autres techniques. Les sous-produits étudiés ont des pH relativement faibles (pH<5) donc un avantage du point de vue de la stabilité. En effet, cette acidité de pH réduit considérablement la contamination par les microorganismes. Notre étude montre aussi que la salinité de tomate séchée au soleil est la plus élevée (4.28±0.06) que celle des autres conserves. D'autre côté, on constate que le degré de Brix de tomate concentrée est plus faible (1.63%), que celle de tomate témoin, séchée au soleil et lyophilisée avec une teneur, respectivement, de 2.83,7.13 et 7.76%. Ainsi que le concentrée de tomate permet de réduire la teneur en matière sèche en donnant une valeur plus équilibrée que celle de autres conserves. Enfin, et eon se basant sur les analyses microbiologiques, le séchage solaire ou par lyophilisation peut réduire le risque de contamination de dos produits par les microorganismes et par conséquence la prolongation du délai de conservation. Voir que le séchage par lyophilisation reste encore un procédé coûteux, il est nécessaire alors de d'optimiser la technique de séchage solaire en se basant sur des théories physiques.

REFERENCES

- Addiscott T.M., Wagenet R.J. 1985. Concepts of solute leaching in soils: a review of modeling approaches. Journal of Soil Science, 36 : 411-424.
- Amouri AA., Fyad Lameche FZ. 2011. Analyse comparative de la tolérance à la salinité du gamétophyte mâle et du sporophyte chez medicago au stade germination
- Agreste 2012. agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/SBIL_FLEG_23_Tomates.pdf, Agriculture et Agroalimentaire Canada.
- Bouchekima B., Babi Y. 2001. Utilisation de l'Energie Géothermique pour le Chauffage des Serres Agricoles au Sud Algérien
- Bouguettai A., Bechki D. 2008. Expérience du séchage solaire dans le Sahara Septentrional Est Algérien.
- Chanforan C. 2010. Stabilité des microconstituants de la tomate (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines C et E) au cours des procédés de transformation : études en systèmes modèles, mise au point d'un modèletoechio-cinétique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate. Thèse de Doctorat. Université d'Avignon et des pays de Vaucluse, p. 399.
- CCTCPG 2016. Le Centre Technique des Cultures Protégées et Géothermiques.
- Derine D. 2003. article 6 la transformation de la tomate. pdf , Diagramme de phase de l'eau, Cours de chimie Thermodynamique et cinétique, Université Laval,
- Dossou J, Soule I, Montcho M. 2006. Analyse économique de la production de purée de tomate à petite échelle au Bénin. Tropicultura, 24(4) : 239-246.
- Dossou J, Soule I, Montcho M. 2007. Evaluation des caractéristiques Physicochimiques et sensorielles de la purée de tomate locale produite à petite échelle au Bénin. Tropicultura, 25, 119-125.
- Dumai S., Odile E. 1999. La gastronomie en plein air, Québec Amérique, Montréal, p. 148-149. Conserver les aliments, Comparaison des méthodes et des technologies des aliments, Technique et Documentation-Lavoisier, Paris, p. 436-456.
- Dumai S. , Odile E. 1999. La gastronomie en plein air, Québec Amérique, Montréal, p. 129. Génie alimentaire, Lyophilisation, 2003
- GGIL .2016 . Évolution des exportations de la tomate en Tunisie
- Hachicha M., Job J.O., Mtimet A. 1994. Sols de Tunisie, Sols irrigués et sols sodiques, Les sols salés et la salinisation en Tunisie. Bulletin de la Direction des Sols n°15 : 281-282.
- Hachicha M., Khaldi R., Mougou A. 2012. Irrigation avec l'eau géothermale salée dans le Sud tunisien. Etude et Gestion des Sols, 19, 91-103.
- Majdoub R. 2012. Etude de la Dynamique de l'eau et du transfert des sels dans un sol sablo-limoneux du sahel tunisien.
- Haddad M., Boukhris M., Mougou A. 2003. L'exploitation des eaux géothermiques pour la production des légumes de contre-saison dans le sud tunisien. New Médit, 58-64.

- Khaldi R., Dhraief M.Z., Sfayhi D. 2012. Techniques de conditionnement, coûts de production des légumes frais et leurs impacts sur le comportement des consommateurs. Les Philippines, 2003
- Majdoub R., Ben M'Barek A., Hachicha M. 2010 .Caractérisation Hydrodynamique d'un sol sablo limoneux irrigué avec l'eau salée dans la région de Mahdia. Actes des 17èmes Journées Scientifiques sur les Acquis de la Recherche Agricoles, 864-872.
- Majdoub R., Hachicha M., El Amri A., Melki M. 2012. Etude de la dynamique de l'eau et du transfert des sels dans un sol sablo-limoneux du Sahel Tunisien. European Journal of Scientific Research, 80(4), 499-507.
- Montcho DM, Ahouansou R. 2004. Rapport de test d'évaluation et adaptation d'une épépineuse de tomate destinées à la fabrication de la purée. Rapport de recherche PTAA/INRAB, (Bénin), p.14.
- Bechki 2015. La cinétique de séchage solaire force des tranches de tomate.
- Naika S, Juede J, Goffau M, Hilmi M, Dam V. 2005 . "Cultivation of Tomato" Production, processing and marketing , Agromisa/ CTA. Revised edition, 2005 Agrodokseries No 17.
- Simunek J., Huang K., Van Genuchten M.TH. 1998. The HYDRUS code for simulating the one dimensional movement of water, heat, and multiple solutes in variably saturated media. Version 6.0. Research Report No. 144. Riverside, CA: U.S. Salinity Laboratory.

Evaluation des méthodes d'extraction de la phycocyanine à partir de spirulina platensis *et sa valorisation*

Lafri Imène[1], Boutekrabt Lynda[2]
[1]Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Saad Dahlab Blida 1, Algerie. i.lafri1703@yahoo.fr
[2]Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Saad Dahlab Blida 1, Algérie. l.boutekrabt@yahoo.fr

RESUME
La spiruline (spirulina platensis) est une algue bleu-vert due à la présence de chlorophylle (vert) et Phycocyanine (bleu) dans sa structure cellulaire. En raison de ses applications pharmaceutiques, les méthodes d'extraction pourraient constituer un facteur déterminant pour une récupération maximale des phycobiliprotéines dans l'état naturel des algues. Les travaux ont porté sur une évaluation de plusieurs méthodes d'extraction de la phycocyanine issue de deux types de spiruline, provenant de la région de Tamanrasset, Algérie , l'autre provenant de la région de Djerba, Tunisie. Six méthodes d'extraction ont été testés sur deux souches de spiruline provenant de deux régions géographiquement différentes (Tamanrasset, Algérie) et (Djerba,Tunisie). L'extraction aqueuse à double phase a donné des valeurs supérieures comparativement aux autres méthodes (par l'eau, solvant), (0,39 vs 0,19 mg/ml). Nous avons obtenu avec la spiruline algérienne 2,5 l de filtrat et 7,5 l de retentât et une concentration de phycocyanine de 0,62 mg/ml et une pureté de 1,37. Un effet significatif du pays de production sur la concentration d'extraction est observé, quelque soit la méthode d'extraction utilisée. La caractérisation de la phycocyanine des deux souches algérienne et tunisienne a montré que la phycocyanine est considérée comme un aliment riche en éléments minéraux, protéines, flavonoïdes et poly phénols totaux avec une activité antioxydante élevée.
Mots-clés: spiruline, phycocyanine, extraction, pureté, antioxydante

1. INTRODUCTION

Les phycobiliprotéines, regroupées généralement en phycocyanines, phycoérythrines, et allophycocyanines sont constitués de protéines pigmentaires photosynthétiques présentes chez certaines algues (algues rouges et cryptophycées) et chez toutes les cyanobactéries. La phycocyanine est généralement extraite à partir de la cyanobactérie spiruline (*Arthrospira platensis*). Actuellement, la demande du consommateur en produits naturels pour des impératifs écologiques est en constante progression confortée par une législation qui tend à substituer les composants synthétiques par des produits naturels. Elle est déjà introduite comme composant dans des crèmes de soin de la peau, des masques de beauté et des produits solaires .

L'extraction des phycobiliprotéines à partir d'une biomasse sèche ou fraîche entraîne une lyse cellulaire qui consiste en une rupture des membranes plasmiques de cellules ou de bactéries en utilisant notamment des moyens physiques/mécaniques (par sonication, cycles de congélation/décongélation) ou des moyens chimiques (solutions de $CaCl_2$, $(NH_4)_2S0_4$) ou encore des moyens biologiques (enzymes). L'extrapolation de tels procédés à une échelle industrielle génère des coûts d'investissement élevés. D'autres procédés, plus simples, utilisent la précipitation par les sels et particulièrement le sulfate d'ammonium qui permet en plus de conserver les phycobiliprotéines contre les bactéries et les champignons.

La production de phycocyanine à un coût accessible, sans dégradation de ses propriétés constitue un défi pour la plupart des chercheurs. Ainsi beaucoup de travaux basés sur des méthodes efficaces de bio-séparation à grande échelle, qui permettraient d'atteindre de hautes valeurs de pureté ont été effectuées. Parmi les méthodes de purification qui pouvaient répondre à tous ces critères, figurait l'extraction aqueuse biphasée (ATPE) ou encore le procédé d'extraction et de stabilisation de la phycocyanine qui consiste en l'étape de macération du ou des matériaux dans du glycérol ou un mélange eau/glycérol.

L'objet des travaux étant l'obtention d'une bonne masse de la phycocyanine extraite à partir de la spiruline provenant de deux régions géographiquement différentes, la région de Tamanrasset (sud Est du Sahara, Algérie) et la région de Djerba, Sud Ouest de Tunisie). Les travaux portent ainsi sur une

comparaison du rendement d'extraction pour les deux souches tout en préservant d'une part, ses qualités intrinsèques, et d'autre part, de pouvoir déduire après, la méthode optimale en termes de rendement pour une récupération maximale des phycobiliproteines dans l'état naturel des algues.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Matériels végétal

La spiruline algérienne est actuellement produite dans son environnement naturel (El Guelta, région de Tamanrasset, Sud de l'Algérie). Sa production artisanale et expérimentale dans un bassin est actuellement maitrisée. Après ensemencement du bassin, nous avons récolté la spiruline en juin 2014. Les feuilles de la plante sont ensuite séchées, broyées et conservées dans des flacons en verre à l'abri de la lumière et l'humidité pour les besoins de l'étude.

La spiruline tunisienne est produite en paillettes au niveau de la station de Djerba, représentant un environnement le plus adapté à sa croissance. Sans OGM, ni pesticides, ni colorants, ni conservateurs avec de l'eau pure et des sels pour la production, un séchage à basse température et un emballage sous vide pour une conservation optimale et un laboratoire d'extraction suivant les normes les plus strictes (norme IDO 22000).

2.2. Méthodes d'extraction de phycocyanine réalisées :

2.2.1. Par l'eau

Une suspension de 4 % de spiruline dans l'eau a été préparée à l'obscurité. La solution obtenue, subit une décantation puis une centrifugation (9000 tours/15 mn) à 4°c. On prélève alors le surnageant lequel subit une dilution (facteur 100) avec de l'eau. On a mesuré ensuite la densité optique de la solution à 615 nm, 652 nm, 620 nm et 280 nm. Soit DIL: le facteur de dilution en volume, le calcul du % en phycocyanine est effectué selon la formule suivante:

Calcul du % en phycocyanine : $1.873 \times (DO_{620} - 0.474 \times DO_{652}) = DIL/C$

C : % de la concentration de spiruline sèche mise à tremper dans l'eau autour de 4 %

La pureté de phycocyanine est exprimée par le rapport : DO_{620}/DO_{280} .

2.2.2. Par sonification

On met 10 mg de spiruline en suspension dans 100 ml de tampon phosphaté, la solution est mise sous l'action de l'ultrason E 3010 NA pendant 5 min suivie d'une centrifugation (9000 tours/15min à 4°C). On prélève le surnageant et on ajoute de nouveau au culot 100 ml de tampon et on le remet à l'action de l'ultrason pendant 2 à 3 min, puis centrifugation afin de prélever de nouveau le surnageant et le mélanger avec le premier et mesurer les densités optiques (DO) à 615, 652 ,620 et 280 nm.

Le pourcentage en phycocyanine est calculé selon la formule de .

$PC = [DO_{615}-0.474 \times DO_{652}]/ 5.34.$

La pureté de phycocyanine est déduite selon la formule : DO_{620}/DO_{280}

Avec DO à 620 nm indiquant la concentration de la phycocyanine

DO à 280 nm indiquant la concentration totale des protéines.

2.3. Par congélation

On met 100 mg d'algues secs dans 200 ml de tampon. La solution subit des cycles de congélation/décongélation (congélation à -20°C) jusqu'à l'éclatement des cellules. La solution obtenue subit une première centrifugation. Au surnageant, on ajoute 20% de sulfate d'ammonium saturé ($(NH_4)_2SO_{4)}$, on le laisse reposer pendant 2 heures. Après une deuxième centrifugation, on ajoute au surnageant obtenu 45% de sulfate d'ammonium saturé. Enfin une troisième centrifugation est effectuée directement et le culot est récupéré.

Des lectures de spectrophotométrie sont effectuées à des DO de 615 nm, 620 nm, 652 nm et 280 nm.

$PC\ (mg/ml) = (A_{615}-0.474 \times A_{652})/5.34$

Pureté = DO_{620}/DO_{280} [12].

2.4. Par solvant

On verse 4 g de spiruline dans 120 ml de tampon phosphate, au début on l'incube à l'obscurité à 4 °C pendant 12h (pour permettre la lyse des cellules à l'hypotonicité de mise), puis centrifuger pour la

première fois et récupérer le surnageant bleu. Ensuite, on ajoute 120 ml du tampon phosphate au précipité et incuber 12h à l'obscurité. Après la deuxième centrifugation, les deux surnageants sont mélangés afin de lire la densité optique à 615, 652, 620 et 280 nm.
Le calcul du % en phycocyanine et de sa pureté est basé sur les équations suivantes:
PC (mg/ml) = $(A_{615}-0.474\times A_{652})/.34$
Pureté = DO_{620}/DO_{280}

2.5. Par séparation aqueuse à double phase

Une solution de spiruline de 90 % est préparée à l'obscurité. On lui rajoute une solution de 40% de PEG (w /w) : 40 g PEG dans 60 g d'eau, ensuite une solution de sels de phosphates à 20% (W/W) : mélange de 10 g de K_2HPO_4 et 10 g de KH_2PO_4 dans 60 g d'eau (on a utilisé une solution glucosée à 20% et on a comparé le rendement d'extraction).
En se référant à la méthode d'Albertson (1994), on a prélevé 1 g de 40 % (W/W) de PEG, 1.25 g de 20 % (W/W) de sels phosphates + 0.5 g de spiruline et 2.25 g d'eau.
Après mélange, le composé mis à l'obscurité, subit une agitation pendant 20 min à l'aide d'un agitateur, puis une centrifugation, mesure de volumes de phases, de lecture de la densité optique à 620, 652, 615 et 280 nm.
Le calcul du pourcentage en phycocyanine et de sa pureté est basé sur les équations suivantes :

PC (mg/ml) = $(A_{615}-0.474 \times A_{652})/4.34$
Pureté = DO_{620}/DO_{280} [4].

2.6. Extraction par macération dans le glycérol

En s'inspirant des travaux de , on a mélangé 800 g de poudre de spiruline algérienne dans 10 kg de glycérol. On laisse macérer pendant 15 j à température ambiante à l'obscurité. Une filtration frontale lente est ensuite effectuée, avec un filtre compatible alimentaire (filtre en nylon, finesse de 25 µ).
Nous avons suivi le même protocole pour la spiruline tunisienne au sein du laboratoire de l'IRAA (station de Djerba, Tunisie).
Le calcul de pourcentage de la phycocyanine est réalisé selon les formules suivantes :
PC (mg/ml) = $(A_{615}-0.474 \times A_{652})/5.34$
Pureté = DO_{620}/DO_{280}

2.4. Caractérisation des extraits de phycocyanine

2.4.1. Analyse des composés phénoliques

2.4.1.1. Polyphénols totaux

On fait diluer l'extrait de la phycocyanine algérienne ainsi que celui de la souche tunisienne, puis on met 0,5 ml de chaque dilution dans des tubes à essai pour chacune d'elles. On ajoute 5ml d'eau distillée et 0.5 ml de réactif de folin à 10%. Après 3 mn on ajoute 0.5 ml de carbonate de sodium 20%. La lecture des absorbances est faite à 760 nm, après agitation et repos d'une heure à l'obscurité. La concentration en composés phénoliques totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide gallique comme standard d'étalonnage.

2.4.1.2. Quantification des composés phénoliques par chromatographie (HPLC)

La chromatographie liquide haute performance (HPLC, Waters Alliance 2695) avec détection UV (détecteur UV 24889 et un logiciel empower V3) a été utilisée pour l'identification et la détection du profil phénolique de l'extrait. Les conditions opératoires retenues sont :
- Débit: 1 mL/min ;
- Pression de travail : 21,3 MPa
- Volume d'injection : 20 µL
- Longueur d'onde: 254 nm
- Concentration de l'échantillon: 1 mg/mL;
- Temps d'analyse : 25 min ;

La phase mobile est de composition gradiante. Elle est composée de deux éluants A et B dont la composition est mentionnée dans le tableau 1 suivant :

Tableau 1 : Composition des deux éluants en fonction du temps de l'opération

Temps (mn)	Composition (%)	
	Solvant A (Acétonitrile)	Solvant B (H20, Ph 2,5)
Initial	2	98
5.00	2	98
15.00	5	95
17.00	100	0
25.00	100	0

2.4.2: L'activité antioxydante

L'objet des travaux consiste en la détermination du pouvoir antioxydant de la phycocyanine extraite des la spiruline algérienne et tunisienne selon deux méthodes :

a. Par le DPPH : (diphenylpicrylhydrazyl)

Préparation de la solution de DPPH : Une quantité de 12 mg de DPPH a été solubilisée dans 50 ml de méthanol, l'incubation a duré pendant 30 mn à l'obscurité et à 4°C avec agitation (cette solution doit être préparée 2 heures avant l'essai, et rester stable durant 5 jours à l'obscurité et à 4 °C). De la solution précédente on prélève 3 ml pour faire la dilution dans 7 ml de méthanol.

- Pour la spiruline algérienne : On prend 0.21 ml de l'extrait de phycocyanine algérienne dans 1.94 ml de la solution de DPPH et on fait une incubation à l'obscurité pendant 30 min à 20°C .
- Le même protocole est utilisé pour la détermination de l'activité antioxydante dans la spiruline tunisienne.

La lecture de la densité optique s'est effectuée à 517 nm.

L'activité antioxydante pour chacune des solutions a été calculée selon la formule:

Delta-DPPH = ADPPH – [A_{517}] simple.

Nous avons utilisé l'acide ascorbique comme standard (15).

b. Par détermination du pouvoir réducteur de la phycocyannine (methode FRAP) [16].

Reactifs et appareillage

- Tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) ;
- Solution aqueuse d'hexacyanoferrate de potassium à 1 % ;
- Solution d'acide trichloracetique a 10 % ;
- Solution aqueuse de chlorure ferrique à 0.1 % ;
- Appareillage: centrifugeuse, bain marie pour l'incubation et spectrophotometre UV-visible.

Mode opératoire :

Un volume de 1 ml de phycocyanine algérienne ou tunisienne a été mélangé à 2,5 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 2,5 ml de solution aqueuse d'hexacyanoferrate de potassium K3 [Fe $(CN)_6$] à 1 %. Après 30 mn d'incubation à 50 °C, nous avons ajouté 2,5 ml de la solution d'acide trichloracetique à 10 % au mélange, qui a ensuite subit une centrifugation pendant 10 mn. Une aliquote (2,5 ml) de surnageant est combiné à 2,5 ml d'eau distillée et à 0,5 ml de solution aqueuse de FeCh à 0,1 % puis l'absorbance a été mesurée à 700 nm.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Extraction de phycocyanine

Les concentrations de phycocyanine obtenues pour les deux souches (algérienne et tunisienne) selon les différentes méthodes d'extractions sont représentées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Valeurs des concentrations et des rapports de pureté de la spiruline algérienne et tunisienne en fonction du mode d'extraction.

Méthodes d'extraction	Concentration (mg/ml)		Degré de pureté	
	Sp Alg (*)	SpTun (**)	Sp Alg (*)	SpTun (**)
Eau	0,19	0 ,20	0,20	0,25
Congélation	0,06	0,10	0,80	0,90
Sonification	0,25	0,25	0,60	0,80
Solvant	0,30	0,35	0,55	1,00
Séparation aqueuse à double phase	0,39	0,41	0,30	0,4

(*) Spiruline algérienne (**) spiruline tunisienne

Nous remarquons que la concentration en phycocyanine de la spiruline sèche pour les deux souches (algérienne et tunisienne) varie entre 0.06-0.39 mg/ml pour la souche algérienne et 0,20-0,41 mg/ml pour la souche tunisienne. Un effet significatif du pays de production sur la concentration d'extraction est observé, et ce quelque soit la méthode d'extraction utilisée. En effet, que ce soit pour les valeurs minimales ou maximales enregistrées, les valeurs des concentrations de la spiruline tunisienne sont significativement supérieures à celles observées pour la spiruline algérienne.
Nous avons regroupé les différentes concentrations et les rapports de pureté selon les méthodes d'extraction au niveau de la figure 1.

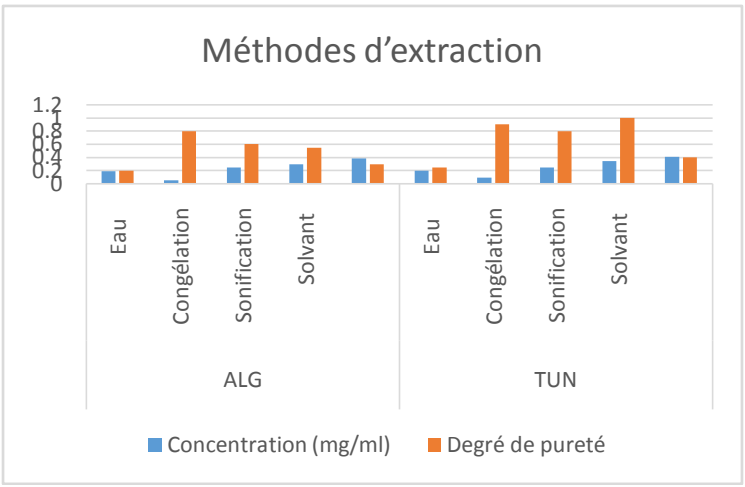


Figure 1. Concentrations et pourcentages de pureté de la phycocyanine des souches (algérienne et tunisienne) de la spiruline, (N = 3) ± SD.

On remarque également que l'extraction aqueuse à deux phases a donné des concentrations supérieures en C-phycocyanine comparativement aux autres méthodes (eau) pour les deux souches (algérienne et tunisienne) (0,39 vs 0,19 mg/ml).
Concernant la pureté, l'extraction par la congélation a donné des valeurs de pureté supérieures aux autres méthodes (par sonification, par solvant) (0,80 vs 0,60) et 0,80 vs 0,55).
Une pureté de C-phycocyanine de 0.7 est considérée comme grade alimentaire, 3.5 comme grade réactive, par contre si elle est supérieure 4, elle est considérée comme grade analytique. Ces valeurs indicatives permettent d'affirmer que cette extraction est de l'ordre alimentaire. Un effet significatif du pays de production sur le degré de pureté est observé, et ce quelque soit la méthode d'extraction utilisée.
Toutefois, que ce soit pour les valeurs minimales ou maximales enregistrées, les valeurs des degrés de pureté de la spiruline tunisienne sont significativement supérieures à celles observées pour la spiruline algérienne. D'après, la pureté d'extraction est de l'ordre de 0.40 avec une extraction de phycocyanine de

l'ordre de 3.73 mg/ml avec l'eau et 4.20 mg/ml avec le tampon phosphate. Ont obtenu une pureté de 2.74 avec une extraction avec sulfate d'ammonium à 50%.
Toutefois ont trouvé une pureté de 0.79 et une concentration de phycocyanine de l'ordre de 2.67 mg/ml par une extraction aqueuse à double phase alors qu ont a obtenu par la même méthode une pureté de 5.1 et une concentration de phycocyanine de l'ordre de 1.11 mg/ml.

3.2. Extraction par macération avec le glycerol

A la fin de la filtration, nous avons obtenu avec la spiruline algérienne environ 2,5 l de filtrat et 7,5 l de retentât et une concentration de phycocyanine de l'ordre de 0,625 mg/ml avec une pureté de l'ordre de 1,37. Par contre avec la spiruline tunisienne nous avons obtenu un taux de rendement plus élevé de 50% avec une concentration de 1 ,90mg/ml. Ces différences de valeurs pourraient être liées aux conditions de culture, au climat, à la souche mère, ou encore aux moyens de séchage. Le filtrat qui contient la phycocyanine est conditionné en flacons multi doses.

3.3. Caractérisation de phycocyanine

3.3.1. Poly phénols totaux

Nous avons regroupé les différentes concentrations selon les méthodes d'extraction sur le tableau 3.

Tableau 3: Concentration en polyphénols pour la spiruline (algérienne et tunisienne)

		Méthode d'extraction				
		Eau	Sonification	Congélation	Solvant	En phase
Flavonoïde (mg/g)	Spiruline algérienne	20	15	17	19	13
	Spiruline tunisienne	23	11	19	20	25

On remarque que la concentration des polyphénols totaux à partir des différentes méthodes d'extractions de C-phycocyanine est comprise entre 4 et 22 mg/g de matière sèche pour la souche algérienne et 6 et 25 mg/g de matières sèches pour la souche tunisienne. Les phycocyanines sont riches en polyphénols. Nos résultats sont supérieurs à ceux cités dans la littérature à 4,9 µg/g. Toutefois nous avons noté que la concentration des polyphénols totaux la plus élevée est obtenue par la méthode d'extraction par glycérol (25 et 22 g/gms). Cependant la souche tunisienne a donné des valeurs supérieures en polyphénols par rapport à la souche algérienne (25 vs 22 g/gms).

3.3.2. Détermination des polyphénols par HPLC

L'identification des pics sur le chromatogramme se fait grâce à des échantillons standards en se basant sur le temps de rétention des molécules analysées.
Le profil chromatographique représenté dans la figure 3 a permis d'identifier au niveau des extraits, la présence des composés polyphénoliques dans *Spirulina platensis* d'acides phénoliques et de composés flavonoïdes tels le pyrogallol, l'acide gallique et le rutin.

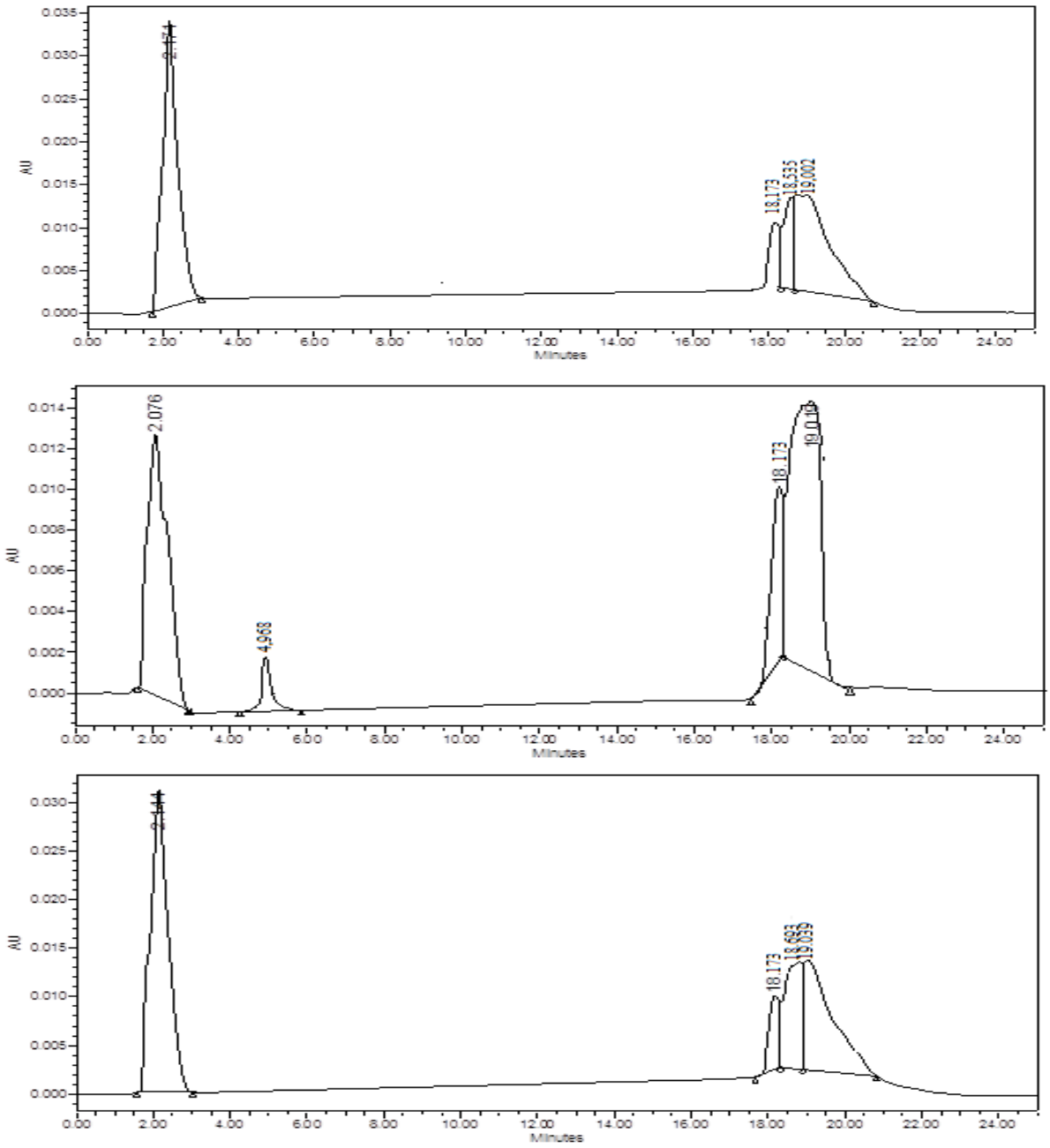


Figure 3 : Profils des polyphénols obtenus des extraits à 254 nm

- Les Flavonoïdes

Les concentrations des flavonoïdes obtenues par différentes méthodes d'extraction sont représentées dans le tableau 4.

Tableau 4: Concentration en flavonoïdes pour la spiruline (algérienne et tunisienne)

		Méthode d'extraction					
		Eau	Sonification	Congélation	Solvant	En phase	Glycérol
Flavonoïde (mg/g)	Spiruline algérienne	0,33	0,27	1,878	2 ,12	0,25	3 ,4
	Spiruline tunisienne	0,45	0,32	2,1	2,9	0,75	4,5

La concentration la plus élevée est obtenue par la méthode d'extraction par glycérol pour les deux souches (algérienne et tunisienne) avec des valeurs respectives de 3,4 mg/g et 4 ,5 mg/g. Par contre, les concentrations les plus faibles sont obtenues par les méthodes d'extraction par sonification et par l'eau (0,33 mg/g , 0,45 mg/g) respectivement.
La phycocyanine tunisienne montre des valeurs plus élevées par rapport à la phycocyanine algérienne en flavonoïde quelque soit la méthode d'extraction utilisée.

- L'activité anti oxydante
Les résultats de l'activité antioxydante sont représentés dans le tableau 5. Nous avons obtenu une activité qui varie de 0,2 à 0,6% pour la souche Algérienne et une activité qui varie de 0,4 à 1,4% pour la souche tunisienne. D'après le tableau 6, nous remarquons que les méthodes d'extraction par le glycérol montrent une activité antioxydante la plus élevée avec toutefois, une activité antioxydante supérieure pour la souche tunisienne. ont obtenu une activité antioxydante variant de 0,17 à 51,94% selon que la concentration de spiruline varie de 0,3 à 15 mg/ml.

Tableau 5: Valeurs (en %) d'activité anti oxydante pour la spiruline (algérienne et tunisienne)

		Méthode d'extraction					
		Eau	Sonification	Congélation	Solvant	En phase	Glycérol
Actité anti oxydante (%)	Souche algérienne	0,2	0,16	0,01	0,23	0,06	0,6
	Souche tunisienne	0,4	0,13	0,015	0,33	0,09	1,4

- Le <u>Pouvoir réducteur</u>
La quantification de l'activité antioxydante d'un extrait par le biais du pouvoir reducteur (PR) implique la capacité des antioxydants analysés a transformer le fer **(III)** en fer **(II),** grâce a leur faculté donatrice d'électrons.

Tableau 6 : Pouvoir réducteur des deux souches de phycocyanine (algérienne et tunisienne) .

	Pouvoir reducteur (en absorbance)
	Extraction par maceration avec le glycerol
Phycocyanine Algérienne	1.749 ±0.052
Phycocyanine Tunisienne	1.788 ±0.0026

D'après le tableau ci-dessus, la phycocyanine tunisienne extraite par macération avec le glycérol possède le meilleur pouvoir réducteur. Cependant, la différence est non significatives ($p > 0.05$),

sachant que la phycocyanine présente une meilleure activité antioxydante révélée par le test de DPPH.

4. CONCLUSION

Notre étude avait pour objectif d'une part, la caractérisation physicochimique de la spiruline produite à Tamanrasset et Djerba, et d'autre part, la comparaison entre les méthodes d'extraction de phycocyanine en vue d'une optimisation. Ces travaux nous ont permis de conclure que l'extraction aqueuse à double phase a donné des valeurs supérieures comparativement aux autres méthodes (par l'eau, solvant). La spiruline algérienne a donné 2,5 l de filtrat et 7,5 l de retentât et une concentration de phycocyanine de 0,62 mg/ml et une pureté de 1,37. La caractérisation de la phycocyanine de souche algérienne a permis de déterminer en termes de rendement sa valeur nutritionnelle en éléments minéraux, en protéines, en flavonoides et surtout son activité antioxydante tant recherchée dans le domaine médical.

Il est à noter que la souche algérienne est en pleine culture et production au Sahara, espace de soleil et d'eau de la chaleur et des sels minéraux. Sa production est simple à mettre en œuvre car la souche est maintenant disponible sur place. Une caractérisation plus poussée de cette souche par les techniques de résonnance magnétique (RMN) permettrait de lui donner sa valeur indicative pour des éventuelles valorisations principalement en cosmétique.

Ainsi après les étapes d'extraction où plusieurs méthodes ont été testés et la caractérisation de la souche, nous proposons la valorisation de cette phycocyanine dans le domaine de la cosmétique ou plusieurs étapes sont en cours d'élaboration.

Contribution à l'étude de l'effet des margines issues de l'extraction à froid des olives sur la germination des plantes

Kadi Kenza[1], Hamli Sofia[1], Boukeria Sabah[2], Dib Dounia[1], Addad Dalila[1], Yahia Abdelouahab[2]
[1]Laboratoire de Biotechnologie, Eau, Environnement et Santé, Faculté SNV, Université Abbes Laghrour Khenchela, Algérie
[2]Laboratoire des sciences et matériaux, Centre universitaire de MILA, Algérie
*Auteur E-mail:Kadi kenza: kadikenza79@gmail.com

RESUME
Cette étude consiste à évaluer l'effet du traitement par les Margines de la région de Baghai, Khenchela sur la germination des deux variétés de blé dur (*triticum durum* sp): Vitron (A) et GTA (G). Un test de germination à différents traitements (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 et 100%). Des analyses physicochimiques ont été effectuées sur les margines utilisées et sur le sol après traitement (CE, pH, MO). Les résultats montrent qu'il y a une différence très hautement significative entre traitements concernant les paramètres physico-chimiques mesurés (MO, CE, calcaire total) sauf le pH. Les résultats de la germination montrent une diminution du taux de cette dernière pour les deux variétés testées par rapport au témoin en fonction de l'augmentation des concentrations des Margines dans les deux essaies, en boites de pétries et en pots, avec une différence très hautement significative. Le taux de germination est corrélé avec les traitements à faible dose des margines et qui ont présenté des valeurs des paramètres physico-chimiques moins importantes. Ainsi, le traitement par les margines provoque une augmentation des éléments fertilisant dans le sol mais diminue le taux de germination.
Mots clés : Margines, blé dur, variété, germination, analyses physicochimiques.

1. INTRODUCTION

L'industrie oléicole, en plus de sa production principale qui est l'huile d'olive vierge, laisse deux sous-produits : solides appelées les grignons, et liquides appelées les eaux de végétation ou les margine. Ces effluents sont très chargés en matières organique et minérale et particulièrement en composés phénoliques (Balaid et *al.*, 2002). Ils ont un impact négatif important sur l'environnement, en raison de leur phytotoxicité élevée contre les microorganismes du sol et la vie aquatique (Elmekawy et *al.*, 2014). Ainsi, ces derniers sont difficilement biodégradables et inhibent l'activité biologique (Balaid et *al.*, 2002).

Les margines ne subissent en générale aucun traitement préalables et sont souvent déversé dans la nature (Filidei et *al*., 2003). Il en résulte un impact négatif sur l'environnement qui se traduit (Camurati et *al*., 1984), par le colmatage des sols, la pollution des eaux superficielles et souterraines et le dégagement de mauvaises odeurs. C'est dans ce contexte s'inscrit la présente étude qui a pour objectif d'évaluer l'effet des margines sur la germination des plantes (deux variétés de blé dur) et de tester l'effet de ces efflues sur la composition du sol.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1 Echantillonnage et matériel végétal

Les margines de cette étude sont obtenues à partir d'olives de couleur noire (variétés Chemlal et Sigoise). Ces olives sont pressées dans une huilerie automatique de fabrication Italienne dans la région de Khenchela selon un processus d'extraction fermé pendant la période de cueillette hivernale (Décembre 2017).

2.2 Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de deux variétés du blé dur Vitron et GTA délivré depuis CCLS de Khenchela (Est Algérien).

2.3 Le sol

Le sol utilisé dans cette étude est un sol argilo-limoneux (ITCMI, 2017) prévenue de la station de Bir rogaa de l'Institut Technique des Cultures Maraichères et Industrielles (ITCMI) d'Oum El Bouaghi.

2.4 Analyses physico-chimiques

Les analyses physico-chimiques ont été réalisées sur les margines étudiées (les différentes dilutions) et le sol épandé.

- La matière organique

La méthode suivie est celle de Walkley et Black, dont l'oxydation s'effectue à lieu froid, mais elle est incomplète. La proportion du carbone oxydé varie de 60 à 86%. La moyenne étant de 76%.

- Le potentiel hydrogène (pH)

Le pH est mesuré sur des margines fraiches, par un pH-mètre de type BANTE instruments.

- La conductivité électrique (CE)

Elle est mesuré sur des margines fraiches, par un Conductimètre de type BANTE instruments.

- Le calcaire total du sol

Le calcaire total regroupe les carbonates insolubles des sols, ceux du calcium et du magnésium. Il est mesuré par l'intermédiaire du calcimètre de Bernard. Il peut, également, être apprécié par le test d'effervescence.

2.5 Essai de germination

- En boites de pétri

Dans chaque boite de pétri (10 cm de diamètre), on mit 10 graines de blé dur de chaque variété sur un couton imbibé par des différentes doses des margines diluées par l'eau distillée avec les pourcentages suivants : 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 70, 80 90 et 100% avec trois répétitions. Ensuite, les boites sont disposées dans l'étuve à une température optimale stable de 25°C qui correspond à la température de développement normal de l'espèce étudiée.

Les graines germées ont été dénombrées, enregistrées et écartées des boites. Les différentes dilutions adoptées figurent dans le Tableau 1.

- En pot

L'étude de l'effet de l'irrigation par les Margines sur la germination des variétés de blé dur peut se manifester autrement dans les conditions de champ. Pour cela, on a adopté un essai en pot pour se rapprocher au maximum des conditions réelles. Le dispositif comporte 10 doses des margines y compris le témoin, les pots contient 100 g du sol pour chaque pot et les dilutions sont les mêmes appliquées dans les boites de pétri. Chaque pot comporte 10 graines de blé de chaque variété avec trois répétitions (Tableau 1).

Tableau 1 : Récapitulatif des différents traitements des Margines pour le test de germination

	0%margines+100 % eau distillée. Témoin	10% margines + 90% eau distillée	20% margines + 80% eau distillée	30% margines + 70% eau distillée	40% margines + 60% eau distillée	50% margines + 50% eau distillée	60% margines + 40% eau distillée	70% margines + 30% eau distillée	80% margines + 20% eau distillée	90% margines + 10% eau distillée	100% margines + 0% eau distillée
Variétés	GTA dur (3 rép) Vitron (3 rép)	GTA dur (3 rép) Vitron (3 rép)	GTA dur (3 rép) Vitron (3 rép)	GTA dur (3 rép) Vitron (3 rép)	GTA dur (3 rép) Vitron (3 rép)	GTA dur (3 rép) Vitron (3 rép)	GTA dur (3 rép) Vitron (3 rép)	GTA dur (3 rép) Vitron (3 rép)	GTA dur (3 rép) Vitron (3 rép)	GTA dur (3 rép) Vitron (3 rép)	GTA dur (3 rép) Vitron (3 rép)

2.6 Analyse statistique

Les analyses de variance et des composantes principales des résultats ont été réalisées par le logiciel EXEL STAT. Les différences considérées très hautement significatives à $p<0,001$.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Les caractéristiques chimiques des margines

Les margines se présentent comme un liquide résiduel aqueux, de couleur brune rougeâtre à noire avec un aspect trouble (Ranalli, 1991a et Aissam, 2003). Leur odeur rappelle celle de l'huile d'olive, mais elle peut devenir gênante lors des phénomènes de rancissement et de fermentation (Iboukhoulef, 2014). Les margines constituent un rejet fortement pollué sous forme de liquide résiduel dont la composition est variable. De nombreuses études sur la composition des margines ont montré que cette variabilité dépend de plusieurs facteurs notamment le stade de maturation des olives, les conditions climatiques, la variété des oliviers, le système de culture, la situation géographique, la nature de conservation des olives et le procédé d'extraction d'huile d'olive (Aissam, 2003 et Benyahia et *al.*, 2003). Les caractéristiques chimiques des margines utilisées sont représentées dans le (Tableau 2).

Tableau 2: Caractéristiques chimiques des Margines utilisées

pH	MO (% De MS)	CE (mS/cm)
4.69	13,08	11,3

MO : Matière organique, CE : Conductivité Électrique

3.2 Effet des margines sur les paramètres mesurés du sol

Les résultats des analyses physico-chimiques mesurées sont présentés dans le tableau 3. Ces résultats montrent que sol étudié présente un pH alcalin (pH = 8.28), et les valeurs de pH du sol diminue légèrement pour tous les traitements. Cette diminution est proportionnelle à la concentration des margines. Ceci est dû à leur richesse en acides organiques et en polyphénols (Khoufi et al., 2007; Yaakoubi et al., 2009) .

Le sol étudié est considéré comme pauvre en sels solubles, puisqu'il présente une conductivité électrique de 0,5 mS/cm. L'épandage des margines a provoqué une augmentation très significative de la conductivité électrique pour toutes les conditions expérimentales pour atteindre des valeurs de 2,3 mS/cm. Le calcaire total du sol augmente par l'augmentation de la dose des margines, l'accroissement de calcaire total du sol est proportionnelle à la concentration des margines épandus. Le calcaire fournit le calcium qui provoque la floculation des colloïdes minéraux et organiques du sol, action nécessaire a l'établissement d'un état structural, et permet au sol de créer les réserves, en éléments nutritifs (Ranalli, 1991b).

Le sol présente un taux de matière organique (MO) de 3,6% avant l'épandage. L'apport des margines a provoqué une augmentation très significative du taux de la matière organique du sol pour atteindre 12,74%.

Tableau 3: Effets des margines sur les paramètres physicochimiques mesurés du sol

Dose du margine (%)	pH	CE (mS/cm)	Calcaire total	MO (%)
Témoin	8,28	0,5	33,33	3,61
10	7,98	1,2	35,08	8,04
20	7,59	1,4	36 ,84	9,39
30	7,40	1,6	40, 35	10,88
40	7,39	1,8	42,1	11,05
50	7,38	1,8	42,98	11,73
60	7,35	2	42,98	11,73
70	7,28	2,1	43,85	12,07
80	7,25	2,1	44,73	12,4
90	7,19	2,2	46,49	12,4
100	7,14	2,3	46,49	12,7

3.3 Test de germination

Essai en boites de pétri

Les résultats présentés dans la figure1 apparait que le taux de germination pour les deux variétés GTA et Vitron par rapport aux témoins a diminué, les deux variétés ont été affectées de la même façon et presque par les même valeurs sauf dans le cas de la dose de margine de 10%. Une diminution du taux de germination de l'ordre de 30% par rapport au témoin a été observée. La variété Vitron est plus sensible que la variété GTA puisque le taux de germination est de 50% pour la variété de Vitron et de 70% pour celle GTA.

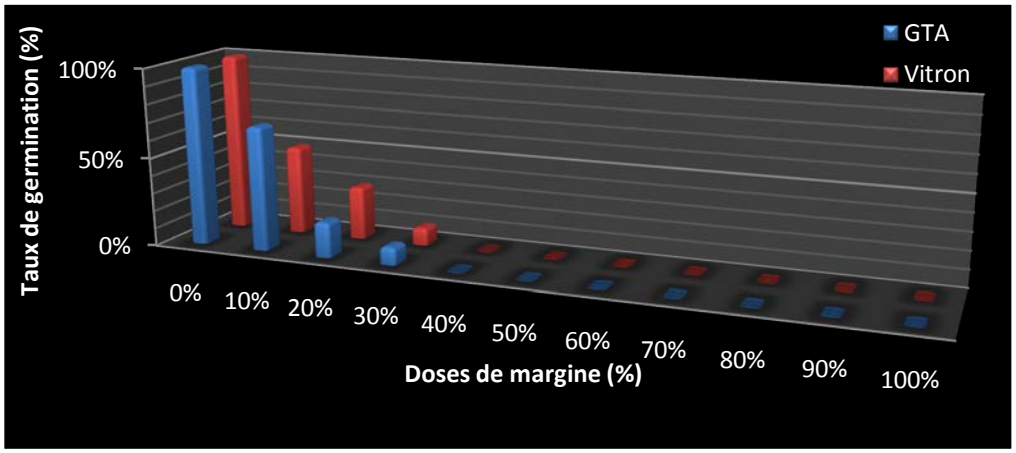


Figure 1: Taux de germination (%) de deux variétés testées (Vitron et GTA dur) en fonction des différentes concentrations des Margines: essai en boites de pétri après 3 jours

L'analyse des résultats (Figure 1) montre une diminution du taux de germination pour les deux variétés testées par rapport au témoin en fonction de l'augmentation des concentrations des margines dans le milieu. Au-delà de cette concentration, l'effet inhibiteur commence à se manifester progressivement sur les deux variétés, pour induire une chute de taux de germination à partir de la dose 30% des margines où on a enregistré une réduction de 90% pour les deux variétés. Cependant, cette tolérance à ce stade n'est pas suffisante pour expliquer le comportement de cette variété en présence des margines au cours du cycle végétatif. Par ailleurs, un retard dans le processus de germination par rapport au témoin a été remarqué pour les deux variétés.

Cependant, pour les deux variétés, ce retard est observé pour les concentrations du milieu les plus faibles, il est de deux jours, respectivement, pour les concentrations 10, 20 et 30% des margines. Bien que pour les concentrations 40,50, 60, 70, 80, 90 et 100% des margines, le taux de germination est nulle. Cette constatation vient de confirmer les résultats de **Abdelly (1992)** qui a démontré que la présence du sel dans le milieu de culture provoque en effet une baisse significative de nombre de graines germées et un retard dans l'initiation du processus de germination. Les effets toxiques liés à une accumulation des sels à l'intérieur des cellules, provoquant des perturbations des enzymes impliquées dans la physiologie des graines en germination (Ungar, 1978), empêchent la germination des embryons ce qui conduit à une diminution de la capacité germinative.
Pour les doses les plus élevées de 40à 100%, aucune germination des graines a été observée pour les deux variétés, ainsi le pouvoir inhibiteur des margines sur la germination est très accentué. Cependant, la dose 10% a donné la germination de 7 graines pour chaque variété, mais avec très lentement par rapport au témoin. En effet, les doses 20 et 30% donne seulement la germination pour 3 graines (30%).

Essai en pots

Les résultats de l'essai en pot montrent que les Margines affectent le taux de germination des deux variétés de blé GTA dur et Vitron de la même manière observée pour l'essai en boite de pétri..

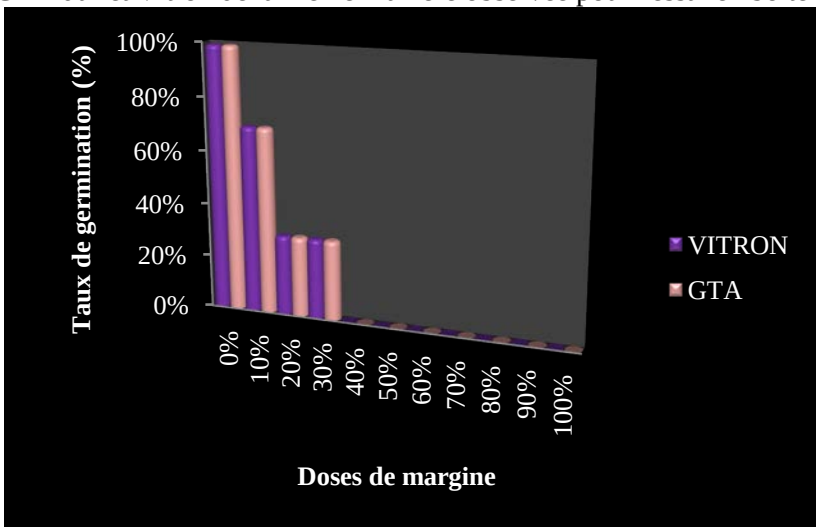


Figure 2: Taux de germination (%) de deux variétés testées (Vitron et GTA dur) en fonction des différentes concentrations des Margines: essai en pots après 3 jours.

4. CONCLUSION

Le taux de germination est corrélé avec les traitements à faible dose des margines et qui ont présenté des valeurs des paramètres physico-chimiques moins importantes. Ainsi, l'épandage des margines sur le sol utilisé provoque une légère diminution du pH, malgré l'acidité de ces margines, ceci est due la richesse du sol en calcaire qui joue un rôle tampon. Il entraîne un enrichissement en éléments minéraux, ce qui est confirmé par l'augmentation de la conductivité électrique, et un enrichissement du sol en matière organique qui a pour conséquence d'augmenter la capacité de rétention d'eau. La matière organique contenue dans ces effluents peut être recyclé pour considérer comme solution pour les sols pauvres. Toutefois, l'épandage spontanément de ces efflues peut causer des dégâts sur l'environnement, il doit être ainsi contrôlé.

REMERCIEMENTS

Un grand remerciement au Professeur Nagaz Kamel Head, Drylands and Oases Cropping Laboratory , Institut des Régions Arides, Médenine, Tunisia pour son aide et son soutient au sein du laboratoire de l'IRA.

REFERENCES

- Abdelly C. (1992). Réactions aux contraintes nutritionnelles des principales herbacées du tapis végétal en bordure de sebkha. Thèse de spécialité, Tunis, pp 252
- Aissam H. (2003). Etude de la biodégradation des effluents des huileries (margines) et leur valorisation par production de l'enzyme tannase. Thèse de doctorat, Faculté des sciences, Dhar El Mehraz, Fès, pp. 69-70.
- Benyahia N, Zein K. (2003). Analyse des problèmes de l'industrie de l'huile d'olive et solutions récemment développées. Contribution spéciale de Sustainable Business Associates (Suisse) à SESEC II, pp 2-7.
- Belaid, C., Kallel, M. and Elleuch, B. (2002). Identification de nouveaux composés phénoliques présents dans les rejets liquides d'huileries d'olive (margines). Déchets - Revue Francophone D'écologie Industrielle, 27: 30-34.
- Camurati F., A. Lanzani, A. Arpino, C. Ruffo et E. Fedeli (1984). Le acque di vegetazione della lavorazione delle olive: tecnologie d'économie di recupero di sottoprodotti. **Riv. Ital. Sostanze Grasse**, 61, 283-292.
- Elmekawy A. Hegab H.M. krishna G.M.Elbaz A. F.BulutM. (2014). Technological advances in CO_2 conversion electro-biorefinery: A step toward commercialization. Bioresource Technology, 215, 357-370
- Filidei S., G. Masciandro et B. Ceccanti (2003). Anaerobic digestion of olive oil mill effluents: Evaluation of wastewater, the organic load and phytotoxicity reduction. **Water, Air Soil Pollut.**, 145, 79-94.
- Iboukhoulef H. (2014). Traitement des margines des huileries d'olive par les procédés d'oxydations avancées basés sur le système Fenton-like (H2O2/Cu). Thèse de doctorat. Université Moloud Maamri Tizi Ouzou.
- Khoufi, S., Feki, F., Sayadi, S. (2007). Detoxification of olive mill wastewater by electrocoagulation and sedimentation processes. J Hazard Mater., 142(1-2): 58- 67.
- Ranalli A. (1991 a). L'effluent des huileries d'olive: Propositions en vue de son épuration. Références aux normes italiennes en la matière. Première partie. Olivae 37: 30-39.
- Ranalli A. (1991 b). The effluent from olive mills: Proposals for reuse and purification with reference to Italian legislation. Olivae 38: 19-34.
- Ungar, I. A. (1978). Halophyte seed germination. Botanical Review, 44, 233-264.
- Yaakoubi A, Chahlaoui A, Rahmani M, Elyachioui M, Oulhote Y (2009) Effet de l'épandage des margines sur la microflore du sol. Agrosolutions 20(1): 35-43.

Session 5 : Investissements, structures de production et de commercialisation (Projets, systèmes de production, structures de production et d'encadrement, commercialisation, approches participatives...).

Commercialisation des dattes sur le marché mondial: Potentiel, contraintes et perspectives

Mohamed BEN SALAH
Center International de Recherche Agricole dans les Régions Chaudes (ICARDA)
Email: bensalah_mohamed@yahoo.com

RESUME

La datte détient un statut élevé dans le marché des produits agricoles et est l'une des plus importantes productions de rente en particulier des petits agriculteurs. L'analyse de la chaine de valeur des dattes revêt une importance de premier degré pour les pays du MENA (Moyen Orient et Nord Afrique) et est un produit stratégique dans les pays du Nord Afrique. La production internationale de dattes est de l'ordre de 7,1 millions de tonnes dont près de 83% proviennent de la région MENA. Moins de 7% de cette production est échangée en dehors des zones de production sur le marché international. L'autoconsommation de dattes dans les pays producteurs ne cesse de régresser avec les traditions alimentaires et culinaires qui ne cessent de changer et la perte au champ est évaluée à un minimum de 30%.

Même si la datte se classe le troisième rang de produits fruitiers commercialisables, elle est la moins valorisée sur le marché international (10%) comparée au Café (78%) et le Cacao (54%). L'indice d'avantage comparatif des dattes des pays producteurs sur le marché international montre que seule la Tunisie possède un haut avantage comparatif suivie de loin par l'Iraq, l'Iran et les Emirats Arabes Unis.

Les dattes tunisiennes détiennent la première place en termes de compétitivité, en fonction de la valeur du produit, même si la Tunisie est classée juste onzième producteur et troisième exportateur sur le marché mondial des dattes.

Les dattes peuvent contribuer davantage dans les économies des pays du MENA si plus d'attention est donnée à la qualité du produit et au marketing. Les potentialités de développement du secteur dattier reste tributaire de la qualité du produit. Beaucoup d'efforts restent à développer dans la lutte phytosanitaire, les opérations post-récolte (triage, emballage, conservation) qui font l'attractivité du produit ainsi que le respect des normes de qualité dans les marchés internationaux exigeants en matière des infestations et des résidus.

Mots clés : Dattes, Chaine de valeur, Avantage comparatif, Marché international, MENA

SAMMARY

The date has a high status in the agricultural commodity market and is one of the most important products especially of small farmers. The date value chain is of first-degree importance to MENA countries and is a strategic product in the countries of Northern Africa. The international production of dates is in the range of 7.1 million tons, of which almost 83% comes from the MENA region. Less than 7% of this production is exchanged outside the production areas on the international market. The consumption of dates in the producing countries continues to regress with the culinary traditions that are constantly changing and the loss in the field is valued at a minimum of 30%. Although the date ranks third in marketable fruit products, it is the least valued in the international market (10%) compared to Coffee (78%) and Cocoa (54%). The comparative advantage index of the dates of the producing countries on the international market shows that only Tunisia and Algeria possess a high comparative advantage followed by far by Iraq, Iran and United Arab Emirates. Tunisian dates hold the first place in terms of competitiveness, depending on the value of the product, even if Tunisia is ranked just eleventh producer and third exporter on the world date market. Dates can contribute more to the economies of MENA countries if more attention is given to product quality and marketing. The development potential of the date sector remains depends on the quality of the product. Much effort remains to be developed in the phytosanitary

struggle, post-harvest operations (sorting, packaging, conservation) that make the product attractive as well as respect for quality standards Among other in pests' infestations and pesticides residues.
Keywords: Dates, Value chain, Comparative advantage, International market, MENA

1. INTRODUCTION

En plus du rôle primordial du palmier dattier et des oasis dans la création d'espaces habitables dans des climats difficile et nocifs à la vie, le rôle économique et social du palmier dattier dans les zones arides est pionnier, et nombreuses économies se basent sur la production et le commerce des dattes. Les études confirment que la culture du palmier dattier datte au moins de 4000 ans avant J.C. L'étroite association entre le palmier et l'homme est due au fait que le palmier a été l'élément vital de la population des zones sahariennes et désertiques dans le temps et cette relation a continué à présent entre les résidents de la région et le palmier (Lazarev, 1988).

Sa présence pendant une si longue période et la relation équilibrée établie entre les capacités de l'écosystème et les besoins humains est le modèle écosystémique durable. Les défis de la production et la commercialisation des dattes sont multiples, et à différents niveaux : production au champ, post récolte, emballage, présentation et commercialisation.

Le présent papier aborde les problèmes majeurs que rencontre le secteur de dattes dans les pays producteurs et les marchés mondiaux et essaye de positionner la datte sur le marché mondial et présente certaines recommandations majeures pour développer ce secteur.

2. REPARTITION DU PALMIER DATTIER A TRAVERS LE MONDE

La culture du palmier se trouve répandue dans la plupart des régions du monde (Tableau 1) tout autant elle reste concentrée dans la région du MENA (Moyen Orient et Nord Afrique).

Le palmier dattier a connu un développement remarquable durant les dernières décennies. Quelques pays se sont investis dans le développement de sa culture et sa production. L'effectif de palmiers dattiers a connu un accroissement du aux extensions et aux nouvelles introductions. Durant les 30 dernières années cet accroissement a atteint 62% aux Emirats Arabes Unies, 8,5% en Egypte, Iran et Pakistan 4,3% en Arabie saoudite, plus de 3% dans les pays du Nord Afrique et 2% en Irak.

D'autres nouveaux pays ont commencé à introduire le palmier dattier en Afrique (Namibie, Afrique du Sud), Amérique du Nord (Mexique) et en Australie.

Tableau 1 : Répartition du palmier dattier à travers le monde

Continent	Nombre de palmier (Million)
Asie	60
Afrique	32.2
Amérique du Nord	0.6
Europe	0.32
Australie	0.03

Source: Zaied and de Wet (2002)

3. LA PRODUCTION DE DATTES DANS LE MONDE

La production internationale de dattes se situait aux environs de 7 millions de tonnes et ne cesse d'augmenter suite entre autres à l'entrée de grands projets en production.

L'évolution de la production dans tous les pays presque est due à l'amélioration des techniques de production. Depuis les années 1960 jusque 2005 la production mondiale s'est multipliée par 4 (Tableau 2). La prévision de l'évolution de la production de dattes pour l'année 2020, donne des estimations de 10 millions de Tonnes de dattes (Tableau 3).

L'Egypte occupe le premier rang de producteurs de dattes, les 5 autres grand producteurs qui suivent sont : L'Arabie Saoudite, l'Iran, l'Algérie, l'Iraq el Pakistan (Figure 1).

Tableau 2 : Evolution de la production des dattes au monde

Année	Production en millions de Tonnes
1961	1.8
1973	2.2
1983	2.6
1985	2.8
1993	4.3
2001	5.4
2003	6.7
2005	7.00

Source : FAO (2013)

Tableau 3 : Prévision de l'évolution de la production de dattes

Année	Superficie (1000 Ha)	Nombre de pieds (1000)	Productivité (Kg/ha)	Production (1000 Tonnes)
2000	1 048	125 837	5 900	6 501,4
2010	1 123	161 805	6 395	7 995,4
2020	→	→	→	10 000

Source : Mbaga (2012)

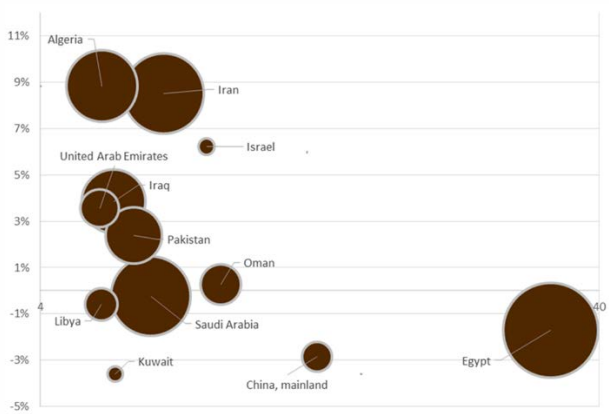


Figure 1 : Les pays grands producteurs de dattes à travers le monde
Source : Baker (2016)

4. USAGE DES DATTES

La majeure voie d'usage des dattes reste la consommation de dattes entant de dattes de table ou de bouche. Jadis les dattes étaient souvent autoconsommées. Elles étaient des denrées alimentaires de base dans la nourriture humaine des populations bédouines pour sa valeur nutritive comme source d'énergie. Le commerce des dattes était réduit dû aux difficultés de transport et de stockage et, par conséquent, les communautés locales se sont appuyées sur les produits alimentaires locaux.

Au cours de la période postmédiévale, la révolution industrielle a commencé, entraînant des changements significatifs dans la vie des communautés humaines.
Les produits alimentaires abondants sur les marchés internationaux et la diversité de l'offre de produits de base aujourd'hui sur les marchés des produits alimentaires en provenance de divers pays et le développement du transport aérien ont permis de mettre les fruits et légumes frais sur les marchés éloignés des sites de production et donc une concurrence accrue entre les denrées alimentaires sur le marché. Les dattes ont été touchées par le fait qu'elles ont commencé à être concourue par de nombreux produits sucrés transformés.
Le panier alimentaire des peuples des pays arabes a changé de façon significative de ce qui était auparavant et la consommation les dattes a été la victime de ce changement.
Actuellement, l'autoconsommation des dattes régresse dans tous les pays producteurs de dattes. L'exemple des pays du golfe arabique est donné comme exemple (Figure 2). Le Sultanat d'Oman est le plus grand pays consommateur de dattes par habitant (92 kg de dattes par habitant en année 2000, cependant cette quantité a régressé en 13 ans pour être aux environs de 68 kg (Dhehibi et *al.*, 2018).

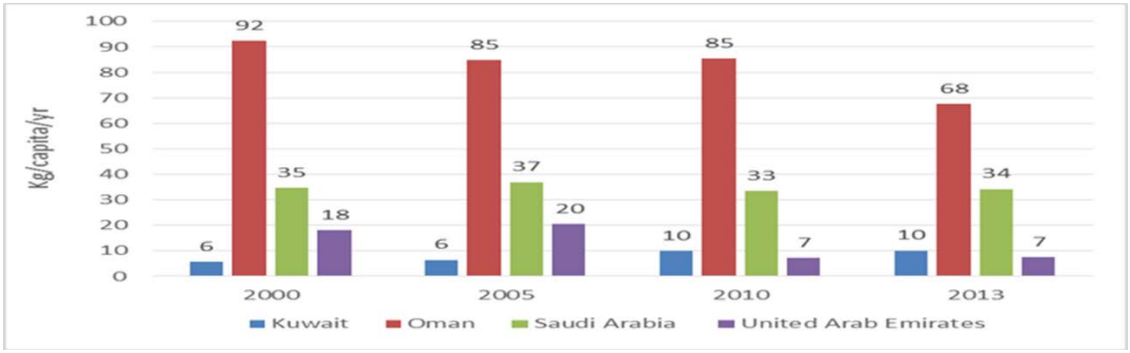


Figure 2 : Autoconsommation des dattes dans quelques pays arabes producteurs de dattes
Source : Dhehibi et *al.* (2018)

5. COMMERCIALISATION DES DATTES SUR LE MARCHE MONDIAL

Le marché de dattes reste limité et les quantités commercialisées sur le marché mondial ne dépassent pas 10 % de la production mondiale (Tableau 4).
Comparée à deux produits prix comme référence, la datte se place au niveau de la production mondiale entre le Café et le Caco, et dépasse de loin la quantité de Cacao produite au niveau mondial (Figure 3). Cependant la quantité commercialisée sur le marché mondial reste de loin basse et ne dépasse pas 10% alors que la quantité dépasse la moitié de la production pour le Cacao et le Café (Figure 4).

Tableau 4 : Quantité de dattes exportée dans le marché mondial

Quantité en mille Tonnes	Année
260	1961
400	1970
500	1998-2005
600	2005-2010
700	2010-2017

Source : FAO (2013)

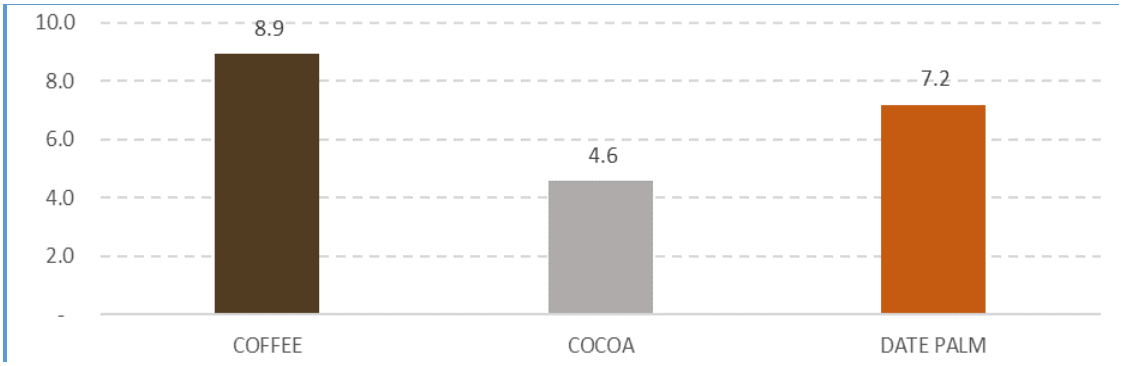


Figure 3 : Production de dattes comparée au Café et Cacao dans le monde
Source : Baker (2016)

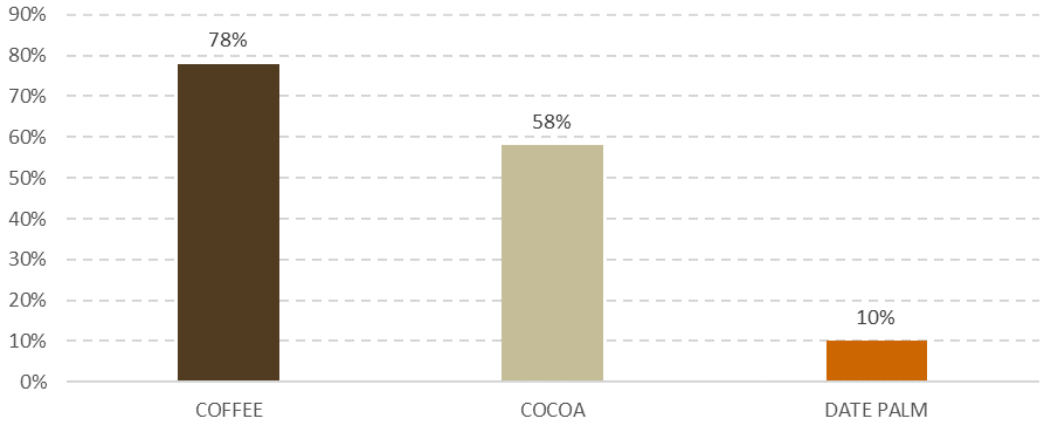


Figure 4 : Niveau de commercialisation des dattes comparée au Café et Cacao sur le marché mondial
Source : Baker (2016)

5.1. Les marchés mondiaux de dattes

Les marchés de dattes restent limités et fermés a des fournisseurs traditionnels. Il existe des pays re-exportateurs de dattes comme les Émirats Arabes Unis et la France. Le premier est également le deuxième importateur international, mais il exporte 90% de ses importations (El-Habba and Al-Mulhim, 2013).

Le marché européen offre les prix les plus promoteurs pour les dattes mais est également le marché le plus exigent en qualité.

Le marché européen est pratiquement fermé aux pays d'Afrique du Nord, en particulier la Tunisie et l'Algérie, qui représentent 72% des importations européennes ou même plus. Ces pays ont pu prendre des mesures qui répondent aux exigences européennes et ont réussi à établir des accords de commerce avec les pays du marché européen. Ces pays ont pu promouvoir leur marque dominante (*Deglet Nour*) sur le marché européen. Le produit exporté vers l'Europe est une datte certifiée et régie par les standards mondiaux : GAP, Dattes biologiques, dattes biodynamiques.

Le marché européen des dattes est stable et l'augmentation qui s'est produite est le résultat de l'accroissement de la population et en particulier des communautés musulmanes qui intègrent les dattes dans leurs habitudes alimentaires. L'un des principaux facteurs qui ont aidé la Tunisie à contenir le marché européen est la production des dattes *Deglet Nour* qui est devenue la datte privilégiée du consommateur européen et cette qualité représente approximativement 50% des exportations de dattes tunisiennes. L'Asie est le plus grand marché potentiel pour les dattes à bas prix et le prix d'une tonne est relativement bas compare au marchés européen et américain.

Tableau 5 : Quantité de dattes exportées vers le marché européen

Pays	Année	Quantité en tonnes
France	1992 – 1990	18.600
	2000 – 1998	24.400
Italie	2000 – 1990	5.000
	2010 – 2000	6.000
Espagne	2010 – 2000	5.300
Europe	1995 – 1995	50.000
	2000 – 1995	60.000

Source : FAO (2013)

Tableau 6 : Pays exportateurs sur le marché européen

Pays	% de Participation
Tunisie	**55**
Algérie	**17**
Israël	14
Iran	6
USA	1.7
Pakistan	1.3
Autres	5

Source : Shaker, 2016

5.2. Prix des dattes exportées

Les prix varient considérablement sur le marché mondial est d'environ 600 à près de 3500 dollars par tonne (Figure 5).

L'Asie est le plus grand marché potentiel pour les dattes à bas prix et le prix d'une tonne est de (200-400 dollars/tonne). La grande variation de prix est régie par la qualité des dattes exportées, le prix des dattes sur le marché asiatique varie entre 200-400 dollars la tonne. Ceci est le prix des dattes *Zehdi (*abondante en Iraq et Iran) préférée dans la plupart des pays asiatiques. Tandis que le prix de vente à l'Europe pour la haute qualité *Deglet Nour* est de 2 600 dollars/tonne pour les dattes tunisiennes. L'Algérie exporte ses dattes en Europe pour 3 500 dollars la tonne.

Les dattes *Mejhoul* de haute qualité peut atteindre 10 000 dollars/tonne sur le marché de détail européen dans la vente en paquet de 250 grammes et au prix de 2,5 Dollars.

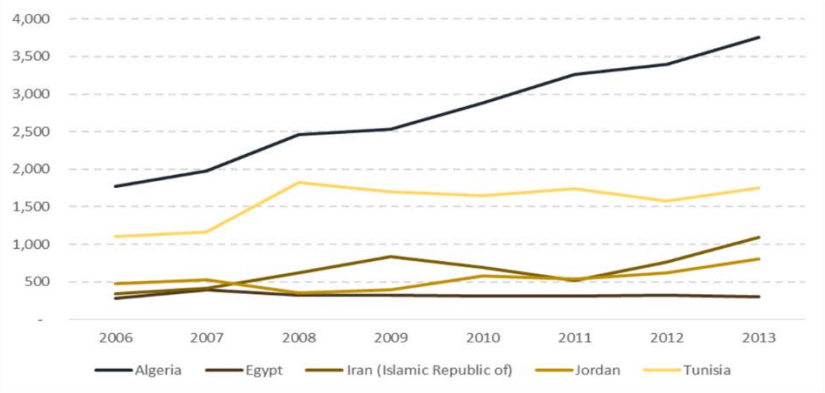


Figure 5 : Prix des dattes au Tonne sur les marchés mondiaux
Source : Baker (2016)

L'avantage comparatif dans le marché mondial de dattes (Tableau 7) classe la Tunisie à la tête des pays traditionnellement producteurs de datte avec une efficience de (39%). Les pays qui la dépassent sont producteurs de moindre quantité de dattes de haute valeur commerciale comme

Israël, La Jordanie, les USA et la Namibie nouveau pays exportateur de dattes dans l'Afrique Australe avantage aussi par la saison de production décalée de 6 mois par rapport a la région MENA.

Tableau 7 : Avantage comparatif dans le marché mondial de dattes

Pays	**Efficience (%)**
Algérie	2.1
Arabie Saoudite	5.6
Iran	15.5
Egypte	0.8
Iraq	29
Pakistan	11.3
Tunisie	39
Emirats arabes Unies	9.5
Oman	1.8
Israël	51.7
Etats Unies d'Amérique	40.4
Jordanie	43.2
Namibie	71.2

(Moyenne internationale 9%)
Source : Shaker, 2016

5.3. Transformation des dattes en produits alimentaires

La transformation traditionnelle des dattes pour la production de sirop de dattes de vinaigre de dattes et de sucreries reste très limitée. Ces denrées alimentaires supplémentaires et ne font pas partie des exigences de la table de famille quotidienne, de sorte que ces matériaux manufacturés ne sont pas la meilleure voie pour le développement et la promotion du marché de la datte.

Il est important de noter que la transformation traditionnelle ne donne pas des rendements économiques satisfaisants puisque le prix du sirop de dattes sur le marché international est d'environ 0,6 euros/kg et ce qui n'est pas suffisant dans le développement de l'industrie.

De nouveaux concepts industriels sont nécessaires à développer. La recherche scientifique dans les pays producteurs doit axer plus sur les nouveaux produits extraits de dattes. La fabrication du fructose à partir de dattes de faible qualité à un coût faible comme exemple doit être développée (Chaira et al. 2010). Ce sucre liquide peut être inclus dans la médecine traditionnelle.

D'autres voies tels que l'extraction de biocarburants ou de matériaux industriels tels que les levures, les enzymes et autres produits chimiques qui ne s'appuyant pas sur le concept de la consommation humaine (Mbaga, 2012).

6. CONCLUSION

La datte produit alimentaire des peuples des zones arides et désertiques perd sa place dans le système alimentaire. L'autoconsommation est en forte régression. Une évolution de la production mondiale des dattes est remarquable grâce à l'amélioration de la productivité par suite du

développement de nouvelles techniques et technologies. De nouveaux grands projets (Oman, Arabie Saoudite, Kuwait, Soudan) et l'intérêt porte à la production de dattes dans de nouveaux pays comme la Namibie, Le Sud Afrique et l'Australie font que la production de la datte se multiplie par 2 au minimum pendant une dizaine d'années.

L'échange des dattes sur le marché international reste tout autant très limité et ne dépasse pas (10% de la production). Le développement de ce marché nécessite une amélioration de la qualité du produit. La qualité en effet commence au champ. Beaucoup d'efforts restent à développer pour améliorer la qualité au champ par l'amélioration de la nouaison (pollinisation) et l'éclaircissage. La protection phytosanitaire est considérée comme un point majeur car les la présence de résidus chimiques affectent la commercialisation de dattes sur le marché international.

Les opérations post-récolte sont également à améliorer. Elles consistent en un meilleur triage, emballage, conservation et transport. Le respect des normes de qualité est également la clé à l'entrée des marchés internationaux exigeants en matière de standards.

Beaucoup de facteurs sont en faveur du développement des marchés de dattes et de ses sous-produits étant donné que la datte est sujette à la production biologique et naturels. Une forte demande sur les dattes (nouveaux marchés asiatiques, conscience de la qualité de dattes comme nutriment) et L'augmentation du taux de consommation humaine occidentale des dattes et ses sous-produits et de la demande de l'industrie alimentaire occidentale sont en faveur de la datte.

Enfin le développement des techniques de propagation et le développent de nouveaux programmes de coopération internationale dans le secteur du dattier et la datte.

Une forte future compétitivité est aussi attendue par suite l'entrée en production de nouveaux pays et de grands projets de plantation de dattier et l'orientation vers des variétés de meilleure qualité peuvent être un facteur à améliorer la qualité du produit pour gagner des nouveaux marchés.

REFERENCES

- Baker J. (2016): Developing an Agrifood Supply Chain for the Date Palm Industry. Conference on the Investment in Date Palm sector (reality and prospects). 23-25 May 2016 Muscat-Oman.
- Chaira N, Smaali MI, Besbes S, Ferchichi A. (2010): Production of fructose-rich syrups using invertase from date palm fruits. Journal of Food Biochemistry 35(6):1576 – 1582. DOI: 10.1111/j.1745-4514.2010.00487.x.
- Dhehibi B, Ben Salah M, Frija A. (2018): Dates Value Chain Analysis and Marketing Opportunities for the Gulf Cooperation Council (GCC) Countries. In Agricultural Economics, ISBN 978-1-78984-050-6.
- El-Habba MS, Al-Mulhim F. (2013): The competitiveness of the Saudi Arabian date palm: An analytical study. *African Journal of Agricultural Research*. Vol. 8(43), pp. 5260-5267.
- FAO (2013): Food and Agriculture Organization online dataset. http://www.fao.org/faostat/en/.
- Lachaal L. (2001) : La compétitivité : Concepts, définitions et applications. In Laajimi A. et Arfa L. (ed.). Le futur des échanges agro-alimentaires dans le bassin méditerranéen : Les enjeux de la mondialisation et les défis de la compétitivité. *Cahiers Options Méditerranéennes*; n. 57, 29-36.
- Lazarev G. (1988) : L'oasis, une réponse à la crise des pastoralismes dans le sahel. Actes du séminaire Les systèmes Agricoles oasiens. Tozeur (Tunisie) 19-21 Novembre 1988 : 77-89.
- Mbaga MD. (2012): Date marketing. In: Manickavasagan A, Essa M, Sukumar E (eds) Dates: production, processing, food, and medicinal values. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp 155–172.
- Shaker S. (2016): Dates Trade. Date palm exhibition- Erfoud, Morocco. October, 2016.
- Zaid A, DeWet PF. (2002). Climatic requirements of date palm, p. 57–72. In: A. Zaid (ed.). Date palm cultivation. Food and Agriculture Organization Plant Production and Protection Paper no. 156. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

Valorisation des coproduits oasiens dans l'alimentation ovine : Cas des pédicelles, des rebuts de dattes et de l'extrait du contenu du rumen

Arbouche HS[1], Arbouche Y[2], Mennani A[2], Arbouche R[1], Arbouche F[1]
[1]Département d'agronomie, faculté des sciences de la nature et de la vie, Université de Ghardaia, Algérie.
[2]Département d'agronomie, faculté des sciences de la nature et de la vie, Université de SETIF1, Algérie

RESUME
Cette étude a pour but de déterminer les effets de l'incorporation de trois sous-produits oasiens locaux (rebuts de dattes, pédicelles de dattes traitées à l'urée et jus du contenu de rumen) dans la ration alimentaire des agneaux Ouled Djellal, sur les performances d'engraissement et les caractéristiques des carcasses.
L'expérimentation d'une durée de 105 jours avec une période d'adaptation de 15 jours a été réalisée sur 4 groupes composés chacun de 10 agneaux mâles Ouled Djellal, âgés de 7-8 mois avec un poids vif moyen de 32±1,5 Kg, répartis aléatoirement et élevés en stabulation entravée. Les rations de base ont été formulées à raison de 0 (témoin) ; 50 ; 80 et 100 % de substitution de la paille d'orge par les pédicelles de dattes traitées à l'urée. Pour les rations complémentaires, celles des lots expérimentaux ont été constituées par une substitution à 100% du maïs par les rebus de dattes. Lors de leurs distributions, ils ont été aspergés par un extrait du contenu de rumen à raison de 250 ml/kg. Le lot 100 % a présenté une différence hautement significatif avec les autres lots avec 43 Kg de poids vif ($P<0,05$), un gain moyen quotidien de 191 g et un indice de consommation de 5,08. Ces trois paramètres ont évolués proportionnellement au taux d'incorporation des rebuts de dattes et des pédicelles traités à l'urée. Le rendement carcasse du lot 100% (48,7 %) est significativement supérieur aux autres lots et l'épaisseur du gras dorsal est significativement inférieure. Sur le plan économique, la marge bénéficiaire du lot 100% est de 30,93 DZA par jour et par animal.
Mots-clés : caractéristiques des carcasses, extrait du contenu de rumen, pédicelles de dattes, performances zootechniques, rebuts de dattes

SUMMARY
The aim of this study is to determine the effects of incorporating three local oasis by-products (cull dates, date pedicels treated with urea and juice from rumen content) into the food ration of Ouled Djellal lambs on fattening performance and carcass characteristics. The experiment was carried out over a period of 105 days, with an adaptation period of 15 days, on 4 groups each consisting of 10 male Ouled Djellal lambs aged 7-8 months with an average live body weight of 32 ± 1.5 kg, randomly distributed and raised in tie stalls. The basic rations were formulated at a rate of 0% (control); 50%; 80% and 100% substitution of barley straw by date pedicels treated with urea. The additional rations intended for the experimental groups consisted of 100% substitution of corn by cull dates. Before distributed, they were sprayed with rumen content extract at a rate of 250 ml/kg. The 100% group displayed a highly significant difference compared to the other groups, with a live body weight of 43 kg ($P<0.05$), an average daily gain of 191 g, and a feed convertion ratio of 5.08. These three parameters developed in proportion to the rates of incorporation of cull dates and pedicels treated with urea. The carcass yield of the 100% group (48.7%) is significantly higher than the other groups while the thickness of back fat is significantly lower. Economically speaking, the profit margin of the 100% group is 30.93 Algerian dinars per day per animal.
Keywords: cull dates, date pedicels, extract of rumen content, sheep fattening

1. INTRODUCTION

La réduction du prix de revient d'un kg de viande ovine nécessite une baisse du coût de l'alimentation, qui représente plus de 47% du coût global de production (Belhouadjeb et Chehat, 2013). Avec la crise économique mondiale et la baisse du prix du baril de pétrole, les pays émergents qui importaient l'ensemble des matières premières composants les formules alimentaires

du bétail comme l'Algérie, se trouvent contraints de trouver des solutions à même de réduire les importations tout en préservant le pouvoir d'achat des classes les plus démunies. Le recours aux aliments non conventionnels comme les sous produits agricoles et agroindustriels, sont des solutions à exploiter même si l'amélioration de leurs qualités nutritives passent par des traitements chimiques (Chermiti et *al.*, 1993; Nyarko-Badohu et *al.*, 1993; Triki et *al.*, 2010; Arbouche, 2012). Dans les zones oasiennes, les écarts de tri des unités de conditionnement et les rebuts de dattes des unités de transformation des dattes (pates de datte) sont assez conséquentes (Chehma et al., 2000, 2001).

L'Algérie dispose de quantités importantes de sous-produits agro-industriels qui peuvent être valorisés en alimentation animale, et notamment les sous-produits de transformation d'abricots dans les zones semi arides (Arbouche et *al.*, 2014) et les sous-produits du palmier dattier des zones oasiennes (Arbouche et Arbouche, 2008; Chehma et *al.*, 2009 ; Meradi et *al.*, 2016), lesquels sont constitués de pédicelles, de palmes, de rebus de dattes et de noyaux qui peuvent former les rations des petits ruminants (Al-Suwaiegh, 2016; Javidan et Khezri, 2013)

Au niveau des abattoirs, les contenus de rumen sont déversés dans les décharges publiques et sont des sources de pollution avec des quantités estimées à environ 25 kg par animal abattu en moyenne (Beranger et Robelin, 1978). Leurs valorisations peuvent être envisageable du fait que leurs compositions chimiques totalisent en moyenne, 13,4 kg de matière sèche, 21,8% de protéines brutes dont 73,4% en acides aminés, 30,3% de fibres brutes, 6,1% de matière grasse et 11,5% de cendres (Jovanovic et Cuperlovic, 1977).

Le contenu de rumen a été utilisé en alimentation animale (Abouheif et *al.*, 1999; Mandey et *al.*, 2015; Elfaki et *al.*, 2015). Les extraits du contenu de rumen améliore les performances des animaux d'élevage (Adeyemi et Familade, 2003; Adeyemi et *al.*, 2008; Darwazeh, 2010; Kuçukersan et *al.*, 2002; Sahin et *al.*, 2009).

La présente étude a examiné les possibilités d'incorporation de trois sous-produits oasiens locaux, les pédicelles de dattes traitées par l'urée en substitution de la paille d'orge pour la ration de base et les rebuts de dattes en substitution au maïs dans la ration complémentaire, cette dernière a été imbibé d'extrait du contenu de rumen au moment de la distribution.

2. MATERIEL ET METHODES

- Régimes alimentaires, animaux et protocole expérimental

Les trois sous-produits oasiens utilisés dans l'expérimentation proviennent de la région de Sidi Okba (wilaya de Biskra).

Les rebuts de dattes de variété « Deglet Nour » et les pédicelles de dattes d'une année ont été récupérés auprès des unités de conditionnement de la région de Sidi Okba (Wilaya de Biskra au Sud-Est Algérien). Les rebuts de dattes ont été broyés grâce à un broyeur à marteau pourvu d'une grille de 1mm. La composition chimique est retracée dans le tableau 1.

Tableau 1. Composition chimique des rebuts de dattes

Matières minérales (% de MS)	2,9
Matières azotées totales (% de MS)	4,2
Cellulose brute (% de MS)	9,4
Matières grasses (% de MS)	8,2
Sucres totaux (% de MS)	63,87
Energie brute (kcal/kg de MS)	4235
Unité fourragère viande	1,12

Les pédicelles de dattes d'une année ont été hachés et mis en bottes de 10-15 kg pour faciliter leur traitement à l'urée (Tableau 2**)**.

Tableau 2 : Composition chimique des pédicelles de dattes **(**Arbouche et Arbouche, 2008**)**

Désignation	MS %	% MS			
		MO	MAT	CB	MM
Pédicelles d'un an traités sous film plastique noir	86,28	94,88	13,62	32,18	5,12

MS : matière sèche ; MO: matière organique; MAT: matières azotées totales; CB: cellulose brute; MM: matières minérales

L'urée à 46,6% d'azote a été utilisée pour le traitement chimique. La solution contenait 70gr d'urée par litre d'eau pour 1kg de matière sèche (Arbouche et Arbouche, 2008; Chehma et *al*., 2009). La durée du traitement a été de 35 jours en milieu anaérobique et obscur par l'intermédiaire d'un film plastique noir, sous une température de 34 à 37°C.
La collecte du contenu de rumen s'est effectuée au niveau des abattoirs ovins juste après l'éviscération des animaux. Après son étalement sur film plastique, le contenu de rumen a été traité avec une solution d'acide chlorhydrique à 1% afin d'empêcher toutes possibilités de ponte des mouches. Le séchage à l'air libre s'est effectué après plusieurs retournements de la masse ruminale. L'extrait du contenu de rumen a été obtenu par addition d'eau chauffée à 80°C à raison d'un litre par kilogramme de contenu de rumen (1L/Kg) et malaxé tous les six heures pendant 24 heures. Après filtrage, l'extrait a été placé en réfrigération à une température de 6°C. La composition chimique azotée est retracée dans le tableau 3.

Tableau 3. Teneur en en matières azotées (%de MS) et en acides aminés (% de MAT) de l'extrait du contenu de rumen d'ovins (ECR)

	MAT	Teneur en acides aminés								
		Cystine	Méthionine	Thréonine	Lysine	Acide Glutamique	Acide Aspartique	Arginine	Leucine	Isoleucine
ECR (%)	8,32	0,89	1,10	2,14	2,56	10,21	6,24	2,85	4,36	1,81

L'essai a été effectué au niveau de la ferme pilote Yahïa Ben Aïchouche (Algérie) où quarante (40) agneaux de race Ouled Djellal âgés de 7 à 8 mois et pesant 32±1,5 Kg ont été répartis aléatoirement en fonction du régime dans quatre lots de dix (10) et menés en stabulation entravée. Tous les animaux ont été déparasités et identifiés par des boucles avant le démarrage de l'expérimentation. La durée de l'essai a été de 105 jours avec une période d'adaptation de 15 jours.
La ration de base a été constituée de paille d'orge, de foin d'avoine et de pédicelles de dattes traités (Tableau 4). Dans les lots expérimentaux, la paille d'orge a été substituée par des pédicelles traités à raison de 50% (Lot 50), 80% (Lot 80) et 100% (Lot 100). La ration de base a été distribuée à volonté selon le protocole suivant : le matin : Paille d'orge et pédicelle de dattes traités, et le soir : Foin d'avoine.

Tableau 4 : Composition et teneur en nutriments de la ration de base

	Témoin	Lot 50	Lot 80	Lot 100
Ingrédients (g)				
Paille d'orge	700	350	140	0
Pédicelles traités		350	560	700
Foin d'avoine	700	700	700	700
Teneur en nutriment calculée en %				
Matière sèche	94,75	92,75	91,55	90,75
Matière grasse	1,5	1,5	1,5	1,5
Protéines brutes	3,95	6,75	8,43	9,55
Cellulose brute	43,9	41,425	39,94	38,95

Matières minérales	5,45	5,45	5,45	5,45
Unité fourragère viande (UFV)	0,22	0,24	0,25	0,26

Deux types de ration complémentaire ont été élaborés (Tableau 5). Le lot témoin recevant une ration commerciale à base de maïs (60 %) et les lots expérimentaux une ration à base de rebuts des dattes en substitution totale du maïs. La ration complémentaire des lots expérimentaux a été aspergé par le filtrat à raison de 250 ml par Kg, et distribuée immédiatement afin de compenser le déficit en matières azotées des rebuts de dattes.

Les animaux ont été pesés individuellement tous les mois, à heure fixe après un jeune de 12 heures, à l'aide d'une pèse-bétail électronique, d'une portée maximale de 100 Kg avec une précision de 5g. La ration de base a été distribuée en adlubitum en limitant le refus entre 5 et 10%. Les quantités de concentré ont été dispensées à raison de 2Kg pour 100kg de poids vif et réajusté à raison de 5% en fin d'essai en maintenant un refus de 100g / animal / jour. Une pierre à lécher a été mise à disposition de chaque lot avec un libre accès à l'abreuvement.

Tableau 5 : Formules alimentaires des rations complémentaires (en p.100 d'aliment)

Ingrédients	Lot témoin	Lots expérimentaux
Maïs	60	0
Rebuts de dattes	0	60
Tourteaux de soja	20	20
Son de blé	9	9
Caroubier	9	9
Sel	1	1
CMV	1	1
Jus de rumen (ml/kg)	0	250
Teneur en nutriment calculée en %		
Matière sèche	85,31	87,71
Matière grasse	2,59	2,61
Protéines brutes	16,23	16,25
Cellulose brute	7,53	7,90
Matières minérales	6,83	6,34
Unité fourragère viande (UFV)	1,14	1,15

A la fin de l'essai, l'ensemble des individus de chaque lot a été abattu après un jeun de 12 heures. Les carcasses ont été pesées à chaud (CC) puis mises en chambre froide à 4°C pour déterminer le poids carcasse froide (CF). Sur cette dernière, a été déterminée l'épaisseur du gras dorsale (Laville et *al.*, 2002). D'autres mesures selon Boccard et Dumont (1955 et 1960), ont été effectuées et ont portées sur la largeur du bassin (G), largeur du thorax (LAC), largeur aux épaules (M), profondeur de la poitrine (TH), longueur de la carcasse (K), longueur de gigot (F), épaisseur du gigot. Les index de compacité du gigot (largeur / longueur) et de la carcasse (largeur / longueur), l'indice du muscle (épaisseur sur longueur gigot), l'indice de carcasse (poids sur longueur carcasse) et l'indice de conformation (g/cm) qui est la somme des deux indices précédents, ont été calculés.

Analyses statistiques

La statistique descriptive et l'analyse de variance du model linaire général uni varié (ANOVA) ont été effectuées avec le logiciel IBM SPSS version 21 (2011) pour l'analyse des poids vifs (PV), le gain moyen quotidien (GMQ), l'ingéré alimentaire (IA) et l'indice de conversion (IC). Le model linéaire général a été utilisé pour tester les effets des facteurs (substitutions) sur les variables, le test post Hoc par l'application du test S.N.K (student-Newman-Keules) et Duncan pour estimer la signification ou l'homogénéité entre les différents sous-ensembles (test de comparaison entre les moyennes). Les différences sont considérées significatives à un risque d'erreur de 5 %.

3. RESULTATS

L'incorporation des pédicelles de dattes en substitution à la paille d'orge dans la ration de base et la substitution du maïs par les rebuts de dattes dans la ration complémentaire, a influencé significativement le poids vif final des agneaux des lots expérimentaux par rapport au lot témoin (Tableau 6). Le gain moyen quotidien (GMQ) et la quantité ingérée (QI) des lots 0, 50 et 80% restent inchangés, ceux du lot 100% sont significativement différents (+46 et + 7%, respectivement). L'indice de consommation du lot 100% (5,08 g de MS/g) est significativement diffèrent des autres lots.

Tableau 6 : Performances d'engraissement des agneaux Ouled Djellal

	L0	L50	L80	L100	ESM	Valeur p
PV initial (kg)	32,3	31,7	32,1	32,4	0,43	0,95
PV final (kg)	$39,6^{a}$	$40,1^{ab}$	$40,5^{ab}$	$43,1^{b}$	0 ,55	0,01
GMQ (g)	$130,35^{a}$	$149,10^{a}$	150^{a}	$191,07^{b}$	5,47	0,001
Q Ingérée (g/animal/jour)	$900,9^{a}$	$917,8^{a}$	$922,3^{a}$	$963,4^{b}$	12,56	0,001
IC (g MS/g)	$7,34^{b}$	$6,49^{b}$	$6,27^{ab}$	$5,08^{a}$	0,25	0,01

Sur une même ligne, les nombres suivis des mêmes exposants ne diffèrent pas significativement à P<0,05

Le lot 50% présente une évolution des poids vifs la moins marquée sur l'ensemble de l'expérimentation (Figure 1). Les lots 0 et 80% ont une variation de poids vifs similaire jusqu'au $60^{éme}$ jour, qui au 90éme jour se différencie en faveur du lot 80%. Pour le lot 100%, l'évolution du poids vif est très significativement marquée par rapport aux autres lots.

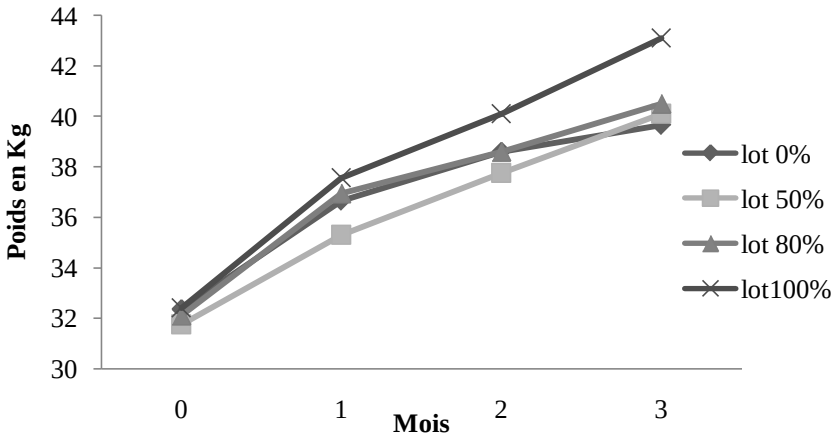


Figure 1. Evolution des poids vifs en fonction du taux de substitution

Les mesures des caractéristiques des carcasses sont présentées dans le tableau 7. Il n'existe aucune différence significative pour le poids de carcasse chaude et froide entre les différents lots. Le ressuyage réfrigéré a engendré une différence de poids de carcasse d'environ 0,6 points. La nature du régime a influencé significativement (p <0,05) le rendement carcasse entre les lots témoin et 100% (44,6 et 48,7 %, respectivement), celui du lot 50% étant similaire à celui du lot témoin alors qu'il est intermédiaire pour le lot 80% avec 47,3%. Une diminution significative (p=0,02) du gras dorsal a été enregistrée pour les lots 50 et 100% par rapport au lot témoin. Le lot 80% présentant une épaisseur du gras dorsale intermédiaire (3,56%) et reste au deçà de celui du lot témoin (3,93%). L'épaisseur du gigot, la largeur du bassin, des épaules, du thorax, la longueur de la carcasse, la profondeur de poitrine, la longueur du gigot, l'index de la carcasse et l'indice de carcasse ne sont pas différents entre les 4 lots. L'index du gigot et l'indice du muscle sont différents entre les lots 0 et 50% (p<0,05), les lots 80 et 100 % tablant des valeurs intermédiaires similaires (environ 0,61 et 0,85 respectivement). L'indice de conformation (somme de l'indice du muscle et de celui de la

carcasse, est similaire entre le lot témoin et le lot 100% (environ 1,18 g/cm), le lot 50% ayant l'indice le moins expressif (1,02 g/cm) et le lot 80% présentant une valeur intermédiaire (1,15 g/cm).

Tableau 7: Effets de l'incorporation des pédicelles et rebuts des dattes sur les caractéristiques des carcasses des agneaux Ouled Djellal

	0	50	80	100	ESM	Valeur p
Poids carcasse chaude (kg)	20,13	20,26	20,46	22,93	0,57	0,28
Poids carcasse froide (kg)	19,5	19,53	19,9	22,43	0,57	0,22
Rendement carcasse (%)	44,66^{a}	45,35^{a}	47,31^{ab}	48,77^{b}	0,63	0,01
Epaisseur du gras dorsal (cm)	3,93^{b}	3,46^{a}	3,56^{ab}	3,23^{a}	0,09	0,02
Epaisseur du gigot (cm)	30,66	27,13	30,23	30,9	0,9	0,47
Largeur bassin (G) (cm)	22,63	20,96	21,26	23,0	0,57	0,58
Largeur thorax (LAC) (cm)	19,16	19,83	19,30	20,56	0,62	0,89
Largeur épaules (M) (cm)	15,86	16,33	15,66	17,93	0,43	0,25
Longueur de carcasse (K) (cm)	66,33	67,50	67,66^{a}	68,00	0,95	0,95
Profondeur de poitrine (TH)(cm)	30,2	26,4	29,86	30,3	0,95	0,45
Longueur du gigot (F) (cm)	33,96	37,00	35,00	36,83	0,69	0,37
Index du gigot (larg/long)	0,66^{b}	0,56^{a}	0,60^{ab}	0,62^{ab}	0,015	0,03
Index de la carcasse (larg/long)	0,29	0,29	0,28	0,30	0,008	0,91
Indice du muscle (épaisseur/long gigot)	0,90^{b}	0,73^{a}	0,86^{ab}	0,84^{ab}	0,026	0,01
Indice de carcasse (pds sur long carcasse)	0,295	0,289	0,293	0,330	0,008	0,30
Indice de conformation (g/cm)	1,19^{b}	1,02^{a}	1,15^{ab}	1,17^{b}	0,026	0,02

Les sous-produits du palmier dattier et d'abattoir utilisés n'ont pas amélioré seulement les performances d'engraissement des agneaux mais ont aussi minimisés le coût d'alimentation avec une marge bénéficiaire de + 30,93 DZD par jour et par animal (Tableau 8).

Tableau 8 : Coût économique. Les prix utilisés des aliments sont les prix de marché local.

Matières premières	Prix DZD/Kg	% de substitution			
		0		100	
		Qtéing	Prix	Qteing	Prix
Concentré témoin	45	900,89	40,54		
Concentré expérimental	42,63			963,39	41,07
R de base témoin	20	500	10		
R de base expérimentale	4,168			500	2,08
Prix (DZD/j) Ration ovin		50,54		43,15	
GMQ (g)		130,35		191,07	
Prix que le consommateur est prêt à payer pour avoir le même rendement[1]		74,08			
Marge bénéficiaire (DZD/jour/animal)[2]		30,93			

Coût de revient des pédicelles de dattes constituant la ration de base expérimentale

Les pédicelles de dattes (PD) sont des déchets de récolte et de conditionnement des dattes. L'estimation de leur tonnage annuel se fait en se basant sur les quantités de dattes produites au niveau national (1 100 000 tonnes en 2017) (Caci, 2017), et en le multipliant par 1,84 % (Chehma et al., 2000). Ainsi, la quantité de pédicelles est de 20 240 tonnes pour l'année 2017, lesquels sont évacués en l'état dans les décharges publiques. Leurs récupérations ne coûtent que les frais de transport et de main d'œuvre. Dans ce sens,

- Les frais de transport sont de 5 000 DZD (camion d'une capacité de 15 tonnes), sachant que le lieu de traitement des pédicelles se trouve à 20 km de l'unité de conditionnement et/ou de transformation. Donc, le coût de transport d'un kilogramme de pédicelle de dattes vers le lieu de traitement est de 0,33 DA/kg/j.

- La main d'œuvre (MO) chargée du chargement, du traitement et du stockage est estimée à 8 ouvriers payés à raison de 1200 DZD/j/ouvrier, ce qui nous amène à 8×1 200 DA/15 000 kg de PD à traiter par jour = 0,64 DA/kg/j
- Le coût du produit de traitement est estimé à 3 DA/kg, calculé comme suit : 100 kg de PD traitées par 5 kg d'urée, dont un sac de 100 kg d'ammonotrate à 46 % d'urée coûte 6 000 DA.

Ainsi, le coûts de charge directe est estimé à CVD = 3,97 DA /kg de PD Traitées
Le coût des charges variables indirectes (CVI) est égale à 5% du CVD soit CVI = 0,1985 DA/kg de PD Traitées
Donc, le coût complet de (1 kg) de PD traités par l'urée est égale à Coût complet = 3,97 + 0,1985 = 4,1685 DA/kg de PD Traitée.
Le prix de revient d'un kg de poids vif du lot 100% à base de rebuts de dattes, pédicelles de dattes traitées et d'extrait du contenu de rumen, comparativement au lot % est très avantageux, passant de 480,07 DZA contre 824,93 DZD/ kg, respectivement, soit une baisse de 42 % (Tableau 9). La marge bénéficiaire passe d'une valeur négative (-174,93 DZA/Kg de PV) à une valeur positive (+169,52 DZA/Kg de PV).

Tableau 9: Coût de production d'un kilogramme de poids vif

Coûts	Lot témoin	Lot 100	Différence
Coût d'alimentation (DZD/j)	50,54	43,15	-7,39
Coût de production* (DZD/j)	107,53	91,8	-15,72
GMQ (g)	130,35	191,07	-60,72
Coût de production (DZD/kg)	824,93	480,07	-344,47
Prix de vente de kg vif d'agneau**	650,00	650,00	/
Marge bénéficiaire (DZD/kg vif)	-174,93	169,52	/

* coût de l'alimentation = 47% du coût total de production (Belhouadjeb et Chehat, 2013).
** Prix de vente de kg vif d'agneau dans la ferme expérimentale dans la période d'Aïd El Kebîr

4. DISCUSSION

La composition chimique des rebuts de dattes est variable d'un auteur à l'autre et est lié à la proportion de noyaux provenant des unités de transformation (pates de dattes) et dattes déclassées provenant des unités de conditionnement (Arbouche et *al.*, 2018).
L'incorporation des rebuts de dattes et de l'extrait de contenu du rumen, a influencé significativement les poids finaux des agneaux Ouled Djellal. Alhomidy et al. (2011) mentionnent que l'utilisation des rebuts de dattes augmente le poids vif ainsi que l'efficacité de la digestion chez les ovins. De même que pour Bayati Zadeh et *al.* (2015), l'utilisation des rebuts de dattes comme source d'énergie augmente l'efficacité d'utilisation de l'azote dans le rumen. Javidan et Khezri (2013) vont dans le même sens en indiquant que l'emploi des rebuts de dattes favorise la synthèse des protéines microbiennes chez les moutons.
Cependant, Meradi et *al.* (2016) et Al-Shanti et *al.* (2013) ont trouvé des différences non significatives en poids vifs finaux avec un taux de substitution à 100 % du maïs par des rebus de dattes sur agneaux locaux. Sur les chèvres Ardi alimentées à base de noyaux de dattes et de palmes traitées par l'urée, Al-Suwaiegh (**2016)** n'a trouvé aucune différence significative dans le poids vif final.
Pour l'utilisation des rebuts de dattes dans les rations de ruminants, Kholif et Abo El-Nor, (1998) et Kholif et *al.* (2001), ont montré la nécessité d'une supplémentation en matières protéiques, laquelle a été apportée par l'extrait de contenu du rumen dans notre ration complémentaire. Selon Ziolecka et *al.* (1984) et Zebrowska et *al.* (1989), l'extrait du contenu de rumen fournit des milieux appropriés pour la croissance et le développement des lactobacilles, empêchant la croissance des microorganismes pathogènes (Clostridium, E. coli, Salmonella, etc.), et augmente la concentration en acide lactique. Şahin et *al.* (2009) et Ziolecka et *al.* (1984) ont montré que l'addition de l'extrait de contenu du rumen dans les rations des agneaux et veaux, a permis une amélioration des performances d'engraissement.

Le traitement des pédicelles de dattes à base d'urée a permis en plus d'assurer les besoins d'entretien, de contribuer à une élévation du poids final des agneaux notamment du lot 100 %, comme le souligne Nyarko-badohu et *al.* (1993).

L'utilisation des rebuts de la transformation et du conditionnement des dattes dans la ration des agneaux d'engraissement a augmenté la quantité ingérée totale par jour pour le lot 100 % (963,39g), sans pour autant avoir une influence sur les lots 0 % ; 50 % ; 80 % (respectivement, 900,89 ; 917,85g ; 922,32g), résultats concordant avec ceux de Meradi et *al.* (2016) et étayés par ceux de Bayati Zadeh et *al.* (2015). L'indice de conversion le plus expressif étant attribué au lot 100 % avec 5,08 ($p<0,05$).

Le GMQ est hautement significatif ($p<0,05$) pour le lot 100 % (191,07g/j) avec +61g/j par rapport au lot témoin.. Chehma et Longo, 2004, trouvent que l'incorporation des rebuts de dattes à raison de 75 %, développe un GMQ de 150g et concluent que les rebuts de dattes ont les mêmes propriétés qu'un concentré énergétique pour l'engraissement des ovins.

Le rendement carcasse a été le plus expressif pour les lots 80 % et 100 % avec respectivement 47,31 % et 48,77%. Cette amélioration est aussi mentionnée par Farhan et *al.* (1969) avec un régime à base de noyaux de dattes. La variation de l'épaisseur du gras dorsal est moins expressive pour le lot 100 % (3,23cm) et serait du à la combinaison de l'azote apporté par le traitement des pédicelles et le taux de rebuts de dattes (60 %) qui ont au niveau du rumen synthétisé des protéines microbiennes permettant un poids final de 43,10kg et réduisant la lipogenèse des sucres apportés par les rebuts de dattes. L'indice de conformation n'est pas significatif entre le lot 0 % et 100 %, rejoignant le constat de **Sañudo** (1998) qui précise que le régime alimentaire a une faible influence sur cet indice.

5. CONCLUSION

L'emploi des sous produits de la phœniciculture (rebuts de dattes et pédicelles) en association avec l'extrait de contenu du rumen dans l'alimentation pour l'engraissement des ovins, notamment au niveau des zones oasiennes est une alternative pour l'amélioration des performances de croissance et les caractéristiques des carcasses et offre une perspective de disponibilité peu onéreuse en viande rouge pour les populations à faible pouvoir d'achat.

REFERENCES

- Abouheif M. A., Kraidees M. S. and Al-Selbood B. A., 1999 : The utilization of rumen content-barley meal in diets of growing lambs. Asian-Aus. J. Anim. Sci. 12, N0. 8: 1234-1240.

- Adeyemi O.A., Familade F.O., 2003: Replacement of maize by rumen filtrate fermented corn-cob in layer diets. Bioresour Technol. 90(2):221-224.
- Adeyemi, O.A., Eruvbetine D., Oguntona T., Dipeolu M. and Agunbiade J.A., 2008: Feeding broiler chicken with diets containing whole cassava root meal fermented with rumen filtrate. Arch. Zootec. 57 (218): 247-258.
- Alhomidy, S.N., Basmaeil, S.A.N., Al-Owaimer, A.M., El-Wazir M. 2011. Effect of Feeding Different Amounts of Discarded Dates on Growth and Efficiency of Digestion in Sheep. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 5(3): 636-64
- Al-Shanti1 H A, Kholif A M, Al-Shakhrit K J, Al-Banna M F and Abu Showayb I E, 2013: Use of crushed date seeds in feeding growing Assaf lambs. Egyptian Journal of Sheep and Goat Sciences, Vol. 8 (1), P: 65-73.
- Al-Suwaiegh S.B., 2016: Effect of substituting different dietary levels of date pits and urea treated palm leaves on growth performance and nutrients digestibility of Ardi goats. Research Journal of Veterinary Sciences, 9: 11-18.
- Arbouche F et Arbouche H S, 2008 : Pédicelles de dattes du Sud-Est Algérien: effets du traitement à l'urée et du mode de stockage sur leur composition chimique et leur digestibilité. Livestock Research for Rural Development**, 20, 97.** http://www.lrrd.org/lrrd20/6/arbo20097.htm
- Arbouche F 2012 Tables de composition et de valeur nutritive des matières premières produites en Algérie pour l'alimentation des ruminants. Institut National Recherche Agronomique Algérie Editeurs, Alger, 46 p.

- Arbouche F, Arbouche R., Arbouche Y., Arbouche H.S, Mennani A 2018 Tables de composition et de valeur nutritive des matières premières et sous produits agro-industriels de l'Afrique du Nord pour l'alimentation des ruminants Institut National Recherche Agronomique Algérie Editeurs, Alger, 89 p. (à paraître)
- Arbouche R., Arbouche F., Arbouche H. S., Arbouche Y., 2014 : Effets de la nature du complément azoté (tourteau d'amande d'abricot vs tourteau de soja) sur les performances d'engraissement et la qualité des carcasses des agneaux Ouled Djellal (Algérie).Revue Méd. Vét., 165, 11-12, pp338-343.
- Bayati Z., MoradiKor N., Sajjad A., 2015: The Effects of different levels discarded dates on synthesis of microbial protein in Kermani sheep. International Journal of Life Sciences 9 (5): 2015; 45 – 49
- Belhouadjeb F.A. et Chehat F, 2013 : Le coût de production et la compétitivité de la viande ovine Algérienne : cas de l'agneau de Djelfa. *Les cahiers du CREAD n°104. 91-110.*
- Beranger C., Robelin J., 1978 : Estimation du poids du contenu digestif des bovins à partir du poids du contenu du rumen. Annales de zootechnie, 1978, 27 (4), pp.639-645. <hal-00887827>.
- Boccard R., Dumont B.L 1955. Etude de la production de viande chez les ovins. 1. La découpe des carcasses. Définition d'une coupe de référence. *Ann. Zootech*., 3, 241-257
- Boccard R., Dumont B.L.1960 Etude de la production de viande chez les ovins. II. Variation de l'importance des différentes régions corporelles de l'agneau de boucherie. Ann. Zootech., 9 , 356-363.
- Caci, 2017 : Statistiques Chambre de commerce et d'industrie. Ministère de commerce.
- Chehma A., Longo H.F., Siboukeur A., 2000. Estimation du tonnage et valeur alimentaire des sous-produits du palmier dattier chez les ovins. Revue Rech. agron. Inraa, 7 : 7-15.
- Chehma, A. ; Longo, H. F., 2001. Valorisation des sous-produits du palmier dattier en vue de leur utilisation en alimentation du bétail. Rev. Energ. Ren. : Production et Valorisation – Biomasse: 59-64.
- Chehma A. et Longo H. F., 2004 : Bilan azoté et gain de poids chez le dromadaire et le mouton, alimentés à base de sous-produits du palmier dattier, de la paille d'orge et du drinn Aristidapungens. Cahiers Agricultures. Volume 13, Numéro 2, 221-6.
- Chehma A, Benabdelhafid M et Hanani A, 2009 : Essais d'amélioration de la valeur azotée des sous-produits du palmier dattier (pédicelles de dattes et palmes sèches) par traitement à l'ammoniac et à l'urée. Livestock Research for Rural Development, volume 21 n°5.
- Chermiti A., Teller E, Matatu B et Vanbelle M, 1993 : Traitement de la paille de blé à l'ammoniac et à l'urée: effet sur la digestibilité ruminale et sur le comportement alimentaire et mérycique chez les bovins. Conference on nutrition and feeding of herbivores No7, Paris, France (25/03/1992) 1993, Volume 42, No2, pp. 142-143.
- Darwazeh M. 2010 Effects of rumen filterate fermented wheat bran on performance of finishing broiler chickens. Master in animal production, Faculty of graduate studies at An-Najah national university, Nablus, Palestine.
- Demarquilly C., Faverdin P., Geay Y., Verite. R., Vermorel M., 1996 : Bases rationnelles de l'alimentation des ruminants. INRA Prod. Anim. Hors-série 1996, 71-80
- Elfaki M. O.A., AbdelattiK. A. and Malik H. E.E., 2015: Effect of dietary dried rumen content on broiler performance, plasma constituents and carcass characteristics. Global Journal of Animal Scientific Research. 3(1): 264-270. 2015
- Farhan S.M., Shakir M.A., El-Khalisi I., 1969. The use of date stones for feeding and fattening Awassi lambs. Iraq. J. agric. Sci., 4:86-94
- IBM, 2011 : Guide de l'utilisateur du Système central IBM SPSS Statistics 20. © Copyright IBM Corporation 1989.
- Javidan, S., Khezri, A. 2013. Study the effect of using discarded dates on rumen fermentation parameters, nitrogen metabolism and performance of kermani sheep. The first national congress of dates Iranian. Shahid Bahonar University of Kerman, Iran

- Jovanovic M. and Cuperlovic M., 1977: Nutritive value of rumen contents for monogastric animals. Animal Feed Science and Technology. Volume 2, Issue 4, December 1977, Pages 351–360.
- Kholif A.M. and Abo El-Nor Sah, 1998: Effect of replacing Corn with powdered date seeds in diets of lactating goat in productive performance. Egyptian Journal Dairy Sciences 26:25-37.
- Kholif A. M, El-Amary H. and Al- Shanti H. A., 2001: Effect of including date seeds and olive cake in diets on the yield and composition of goat and sheep milks in Southern Saini. Journal of Agriculture Sciences, Mansoura University 26 (8):4764-4772.
- Kuçukersan K., Tuncer S.D., Sanli Y., Midilli M., Goncuoglu E., Kuçukersan S. and Tan H., 2002: The effects of dietary stabilized rumen extract (SRE) and virginiamycine on performance and carcass yield of broilers. Revue Méd. Vét., 153, 11, 723-726.
- Laville E., Boiux J., Sayd T., Eychenne F., Marcq F., Leroy P. L., Elsen J.M. et Bibe B., 2002 : La conformation bouchère des agneaux, étude d'après la variabilité génétique entre races. INRA. Prod.aim.15, pp 53-66.
- Mandey J.S., Maaruf K., Regar M.N., Kowelly.H.S. and Junus C., 2015: Effect of dried rumen content with and without cellulase in diet on carcass quality of broiler chickens. International Journal of Poultry Science 14 (12): 647-650.
- Meradi S., Arbouche F. et Arbouche R, 2016 : Valorisation de l'engraissement de la race ovine Hamra par les sous-produits de la datte. Livestock Research for Rural Development. Volume 28 n°4. http://www.lrrd.org/lrrd28/4/arbo28070.html.
- Nyarko-Badohu D K, KayouliC, Ba A A et Aziza G, 1993 : Valorisation des pailles de céréales en alimentation des ovins dans le Nord de la Tunisie: 1. Traitement aux alcalis (ammoniac/urée) 2. Complémentation par des blocs mélasse-urée. Livestock Research For Rural Development 5 (1) http://www.lrrd.org/lrrd5/1/tunis.htm
- Şahin T., Kaya İ., Ünal Y., Uzlu E., Elmali D.A., 2009 : Effects of supplementation of the stabilized rumen extract to Tuj lambs diets on fattening performance, rumen fermentations and diet digestibility. Revue Méd.Vét., 160, 1, 23-27
- Sañudo C., Sánchez A. and Alfonso M., 1998: Small ruminants' production systems and factors affecting lamb meat quality. Meat Science, 49-Suppl. (1): S29-S64.
- Triki S, Benmessaoud N E et Ghozlane F, 2010 : Valeur alimentaire comparée de la paille de céréales traitées à l'urée ou à l'ammoniac. Livestock Research for Rural Development. Volume 22 (1).www.lrrd.org/lrrd22/1/trik22017.htm
- Zebrowska T., Ziolecka A., Ziolecki A., 1989: The effect of stabilized rumen extract on growth and development of calves. 3. Digestion in the small intestine. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr, 61, 245-254.
- Ziolecka A., Osinska Z., Ziolecki A., 1984: The effect of stabilized rumen extract on growth and development of calves. 1. Live weight gain and efficiency of feed utilization. Z. Tierphysiol. Tierernahrg U Futtermittelkde, 51, 13-20.
- Ziolecka A., Kwiatkowska E., Laskowska H., 1984: The effect of stabilized rumen extract on growth and development of calves. 2. Digestive activity in the rumen and development of microflora in the rumen and faces. Journal of animal physiology and animal nutrition. Volume 51, Issue 1-5. Pages 20–31.

Durabilité des exploitations irriguées dans le sud-est Tunisien: Cas du périmètre irrigué privé de Bsissi-Oued El Akarit, Gabès

Naceur Mahdhi[1], Hssan Abdelhapith[2], Farhat Soudi[1]
[1]Institut des Régions Arides de Médenine, Tunisie
[2]Ecole Supérieur d'Agriculture de Mograne, Tunisie
Email : naceur.mahdhi@ira.rnrt.tn

RESUME
Compte tenu de l'évolution des attentes de la société envers la qualité des produits et de l'environnement, les exploitations agricoles devront de plus en plus s'inscrire dans un objectif de durabilité encourageant une agriculture écologiquement saine, socialement équitable et économiquement viable. Pour atteindre cet objectif la méthode IDEA (Indicateurs de la Durabilité des Exploitations Agricoles) a été utilisée pour évaluer la durabilité globale du périmètre irrigué privé de Bsissi Oued El Akarit du gouvernorat de Gabès, choisi comme zone d'étude, et connue comme un cas de réussite unique en Tunisie pour la gestion communautaire et participative d'une nappe phréatique en état de surexploitation. Sur la base d'un échantillon de 60 une analyse empirique a permis d'apprécier et de comparer la durabilité des exploitations irriguées sur la base du calcul de quelques indicateurs de durabilité inspirés de la méthode IDEA (Indicateurs de la durabilité des exploitations agricoles). La durabilité économique est le point fort de cette agriculture. Elle atteint 60,5% du maximum théorique pour l'ensemble des exploitations. La durabilité agro-écologique constitue le point faible de ces exploitations (40 sur 100). Elle est pénalisée par des scores moyens ou très faibles au niveau de 5 indicateurs sur les 9 qui composent cette échelle. La durabilité socio-territoriales de ces exploitations est moyenne (55 sur 100). Elle se caractérise par une amplitude des scores au niveau de ses différents indicateurs relativement plus faible. Les résultats issus des trois échelles de durabilité montrent que les exploitations conservent encore des marges de manœuvres qui pouvant être atteintes avec l'amélioration des pratiques agricoles (usage des pesticides, protection de la ressource sol), la diversification des systèmes de culture (diversité annuels et temporaires), l'intégration de l'élevage (diversité animale) et la gestion des matières organiques à l'échelle agro-écologique, et l'amélioration des indicateurs liés à l'accessibilité de l'espace et à la formation (journée de formation) à l'échelle socio-territoriale et à l'amélioration de l'efficience du processus productif à l'échelle économique.
Mots-clés: durabilité agro-écologique; indicateurs ; durabilité socio-territoriales, durabilité économique ; agriculture irrigué, Tunisie.

1. INTRODUCTION

Dans un contexte de raréfaction et des risques de changements climatiques, la gestion de la ressource en eau est devenue une préoccupation majeure du monde entier. Particulièrement concernée, la Tunisie se place dans la catégorie des pays les moins dotés en ressources en eau dans le bassin méditerranéen. Ces ressources sont relativement faibles et leurs mobilisations sont assez avancées (90% en 2013) (Mahdhi, 2014). Toutefois, si dans un passé non lointain ces ressources sont parues suffisantes, voir même abondantes pour le développement agricole en zones arides, la situation actuelle n'est plus tellement rassurante. Les profondes mutations survenues aux cours des quarante dernières années se sont traduites par des évolutions marquées et rapides des systèmes de production et des modes d'exploitations et de gestion des ressources naturelles. C'est ainsi qu'on assiste à l'amorce de l'exploitation accrue des eaux souterraines et du développement de l'arboriculture et de l'extension remarquable du potentiel irrigable (469000 ha en 2012) aux dépens des espaces pastoraux, notamment, sur la zone littorale liée à des transferts de propriété foncière. Dans ce contexte, la complémentarité spatiale des systèmes agraires a disparu pour faire place à des systèmes de production interconnectés dont la dynamique s'exprime par une compétition pour

l'accès aux ressources naturelles dont notamment les ressources en eau souterraine dans le sud-est Tunisien. Conscient de cette menace, des réformes profondes (institutionnelles et réglementaires) ont été apportées au secteur irrigué en vue de maîtriser la demande en eau, d'accroître l'efficacité de l'eau d'irrigation, d'améliorer l'efficacité de l'eau à la parcelle et d'atteindre une meilleure valorisation économique de l'eau d'irrigation. Cependant, malgré cette volonté de gestion de la demande, le secteur irrigué se trouve aujourd'hui parmi les secteurs le plus critiqué, que ce soit en matière de pollution environnementale, de sécurité alimentaire, de rôle paysager ou de performance économique. Dans plusieurs régions du sud-est Tunisien, la surexploitation des ressources en eau souterraine a conduit à des risques environnementaux, économiques et sociaux. Devant la baisse de débit de leur forage les irrigants se trouvent obligés à investir toujours pour continuer de disposer d'eau douce en quantité suffisante pour leurs cultures, soit à modifier leurs systèmes de cultures pour s'adapter à la rareté et la surexploitation des ressources en eau souterraine (Mahdhi et al, 2016). En l'absence de politiques spécifiques les différences s'accroissent entre les exploitations agricoles qui ont les moyens d'investir toujours plus pour avoir suffisamment d'eau et celles qui doivent adapter leurs cultures à la pénurie. Ainsi des interrogations peuvent être posées: est-il possible de soutenir la durabilité de ses pratiques de gestion ?.

Faire face à ces problèmes nécessite d'inviter les exploitations agricoles de s'inscrire de plus en plus dans un objectif de durabilité encourageant une agriculture écologiquement saine, socialement équitable et économiquement viable. C'est ce à quoi essaie de répondre ce travail qui a pour objectif l'évaluation de la durabilité des exploitations irrigués dans le sud-est tunisien?

En Tunisie, l'évaluation de la durabilité est un sujet relativement récent et les essais réalisés dans ce domaine, malgré leur importances et utilité, restent limités où plusieurs systèmes de production présentent, aujourd'hui, des failles importantes au niveau de la durabilité et demandent la prise de mesures concrètes afin d'améliorer la durabilité (MARH, AVFA, 2016. Une agriculture durable doit être économiquement viable, écologiquement saine et socialement équitable (Francis et Youngberg, 1990) in Zahm et al (2013). Les exploitations agricoles durables doivent donc répondre au mieux à ces trois objectifs, dans le contexte de leur territoire et de leur système agraire. Toutefois, ce concept reste assez flou et implique un certain nombre de questionnements : quels sont les critères à retenir pour estimer les différentes composantes de la durabilité d'une exploitation agricole ?, comment mesurer la durabilité de l'agriculture et des exploitations agricoles ? Des variables qui pourraient représenter de façon synthétique les trois échelles de la durabilité – économique, environnementale et sociale sont difficiles à définir. quelles sont les méthodes aujourd'hui disponibles pour mesurer ce niveau de performance élargie d'une exploitation agricole ?.

Appliquée à l'échelle de l'exploitation agricole, la durabilité nécessite la mise en place de méthodes permettant de l'évaluer. L'une d'elles, la méthode IDEA (Indicateurs de la durabilité des exploitations agricoles), est utilisée, dans la présente étude, et permet d'évaluer la durabilité des exploitations agricoles par des indicateurs dans la zone de Bsissi-Gabès, pris comme zone d'étude.

2. MATERIELS ET METHODES

Afin d'apprécier la durabilité des exploitations irrigués dans la région de Bsissi, nous avons utilisé quelques indicateurs de durabilité qui sont inspirés de la méthode IDEA (Vilain, 2003). C'est une méthode de *scoring* qui évalue la durabilité d'une exploitation agricole à partir de 41 indicateurs structurés dans trois échelles indépendante de durabilité (l'échelle de durabilité agroécologique, l'échelle de durabilité socioéconomique et l'échelle de durabilité socio-territoriale). Chacune de ces trois échelles est subdivisée en trois ou quatre composantes qui synthétisent les grandes caractéristiques fondamentales du diagnostic de durabilité (Girardin et *al.*, 2004). L'hypothèse principale de cet outil repose sur l'idée qu'il est possible de quantifier les diverses caractéristiques des systèmes agricoles en leur attribuant une note chiffrée, puis d'agréger les informations obtenues pour obtenir un score ou une performance globale. L'agrégation se fait au sein de trois échelles. Le nombre de points ou d'unités de durabilité attribués à chaque indicateur est compris entre les bornes zéro (même si la somme des items élémentaires est négative) et une valeur plafond qui est propre à chaque indicateur (même si la somme de ses items élémentaires est supérieure). Les performances globales de chaque échelle de durabilité sont analysées de manière indépendante. Le score d'une

exploitation, pour chacune des trois échelles de durabilité, est le nombre cumulé d'unités élémentaires de durabilité obtenues pour divers indicateurs de l'échelle considérée. Plus la note est élevée, plus l'exploitation est considérée comme durable sur l'échelle considérée. La valeur numérique finale de la durabilité est constituée de la valeur la plus faible des trois échelles, en appliquant ainsi la règle des facteurs limitant qui s'impose dans l'ensemble du vivant.
Cette méthode a été choisie pour sa facilité de mise en œuvre et pour son adaptabilité à une enquête en temps limité. Cette étude s'appuie sur des enquêtes réalisées au mois de mars 2017 aux prés de 60 exploitations irriguées dans la région de Bsissi (Figure 1). Les informations brutes recueillies sur la base d'un questionnaire inspiré de la méthode IDEA avec 140 questions ont fait l'objet d'un dépouillement pour le calcul des indicateurs. Le principe de calcul consiste en un barème de notation sur les modalités qui déterminent chaque simple indicateur. Les scores obtenus ont été organisés et exploités grâce au logiciel Excel pour l'analyse descriptive des échelles de durabilité agricole.

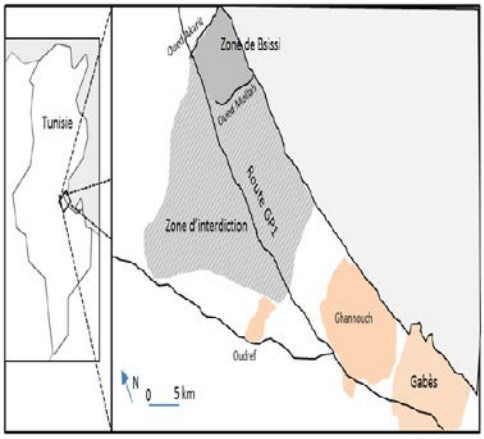


Figure 1. Zone d'étude

3. RESULTATS ET DISCUSSION

Sur la base des données collectées, une analyse empirique a été effectuée en vue d'évaluer la durabilité des exploitations irriguées faisant l'objet de notre étude. Dans cette section, on décrira les résultats de l'étude. On procédera successivement à la description de l'indicateur utilisé, à l'attribution de la note pour chaque échelle et à l'appréciation de la durabilité globale des exploitations moyennant la méthode IDEA.

3.1. L'échelle de durabilité agro-écologique

Elle rassemble des indicateurs illustrant la capacité des exploitations à auto-entretenir leur fertilité et leur potentiel productif à long terme, capacité étroitement corrélée à la gestion du capital naturel (eau, sol, biodiversité, air et lumière). De façon plus positive, cette échelle vise plutôt l'optimisation des facteurs de production orientés vers une *rentabilité nouvelle*, moins vulnérable aux fluctuations du marché et des aides publiques, et plutôt solide au plan agronomique, écologique et sanitaire. Cette échelle est divisée en trois composantes de même poids et sont expliquées par des indicateurs qui seront présentés ultérieurement.

3.1.1. Diversité des cultures annuelles et temporaires

Cet indicateur vise à favoriser la biodiversité végétale, la cohérence technique et la gestion de la fertilité du sol à long terme en encourageant le nombre d'espèces cultivées. En effet, plus le système est diversifié, plus il est capable de combiner des productions complémentaires qui limitent les risques de fluctuations économiques, climatiques ou sanitaires, protègent les sols de l'érosion, et optimisent les rotations et la gestion agronomique de la fertilité. Par espèce cultivé la méthode IDEA attribue une note de 2 points et attribue 2 points s'il y a une diversité variétale (plus de 6 variétés).

La présence des légumineuses dans le système de production est ainsi indispensable au fonctionnement agronomique du biotope sol; c'est aussi une source d'azote pour les cultures suivantes. Si la présence des légumineuses est significative (>10%) dans l'assolement, la méthode IDEA attribue une note de 3 points, alors que si elle n'est pas significative la note est égale à 0. La note moyenne obtenue par cet indicateur est faible : 4,8 sur 14 soit 34,28% du score maximal théorique. Cela s'explique par la faiblesse de la diversité des cultures au sein de chaque exploitation et à l'absence des légumineuses.

3.1.2. Diversité des cultures pérennes

Cet indicateur permet une quantification de la diversité des cultures pérennes notamment les arbres fruitiers et les oliviers. La moyenne pour cet indicateur n'atteint que 31,92% du score maximal théorique, puisque 73% des exploitants ne possèdent qu'une seule espèce des cultures pérennes (oliviers) et seulement 40% possèdent plus d'une variété pérenne supplémentaire (variable qui donne une idée de la diversité des cultures pérennes).

3.1.3. Diversité animale

Les productions animales permettent de valoriser des ressources locales (herbe) et de limiter les apports d'intrants (fertilisants). Elles permettent également de maintenir le taux de matière organique du sol, clé de sa fertilité. La moyenne pour cet indicateur n'atteint que 10 % du score maximal théorique puisque 94% exploitations n'intègre pas l'activité d'élevage dans leurs systèmes de production à cause de l'élévation des charges d'alimentation et l'accroissement du phénomène du vol dans la zone étudiée.

3.1.4. Assolement

Une monoculture et des assolements simplifiés induisent des risques économiques, écologiques et parasitaires, c'est un indicateur précieux dans la détermination de la durabilité des exploitations agricoles. La moyenne observée pour cet indicateur atteint 42,77% du score théorique; cette faiblesse est exprimée par la spécialisation de certains agriculteurs dans la culture d'olivier, et la domination de certaines cultures par rapport à d'autres. La moyenne observée pour cet indicateur forme 16% du maximum théorique, car 30% des exploitations ont une culture dominante qui occupe entre 20 et 94% de la surface assolée (donc ayant entre 2 et 8 points). La mixité des cultures ne s'observe que chez 2% des exploitations enquêtées, ce qui explique en partie le faible score de cet indicateur.

3.1.5. Gestion des matières organiques

Le score attribué à cet indicateur est positif et proportionnel à la quantité de fumier épandue jusqu'au niveau au-delà duquel l'agriculteur sera pénalisé (20 tonnes de fumier par hectare : -2 points). La quantité épandue moyenne pour les exploitations enquêtées est de 10% par rapport au maximum théorique. En effet 77,5% des exploitations enquêtées épandent moins qu'une tonne de fumier par hectare (parmi eux 68% n'ont pas de terrain et 32% en possèdent mais n'épandent qu'une quantité inférieure à 1 tonne/ha). Ils préfèrent vendre leur fumier à un prix acceptable puisqu'il est bien apprécié pour les cultures sous serre (maraîchères: tomate et

3.1.6. Fertilisation

Cet indicateur prend en considération la quantité d'azote annuel apporté par hectare, la quantité de potassium et de phosphore, et la présence des cultures pièges à nitrate. En se basant sur le barème de la méthode IDEA, une note égale à 9,26/13 est attribuée à cet indicateur puisque la fertilisation azotée est quasi-nulle (inférieure à 70 kg/ha) pour 90% des cas observés.

3.1.7. Pesticides

La pression polluante résulte de l'utilisation de pesticides. (Pression polluante (PP) = Surface développée / SAU). Aussi on tient compte de la lutte biologique et de l'utilisation des produits

toxiques et le lavage des cuves de pulvérisation. La moyenne pour cet indicateur observé sur les 60 exploitations est très faible: 5,26 sur 20 soit 26,3% du score maximal théorique ; ce qui reflète l'utilisation abusive des pesticides, et la réduction de la lutte biologique pratiquée par ces agriculteurs.

3.1.8. Protection de la ressource sol

La protection de la ressource sol est très nécessaire pour le maintien et la conservation du potentiel de production, également pour s'assurer de la durabilité de la ressource sol. La moyenne générale pour cet indicateur est de 38% par rapport au maximum théorique. La faiblesse des scores est due au fait que la pratique de culture sans labour n'est pas observée chez les exploitations enquêtées, seulement 37% des exploitations enquêtées ont zéro pour cent de leur terrain considéré comme nu, et un faible pourcentage des exploitations (19%) a des dispositifs anti-érosion.

3.1.9. Gestion de la ressource en eau

Une bonne gestion de la ressource en eau est indispensable pour s'assurer de la réserve en eau et son existence pour les futures générations. La moyenne calculée pour les exploitations enquêtées se situe à 83,1% du maximum théorique. Cette moyenne relativement élevée est due au fait que 86.66% de la superficie irrigué totale est équipée en système d'irrigation goutte à goutte.

3.2. Durabilité socio-territoriale

Elle caractérise l'insertion de l'exploitation dans son territoire et dans la société. Elle cherche à évaluer la qualité de vie de l'agriculteur et le poids des services marchands ou non marchands qu'il rend au territoire et à la société. En ce sens, elle permet une réflexion sur des enjeux dépassant la seule exploitation agricole et elle nous informe sur le rôle de l'exploitation dans la création de l'emploi et sa contribution à l'amélioration des niveaux de vie de la population existante. Les trois composantes de la durabilité socio-territoriale ont le même poids et sont expliquées par des indicateurs qui seront présentés ultérieurement.

3.2.1. Accessibilité de l'espace

Dans la région de Bsissi, cet indicateur constitué par deux modalités présente un score moyen de l'ordre de 40% du maximal théorique. Si la circulation des randonneurs est favorisée dans 75% des exploitations, par contre les chemins et les haies sont rarement entretenus (10% des exploitations enquêtées).

3.2.2. Implication sociale

Les agriculteurs étant désormais minoritaires dans la plupart des communes rurales, leur point de vue et les valeurs qu'ils défendent seront d'autant mieux reconnus qu'ils resteront fortement insérés, du côté social, sur le territoire et dialogueront avec les autres représentants de la société. Leur participation active à des associations ou à des structures électives non professionnelles, qui sont des lieux de rencontre avec des non-agriculteurs, permet ce dialogue et cette vitalité territoriale.

Cet indicateur atteint une note moyenne de 4,74 ce qui représente 36,46% du maximum théorique. La note obtenu reflète l'implication de 100% des irrigants dans des structure associative (GDA de surveillance et d'exploitation de la nappe de Bsissi-Oued El Akarit) et dans des structures professionnelles (l'union des agriculteurs) pour pouvoir bénéficier des aides de l'Etat.

3.2.3. Contribution à l'emploi

Etant donné l'importance de l'emploi, des jeunes notamment, dans le volet « social » du développement durable, il est primordial de prendre conscience de la contribution à l'emploi sur son territoire d'une exploitation agricole ; c'est le but du présent indice. Les exploitations employant une main d'œuvre importante par unité de surface ou de production, main d'œuvre de préférence locale, seront ici valorisées. Cet indicateur bénéficie de la note maximale de la méthode IDEA pour cet indicateur qui est de 11 points. Cette moyenne très élevé s'explique par la forte contribution à l'emploi du secteur irrigué en zone aride notamment la femme rurale.

3.2.4. Travail collectif

La participation à des formes de travail collectif développées au sein du territoire favorise la solidarité, génère une meilleure efficience, développe des économies d'échelle et des synergies et constitue, ainsi, un puissant levier de développement local.

L'évolution des systèmes agricoles vers une plus grande durabilité est également facilitée quand plusieurs agriculteurs d'un même territoire marchent dans la même direction. Tel est le cas des agriculteurs touchés par notre enquête, dont 80% appartiennent à un groupement d'agriculteurs. Cette caractéristique permet aux exploitations un bon classement sur l'échelle de la durabilité socio-territoriale. La moyenne observée pour cet indicateur représente 55,55% du score maximal théorique. Seuls 22% de l'échantillon ont attient la note maximale. En effet, l'entraide et le travail collectif sont limités aux travaux de labour et de récolte (récolte des oliviers). En outre le travail en réseau est limité à l'intérieur de la grande famille.

3.2.5. Formation

Il existe de nombreuses façons de se former. Deux actions relèvent du champ de cet indicateur : participer à des sessions de formation et accueillir des stagiaires ou des groupes de professionnels ou d'étudiants. Pour le périmètre irrigué de Bsissi cet indicateur est très faible et ne concerne que 8,5% des exploitants pour lesquels la formation dépasse cinq jours/personne/an; 9,3% accueillent des stagiaires et 8,5% accueillent des groupes de professionnels. Ainsi le score moyen de l'indicateur ne dépasse pas 15% du maximum théorique et le score de zéro est observé pour 75% des cas.

3.2.6. Intensité de travail

Cet indicateur à une valeur moyenne de l'ordre de 39,28% du maximum théorique. 35 pour cent des exploitants se sentent surchargés entre 30 et 59 jours par an et 45,5% plus de 50 jours et seuls 19,5% des irrigants correspondent à un score maximal de 6 points soit un temps de surcharge qui ne dépasse pas les 30 jours par an.

3.2.7. Qualité de vie

Le calcul de cet indicateur repose surtout sur l'auto-estimation (entre 0 et 6 points) donnée par l'exploitant sur sa qualité de vie. Cet indicateur a une moyenne de 51.16% du maximum théorique. Ceci est considéré comme très acceptable puisque tout d'abord aucun exploitant n'a choisi la note zéro, et qu'une abondance de résultats s'observe pour les tranches allant de 3 à 5 points soit 87% de l'ensemble. Les résultats montrent que les irrigants sont en général satisfaits en ce qui concerne leur indépendance et la possibilité de gérer librement leur temps et le lien avec la nature; par contre, ils se plaignent longuement des prix des intrants et de la faiblesse du soutien de l'Etat.

3.3. Durabilité économique

L'échelle de durabilité économique, dont les indicateurs résultent des orientations techniques et financières du système de production, analyse les résultats économiques au-delà du court terme et des aléas conjoncturels. Appréhendée par six indicateurs, cette dimension est étudiée depuis plus longtemps par les agroéconomistes qui utilisent couramment de nombreux ratios de gestion économique et financière. L'évaluation de la durabilité économique dépasse, cependant, l'analyse de la seule performance économique à court terme. En effet, la pérennité d'un système de production dépend d'abord de sa viabilité économique, mais aussi de son indépendance économique, de sa transmissibilité et de son efficience.

La viabilité économique caractérise l'efficacité économique des systèmes agricoles à court et moyen terme. C'est une donnée essentielle qui doit être relativisée par les indicateurs suivants. L'indépendance économique et financière garantit généralement le moyen terme, en permettant aux systèmes de production de s'adapter plus facilement aux inévitables évolutions des aides publiques, mais aussi d'avoir la capacité d'adapter l'exploitation agricole par de nouveaux investissements.

La transmissibilité constitue un élément de l'analyse du long terme. En effet, la durabilité des systèmes agricoles provient aussi de leur capacité à perdurer d'une génération à l'autre. En cas de succession, l'importance des capitaux nécessaires au fonctionnement de l'exploitation et à sa reprise peut finalement conduire à son démantèlement.

3.3.1. Viabilité économique

Cet indicateur basé sur la déduction des besoins de financement de l'excédent brut de l'exploitation et en rapportant cette différence au nombre d'UTH non salarié (familiale ou associé), le résultat est comparé au SMAG. Le score moyen observé par cet indicateur est de l'ordre de 9,6 soit 48% du maximum théorique. 64% présentent des scores faibles. Cela s'explique par rentabilité faible du secteur irrigué en zone aride.

3.3.2. Taux de spécialisation économique

La méthode IDEA considère qu'un système de production diversifié est moins vulnérable et moins dépendant de la conjoncture économique. Cet indicateur est évalué par la contribution de la principale activité dans le chiffre d'affaire. Il est déterminé par la formule suivante: TS = Produit brut de la production principale /Produit brut total. Cet indicateur marque une moyenne de 35,2% par rapport au total théorique. Ce résultat est expliqué par des systèmes de production moins diversifiés et par la dominance de la monoproduction (production oléicole) chez 70% des exploitants.

3.3.3. Autonomie financière

Cet indicateur renseigne sur l'autonomie financière et la dépendance de l'exploitation. La recherche d'une autonomie importante est l'un des objectifs de l'agriculture durable. Elle nous renseigne sur les dettes vis-à-vis des fournisseurs et des banques; par conséquent, plus ces dettes sont faibles, plus l'exploitation est indépendante et donc, l'autonomie est élevée. La dépendance financière (DF) est calculée par la formule suivante: *DF = Σ annuités / EBE Avec EBE: Excédent brut de l'exploitation*
Cet indicateur marque un moyen très élevé, elle est de l'ordre de 80% du maximum théorique. Cela s'explique par le fait que la plupart des exploitants ne font pas recours au crédit bancaire mais ils des dettes envers les fournisseurs pour le financement de leurs compagne agricole.

3.3.4. Sensibilité aux aides

Cet indicateur prend en compte les subventions d'exploitation et les aides publiques à la production versées aux exploitations, et exclut les aides financées directement par les producteurs. Les aides à l'investissement et les aides indirectes sous forme de bonification d'intérêts. La sensibilité aux aides est : ∑aides/EBE.
Dans la zone de Bsissi, cet indicateur marque un score très élevé de l'ordre de 90,4%, puisque seulement 5% des exploitants reçoivent des aides supérieures à 1% de leur EBE.

3.3.5. La composante transmissibilité économique

Cet indicateur rend compte de la capacité de l'exploitation à être transmise, Dans notre étude on a pu calculer tous les indicateurs à l'exception de celui de la transmissibilité économique qui nécessite des informations détaillées sur le capital d'exploitation (la valeur du foncier, la valeur des équipements d'accès à l'eau - puits/ sondage; la valeur des plantations..), qui ne sont pas toutes des données qui ont pu être collectées lors des enquêtes.
Cet indicateur atteint un pourcentage important de 91% du maximum théorique. Les déclarations des irrigants concernant la pérennité de leur exploitation sont généralement optimistes. En effet, 85,7% des enquêtés ont donné une réponse de quasi-certitude alors que
5,5% s'attendaient à la disparition totale de leur exploitation. De plus, 9% seulement considèrent que le financement peut être un obstacle à la pérennité de leur activité.

3.3.6. La composante efficience du processus productif

Cet indicateur est pertinent car il permet d'évaluer sur le long terme la durabilité de l'exploitation. Il se limite aux aspects économiques et traduit avec quelle efficience technique les intrants sont transformés par le système de production. Il exprime la tendance vers l'autonomie et l'économie des ressources. Il se calcule par la formule suivante :

Efficience = (Produit – Intrants) /Produit, avec les produits sont le montant des ventes hors primes, et les intrants présentent le montant des consommables (énergie, eau, engrais, pesticides, semences, aliments du bétail, médicaments,...), et les frais de MO temporaire spécifique.

Quand l'efficience dépasse 90%, elle est à sa valeur maximale, cependant ce n'est pas le cas de nos exploitations enquêtés, qui présentent des pourcentages relativement faibles à moyennes et qui résultent un score de 5.14 sur 25 soit 26,3% du score maximal théorique ; ce qui reflète que ces exploitants ne valorisent pas leurs potentialités et/ou leur savoir-faire en matière de production, de transformation et de commercialisation.

3.4. Durabilité Globale des exploitations

Suite à une analyse séparée par indicateur, il convient de synthétiser les résultats obtenus pour l'ensemble des 3 échelles. La pondération d'une note globale de durabilité englobant les trois composantes, écologique, sociale et économique, reste plus pratique pour apprécier le niveau de durabilité des exploitations irriguées. La méthode IDEA considère que ces trois échelles ne sont pas cumulables et que le niveau réel de durabilité du système étudié est limité par la plus faible de ces trois valeurs. La durabilité économique constitue le point fort de cette agriculture et la durabilité globale est limitée par la durabilité agro-écologique qui prend la valeur de 40 sur l'échelle de l'IDEA.

4. CONCLUSION

L'analyse globale de la durabilité laisse apparaître une même tendance pour toutes les exploitations: elles sont durables à l'échelle économique, moyennement durables à l'échelle socioterritoriale et moins durables à l'échelle agro-écologique. Cependant, Il n'existe pas d'exploitations bien ou mal notées sur les trois dimensions de la durabilité. La caractérisation du profil de durabilité de ces exploitations ne permet pas, en outre de préciser si les tendances de durabilité sont en relation avec le contexte géographique ou avec le modèle d'exploitation.

Sur le plan méthodologique, il convient de s'interroger sur l'utilisation de cet outil d'autodiagnostic (IDEA) dans le contexte de l'agriculture tunisienne. En effet, si plusieurs indicateurs se révèlent pertinents, beaucoup d'autres semblent totalement inadaptés au contexte de l'agriculture irriguée en zone aride, ils semblent surestimer les barèmes de notation ou manquer de précision dans leurs modalités de détermination. Ainsi, en plus de l'identification des modifications qu'il convient d'apporter à quelques indicateurs, il convient également de s'interroger sur la nécessité d'intégrer d'autres indicateurs spécifiques au contexte de l'agriculture tunisienne, comme, l'expansion urbaine et industrielle au détriment du foncier agricole.

REFERENCES

- Girardin, Ph., Mouchet, Ch., Schneider, F., Viaux, Ph., Vilain, L., 2004, Etude prospective sur la caractérisation et le suivi de la durabilité des exploitations agricoles françaises. Rapport de l'étude n° 04 F5 02 03 sur le chapitre budgétaire 37-11 article 44, Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et des Affaires Rurales, France.
- Le Ministère de l'Agriculture, des Ressources Hydrauliques et de la Pêche Agence de la Vulgarisation et de la Formation Agricoles (AVFA), 2016 : Référentiel du développement agricole durable en Tunisie. Document de base pour la formation et le conseil agricole, 60p.
- Mahdhi N, 2014. Asymétrie d'information et gestion des ressources en eau souterraine dans les périmètres publics irrigués de la région de Zeuss-Koutine, Sud-est Tunisien. Thèse de doctorat, Institut National Agronomique de Tunisie (INAT).
- Mahdhi N., Smida Z., Fouzai A., 2016: Farmers' strategies and determinants of choice to cope with the groundwater crisis in the private irrigated perimeters in south-eastern Tunisia. 2nd EWaS International Conference, 1- 4 June, 2016 - Chania, Crete, Greece.

- Viaux, Ph., 2005, Mesurer la durabilité à l'aide des indicateurs: la méthode IDEA une conception pluridisciplinaire, SAF commission agriculture et environnement, Institut du végétal ARVALIS.
- Vilain, L., 2004, Etude prospective sur la caractérisation et le suivi de la durabilité des exploitations agricoles françaises. Rapport de l'étude n° 04 F5 02 03 sur le chapitre budgétaire 37-11 article 44, Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et des Affaires Rurales, France.
- Zahm F., 2011, De l'évaluation de la performance globale d'une exploitation agricole à l'évaluation de la politique publique agro-environnementale de la Politique Agricole Commune. Une approche par les indicateurs agro-environnementaux, Thèse en économie de l.agriculture et des ressources, Université Européenne de Bretagne et Agrocampus-ouest, Rennes.
- Zahm F., Alonso A., Ugaglia B., 2013 : De l'Homme. L'évaluation de la performance globale d'une exploitation agricole. Synthèse des cadres conceptuels, des outils de mesure et application avec la méthode IDEA. 8ème Congrès du RIODD, Jun 2013, Lille, France. 32 p.
- Zahm F., Ugaglia A., Del.Homme B., Steffe J., 2009, De l.évaluation de la durabilité en agriculture au reporting de la performance globale des exploitations agricoles à partir de la méthode IDEA, In : Développement durable, entreprises et territoires, vers un renouveau des pratiques et des outils, sous la direction de Y. LAZERRI L.harmattan, ISBN : 978-2-296-07346-3, pp. 57-80.

Valorisation des produits de terroir en zones arides: diagnostic d'une petite entreprise produisant la confiture de dattes

Selt Mohammed Mostefa
Université Ziane Achour de Djelfa, Faculté des Sciences Economiques et de Gestion, 17000 Djelfa, Algérie
Email: mmselt2000@yahoo.fr

RESUME
L'objectif de notre travail, est d'essayer de comprendre la réalité des petites entreprises agro-alimentaires en zones arides, et ce à travers une entité située à *Messaad* (wilaya de Djelfa) spécialisée dans la fabrication et la mise en marché de la confiture de dattes, et de mettre en exergue, la valorisation des produits agricoles locaux, comme étant un levier important, afin de s'inscrire dans une logique de durabilité pour le secteur agricole. L'approche méthodologique d'analyse utilisée c'est celle des trois E : entreprise – entrepreneur – environnement, où nous nous sommes servis de quelques outils proposés par le champ de l'entrepreneuriat afin de mieux identifier, l'entrepreneur (profil et esprit d'entreprendre), la petite entreprise (forces et faiblesse), et l'environnement (opportunités et menaces). La constatation nous a conduit à confirmer que l'esprit d'entreprendre avec l'encouragement et l'accompagnent à ce genre d'entrepreneuriat naissant, constituent la clé de voute pour faire valoriser les produits locaux dans ces régions.
Mots clés : valorisation, produits de terroir, petite entreprise, zones arides, confiture de dattes.

SAMMARY
The objective of this study is to try to understand the reality of small agro-food companies in arid zones located in *Messaad* (wilaya of Djelfa) specialized in the manufacture and the marketing of the date jam, and to highlight, the valorization of the local agricultural products, in order to improve the durability for the agricultural sector. The methodological approach of analysis used was the three E: company - entrepreneur - environment, where we have used some tools proposed by the field of entrepreneurship to well identify, the entrepreneur (profile and spirit to undertake), small business (strengths and weaknesses), and the environment (opportunities and threats). The results were confirmed that entrepreneurship with the encouragement and support of this kind of nascent entrepreneurship, are the keystone to promote local products in these regions.
Keywords: valorization, local produce, small business, arid zones, date jam**.**

1. INTRODUCTION

Comme il est constaté pour le secteur agro-alimentaire des pays à économie de marché, on assiste en Algérie à l'augmentation du poids des petites entreprises, que ce soit à travers leur nombre, leur chiffre d'affaires, leur effectif et même leur taux d'exportation. Mais « le monde de la petite entreprise reste largement un mystère » selon Julien et Marchesnay, (1992), dont « la gestion est un énigme » selon Meier et Pacitto, (2007), et dont « il faut sortir de l'ignorance » selon Julien et Marchesnay, (2003).

En l'absence d'une stratégie claire, adoptée par le secteur des IAA (Industrie Agroalimentaire) destiné à faire valoriser les produits dits de terroir, cela nous à ramener à accorder l'intérêt à ce type de petites entreprises, il s'agit là d'une branche naissante peu connue, à partir de là, on a réalisé cette constatation qui s'est intéressé à une petite entreprise qui s'est spécialisée dans la fabrication d'un produit local: La confiture de dattes, en aval de la filière de la phoeniciculture, où plus de 50% de la production qui est estimé à 700 mille tonnes (Touzi 2015) actuellement 1 millions de tonnes est non valorisée.

L'entreprise est implantée dans la région de Messaad (wilaya de Djelfa) , une région aride, steppique, mais qui offre un micro climat fertile aux jardins arboricoles, un potentiel qui reste lui aussi à valoriser et à en tirer profit, vu l'absence d'un entrepreneuriat local.

En effet, concernant les région phoenicicoles où s'installe des unités de conditionnement, (Benziouche2012), on a constaté l'absence quasi totale de la production de produits finis dérivés des dattes, Les seuls dérivés connus et produits localement sont la pâte de dattes (Ghars), et la datte dénoyautée fabriquée par certains conditionneurs ou à titre artisanal à petite échelle. Alors qu'il est possible d'en inventorier plus de 30 dérivés, tels que la confiture, le jus, les barres de fruit avec des fragments de dattes qui sont produites et commercialisés à grande échelle dans certains pays phoenicicoles, à l'instar de l'Arabie saoudite et l'UAE qui sont bien avancés dans ce domaine de valorisation des dattes (production, commercialisation et consommation)

En revanche, la discordance entre la capacité de conditionnement et la production dans les régions phoenicicoles engendre des transferts de quantités importantes vers les unités installées ailleurs, soit dans le nord du pays ou dans les régions semi arides..

L'enjeu pour notre économie agricole, est d'intégrer dans une logique de durabilité, et de valoriser tout notre potentiel existant à partir de l'utilisation rationnelle et raisonnée des ressources disponibles, et la valorisation de ces grandes quantités de dattes (Figure 1).

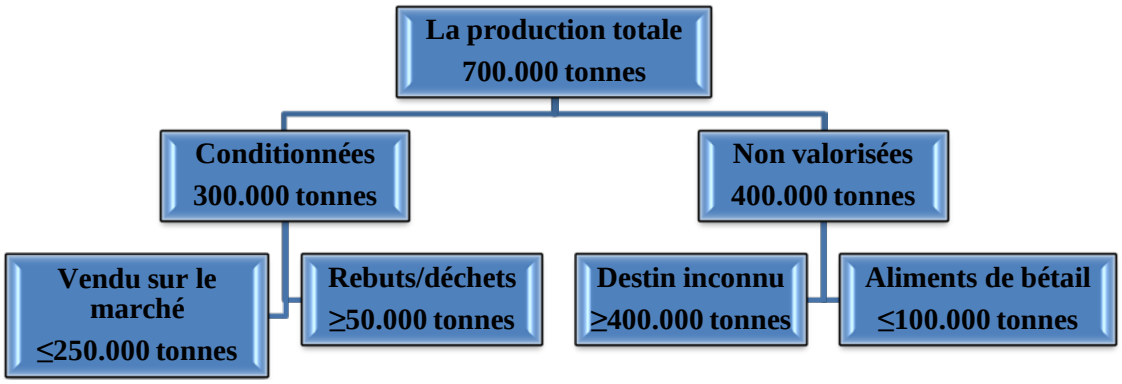


Figure 1. Le potentiel dattier en Algérie (Ulrich, 2013).

2. PROBLEMATIQUES ET HYPOTHESES

Notre travail a pour objectif d'en tirer une meilleure connaissance sur les performances économiques de cette entreprise, qui prend l'initiative d'investir dans le domaine de transformation, de valorisation des dattes généralement marginalisées même dans ses régions de production, dont l'objet est de s'inscrire dans le cadre de la compréhension de cette initiative avec les risques encourus sur tous les plans.

L'objectif est aussi la connaissance de la stratégie et le comportement de cette entreprise ainsi que leur performances économiques et enfin la connaissance de leur atouts, opportunités et menaces.

Notre problématique, qu'on cherche à traiter est la suivante :

- Quel est le vécu des petites entreprises agroalimentaires qui valorisent les produits de terroir en zones arides, sont-elles un levier pour une agriculture durable?
- Quelle performance économique de cette petite entreprise en recourant à la valorisation des dattes ?
- Quels sont les atouts, les opportunités et les contraintes de cette petite entreprise suite au recours à cette activité hors régions de production ?
- Quel impact socioéconomique de l'activité de l'entreprise sur la filière et sur le développement de la région?

Ainsi pour répondre à cette question, nous sommes amenés à formuler quatre hypothèses ; La première met en exergue la relation qui peut exister entre les caractéristiques de l'entrepreneur et les opportunités de l'environnement ; une interaction qui semble pertinente pour l'existence et la survie de l'entreprise. La deuxième hypothèse considère que**,** l'entreprise qui valorise un produit de terroir; cela constitue un actif spécifique important en matière de développent agricole durable. Tan disque la troisième hypothèse c'est celle qui suppose que l'entreprise réalise des performances économiques importantes dans cette nouvelle activité agroalimentaire, bien que les contraintes de

maitrise de technique et de rupture d'approvisionnement en datte à transformer sont présents. Toutefois, la dernière hypothèse considère que les impacts socioéconomiques sur la filière dattes et également sur le développement des zones arides seront fructifiant (particulièrement sur l'employabilité dans la région et le débouché des dattes à faible valeur marchande) avec la génération de cette expérience dans d'autres régions et sur ce type de produits transformés.

3.- Approche méthodologique utilisée

Afin de traiter notre problématique, à savoir le diagnostic du trinôme: entrepreneur – entreprise-environnement et la vérification des hypothèses de recherche formulées, nous nous somme basés en premier lieu, sur les données statistiques agricoles, et sur des ressources bibliographiques récentes traitant cette thématique. En seconde lieu, sur l'observation libre sur terrain au sein de cette entreprise, et de l'entretien semi dirigé, dans un processus qui nécessite un certain attention volontaire orienté par l'objectif de notre travail pour en recueillir les informations voulues sur les comportements des parties prenantes à savoir le créateur de l'entreprise, le contre maitre, le subdivisionnaire de l'agriculture et le responsable du contrôle qualité. La réalisation des enquêtes auprès des acteurs ayants des relations avec la recherche s'effectuent par l'utilisation du questionnaire contenant des questions directes avec le sujet; en abordant les dimensions liées à la filière, aux éléments de la matrice SWOT[1]) et aux dimensions de performance selon une grille d'observation adaptée de celle développé par M. Marchesnay en 1993.

Quant au profil de l'entrepreneur, nous nous sommes servis de la grille proposée par Pendeliau (1997) et la classification de Boutillier et Uzunidis (2002), qui s'appuie sur la nature du capital social que l'entrepreneur mobilise pour créer son entreprise; son mode d'articulation au système économique et les mesures de politique économique qui favorisent l'apparition d'entrepreneurs dans le but d'innover et /ou de créer des emplois et de revenus.

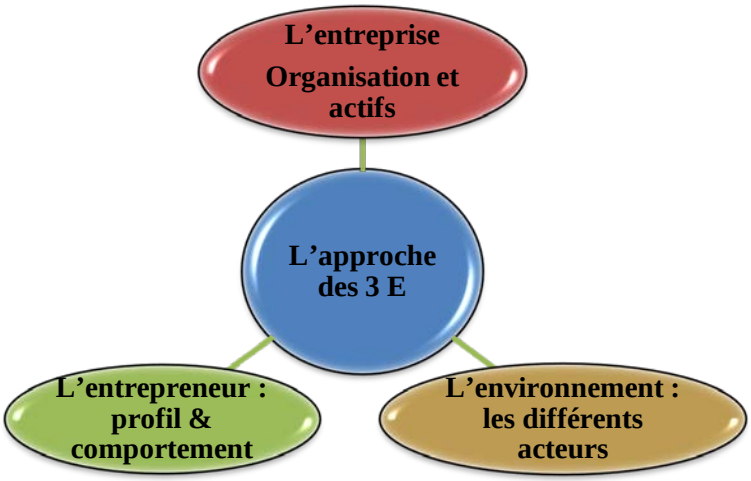


Figure 2. L'approche des 3 E.

4. CARACTERISTIQUES GENERALES ET PRINCIPAUX TRAITS DES PME ALGERIENNES

Selon (Torres. 1999) la petite entreprise, et malgré une très forte hétérogénéité à travers le monde, il est possible de dire que sa logique d'existence se situe entre « small is beautiful » et « small is difficult », et qui se caractérise selon (Foliard, 2010) par les traits suivants :

- La responsabilité, et le risque sont concentrés sur un seul homme
- Les petites entreprises n'ont pas de gros moyens, mais elles en font ce qu'elles veulent (flexibilité).

[1] ***S****trengths* (forces), ***W****eaknesses* (faiblesses), ***O****pportunities* (opportunités), ***T****hreats* (menaces)

- Le système d'information est sans formalisation.
- La stratégie est intuitive et peu formalisée.

Tirant profit des expériences de certains pays, et suite au rôle fondamental que jouent les PME dans le processus de développement économique. L'Etat algérien a pris à travers plusieurs réformes économiques une série de mesures d'aides et soutiens à la promotion des PME, en matière de création et de développement.

Ainsi, la loi d'orientation sur le développement de la PME promulguée en mois de juin 2017, qui modifie et complète la loi de 2001, vise l'encouragement de l'émergence des PME, l'amélioration de leur compétitivité et leur capacité d'exportation ainsi que l'amélioration du taux d'intégration nationale et la promotion de la sous-traitance. De ce fait, plusieurs PME ont été créés, les statistiques disponibles illustrent que le nombre total de ce type d'entreprise avoisine 1060289 PME tous statuts confondus (Tableau 1). Le plan d'action du gouvernement vise la création d'un (1) million de nouvelles PME durant le quinquennat 2015-2019.

Tableau 1. Chiffre clés sur les PME en Algérie jusqu'au 30 juin 2017

Population totale des PME (tous statuts confondus)		1 060 289
PME créées en 1er semestre 2017		9941
Cessations d'activités (PME privées)		4166
PME privées (personnes morales)		595810
PME privées (personnes Physiques)		464 215
PME publiques (personnes morales)		264
Emplois (agents)		2 601 958
Densité des PME (Nombre de PME pour 1000 Habitants)	Tous statuts juridiques confondus/ Moyenne internationale	23/45
	Personnes morales privées/ Moyenne internationale	17/45

Source : Bulletin d'information statistique de la PME n°31, Ministère d'Industrie et des mines (Novembre 2017)

Le nombre de salariés de toutes ces entreprises crées dépasse l'effectif de 2601958 embauchés dans toutes les catégories des activités économiques. Néanmoins la part du secteur agricole dans le total des PME personnes morales reste dérisoire et ne dépasse pas les 6 476 unités soit 1.08% du total estimé de 595 810 PME (Tableau 2).

Tableau 2. Répartition des PME (personnes morales) par secteur d'activité

Secteurs d'Activité	*PME privées*	*PME publiques*	*Total*	*Part en %)*
Agriculture	6392	84	6 476	1,09
Hydrocarbures, Energie, Mines et services liés	2843	3	2 846	0,48
BTPH	177727	23	177 750	29,82
Industries manufacturières	92804	84	92888	15,58
Services	316044	70	316114	53,03
Total Général	595810	264	596 074	100

Source : Bulletin d'information statistique de la PME n°31, Ministère d'Industrie et des mines (Novembre 2017)

Cependant, l'analyse des données du ministère de l'industrie et des mines montre que seulement 9% de ces PME privées (personnes morales) sont localisées dans le sud du pays jusqu'au juin 2017.avec une part insignifiantes sont d'ordre d'agriculture. Alors que 69% sont localisé dans le nord du pays et 22% dans les régions des hauts plateaux, ce qui signifie la répartition inégale entre région et entre secteurs d'activités. Ceci s'explique incontestablement par la réticence des jeunes vers le secteur

agricole qu'ils voient pénible et plein de risque. Mais également suite à des contraintes bureaucratiques et religieuses (Tableau 3).

Tableau 3. Concentration des PME privées (personnes morales) par région

Région	Nb de PME S1/2017	Taux de concentration (%)
Nord	415 242	69
Hauts Plateaux	129 767	22
Sud	50 801	9
Total Général	595810	100

Source : Bulletin d'information statistique de la PME n°31, Ministère d'Industrie et des mines (Novembre 2017)

Les PME algériennes présentent une caractéristique sociologique largement répandue, celle d'être des entreprises familiales, donc à aspect de proximité bien présent, elles sont dotées de statuts juridiques privilégiant très largement l'entreprise personnelle, l'EURL (l'entreprise unipersonnelle à responsabilité limitée), et dans une moindre mesure, la SARL (société à responsabilité limitée) (Chellil et Ayad, 2009).
Leur gestion reste soumise à un modèle familial : le propriétaire unique ou principal, entouré de personnels recrutés dans le giron familial, assure lui-même la gestion et concentre entre ses mains la quasi-totalité du pouvoir décisionnel, des responsabilités et des prérogatives. La maîtrise des méthodes modernes de management y demeure insuffisante et le recours au conseil et à l'expertise extérieurs ne s'effectue que très exceptionnellement. (Melbouçi, 2005).

5. RESULTATS ET DISCUSSION

5.1. Diagnostic entrepreneurial entre potentialités offertes et disette d'un esprit entrepreneurial.

L'entreprise a été créé dans le cadre de l'encouragement de l'État à la création des petites entreprises afin de faire face à la crise montante du chômage constatée surtout lors des moments difficiles de la décennie 1990-2000. Et dans un contexte d'une nouvelle politique agricole qui s'inscrit dans une logique de durabilité, et qui a envisagé à la fois l'encouragement des filières stratégiques, et la prise en considération de la valorisation des produits locaux ;
La période antérieur à 2008, les produits de terroir étaient marginalisés, malgré les atouts dont dispose le pays en matière d'écosystèmes et biodiversité variés (Une très large gamme de produits de terroir), et des savoirs faire locaux et patrimoines ancestraux très riches. Et depuis 2008 où la politique du renouveau agricole et rural été promulgué par la loi 08-16 du 03 aout 2008 portant orientation agricole qui concerne deux principaux axes:
- La protection et la valorisation des ressources naturelles,
- La Préservation et valorisation des patrimoines ruraux matériels et immatériels, on assiste à des efforts qui sont en plein essor pour valoriser les produits de terroir y compris les produits phoenicicoles.
La région de Messaad constitue une ancienne palmeraie partiellement exploitée, qui se situe à la croisée des routes qui mène aux Zibanes, à Ghardaïa, et à Touggourt, qui sont des zones à forte potentialité en produits dattier.
L'entreprise est de petite taille, d'envergure commercial local, situé dans une région aride, qui s'étire à l'Est au Sud d'une palmeraie, et qui offre en particulier des potentialités agricoles, et arboricoles : (2500 ha d'arbres fruitiers).
Alors que le socle de cette activité de transformation est la phoeniciculture qui offre dans notre pays un fort potentiel à valoriser.
La valorisation des dattes à l'instar de plusieurs produits agricoles en Algérie reste à l'heure actuelle en deçà des objectifs escomptés depuis l'indépendance, bien que les actions et les programmes colossal mises en place par l'Etat, particulièrement dans les nouveaux programmes de développement agricole à partir de l'an 2000.

L'entreprise essaye de contribuer dans une large mesure à la valorisation des dattes particulièrement les cultivars à faible valeur marchande; dont la majorité sont en cours de régression voir de disparition. En effet plusieurs études (Remini, 2006) illustrent ces dernières années l'érosion flagrante de la biodiversité dans certaines palmeraies algériennes.

Son choix été orienté vers un produit qui fait partie de ces produits agro-alimentaires ancestralement transformés au foyer et qui relevaient d'une activité essentiellement artisanale, et donc toujours de « proximité » ou « domestique » (Ferrier, 2000). Il s'agit de la confiture de dattes, les fruits du palmier, puisque la datte, selon sa consistance, son arôme et son taux de sucre, est préférentiellement destinée à tel ou tel usage (comme fruit frais de table, comme fruit sec apte au transport ou encore pour la transformation en produits du terroir (confiture de dattes par exemple) (Touzi, 2015)

Le secteur de la transformation agroalimentaire est tout à fait nouveau dans la région, de même la mise en marché d'un produit local issu de la transformation a été vu comme un défi local, malgré que les produits transformés, et artisanalement préparés aux foyers, sont bien présents dans l'assiette du consommateur.

L'entreprise est devant, un défi de proximité en valorisant un produit nouveau sur le marché, pour dire que l'activité est en phase de démarrage. Si on se permet d'utiliser la notion de leader à ce niveau, et pour ce couple : Confiture de dattes- marché, qui se caractérise par l'approche locale, on peut dire qu'effectivement, l'entreprise est leader sur son marché ; Quoi que : l'ENAJUC (l'entreprise nationale des jus et des conserves), producteur publique numéro 1, avec sa filiale N'gaouss semblait être le détenteur de la grosse part.

D'après notre synthèse (Figure 4), on a constaté que le contexte institutionnel semble théoriquement favorable au développement de l'activité (les dispositifs de soutien aux jeunes promoteurs, la politique d'encouragement pour la valorisation des produits de terroir…), dans une région qui offre bel et bien un approvisionnement important en matière première ; fruits et légumes, dans la perspective d'élargissement de l'activité de transformation. Aussi la constatation nous a permis de dire que l'entrepreneur est désormais précurseur, d'une part dans le lancement d'un esprit entrepreneurial individuel dans un milieu pauvre en la matière, en créant cette petite unité de transformation, et d'autre part par la mise en marché d'un produit peu connu, d'où un esprit d'innovation bien présent.

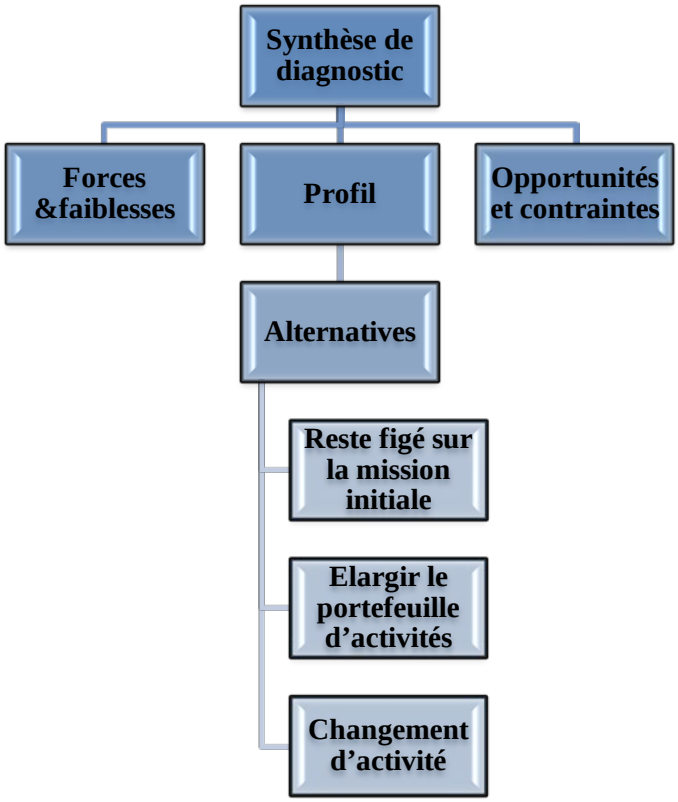


Figure 4. Investigation de l'étude de cas

5.2. Atouts et faiblesses

La notoriété du produit est désormais l'atout majeur de cette organisation, qui est tout à fait apprécié, et qui a une qualité organoleptique conforme aux caractéristiques signalées dans la fiche technique établit par l'entrepreneur et déposée auprès des services de qualité ; d'où un risque sanitaire nul, et une qualité constante et sûre de point de vie hygiénique et sanitaire.

Par contre, ce qu'on a pu remarquer comme étant des faiblesses, c'est surtout l'effet de la proximité sociologique qui n'est pas assez favorable (le dirigeant est originaire d'une autre région que le lieu de l'entreprise, ce qui empêche le développement d'un tissu relationnel dense), et de point de vue financier on remarque la faible rentabilité financière, le faible taux de trésorerie, et le manque d'une culture d'enregistrement comptable.

Aussi on a pu remarquer la fluctuation du prix de la matière première : les dattes, due à la désorganisation du marché et la perturbation de la production trop liée aux aléas climatiques, la conduite culturale, et l'alternance biologique (Benziouche, 2014, Benziouche et Chehat, 2010, Benziouche et Cheriet, 2012) ;ce qui influe sur le prix du produit.

Ainsi, dans cette phase très délicate dans la vie de l'entreprise, l'entrepreneur est devant le fait qu'il lui manque d'une part les moyens financiers, et d'autre part la faible motivation qui commence à gagner du terrain dans son esprit, ou bien il cède le projet à son collaborateur, ou bien il tente de diversifier le portefeuille d'activité, et s'élargir, en saisissant l'opportunité du plan de développement agricole en fabriquant les jus de fruit.

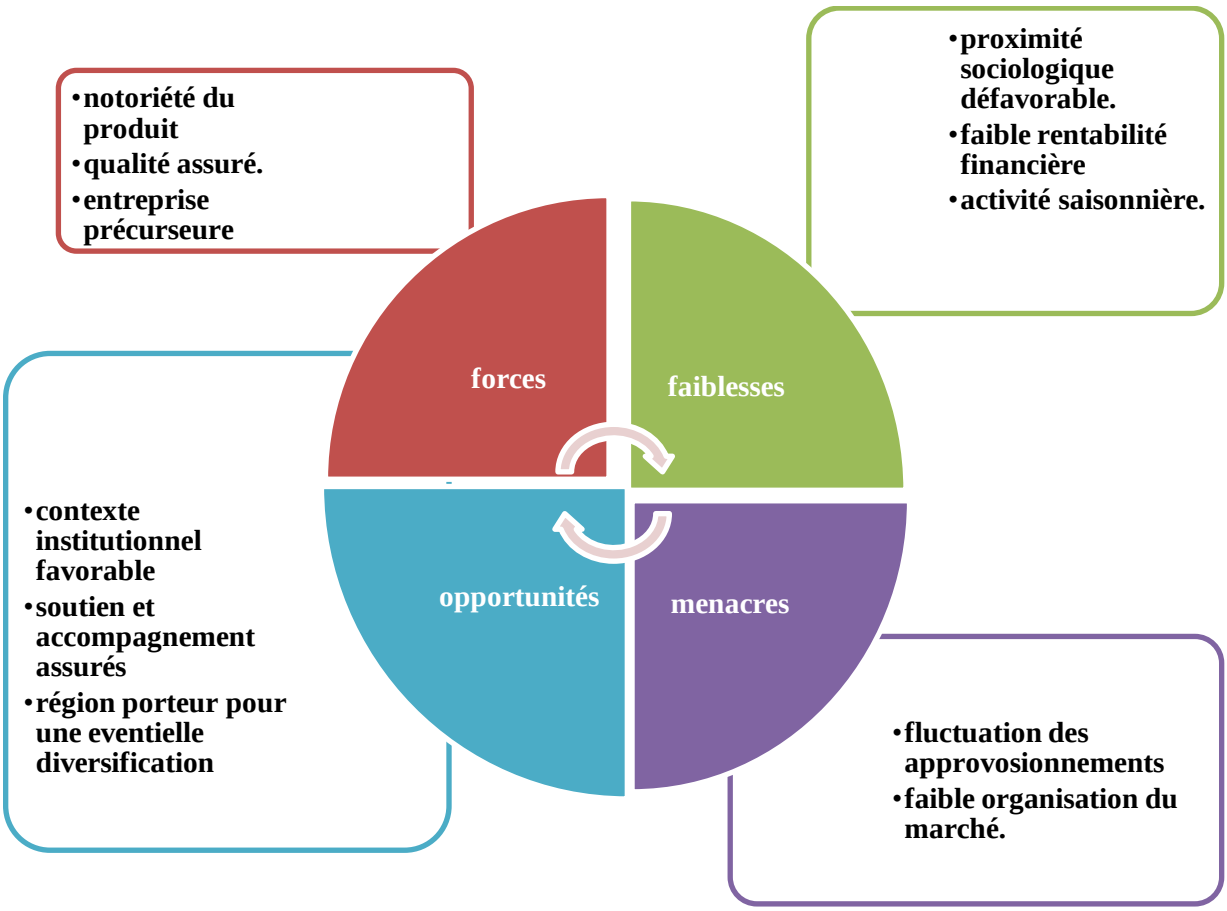


Figure 5. Les principaux éléments SWOT de l'entreprise.

5.3. CONTRAINTES ET MENACES

La faible demande et la consommation saisonnière de ces sous-produits valorisés des dattes sur le marché algérien constituent une réelle contrainte; vu le faible pouvoir d'achat des consommateurs d'une part et les habitudes alimentaires qui privilégient la consommation des produits frais notamment les dattes, d'autre part.

Notre travail au niveau de cette entreprise et à l'instar des autres unités de conditionnement des dattes (Benziouche, 2014), montre que la maitrise technique, le savoir-faire, et l'envie de s'élargir dans l'activité reste faible. De ce fait, on ne rencontre aucun spécialiste en conditionnement ni en froid, et qu'aucun n'a bénéficié des résultats des institutions de recherche ou de formation dans le domaine ce qui répercute négativement sur les performances économiques de ces entreprises..

Contrairement aux autres unités intervenants dans le conditionnement de dattes et implantées dans les régions phoenicicoles, l'unité implantée à Messad destine la totalité de sa production pour le marché local, ce qui limite son fonctionnement à une période de 4 à 5 mois au maximum durant l'année suite à la rupture d'approvisionnement d'une part, et à la cessation de l'activité pendant l'été d'autre part.

5.4. Impacts sur la filière et sur la région

La palmeraie de Guettara (daïra de Messaad) qui s'étale sur une superficie productive de 100 ha, constitue une niche phoenicicole bien présente, alors que la région de Messaad quant à elle, offre un potentiel arboricole non négligeable : à Khatala, Dhayet Tolba, Cheabat Henni ; Gahra ; Selmana, Mgueyed, et Mlaga, toutes ces localités peuvent contribuer à l'amélioration des conditions de vie et au développement local de cette région via la création des petites entités de transformation et de conditionnement à l'instar de cette petite entreprise, permettant ainsi la survie d'une population de

plus en plus confrontée à la marginalisation et à la disette des postes de travail. En outre, une réduction de la pauvreté suite à des embauches offertes.

Après les quelques années d'instalation, cette petite entreprise à Messad a réussi en grande partie à atteindre son objectif ; Les résultats enregistrés parlent d'eux-mêmes et témoignent de l'efficience de cette politique.

A titre d'exemple, on peut citer que, la superficie plantée en arbres fruitiers dépasse largement celle comptabilisée depuis l'indépendance du pays. Plusieurs emplois créés au niveau de cette région, et la superficie agricole irriguée a doublé. Le visage de l'agriculture de cette région est particulièrement changé. Le plan de développement agricole a permet aux agriculteurs, notamment les arboriculteurs et les phoeniciculteurs de tenir en compte de leurs palmeraies et d'améliorer l'itinéraire technique grâce aux aides accordées et aux encouragements sur le plan financier et en matière de vulgarisation et perfectionnement (le programme PRCHAT)[2] .

5.5. La performance de l'entreprise : Dimensions et critères

D'après notre diagnostic mené sur le vécu de l'entreprise étudiée, on a pu enregistrer l'ensemble de critères, qui définissent davantage notre objectif, à savoir les composantes de la performance de l'entreprise, sa pérennité, son efficience, la valeur de ses ressources humaines et sa légitimité dans son environnement, et le tableau ce dessus développe le contenu de ces critères (Tableau 4).

Tableau 4. Critères de performance de l'entreprise d'après notre constatation

1. Pérennité de l'organisation - Qualité du produit : bonne selon les contrôles officiels effectués périodiquement, ce qui donne l'idée de certaine confiance de l'entreprise en elle-même pour qu'elle continuer à fabriquer le produit. - Rentabilité financière : difficile à comptabiliser, s'apparaît faible, pas assez encourageante, cela peut être expliqué par le fait que l'entreprise est peu expérimentée. - Compétitivité : à ce niveau du marché, et en l'absence des produits similaires, on ne peut pas parler de degré de compétitivité.
2. Efficience et économie - Économie des ressources : L'idée de s'implanter dans un lieu proche des régions phoenicicoles donne l'idée de recherche d'une efficience, et l'utilisation de ces dernières semble relativement économique, charges variables et charges fixes à la fois.
3. Valeurs des ressources humaines - Mobilisation des employés : les femmes salariées sont moins exigeantes et plus mobilisées, des jeunes filles récemment sortantes de la vie scolaire. - Climat de travail : sain dans l'ensemble, basé sur le respect réciproque. - Rendement des employés : bon, un chiffre d'affaire par salarié satisfaisant. - Développement des employés : l'inexistence d'un plan de formation ou autre.
4. Légitimité de l'organisation auprès des groupes externes - Satisfaction des bailleurs de fonds : dans ce cas-là, on parle de l'argent public, offert par l'état sous forme d'un soutien à l'investissement, pas assez souvent contrôlé, mais il semble que l'entreprise détienne une confiance par l'agence ANSEJ[3], et aussi de la part de la subdivision de l'agriculture, qui chapeaute les projets locaux de développement agricole. - Satisfaction de la clientèle : d'après nos constatations menue auprès des clients de proximité, la clientèle semble satisfaite. - Satisfaction de la communauté : chaque acteur de la communauté a sa propre vision pour la

[2] PROGRAMME DE RENFORCEMENT DES CAPACITES HUMAINES ET. D'ASSISTANCE TECHNIQUE.

[3] L'Agence **nationale de soutien à l'emploi des jeunes.**

mission de l'entreprise, en général une attitude de satisfaction qui règne, mais sans que cette attitude est accompagnée d'encouragement auprès des autorités locales.

5.6. Identification du profil de l'entrepreneur

Partant de l'aspect d'un management de proximité évoqué par Torres (2002), qui selon lui l'entrepreneur est proche de ses salariés sans distance hiérarchique ou social, et qui exerce une autorité centralisé voir personnalisé. On peut confirmer ce qui caractérise ce management à savoir :

- L'absence de décomposition fonctionnelle.
- Forte polyvalence chez le créateur.
- Une forte imbrication entre les décisions prises par l'entrepreneur.
- Un système d'information et de coordination simplifiés, fondé sur la communication orale.
- Une stratégie implicite à court terme : intuition-décision-action.
- Un capital de proximité essentiellement relationnel.
- Une clientèle locale.

Donc suite aux observations et aux entretiens menus, nous pouvons retracer quelques traits de cet entrepreneur, et de son profil.

- Capital social de l'entrepreneur

Ce capital qui comporte , le capital financier, le capitale connaissance et le capital relations, il apparaît que son capital financier est faible, et que son investissement dépend du soutien de l'État accordé en faveur de créateurs d'entreprises dans le cadre du dispositif ANSEJ et FNRDA (le fonds national de régulation et de développement agricole).

Concernant son capital connaissance il semble l'entrepreneur valorise un diplôme universitaire, et une expérience professionnelle significative ; alors que son capital relations et faible, quoi que il a su profiter de ces anciennes connaissances pour faire démarrer son affaire.

- Mode d'articulation au système économique

Ce genre d'entrepreneuriat est témoin de l'importance du soutien institutionnel, et du résultat de la politique économique de l'État dans cette phase de transition en faveur de l'entrepreneuriat et la création d'entreprises, afin de s'inscrire dans la durabilité de développement de ces régions.

Malgré l'esprit d'innovation et l'envie d'entreprendre senti dans son discours, il peut être qualifié comme un entrepreneur de proximité où il n'a pas pu s'engager dans son projet que par des capitaux propres très limités, et que l'aspect proximité est très présent dans le vécu de l'entreprise.

- Mesures de politique économique

Cette politique est mise en œuvre par un ensemble d'aides et de soutien à travers des fonds spéciaux crée par l'Etat pour permettre aux jeunes diplômés, de créer leur propre emploi, pour faire encourager l'employabilité et en limitant l'exode des jeunes.

- L'âge de l'entrepreneur

L'entrepreneur est âgé de 40ans, l'âge de la pleine maturité et d'activité et aussi de la pleine expérience requise.

- Le genre

Le porteur de l'idée d'entreprendre dans notre cas c'est le reflet du contexte social, c'est un homme témoin de la domination du genre masculin sur le monde des affaires.

- Les principaux mobiles

On peut citer les suivants : son envie d'entreprendre, sa passion de faire valoir un produit local, et le fait de saisir l'opportunité d'aide accordée.

- Niveau d'études

L'entrepreneur disposé d'un niveau d'études supérieures, il est de formation technique.

- La profession antérieure

Pendant quelques années après qu'il a terminé ses études, l'entrepreneur a affilié la fonction publique, pour une courte durée avant de s'adhérer à une entreprise publique, mais cela n'a pas duré longtemps à cause de la dissolution des entreprises locales.

- Les qualités du dirigeant

On peut citer, d'après ce qu'on a pu constater que, ce qui marque de plus les qualités du dirigeant sont surtout, la persévérance et l'attachement au projet.

- Son discours

Il adopte un discours clair, que ce soit avec les acteurs hors entreprise ou à l'intérieur de l'entreprise, mais parfois il lui manque la force de convaincre, par manque d'un propre engagement financier.

- Investissement envisagé

Le capital financier de l'entrepreneur est constitué essentiellement des aides accordés par deux dispositifs, un crédit allégé de l'agence national pour l'emploi des jeunes, et du soutien financier accordé dans le cadre du fonds de développement agricole.

Pour le moment il lui manque les fonds propres pour y penser, mais cela n'empêche pas qu'il a une volonté de chercher d'autres sources de financement, tel que le cofinancement, ou à nouveau déposer un dossier de soutien complémentaire.

5.7. L'environnement local et ses caractéristiques

La principale lacune inhérente à l' entrepreneur, peut avant tout être liée à ses insuffisances en matière de gestion, également sur le plan humain, il devient entrepreneur pour la première fois dans sa vie, dans un entourage habitué à l'entreprise public et à l'entrepreneur public, donc ce qui caractérise l'environnement local c'est l'absence d'un héritage entrepreneurial local, mais aussi l'existence de contraintes liées au développement économique et social de la région qui sont, elles aussi, importantes et nombreuses. Elles sont d'ordre physique, démographique et économique. Malgré que la région renferme d'importantes potentialités et ressources diversifiées (physiques, naturelles,..) dont leur mise en valeur favoriserait, d'une manière certaine, son développement économique et social, et peut marquer le lancement d'un entrepreneuriat privé.

Concernant l'environnement lointain, on peut constater, la prudente intégration de la population locale dans les différents dispositifs de l'état, le fort taux de chômage, et l'absence d'organisation du marché de la matière première.

6. CONCLUSION

En partant des paramètres de la durabilité agricole, à savoir entre autre, la valorisation des potentialités agroalimentaires disponibles, notre travail s'inscrit dans le cadre de la compréhension de la réalité d'une petite entreprise valorisant un produit de terroir : la confiture de dattes.

D'après notre étude, et en lecture de ce qu'a été obtenu, on a pu constater que l'entreprise confirme l'approche de proximité, comme étant « une organisation centralisée, faiblement spécialisée, dotée de systèmes d'information interne et externe simples et privilégiant des stratégies intuitives et peu formalisées» (Torres, 2002) ; est qu'elle est encore dans une phase fragile et sensible en matière de commercialisation, et de construction d'image, chose qui peut heurter à son maintien et son développement sur les marchés limitrophes.

Considérée comme un étant un acteur nouveau (absence d'une culture entrepreneurial de transformation et de conditionnement), l'entreprise trouve des difficultés pour s'y adapter, vu l'inexistence d'une politique de coopération agricole, l'absence de structures d'accompagnement et d'encadrement, ce qui empêchent aux producteurs de s'organiser, et de créer des unités de transformation.

Quant au créateur de l'entreprise, il est entouré d'un environnement local non encore adapté à ce genre d'entrepreneuriat, ce dirigeant porteur de projet, issu du milieu universitaire se caractérise par un esprit d'innovation, et d'une envie d'entreprendre. Il vient de fabriquer et commercialiser un produit nouveau où il a créé son propre emploi et faire travailler d'autres, malgré son faible engagement en matière d'investissement en capitaux propres.

Néanmoins, ce genre d'entrepreneuriat peut contribuer à la valorisation des dattes à faible valeur marchande, et à améliorer les conditions de vie de la population locale, permettant ainsi, un développement local durable.

En conclusion, on peut constater, malgré l'effort étatique en matière de développement agricole, l'absence d'une vision claire chez les différents acteurs locaux afin de faire valoriser le potentiel agroalimentaire, et que l'esprit d'entreprendre d'un côté et la politique d'encouragement et

d'accompagnent de cet entrepreneuriat naissant d'autre coté, peuvent constituer la clé de voute pour faire valoriser les produits locaux et de s'inscrire dans une logique de durabilité agricole.

REFERENCES

- Benziouche S.E et Chehat F, 2010. La conduite du palmier dattier dans les palmeraies des Zibans; (Algérie) Quelques éléments d'analyse. Revue EJSR N°42 (2010).

- Benziouche S.E et Cheriet F., Structures et contraintes de la filière dattes en Algérie. Revue New Médit, N°4 (2012)
- Benziouche S.E., Le conditionnement des dattes en Algérie Constats et perspectives. Revue Roa Iktissadia, N° 4 ; Univ El-Oued,.http://www.univ-eloued.dz/roa/(2014)
- Chelil A & Ayad SA.PME en Algérie : réalités & perspectives. Université de Tlemcen. Document en ligne file : fseg2.univ-tlemcen.dz/larevue09/CHELIL%20Abdelatif.pdf
- Ferrier O., Les petites entreprises. Editions DeBoeck. Bruxelles (2002)
- Foliard,S. L a gestion des TPE classiques, entre territorialités et fidélité. CIFEPME Bordeaux, France (2010)
- Julien, P,A & M, Marchesnay, « Des procédures aux processus stratégiques dans la PME », **Revue Piccola Impresa,** n° 2, 1992, p. 13-41, Turin(1992)
- Julien, P,A & M, Marchesnay. La petite entreprise : sortir de l'ignorance, Revue française de gestion Lavoisier 2003/3, n°144, p.107-118.(2003)
- Meier O, Pacitto JC, Le retour de l'acteur ou les « bonnes raisons » du comportement des dirigeants des très petites entreprises, Actes du 5ème Congrès International de l'Académie de l'Entrepreneuriat, Sherbrooke, (2007)
- Melbouçi L. Les PME algérienne : un essai d'analyse par les ressources. Faculté des sciences économiques. Université de Bejaia. www.univ-bejaia.dz/.../Essai%20d'analyse%20de%20la%20contribution%20des%20P
- Ministère d'Industrie et des mines (Algérie) : Bulletin d'information statistique de la PME n°31 (Novembre 2017)
- Pendeliau.G., Le profil du créateur d'entreprise. Editionsle Harmattan. Paris (1997)
- Remini. B., La disparition des ghouts dans la région d'ElOued (Algérie). Larhyss Journal, ISSN 1112-3680, n° 05, Juin 2006, pp.49-62 (2006)
- Torres, O. Les PME. Editions Flammarion. Paris (1999)
- Torres., Essaie de conceptualisation proxémique de la petitesse des entreprises. Actes du 6ème congrès international francophones PME. Montréal (2002).
- Touzi. A. les dattes et la transformation technologique. Document en ligne http://sidab.caci.dz/wp-content/uploads/2015/04/Transformation-de-la-datte.pdf (2015)
- Ulrich. M. Valorisation des dattes non comestibles en Algérie. Symposium « valorisation des fruits dans les boissons » (2013)
- Uzunidis, D, S.Boutillier. L'entrepreneur socialisé : traits actuels du créateur d'une petite entreprise. Organisations et territoires.2002 printemps-été, p1-9 (2002)
- Ziar N. La place des PME dans une économie de transition : le cas de l'Algérie. Université d'Oran 2002. [En ligne]. Disponible sur Internet. http://www.univ-paris12.fr/www/labos/gratice/Ziar.doc (2002).

Contraintes et perspectives de développement des plantes aromatiques et médicinales au sud-est tunisien : analyse de jeux d'acteurs par l'outil MACOR

Hatem Khattali[4], Mongi Sghaier[5]
[1]Chercheur à l'Institut des Régions Arides de Médenine, Tunisie. Email: hatem.khatteli@gmail.com
[2]Directeur de Recherche et chef de laboratoire d'économie et sociétés rurales,
Institut des Régions Arides Médenine, Tunisie. Email : sghaier.mon@gmail.com.

RESUME
Cet article porte sur le secteur des plantes aromatiques et médicinales (PAM) et les impacts et les enjeux socioéconomiques liés à son développement. En fait, la mise en place d'une stratégie de conservation et de promotion des PAM est indispensable pour gérer durablement les ressources naturelles et répondre aux besoins socio-économiques de la population locale. L'approche méthodologique adoptée est déclinée en deux phases interconnectées. En se basant sur une étude bibliographique et des enquêtes formelles par questionnaires destinés aux acteurs intervenants dans le secteur des PAM, la première phase consiste à détecter les potentialités productives de l'écosystème local. La deuxième phase, consiste analyser les jeux d'acteurs et la performance du tissu institutionnel local pour montrer l'influence de la gestion actuelle des PAM sur leur conservation et leur mise en valeur. La méthode MACTOR nous a servi pour étudier les convergences et les divergences des acteurs vis-à-vis des objectifs associés à la valorisation et la conservation des PAM. Ce travail a montré que les plantes aromatiques et médicinales restent parmi les activités rentables non encore suffisamment valorisées. La valorisation et la conservation des PAM
Nécessiteraient de nouvelles pratiques de gouvernance locale davantage concertées qui contribueraient vraisemblablement au dépassement des conflits entre acteurs.
Mots-clefs : Plantes aromatiques et médicinales, contraintes, perspectives de développement, jeux d'acteurs.

SUMMARY
This paper focuses on the aromatic and medicinal plant (MAP) sector and the socioeconomic issues and impacts related to its development. In fact, developing and implementing a strategy for the conservation and sustainable use of MAP is essential for natural resource management and to meet the socio-economic needs of the local population. The methodological approach consists of two interconnected phases. Based on literature review and a structured questionnaire survey directed to actors involved in MAPs sector, the first phase consists in detecting the productive potentialities of the local ecosystem. Using MACTOR method, the second phase consists in analyzing the actors' games and the institutional network embeddedness on MAP sector to show the influence of the current management on their conservation and improvement. Results show that aromatic and medicinal plants remain among the profitable activities not yet sufficiently valued. Conservation and sustainable use of MAPs require innovative and more concerted local governance practices that would contribute to the overcoming of conflicts between actors.
Key words: Aromatic and medicinal plants, constraints, development perspectives, actors' games.

1. INTRODUCTION

Les plantes aromatiques et médicinales sont d'une importance considérable. En effet ces plantes sont utilisées pour des fins multiples, par exemple pour soigner diverses maladies, pour des usages culinaires, comme elles servent à parfumer le corps humain et à aromatiser des plats alimentaires.

De nos jours, et en dépit du développement spectaculaire de la synthèse des principes actifs de la chimiothérapie, l'intérêt à la valorisation et l'usage de ces plantes ne s'est pas affaibli, bien au contraire, il s'est accru remarquablement en se traduisant par une demande mondiale en plantes végétales à vertus thérapeutiques et leurs dérivés ne cessent d'augmenter. Le marché global est estimé à 30 Milliard de dollars en l'an 2000. L'Europe détient le plus grande marché, suivie par l'Asie, l'Amérique du Nord et le Japon. Les USA constituent le marché qui évolue le plus rapidement (Audinet, 2006).

Appartenant au bassin méditerranéen, la Tunisie présente un terrain de prédilection au développement de ces plantes. L'importance de la demande a encouragé l'intensification et l'exploitation de ces espèces spontanées, faisant ainsi de la Tunisie le plus grand producteur d'huile de romarin dans le bassin de la Méditerranée. Les années 90 ont été marquées par une prise de conscience générale en faveur de la santé de l'homme et de la qualité de l'environnement, l'agriculture biologique, la phytothérapie et l'aromathérapie. Cependant, ce n'est qu'au début des années 2000 que la prise de conscience nationale de l'importance socio-économique de ces plantes a catalysé l'action en termes d'une véritable promotion et de développement du secteur. Ainsi, ce secteur est devenu actuellement au centre des préoccupations des politiques sectorielles et des orientations stratégiques de l'économie tunisienne. Les perspectives locales, régionales, nationales et internationales sont très prometteuses pour ce secteur (APIA, 2003, 2008).

Les plantes aromatiques et médicinales en tant que ressources occupant ces écosystèmes ont, à cet effet, une signification économique et écologique particulière en raison de leur grande capacité adaptative à la sécheresse et aux conditions difficiles du milieu**.** Ils offrent de véritables atouts au développement rural et territorial basé sur l'innovation et la valorisation socio-économique des savoirs faire locaux. Ainsi, elles peuvent jouer un rôle prépondérant dans la diversification économique et la création de nouvelles perspectives d'emploi au sein des régions rurales ou les alternatives professionnelles sont souvent rares (Sghaier, 2007), comme c'est le cas de la région du sud-est de la Tunisie.

Le Sud Est Tunisien est caractérisée par une une biodiversité importante marquée surtout par un couvert végétal spontané très riche en plantes aromatiques et médicinales qui bénéficie d'une forte image de qualité et d'authenticité spécifique au paysage de la région. Ce secteur reste parmi les activités rentables non encore suffisamment valorisé. Les opportunités économiques qu'offre ce secteur, sont loin d'être négligeable. Le marché des PAM est encore fragile et à l'état traditionnel. Aucune stratégie relative à la commercialisation n'a été développée sur le marché. La commercialisation des produits des PAM, pose de nombreux problèmes liés à la difficulté de maîtriser et de prévoir la production et en même temps de gérer la demande. Dans ces conditions, l'ajustement entre la demande et l'offre finale est particulièrement complexe face à des incertitudes portant sur la quantité et sur la qualité.

Les objectifs assignés de cette étude consistent à développer la filière de la commercialisation des plantes aromatiques et médicinales dans le Sud Est Tunisien en vue de mieux valoriser ce secteur qui peut jouer un rôle important au niveau de l'amélioration des ressources de revenus et la création de nouvelles perspectives d'emploi.

2. MATERIELS ET METHODES

L'approche méthodologique adoptée est basée sur les données statistiques disponibles, une revue de la littérature pour permettre d'identifier et d'analyser les études, les travaux relatifs à la situation du marché des plantes aromatiques et médicinales au Sud-est tunisien. Des visites de terrain ont été conduites dans la région du Sud Est Tunisien auprès des principaux intervenants (Agriculteurs, collecteurs, commerçants, grossistes, consommateurs). Des prospections et des observations directes ont été effectuées dans les marchés locaux et régionaux afin d'avoir une idée sur les prix, les quantités et les intervenants, approvisionnements, lieux d'écoulement, usages, catégories de consommateurs. En plus des entretiens semi structurés, des journées d'information, de sensibilisation et de concertation ont été organisées avec les principaux intervenants dans le marché des plantes aromatiques et médicinales. L'élaboration des enquêtes et des questionnaires pour approfondir et affiner les informations et les données primaires collectées. L'outil MACTOR

(Méthode Acteurs, Objectifs, Rapports de force) a été servi comme outil pour étudier les convergences et divergences des acteurs vis-à-vis des objectifs associés à la valorisation et la conservation des PAM.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Analyse de la structure du marché des espèces végétales à vertus thérapeutiques

La commercialisation des PAM et leurs produits dérivés dans le marché du sud-est tunisien s'effectuent soit par les interactions des divers marchés, soit par la récolte directe des exploitants du couvert végétal. Deux types de marchés différents caractérisent la région. Un marché informel qui se caractérise par la commercialisation des produits des PAM et leurs dérivés (huiles essentielles, eaux des parfums, produits cosmétiques, etc.) dont la plupart sont en provenance des marchés internationaux et des marchés nationaux et locaux ; légales et illégales. Un marché formel qui se caractérise par la commercialisation des produits des PAM et leurs dérivés suivant les normes légales du code de commerce tunisien. Ces produits finis sont en provenance des marchés nationaux et locaux et des marchés internationaux à travers l'exportation légale.

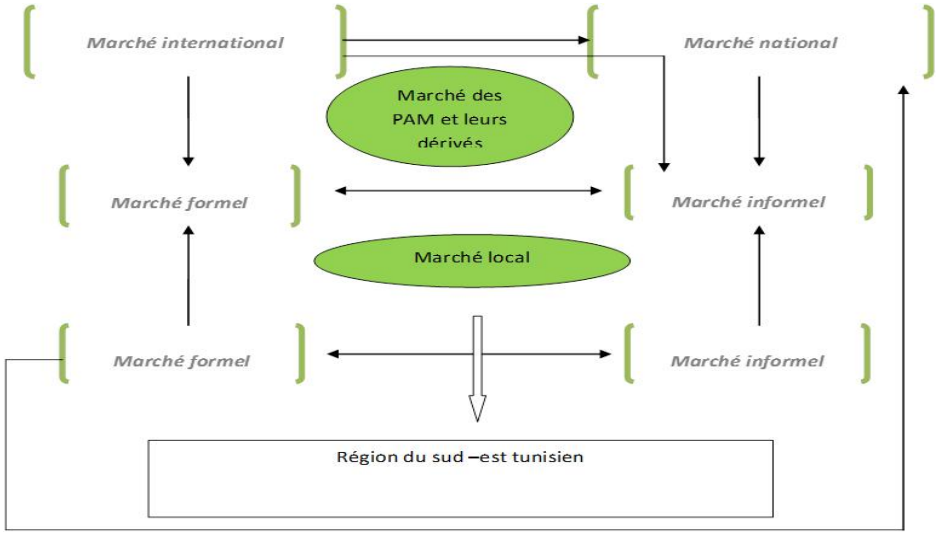


Figure 1. Structure du marché régional des plantes aromatiques et médicinales

3.1.1. Les opérateurs du marché à l'échelle régionale

Les principaux opérateurs qui animent le marché régional des plantes aromatiques et médicinales sont assez diversifiés. Au niveau de notre travail d'analyse nous nous sommes limités aux principaux intervenants qui animent ce marché (les producteurs, collecteurs, herboristes, commerçants intermédiaires, commerçants grossistes et les vendeurs ambulants).

3.1.1.1. Collecteurs

On distingue plusieurs types de collecteurs, tout d'abord on trouve des collecteurs qui font la collecte juste pour l'autoconsommation, ensuite des collecteurs salariés qui travaillent pou le compte d'un autre c'est-à-dire un collecteur grossiste, commerçant grossiste, etc. Généralement les collecteurs salariés sont ou bien des femmes rurales, jeunes filles et des petits garçons, et en enfin des collecteurs qui travaillent pour leurs propres comptes c'est-à-dire qu'ils font eux-mêmes la commercialisation de leurs produits. La cueillette des PAM est effectuée à l'aide de faucille, de sécateur ou à la main.

3.1.1.2. Producteurs

On parle des producteurs des PAM, seulement pour les plantes cultivées telle que la menthe. Actuellement avec le développement de ce secteur à l'échelle régionale et nationale on assiste à

l'apparition de plusieurs pépinières spécialisées dans la production des PAM (romarin, armoise blanche, thym, etc.).

3.1.1.3. Commerçants grossistes

Ce sont des commerçants qui procèdent à l'achat et la vente des plantes aromatiques et médicinales en grandes quantités. Ils ont de locaux de stockage dans plusieurs régions. Les commerçants grossistes ont des relations directes et indirectes avec les différents opérateurs et même avec l'extérieur pour l'exportation et l'importation des PAM.

3.1.1.4. Commerçants intermédiaires

Pour ces commerçants, l'activité des plantes aromatiques et médicinales est une activité secondaire surtout que les achats et les ventes sont réalisés en détails et avec des faibles quantités. Au sein de leurs locaux, on trouve un rayon destiné à vendre des PAM (grandes surfaces, commerçants d'alimentation générale, etc.).

3.1.1.5. Herboristes permanents

Les herboristes sont des spécialistes au niveau de la commercialisation des plantes aromatiques et médicinales et des connaisseurs pour l'usage de ces plantes. La commercialisation des PAM constitue l'activité principale pour les herboristes.

3.1.1.6. Vendeurs ambulants

Les vendeurs ambulants ne possèdent pas des locaux pour la commercialisation des PAM, ils se déplacent dans les marchés hebdomadaires dans plusieurs régions pour la vente des PAM. Actuellement on assiste à l'installation des hangars par les vendeurs ambulants pour le stockage surtout dans les régions de production et dans les régions ou la demande est très importante.

3.1.1.7. Consommateurs

Une fois la production et la transformation des PAM ont été achevées par les différents opérateurs sous forme de plusieurs produits, la population procède à la consommation et l'utilisation des PAM pour des fins alimentaires, médicinales, parfumeries et cosmétiques.

3.1.2. Les principales plantes aromatiques et médicinales à l'échelle régionale

La région du Sud Est Tunisien est célèbre de sa biodiversité importante surtout en plantes à usage thérapeutiques où la population locale a développé un savoir faire diversifié d'exploitation.

Ce couvert végétal spontané, bénéficie d'une forte image de qualité et d'authenticité spécifique au paysage de la région et joue un rôle très important dans le maintien de l'équilibre écologique.

Les principales espèces identifiées dans la région du Sud Est Tunisien et qui sont les plus connus par la population pour de différents usages sont énumérés par le tableau suivant, sachant que la richesse en biodiversité végétale dans cette région dépasse ces dizaines de noms.

Tableau 1. Les espèces végétales de la région du Sud Est Tunisien

Nom scientifique	Nom français	Nom vernaculaire
Artemisiacampestris	Armoise champêtre	Tgoufét
Artemisia herba-alba	Armoise blanche	Chih
Thymus hirtus	Thym	Zaatar
Rosmarinusofficinalis	Romarin	Klil
Atriplexhalimus	pourpier de mer	Gtaff
Calycotomvillosa	Calycotome velu	Gandoule
Capparisspinosa	Câprier épineux	Kabbare
Colocynthisvulgaris	Coloquinte	El Handal
Ferulatunetana	Ferula de Tunisie	El Klak
Juniperusphoenicea	Genévrier de phénicie	Arare
Stipa tenacissima	Alfa	Halfa - Gueddîme
Ziziphus lotus	Jujubier	Essdèr
Lygeumspartum	Faux alfa-sparte	Halfamahboula

3.1.3. Analyse de la politique de distribution des plantes aromatiques et médicinales à l'échelle régionale

Les investigations relatives à l'étude du marché des espèces végétales à vertus thérapeutiques réalisées ont relevé l'existence uniquement de deux types de circuits de commercialisation dans la région : les circuits directs et les circuits courts. L'absence de circuits plus complexes tels que les circuits intégrés traduit bien la faible organisation de ce marché dans la région et justifie amplement la promotion du secteur dans une vision stratégique de développement territorial et locale durable.

La commercialisation de ces espèces végétales au marché régional varie d'une plante à une autre pour plusieurs raisons :

- La nature de la plante;
- La partie commercialisée de la plante;
- La commercialisation de la plante à l'état frais ou conditionné ;
- La saison de la production;
- Le lieu de la production de la plante;
- Les différentes étapes de transformation de la plante (séchage, défeuillage, nettoyage...);
- La demande de la plante sur le marché.

3.1.3.1. Circuit direct

L'analyse de ce circuit nous permet de relever les points suivants :

- La quantité colletée est commercialisée directement au consommateur final ;
- Le collecteur peut tirer plus de profit (pas d'intermédiaires) ;
- C'est un circuit qui n'est pas très fréquent à l'échelle régionale ;
- Le prix de vente au consommateur est relativement faible ;
- La quantité commercialisée au niveau de ce circuit n'est pas importante ;
- Le rôle de la femme dans ce circuit est important car elle assure non seulement la cueillette mais également la commercialisation en petite quantité et selon les besoins aux familles et aux femmes voisines.

La collecte des plantes aromatiques et médicinales à l'échelle régionale, est une activité très fréquente, mais juste pour satisfaire les besoins d'autoconsommation (usage médicinal et alimentaire). Quelques collecteurs pratiquent cette activité pour la commercialisation.



Figure 2. Circuit direct de distribution des plantes à vertus thérapeutiques

3.1.3.2. Circuits courts

3.1.3.2.1. Circuit court (type 1)

Ce circuit nous montre que les produits des PAM frais et séchés sont vendus par le producteur/collecteur à l'herboriste permanent (H), au consommateur intermédiaire (CmI) ou au vendeur ambulant (VA), aussi il fait appel à une deuxième étape qui consiste à la vente de certains produits par le VA au CmI et à l'Herboriste. La vente s'effectue en général sur les lieux, le déplacement des producteurs est moins fréquent. Le vendeur ambulant se déplace chez les collecteurs et s'approvisionne en général de quantités limitées.

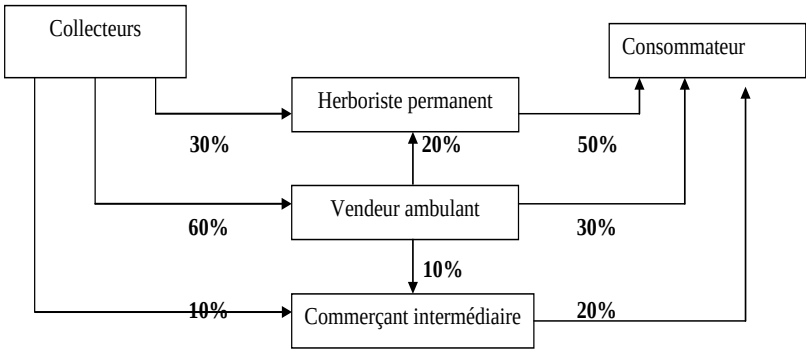


Figure 3. Circuit court (type 1) de distribution des plantes à vertus thérapeutiques

C'est un circuit très fréquent à l'échelle régionale. Actuellement le consommateur pour acheter des plantes aromatiques et médicinales il s'adresse ou bien à un herboriste, à un vendeur ambulant au marché hebdomadaire ou à un commerçant intermédiaire.

Au niveau de ce circuit on remarque que la grande partie collectée est destinée aux vendeurs ambulants pour les raisons suivantes :

- La plupart des collecteurs sont des salariés et ils travaillent pour le compte des vendeurs ambulants;
- Les vendeurs ambulants se déplacent directement sur les lieux de collecte pour l'achat des plantes (Romarin, Thym, Artemisia, Basilic, Verveine…);
- Les herboristes sont des clients pour les vendeurs ambulants;
- Au niveau de ce circuit, on a constaté que tous les vendeurs ambulants rencontrés aux marchés hebdomadaires viennent d'autres régions telles que Kasserine, Sidi Bouzid etc.

3.1.3.2.2. Circuit court (type 2)

Ce circuit fait intervenir des collecteurs grossistes qui ramassent des quantités importantes de PAM directement chez les producteurs. Parfois l'opération de cueillette et de récolte des PAM spontanées est assurée localement par des salariés, généralement des femmes et des vieux, payés par le grossiste. Ensuite, le grossiste assure l'écoulement des produits auprès des détaillants notamment les herboristes et les commerçants intermédiaires. Ces derniers se chargent alors de l'écoulement auprès des consommateurs. Ce circuit fait intervenir une autre variante qui sont les industriels qui achètent les produits des PAM auprès des grossistes pour les transformer (Poudre, huiles, eaux florales). Ces produits sont vendus soit directement aux consommateurs, soit en passant par les commerçants détaillants.

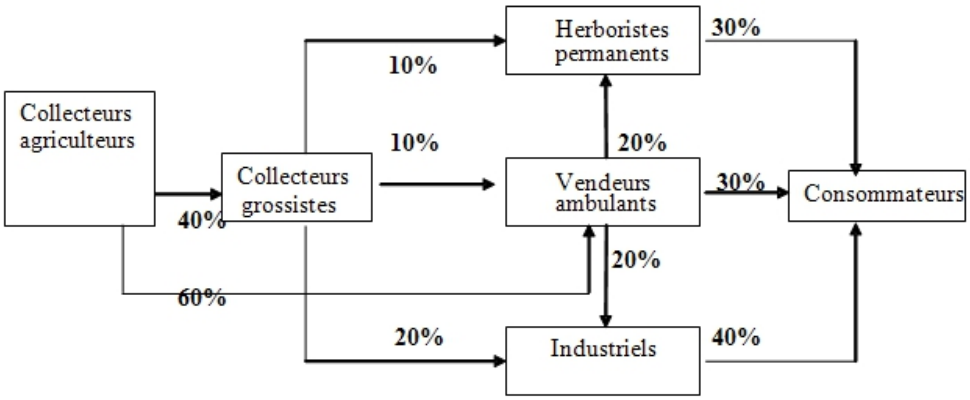


Figure 4. Circuit court (type 2) des plantes à vertus thérapeutiques

L'étude de ce circuit montre que les vendeurs ambulants constituent des monopoles lors de l'achat et la vente des plantes aromatiques et médicinales, puisqu'ils ont des relations directes avec les collecteurs. La plupart des collecteurs travaillent pour le compte des vendeurs ambulants (salariés occasionnels.). La majorité des collecteurs ont des relations familiales avec les vendeurs ambulants.
L'analyse des circuits de commercialisation à l'échelle régionale a permis de soulever les points suivants :
- Le marché des plantes aromatiques et médicinales à l'échelle régionale n'est pas organisé et non encore réglementé par la législation à l'exception de quelques espèces ;
- Absence de contrôle de la qualité ;
- Les prix de vente sont variables d'une saison à une autre et d'un fournisseur à un autre ;
- L'ajustement entre la demande et l'offre des plantes aromatiques et médicinales est particulièrement complexe face à des incertitudes portant sur la quantité et sur la qualité.

3.2. Analyse des stratégies d'acteurs pour la conservation et la valorisation des plantes aromatiques et médicinales

Tableau 2. Liste des acteurs et objectifs

Acteurs	Abréviation	Rôles et Objectifs
Producteurs	Pro	• Conservation et valorisation du patrimoine naturel • Réalisation des Profits • Améliorer les ressources de revenu
Collecteurs	Coll	• Réalisation des Profits • Améliorer les ressources de revenu
Herboristes et commerçants	Her. Com	• Réalisation des Profits • Améliorer les ressources de revenu
Vendeurs ambulants	Ven.Amb	• Conservation et valorisation du patrimoine naturel • Réalisation des Profits et amélioration des ressources de revenu
Industriels	Indus	• Réalisation des Profits • Organisation et règlementation du marché • Création d'emplois
Commissariat Régional de Développement Agricole	CRDA	• Conservation et valorisation du patrimoine naturel • Création d'emplois • Organisation et règlementation du marché

Institut des Régions Arides	IRA	• Actions de recherche pour la conservation et la valorisation du patrimoine naturel • Organisation et règlementation du marché
Agence des Promotions des Investissements Agricoles	APIA	• Promotion et financement du patrimoine naturel • Création d'emplois
Consommateurs	Cons	• Produit nécessaire de point de vue thérapeutique, culinaire et aromatique
Groupement de Développement Agricole	GDA	• Conservation et valorisation du patrimoine naturel

3.2.1. Analyse des influences et dépendances entre acteurs

Pour synthétiser notre travail concernant l'influence directe et indirecte entre acteurs, nous proposons de positionner chaque acteur en utilisant la méthode MACTOR sur deux axes (influence et dépendance). Ce travail nous amène à un classement des acteurs en fonction du rôle qu'ils jouent pour la conservation et la valorisation des plantes aromatiques et médicinales.

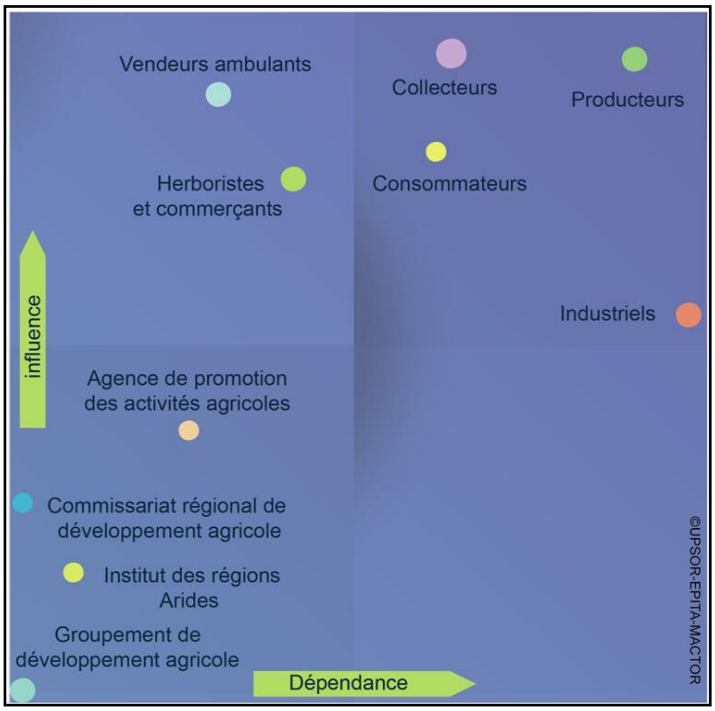


Figure 5. Plan des influences et dépendances entre acteurs

L'analyse de cette figure apporte une visualisation des positions de chaque acteur en tenant compte de son influence et son dépendance avec les autres. Ce graphique se décompose en quatre parties faisant apparaître quatre catégories d'acteurs.

- **Les acteurs relais (Nord-Est) :** Ces acteurs disposent d'une influence forte et ils sont également fortement dépendants d'autres acteurs. Dans notre cas il s'agit surtout des producteurs, des consommateurs et des collecteurs. Ces acteurs sont très influents surtout au niveau des actions de conservation mais ils sont fortement influencé au niveau des actions de valorisation par les vendeurs ambulants et les herboristes qui constituent un monopole au niveau des transactions commerciales des plantes aromatiques et médicinales au niveau régional, aussi la majorité des collecteurs et des producteurs travaillent pour le compte de ces acteurs. Cet analyse nous a montré aussi que les

acteurs dominants le marché régional sont des acteurs mal structurés et qui travaillent dans le cadre d'un marché informel. La commercialisation des produits des PAM et leurs dérivés (huiles essentielles, eaux des parfums, produits cosmétiques, miel) ne respectent pas les normes légales du code de commerce tunisien. Ces produits finis sont en provenance des marchés qui ne sont pas contrôlés.

- Les acteurs dominants (Nord-Ouest) : Ces acteurs disposent d'une influence forte sur les autres sans être eux-mêmes fortement influencés : dans notre cas d'étude, ce sont essentiellement les vendeurs ambulants et les herboristes. La structure de marché régional qui n'est pas organisé, aussi non contrôle par le pouvoir public à permis à ces acteurs de dominer la majorité des spéculations qui s'effectuent au niveau régional. Cet analyse nous a montré aussi que les acteurs dominants le marché régional sont des acteurs mal structurés et qui travaillent dans le cadre d'un marché informel. La commercialisation des produits des PAM et leurs dérivés (huiles essentielles, eaux des parfums, produits cosmétiques, miel) ne respectent pas les normes légales du code de commerce tunisien. Ces produits finis sont en provenance des marchés qui ne sont pas contrôlés.

En effet, cette situation va permettre le ralentissement de l'action de mise en valeur du des plantes aromatiques et médicinales et le développement de ce territoire.

- Les acteurs autonomes (Sud-Ouest) : Ce sont des acteurs peu influents et peu dépendants, ils ne disposent pas d'un pouvoir et d'une influence forte pour agir sur les actions de conservation et de valorisation du patrimoine.

Dans notre étude, cette catégorie regroupe l'ensemble des acteurs publics à savoir, le Commissariat Régional de Développement Agricole (CRDA), Agence de Promotion des Investissements Agricoles (APIA) et le Groupement de Développement Agricole (GDA).

L'analyse de ce graphique, révèle des défaillances importantes surtout au niveau de la faible implication des acteurs publics au niveau régional pour promouvoir le secteur des plantes des transactions commerciales illégales et la prospérité d'un marché informel.

Notre travail relatif aux contraintes et perspectives de développement des plantes aromatiques et médicinales a montré que les acteurs publics qui sont amenés les premiers à valoriser et à conserver le potentiel patrimonial, sont des acteurs autonomes au niveau de ce territoire. En effet, une des conditions nécessaires pour la mise en valeur du patrimoine est l'engagement collectif des acteurs dans ce processus.

- Les acteurs dominés (Sud-Est) : Ceux qui disposent d'une faible influence et qui sont fortement influencés. Notre analyse relatif au marché des plantes et médicinales au Sud-est tunisien n'a pas permis d'identifier des acteurs appartenant à cette catégorie.

3.3. Contraintes pour le développement du marché des PAM

Dans la plupart des pays en voie de développement, la culture des PAM est encore limitée et elle ne reçoit que peu de priorités dans les investissements nationaux et des programmes de développement. Malgré la grande importation des PAM par les pays développés, la croissance des exportations des pays en voie de développement reste limitée.

Dans la région du Sud Est de la Tunisie, les principaux facteurs qui constituent un handicap pour le développement du marché des PAM sont les suivants :

- Le non disponibilité de ces plantes au cours de l'année, la quantité produite des PAM reste toujours variable d'une année à une autre et d'une saison à une autre. Car la plupart des espèces récoltées sont spontanées en plus du rétrécissement des espaces de production à cause de la sècheresse.
- Le marché régional des PAM n'est pas organisé et non encore réglementé par la législation, c'est pour cela que les prix d'achat et de vente sont fluctuants et variables d'un fournisseur à un autre.
- Un manque au niveau de l'esprit de marketing, d'où une demande touristique faible des produits PAM.
- Un manque de connaissance des techniques de production, d'extraction et de standardisation.

- La pénurie de main d'œuvre qualifiée pour la récolte, le stockage, le conditionnement et l'emballage qui permet une production de mauvaise qualité et ayant une faible valeur marchande pour l'exportation.
- Un manque de mesure de contrôle de la qualité : Les exportateurs ne connaissent pas suffisamment les normes internationales pour l'hygiène, la qualité et les spécifications de produit. Ils manquent également de systèmes d'essais, des mesures pour le contrôle de la qualité et l'efficacité de ces produits.
- Une contrainte au niveau de la législation, considérée très importante par les acteurs locaux qui réside dans les difficultés d'application des lois au niveau des terres collectives. En effet, le statut collectif constitue l'un des principaux facteurs qui entravent la gestion rationnelle des espaces naturels.

Cette situation traduit bien l'état de fait que la population locale n'est pas tout à fait consciente des opportunités socio-économiques que pourrait offrir le secteur des PAM pour les économies familiales.

3.4. Perspectives de développement du marché des PAM

Le développement des zones rurales arides qualifiées défavorisées constitue aujourd'hui un des grands objectifs des politiques de développement de la plupart des pays méditerranéens. Ce développement suppose tout d'abord la mise en place des moyens efficaces de protection et de valorisation des espaces et des ressources naturelles, et une incitation en faveur de la préservation de l'environnement fragile.

Le développement de ces zones est aussi la mise en place des conditions d'accroissement de la productivité agricole et de valorisation économique de tous les systèmes de production et de toutes las activités existantes et permettant le dégagement de revenus pour la population.

Au niveau de la région du Sud Est de la Tunisie, l'abondance de biodiversité en PAM doit être associée à la révélation et la mise en valeur de cette richesse qui sont indispensable pour bénéficier de ses avantages comparatifs.

Cette révélation nécessite une coordination entre les acteurs du territoire allant du macro-social présenté par l'Etat et ses projets de développement rural, jusqu'au microsocial présenté par la population qui est l'ossature dans cette démarche de conservation et de valorisation des PAM. Son savoir faire constitue un patrimoine immatériel dont la valorisation parait la meilleure façon pour le conserver et surtout pour en bénéficier dans une démarche de développement territorial.

De ce fait, la promotion de ces produits présente certaines caractéristiques en assurant, d'une part, l'amélioration de revenu des agriculteurs locaux et, d'autre part, la fixation de la population rurale de cette zone (Sghaier et al., 2011).

Pour arriver à une meilleure valorisation des ces plantes médicinales et aromatiques le recours à la filière et à son développement devient une nécessité, du fait que :

De point de vue économique, le développement de la filière PAM permettra l'organisation d'un marché de ces plantes et par la suite la création des points de vente, et la diversification des activités économiques dans un contexte dominé par les activités agricoles et les revenus provenant de l'émigration. D'autre part, la mise en culture des PAM permet l'exploitation économique de leur potentiel botanique à des fins de mise en marché.

Sur le plan social, le développement de la filière PAM est un point fort pour combattre le chômage et créer des emplois pour les jeunes de la région, sachant que cette filière nécessite une main d'œuvre importante pour la production, la récolte et la transformation de ce produit. Ceci va permettre la limitation de l'exode rural et l'émigration et par la suite le maintien de la population dans une région considérée comme « forte région d'exode ».

D'autre part, le savoir faire impressionnant que possèdent les femmes en terme de transformation de ces plantes (surtout la distillation) peut être valorisé ce qui permettra à cette catégorie sociale de se doter d'une certaine autonomie financière notamment.

De point de vue environnemental, les PAM jouent un rôle important en terme de conservation des eaux et des sols; leur adaptation aux conditions de sécheresse fait qu'elles consomment moins d'eau que la plupart des cultures tout en offrant des rendements considérablement plus élevés.

Il est donc bien clair que les trois piliers du développement durable sont existants (conomique, social et environnemental) et que les PAM peuvent être à la base d'un développement à la fois territorial et durable (Mejlissi, 2009).

4. CONCLUSION

La modernisation du secteur PAM et son développement est devenu actuellement au centre des préoccupations des politiques sectorielles et des orientations stratégiques de l'économie Tunisienne. Les perspectives locales, régionales, nationales et internationales sont très prometteuses pour ce secteur. D'autre part, les PAM en tant que ressources locales des territoires ruraux offrent de véritables atouts au développement rural et territorial.

Ce secteur constitue un moyen non seulement pour la diversification de leurs productions agricoles nationales, mais aussi pour la valorisation au mieux des espaces fragiles à potentialités économiques limitées et pour offrir aux populations des régions rurales des sources de revenus particulièrement intéressantes.

La diversité de ces plantes et leurs utilisations nécessite une une politique clairement définie et organisée impliquant la profession, les pouvoirs publics concernés et les centres de recherche spécialisés.

REFERENCES

- APIA (Agence de Promotion des investissements Agricoles), 2003. Revue annuelle de Ministère de l'Agriculture et des Ressources Hydraulique.
- APIA (Agence de Promotion des investissements Agricoles), 2008. Revue annuelle de Ministère de l'Agriculture et des Ressources Hydraulique, P. 1-28
- Duteurtre, G., (2000). Une mérhode d'analyse des filières, LRVZ, N'Djamena, Document de travail, p : 15-16.
- Sghaier M. et Gammoudi, T., (2007). Le secteur des plantes aromatiques et médicinales (PAM) en Tunisie : importance et opportunités socio-économiques. Revue des Régions Arides, Numéro spécial, Vol II. Actes du séminaire international « Perfume, Aromatic and Medicinal Plants : from production to valorization », 2-4 Novembre 2006, Jerba, Tunisie, P.834.
- Mejlissi I. 2009. « Analyse de la filière des plantes aromatiques et médicinales en Tunisie »
- Gammoudi, Taoufik, Ibrahim Mejlissi, Mohamed Abdeladhim, Hatem El Khatalli&MongiSghaier, 2009. Contribution à l'analyse de la filière des Plantes Aromatiques et Médicinales (PAM) en zones arides (sud-est de la Tunisie). Actes du séminaire international «Medicinal and Aromatic Plants » SIPAM, 2009, 26-28 Mars 2009, Djerba, Tunisie.
- Sghaier M, Khateli, H et Gammoudi, T., (2011). Filière des plantes Aromatiques et Médicinales (PAM) dans le sud-est de la Tunisie : Importance et persepectives de développement.

Productivité Totale des Facteurs de Production des Dattes dans les Exploitations Phoénicicoles et ses Déterminants

Rached Zouhair[6], Ali chebil[7], Khadija Ouerghi[1], Saleh Selmi[8],
[1] Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie, Tunis, Tunisie.
[2] Institut National de la Recherche en Génie Rurale Eaux et Forêts , Tunis, Tunisie.
[3] École Supérieure d'Agriculture de Mograne, Zaghouan, Tunisie.

RESUME
La production des dattes présente une forte valeur marchande ce qui lui attribue d'être une source principale de revenus des ménages essentiellement dans les régions de production (Tozeur et Kébili). Toutefois, le rendement des dattes reste encore faible comparativement à ceux des rendements mondiaux. Ce travail s'interroge sur la performance économique et technique des exploitations phœnicicoles dans les oasis Tunisiennes. Pour ce faire, une enquête par questionnaire a touché 160 producteurs des dattes dans les principales régions de production à savoir, les oasis de Tozeur et Kebilli. L'approche des coûts reconstitués a été mobilisée afin de calculer les coûts de production des dattes Déglet Nour dans les zones de production aussi bien en mode biologique qu'en mode conventionnel. En outre, la productivité totale des facteurs de production pour chaque exploitation a été estimée. Les résultats obtenus montrent que les performances économique (coût de production, marge brute) et productive (PTF) dépendent de la région de production et de la taille de l'exploitation. En effet, la marge brute et la PTF est inversement proportionnelle à cette dernière. La performance des exploitations biologiques est plus importante comparée à celles du mode conventionnel.
Mots clés : Coût de production, PTF, Dattes, Tunisie**.**

SAMMARY
In Tunisia, date palm production is an important source generation mainly for the farmers located in the major production regions (Tozeur and Kebili). However, the average yield in this country is still low compared with those observed in the world. This work aims to study the economic and technical performance of the date's farms in the Tunisian oases. The data used in this study were obtained from 160 producers of dates in the main regions of production (the oases of Tozeur and Kebilli). The reconstituted costs approach was used to calculate the production costs of dates Deglet Nour in biological mode as well as in conventional mode in the target regions. In addition, the Total Factors Productivity (TFP) for each farmer was estimated. The results show that economic performance indicators (production cost, gross margin) and (TFP) depend on the production region of and farm sizes . The gross margin and the TFP are inversely related to the farm size. The results also show that economic indicators are higher for organic farms than conventional ones.
Key Words : Production cost , TFP, Dates, Tunisia.

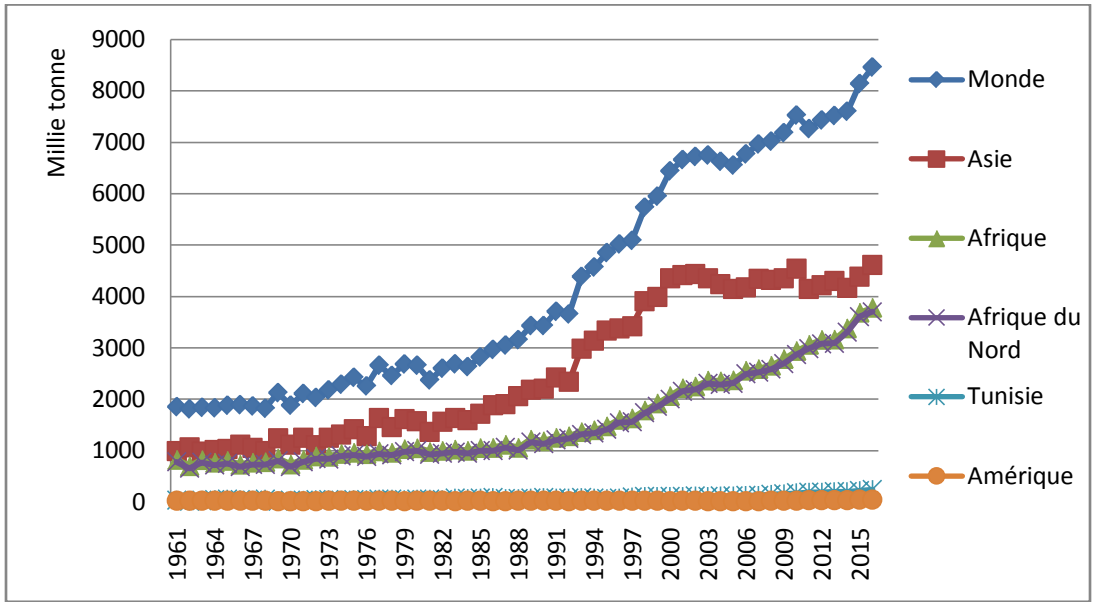
1. INTRODUCTION

En vertu de son importance socioéconomique et environnementale, le secteur datte revêt une place importante dans l'agriculture. Il contribue avec 725 Millions DT dans la production agricole offrant ainsi d'environ 60000 emplois et par conséquent 10,374 millions jours. En plus, la filière des dattes

est considérée comme étant un bon stimulant pour l'industrie et les services liés aux : commerce, stockage, emballage et le transport.
La production des dattes présente une forte valeur marchande ce qui lui attribue d'être une source principale de revenus des ménages essentiellement dans les régions de production (Tozeur et Kébili). La filière des dattes est organisée autour de trois fonctions principales à savoir : la production, la collecte / le stockage et le conditionnement et l'exportation. La variété Deglet-Nour a une forte réputation sur le marché.
Les oasis possèdent un aspect environnemental important. Elles offrent un milieu environnemental favorable à vivre à travers son écosystème unique. Elles peuvent avoir une possibilité d'intégrer dans les systèmes de cultures étant en étage de cultures tel qu'en arboriculture et cultures maraichères. Elles permettent aussi à la lutte contre la désertification et par conséquent à la préservation de la biodiversité et la protection de l'environnement.
L'objectif du présent travail est de calculer le coût de production des dattes dans trois oasis de sites géographiques différentes. Le deuxième niveau d'analyse porte sur les strates de superficies des exploitations phoénicicoles. Ce travail est composé de trois parties. Dans la première on présente les sites de notre étude. Dans la deuxième on expose la méthodologie de la recherche. La troisième est réservée à l'exposition des résultats et discussions. La conclusion fera l'objet de la dernière partie.

2. ÉVOLUTION DE LA PRODUCTION ET LE RENDEMENT MONDIALE DES DATTES

Selon FAO (2018), la production mondiale des dattes connait un progrès échelonné et quantitatif depuis 1961 avec une production qui dépasse 8000 mille tonnes des dattes. L'Asie est le continent le plus productif des dattes. Sa domination est aperçue essentiellement durant la dernière décennie. L'Afrique du nord a une production approximative de 3000 tonnes. La Tunisie a une production faible en le comparant à celle de l'Asie et de l'Afrique ainsi de l'Afrique de Nord. Elle présente presque un 1/10 de la production mondiale.

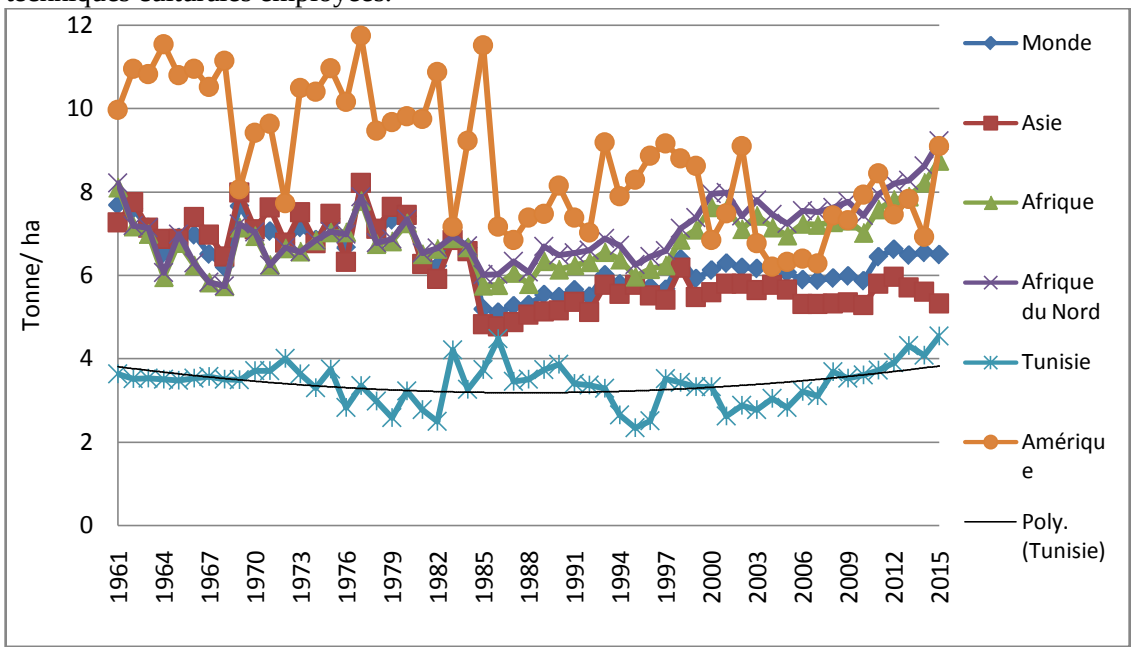


Source : FAO, 2018

Figure 1 : Evolution de la production mondiale des dattes

Quant au rendement, il reste instable pour les pays productifs des dattes. La Tunisie produit un rendement de 5 tonnes par hectare qui est inférieur à celui du rendement mondial. Cette faiblesse en rendement des dattes est due principalement à la régression des ressources notamment celles de

l'eau d'irrigation, à la vétusté des réseaux de distribution et d'irrigation et aux inefficacités des techniques culturales employées.



Source : FAO, 2018

Figure 2: Evolution des rendements moyens des dattes dans les pays producteurs

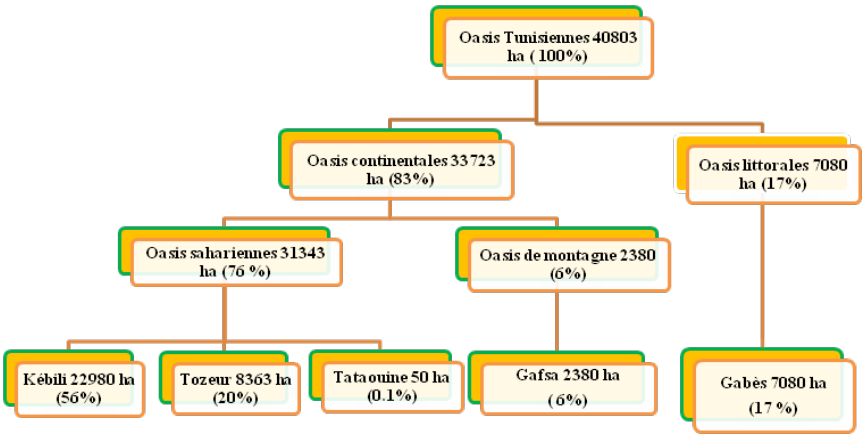
3. REPARTITION GEOGRAPHIQUE DES OASIS EN TUNISIE

Les oasis Tunisiennes couvrent une superficie de 40803 hectare qui correspond à 100 % de la totalité. Ces superficies sont partagées sur 54 415 parcelles dont 67,6% (14 716 ha) de celles-ci sont de type traditionnel et 32,4% sont des nouvelles plantations. Prés de 75 % de ces parcelles sont de taille inférieure à 1 ha.

Sur le plan géographique, elles sont réparties en deux types des oasis : l'une à caractère continentale dont la superficie est de l'ordre 33723 ha et l'autre à caractère littorale ayant une superficie de 7080 ha (17%) qui se localise dans la région de Gabes. Les oasis continentales présentent 83% de la surface totale, elles sont subdivisées en sous deux types des oasis :

-Les oasis sahariennes : Elles couvrent une superficie de 31343 ha avec un taux de 76% de superficie oasienne. Elles sont réparties essentiellement sur trois gouvernorats à savoir Kébéli, Tozeur, Gafsa et Tataouine avec une superficie de 22980 ha (56%), 8363 ha (20%) et 50 ha (0.1%) respectivement.

- Les oasis de montagne qui sont localisées à Tamoghza, Mides et Chbika… Elles sont étendues sur une superficie de 2380 ha (6% de la superficie totale oasienne).



Source : MARHP,2012

Figure 3 : Répartition Géographiques des Oasis

Par ailleurs, les rendements des dattes enregistrées varient au niveau des régions qu'aux niveaux des exploitations. Toutefois, ceux-ci restent en dessous du potentiel mondial notamment dans les pays producteurs à savoirs les pays proches Maroc et Algérie. Face à cette variation on se demande quels sont les déterminants de l'insuffisance des rendements des dattes en Tunisie ? Et quelle sont les facteurs socio-économiques qui expliquent les niveaux de la productivité globale des facteurs de production ?

Notre recherche se propose d'étudier la performance économique des exploitations phoénicicoles à travers l'analyse de leur productivité globale des facteurs de production et de leurs niveaux des coûts de production dans les différents types des oasis en testant l'effet de la strate de superficie sur la productivité des exploitations.

4. Méthodologie de la recherche

4.1. Méthode de calcul du coût de production et PTF

L'approche des coûts reconstitués (ou coût au prix de marché) a été mobilisée afin de calculer les coûts de production des dattes dans les zones de production des dattes de Déglet Nour aussi bien en mode biologique qu'en mode conventionnel. Les charges variables ont été calculées à partir de la formule utilisé par Gharbi et al.(2002) suivante :

$$CHV = \sum_{i=1}^{n} wv_i * qv_i$$

Le coût unitaire (CU) = la soustraction de la valeur des sous-produits divisé par la quantité produite. Desbois (2002);

$$CU = [(\sum_{i=1}^{n} wv_i * qv_i + \sum_{i=1}^{n} wf_i * qf_i\ ) - \mathrm{Q_s} * \mathrm{p_s}\ ]/\mathrm{Q}$$

Avec:

- qf_i et wf_i sont respectivement les quantités et les prix des facteurs (charges) fixes pour la production des dattes;
- CHT, CHF et CHV sont respectivement les charges totales, les charges fixes et les charges variables
- wv_i et qv_i représentent respectivement les prix et les quantités des facteurs spécifiques pour la production des dattes;
- p_s et Q_s sont le prix et la quantité de sous-produit respectivement.

La productivité totale des facteurs de production (PTF) est le rapport entre la production totale et la somme des charges variables (Following et Bride 2003). Selon Bamidele et al. (2008), Mbam et Edeh (2011), Dhehibi et al. (2012), la productivité est estimée par la formule suivante :

$$PTF_j = \frac{R_J}{\sum_{i=1}^{n} CVT_i}$$

Dans notre cas, où la méthodologie adaptée est celle des coûts reconstitués, la productivité est estimée par l'équation suivante :

$$PTF_j = \frac{R_j}{\sum_{i=1}^{n} P_i * x_i}$$

Dont :
- PGF_j est la productivité totale des facteurs pour l'exploitation j.
- R_j représente la recette totale de l'exploitation j.
- P_i et x_i sont les prix et les quantités des facteurs (i) de production respectivement.
- CVT indique le coût des charges variables.

4.2 Production des données

Les données nécessaires à l'analyse ont été collectées à travers une enquête par questionnaire socioéconomique auprès des exploitations phoenicicoles des gouvernorats de Tozeur et Kébili. Ces gouvernorats représentent plus de 90% de la production des dattes en Tunisie. Cette enquête a été réalisée en 2015 dans trois principales types des oasis, de montagne ce de Tamoghza et deux continentaux ceux de Kébili et Déguech. Elle a touché 152 exploitants répartis sur ces trois zones.
Le tableau 1 montre la variabilité des intrants utilisés dans la production des dattes par les exploitations agricoles dans les trois oasis étudiées à savoir Tamoghza, Deguech et Kébili.

Tableau 2 : Nombre d'exploitant enquêtés, produit et charges d'exploitation

Oasis		Produit Brut (DT/ha)	Fertilisation (DT/HA)	Irrigation (DT/An)	Main d'œuvre (DT/An)	Entretien (DT/An)	SAT (ha)
Tamoghza	N	48	48	48	48	48	48
	Moyen	12479	81	630	1256	206	1,1
	Minimum	0	0	480	125	105	0,1
	Maximum	45000	300	1440	6750	473	4
Deguech	N	59	58	59	59	59	59
	Moyen	9944	328	1059	1164	61	1
	Minimum	450	0	48	0	0	0,1
	Maximum	45000	2800	7150	5050	675	4
Kébili	N	45	45	45	45	45	45
	Moyen	6733	1181	434	1211	271	0,9
	Minimum	552	70	38	200	0	0,1
	Maximum	17600	10875	1344	4200	1200	4
Total	N	152	151	152	152	152	152
	Moyen	9718	504	738	1207	169	1
	Minimum	0	0	38	0	0	0,1
	Maximum	45000	10875	7150	6750	1200	4

Sources : Notre enquête

5. RESULTATS ET DISCUSSION

La phoéniciculture est une activité particulière de l'agriculture Tunisienne. En effet, la mécanisation est quasi absente dans les travaux d'entretien de la culture des dattes. Les résultats obtenus par le calcul des charges de production des dattes, dans les trois oasis de Tamoghza, Kébili et Deguech,

montrent que la main d'œuvre accapare prés de 42,4% de totale des charges variables suivie par l'irrigation, l'entretien et la fertilisation avec des taux de 32.9%, 17.1% et 7.4% respectivement.
Les dépenses allouées à la fertilisation et l'irrigation, dans les oasis de Kébili sont plus importantes que celles dans les oasis de Tamoghza et de Deguech. Ceci est due que la plus part des exploitants agricoles des oasis de Kébili irriguent avec leurs propres sondages. Par contre, les parts des autres charges sont presque identiques dans les trois zones de production.
L'identification des déterminants de la PTF des dattes montre que celle-ci est affectée par plusieurs variables liées à l'exploitant, à l'exploitation et à l'environnement socio-économique de l'exploitation agricole. En effet, les tests statistiques ceux de Duncan et ANOVA, ont montré que la zone de production est en relation avec le revenu agricole de l'exploitation, les quantités des fertilisants utilisées, la quantité d'eau consommée par hectare, les travaux d'entretien réalisés. Au niveau de l'exploitant la zone est corrélée avec le taux d'encadrement et la formation des producteurs et leurs âges.
Par contre, la quantité de la main d'œuvre employée, l'efficacité technique et le coût de production ne dépendent pas de l'oasis. Toutefois, le cout de production varie en fonction de mode de production. En effet ce coût unitaire de production des dattes déglet Nour est plus élevé en mode conventionnel que celui en mode biologique.
Parallèlement, la typologie des producteurs et leur PTF des dattes par taille d'exploitation a été utilisée pour la caractérisation des exploitations agricoles en Tunisie. En effet, ce critère est sélectionné en considérant que les petites exploitations sont le moins efficaces et quelles sont le plus défavorisées d'une part et que l'amélioration de la productivité du secteur doit passer par l'amélioration de la productivité des petites exploitations. Or les résultats obtenus montrent que les petites exploitations possèdent la PTF la plus élevée. Ces résultats confirment celles qui ont été prouvées par Rached (2008) que la typologie par taille d'exploitation n'a aucun ajout sur l'amélioration de la productivité des exploitations agricoles. Par ailleurs, la marge brute par hectare est inversement proportionnelle par rapport a la taille de l'exploitation. La marge brute par hectare la plus élevée est enregistrée dans la strate de superficie les plus faible (0.1-0.5ha).

Tableau 3 : Variation des structures des charges d'exploitation par zone de production

Oasis (%)		Main d'Œuvre	Irrigation	Entretien	Fertilisation
Tamoghza	Moyen	43,3	39,4	12,9	4,3
	Maximum	89,3	65,7	24,9	11,5
	Minimum	13,7	6,4	2,8	0
Deguech	Moyen	41,1	40,6	1,4	17,1
	Maximum	84,8	100	15,7	64,8
	Minimum	0	3,6	0	0
Kebili	Moyen	43,2	15,9	9,4	31,4
	Maximum	73,1	48,7	32,3	75,8
	Minimum	12,1	1,12	0,0	9,3
Total	Moyen	42,4	32,9	7,4	17,3
	Maximum	89,3	100	32,2	75,8
	Minimum	0,0	1,12	0,0	0,0

Sources : Nos calculs

Tableau 4 : Productivité globale de production par strate de superficie

Oasis	Strate	Production (kg)	Production (Dt)	PTF	CU (DT/kg)	Marge Brute (Dt)
Tamoghza	0,1-0,5ha	1329,3	2928,0	3,2	1,2	1980,1
	0,51-1ha	1260,8	2886,5	1,5	3,2	819,7

	Supérieur 1ha	3680,0	11040,0	2,5	2,3	6769,5
	Total	1999,3	5284,5	2,6	2,0	3111,1
Deguech	0,1-0,5ha	1564,8	2018,0	2,5	0,7	971,4
	0,51-1ha	7102,9	9829,2	3,1	0,5	6687,6
	Supérieur 1ha	15271,1	21515,3	3,0	0,5	14325,1
	Total	7474,3	10405,3	2,8	0,6	6819,7
Kébili	0,1-0,5ha	3481,7	3942,9	2,0	1,1	1708,6
	0,51-1ha	5888,3	7181,3	1,9	0,8	3147,7
	Supérieur 1ha	8056,1	12371,2	3,6	1,0	8118,6
	Total	5038,3	6492,1	2,3	1,0	3374,4
Total	0,1-0,5ha	2136,5	2963,5	2,6	1,0	1547,3
	0,51-1ha	5132,0	7125,6	2,3	1,3	4012,0
	Supérieur 1ha	9861,3	16064,1	3,0	1,2	10476,6
	Total	5040,2	7647,9	2,6	1,2	4642,9

Sources : Nos calculs

Par ailleurs, une typologie a été réalisée selon le mode de production (biologique et conventionnel) a pu montrer que les dattes biologiques sont plus rentables que celles des dattes conventionnelles. En effet, le rendement et par conséquent la marge brute enregistrés en mode biologique sont plus encourageants que celles en mode conventionnel. Ces résultats sont conforment a ceux qui ont été prouvé par Rached et al. (2012) qui ont montré l'opportunité de la conversion en mode biologique.

Tableau 5 : la production et la marge brute des modes de production des dattes biologique et conventionnelle.

Mode de production	Biologique	Conventionnel
Production moyenne kg/ha	6597	5565
Rendement moyen Kg/pied	55	40
Recette (Dt/ha)	6930	4996
Marge brute (Dt/ha)	5027	3338

Sources : Nos calculs

6. CONCLUSION

La structure des charges de production montre que l'eau d'irrigation et la main d'œuvre constituent les facteurs les plus déterminants de la production des dattes dans les oasis. Par conséquent, la réduction des coûts et la préservation des ressources nécessiteraient plus d'effort en matière de conservation de la ressource en eau par l'introduction des technologies et mode d'irrigation dans les oasis ainsi la mécanisation des opérations est devenue une priorité.

Le coût de production et la productivité totale des facteurs de production sont liés à la zone de production et à la taille de l'exploitation. De même, la marge brute est liée non seulement à la région, mais elle dépend aussi de la taille de l'exploitation. Par conséquent, les programmes de développement seront plus efficaces s'ils seraient établis par région et non d'une façon globale. L'activité phoénicicole assure des revenus moyens à faibles aux producteurs (la durabilité est menacée). En effet, le développement et la mise à niveau des exploitations Phoénicicoles sont cruciaux.

Parallèlement, le coût de production des dattes biologiques est moins important que les dattes conventionnelles. De ce fait, le mode biologique pourrait être une alternative pour la promotion des revenus des oasiens.

REFERENCES

- Desbois, D. 2002. Coûts de production agricole: Comparaison de deux méthodes d'estimation sur la base du RICA. Insee-Méthodes: Actes des Journées de Méthodologie Statistique 2002. INRA. Economie et Sociologie rurales et MAAPAR/DAF/SCEES (Bureau du Rica).
- Dhehibi, B., H. Bahri et M. Annabi. 2012. Input and output technical efficiency and total factor productivity of wheat production in Tunisia. AfJARE Vol 7 No 1 October 2012.
- Food and Agricultural Organization (FAO). 2018. FAOSTAT: www.fao.org/faostat/fr.
- Gharbi, F., M. El Fahem, F. Lahsoumi, et Z. Rached. 2002. Analyse de la rentabilité de production des semences de la pomme de terre . BASE. 2002.
- Lasrem, A., H. Dellagi, M. M. Masmoudi et N. Ben Mechlia. 2015. Productivité de l'eau du blé dur irrigué face à la variabilité climatique . New Medit N°1, 2015.
- Mbam, B.N. and H.O. Edeh. 2011. Determinants of farm productivity among smallholder rice farmers in Anambra State, Nigeria Journal of Animal & Plant Sciences,.Vol. 9, 2011 Issue 3: 1187-1191.28/2/2011.
- Ministère de l'Agriculture des Resource Hydrauliques et de la Pêche (MARHP). 2012,2015 Budgets économique. DGEDA et ONAGRI. « http://www.onagri.tn/ »
- Rached, Z. 2008. Analyse comparative des coûts de production et de l'efficacité technique des dattes biologiques: Cas de la région de Hezoua. Mémoire de Mastère. INAT.2008.140pp.
- Rached, Z., A. Selmi et R. Khaldi. 2012. Etude comparative de la performance des dattes biologiques en Tunisie. Cas de la région de Hezoua. New medit N°3.2012.

Les coproduits oasiens dans l'alimentation des volailles : Cas des rebuts de dattes et de l'extrait du contenu du rumen

Arbouche F.[1*], Arbouche R.[1], Arbouche Y.[2], Mennani A.[2], Arbouche H.S.[1]
[1]Département d'agronomie, faculté des sciences de la nature et de la vie, Université de Ghardaia, Algérie
[2]Département d'agronomie, faculté des sciences de la nature et de la vie, Université de SETIF1, Algérie

RESUME
L'objectif de cette étude a été de déterminer l'effet de substitution du maïs par les rebuts des dattes issus des industries agroalimentaires des zones oasiennes et d'une complémentation par de l'extrait du contenu de rumen issu des abattoirs ovines dans les rations du poulet de chair locale, sur le poids corporel, la consommation, la conversion alimentaire et les caractéristiques de la carcasse. 200 poussins males et femelles, de souche locale, d'un jour, pesant en moyenne 25±2g, ont été répartis aléatoirement en 4 lots de 50 sujets chacun, en fonction du taux de substitution du maïs par les rebuts de dattes (0 %, 20 %, 30 % et 40 %) durant 48 jours. Les poids vifs à 48 jours ont été améliorés pour l'ensemble des lots expérimentaux avec +162g (20%) ; +82g (30 %) et + 31g (40 %), l'ingéré alimentaire est resté constant avec un indice de consommation qui s'est amélioré (-0,17 lot 20%; -0,05 lot 40 %) par rapport au lot témoin. L'ensemble des caractéristiques restent inchangés pour l'ensemble des lots, hormis le poids du foie qui est moins développé pour les lots expérimentaux (-19g lot 20%; -14g lot 30 % et -17g lot 40 %). L'incorporation des rebuts de dattes à raison de 40 % en substitution au maïs avec addition de 250ml par kilogramme d'aliment d'extrait de contenu du rumen dans l'alimentation du poulet de chair, permet d'améliorer le poids vif, le gain moyen quotidien en induisant un ingéré alimentaire et un indice de consommation moins important.
Mots-clés: croissance pondérale, extrait du contenu de rumen, indice de consommation, poulet de chair, rebuts des dattes.

SAMMARY
The aim of this study was to determine the effect on the body weight, consumption, food conversion and carcass characteristics of local broiler chickens of replacing corn with cull dates from agri-food industries in oasis zones and of complementing this with rumen content extract from sheep abattoirs in the chickens' feed rations. A total of 200 male and female day-old chicks of local stock, with an average weight of 25±2 g, were divided randomly into 4 groups of 50 individuals, each group distinguished by the respective rate of substitution of corn by cull dates (0 %, 20 %, 30 % and 40 %) for a period of 48 days. Each batch was divided into ten (10) packages of 05 subjects, banded and numbered. The live weights after 48 days improved for all experimental groups, recording an increase of + 162 g (20 %); + 82 g (30 %) and + 31 g (40 %). The quantity of feed ingested remained constant while the consumption index improved (-0.17 for the 20 % group; -0.05 for the 40 % group) in relation to the control group. All of the characteristics remained unchanged for all groups with the exception of liver weight, which was lower in the experimental groups (-19 for the 20 % group; -14 g for the 30 % group and -17g for the 40 % group). Substituting 40% of the corn by cull dates while adding 250 ml rumen content extract per kilogramme of broiler chicken feed increased the live weight and average daily gain while reducing the quantity of feed ingested and the consumption index. The economic benefit represented a 4.8 % and 3.4 % reduction in the cost of feed for a substitution rate of 20% and 40% respectively.
Key words: **broiler chicken,** consumption index, cull dates, **rumen content** extract, **weight gain**.

1. INTRODUCTION

Les élevages avicoles fournissent de la viande blanche plus rapidement que ceux qui fournissent de la viande rouge. Ils permettent de mettre à la disposition des populations les plus démunies des protéines animales à faible cout de revient vis à vis des viandes rouges. Cependant, dans la plus part des pays émergeants, les productions animales sont dépendantes des importations de matières premières constituants les formules alimentaires de ces monogastriques à l'instar de l'Algérie. Dans ce type d'élevage, l'alimentation constitue 60 à 70% des dépenses d'élevage (Belhouadjeb et

Chehat, 2013) et pour que son impact sur le kilogramme de viande produit soit moindre, il y a lieu de baisser les couts des formules alimentaires en utilisant les aliments non conventionnels notamment les sous produits agro industriels comme les rebuts des dattes des régions oasiennes. Issus des industries de conditionnement et de transformation des dattes, leurs quantités sont importantes (Chehma et *al.*, 2000) et leur composition chimique et valeur nutritive ont été déterminées (Arbouche 2012 et Arbouche et al., 2018). Plusieurs études ont eu pour objet, l'incorporation des sous produits des dattes (Meradi et al., 2016 ; Meradi et Aloui 2009) et leurs améliorations par des traitements chimiques (Chehma et al, 2009 ; Chehma et Lango 2004 ; Arbouche et Arbouche 2008 ; Arbouche 2012). Plusieurs essais d'amélioration des performances de production utilisant des améliorateurs de croissance (Rahman et al 2012), des pro biotiques avec ou sans minéraux et vitamines (Anjum et al, 2005 ; Islam et al, 2004 ; Harun Ar Rashid et al, 2015), des enzymes exogènes et des amino acides essentiels (Fernandes et al., 2015; Murakami et al., 2012) et du jus de rumen (Zebrowska et al., 1989, Ziolecki et al., 1984 et Ziolecki et al., 1984), ont été étudiés. Sur monogastriques notamment le poulet de chair, le jus de rumen a été testé comme améliorateur de croissance (Sanli et al., 1998; Tuncer et al., 1999; Kuçukersan et al., 2002).
Le but de notre étude est de déterminer l'influence de la substitution du maïs par les rebuts de dattes et l'inoculation de l'extrait du contenu de rumen dans les différents régimes de substitution, à raison de 250 ml par kilogramme d'aliment en vue de compenser le déficit protéique des rebuts de dattes, sur les performances zootechniques et la qualité des carcasses du poulet de chair.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Animaux, régime alimentaire et protocole expérimental

L'essai s'est déroulé au niveau du centre avicole d'El Kala (wilaya d'El-Tarf), dans un bâtiment fermé à ventilation statique, réservé aux expérimentations sur poulets de chair. 200 poussins males et femelles, de souche locale, d'un jour, pesant en moyenne 25±2g, ont été répartis aléatoirement en 4 lots de 50 sujets chacun, sur une superficie de 5m^2 par lot, avec comme litière de la paille de blé dur broyée. Chaque lot a été subdivisé en 10 paquets et les sujets ont été bagués et numérotés.
Les rebuts des dattes (variété Deglet Nour), provenaient des unités de conditionnement du Sud-Est Algérien (Biskra). Ils ont été préalablement séchés au soleil, puis broyés grâce à un broyeur à marteaux avec une grille de 1mm. La composition chimique est retracée dans le tableau 1.

Tableau 1 : composition chimique des rebus des dattes (Arbouche *et al.*, 2018 à paraitre)

Matières organiques (% de MS)	97,1
Matières azotées totales (% de MS)	4,2
Cellulose brute (% de MS)	9,4
Matières grasses (% de MS)	8,2
Matières minérales (% de MS)	2,9
Sucres totaux (% de MS)	62,3
Extractif non azoté (% de MS)	66,1
Energie brute (kcal/kg de MS)	4235
Energie métabolisable (kcal/kg de MS)	3683
Lysine (g/100g d'aliment)	3,2
Méthionine (g/100g d'aliment)	1,5
Cystine (g/100g d'aliment)	1,7

MS : matière sèche
Energie métabolisable : estimée selon la formule de Carpenter et Clegg (1956) avec EM (kcal/kg de MS) = 35,3 x PB (%) + 79,5 x EE (%) + 40,6 x NFE (%) + 199
(EM : énergie métabolisable, PB : Protéines brutes, EE : Ether extract, NFE : Nitrogen Free Extract) d'après Carpenter et Clegg (1956)

Le contenu de rumen a été récupéré au niveau des abattoirs juste après l'éviscération des ovins. Il a été traité avec une solution d'acide chlorhydrique à 1% afin d'empêcher toutes possibilités de ponte des mouches et étalé sur film plastique. Le séchage au soleil s'est effectué après plusieurs

retournements. Le contenu de rumen a été immergé dans une eau chauffée à 80°C à raison d'un kilogramme par litre (1 Kg/L) et malaxé tous les six heures pendant 24 heures. Après filtrage, l'extrait a été placé en réfrigération à une température de 6°C. La teneur en matières azotées totales (MAT) et en acides aminés (AA) est retracée dans le tableau 2.

Tableau 2. Teneur en en MAT (% de MS) et en AA (en % de MAT) de l'extrait du contenu de rumen d'ovins (ECRo)

		Teneur en acides aminés								
	MAT	Cystine	Méthionine	Thréonine	Lysine	Acide Glutamique	Acide Aspartique	Arginine	Leucine	Isoleucine
ECRo	8,32	0,89	1,10	2,14	2,56	10,21	6,24	2,85	4,36	1,81

Par l'intermédiaire du logiciel WUFFDA pour la formulation alimentaire du poulet de chair, quatre rations iso-protéiques ont été constituées, avec 0% (aliment témoin), 20 ; 30 et 40% de substitution du maïs par des rebuts de dattes pour les différentes phases d'élevage (Tableau 3).

Tableau 3 : Formules (kg/100 kg d'aliment) des aliments de démarrage (1 à 20 jours), de croissance (21 à 33 jours) et de finition (34 à 48 jours) distribués aux poulets en fonction du taux de substitution du maïs par les rebus des dattes. imbibés de jus de rumen

Type d'aliment	Démarrage				Croissance				Finition			
Taux de substitution de l'aliment (%)	0	20	30	40	0	20	30	40	0	20	30	40
Ingrédients												
Maïs	61	48,8	42,7	36,6	64	51,2	44,8	38,4	70	56	49	42
Rebuts de Dattes	0	12,2	18,3	24,4	0	12 ,8	19 ,2	25 ,6	0	14	21	28
Tourteau de soja	30	30	30	30	27	27	27	27	21	21	21	21
Issue de meunerie	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Phosphore bi calcique	1,2	1,2	1,2	1,2	1 ,2	1 ,2	1 ,2	1 ,2	1,2	1,2	1,2	1,2
CMV	1,25	1,25	1,25	1,5	1	1	1	1	1	1	1	1
L-Lysine	0 ,15	0 ,15	0 ,15	0 ,15	0 ,5	0 ,5	0 ,5	0 ,5	0,5	0,5	0,5	0,5
DL-Méthionine	0,4	0,4	0,4	0,15	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Teneur en nutriments en % de MS												
Energie métabolisable (Kcal/Kg)	2890	2912	2923	3119	2840	2920	3015	3242	2990	3351	3610	3873
Protéine brute (%)	21	20,18	20,02	19,51	20,33	19,21	19,02	18,85	18	17,8	17,1	16,75
Matière grasse (%)	2,8	2,33	3,3	1,87	2,88	2,4	2,15	1,91	3,05	2,52	2,25	1,99
Matière minérale (%)	3	3	3,2	3,3	2,7	2,7	2,8	3	2,9	3	3	3,1
Cellulose brute (%)	2,96	2,69	2,62	2,43	2,91	2,63	2,49	2,51	2,81	2,5	2,35	2,19
Lysine (%)	1,20	1,17	1,15	1,14	1,38	1,35	1,33	1,31	1,22	1,18	1,16	1,14
Méthionine (%)	0,72	0,69	0,68	0,67	0,6	0,58	0,57	0,56	0,57	0,55	0,54	0,52
CMV (Complément Minéralo-Vitaminique), dont la composition est :Calcium : 16.8%, Magnésium : 0.1%, Sodium : 12.8%, Chlore : 20.5%, Vitamine A : 750 000 UI, Vitamine D3 :160 000 UI, Vitamine E : 1280mg/kg, B1 :100mg/Kg, B2 :300 mg/Kg, Pantothénate de calcium : 570 mg/Kg, Niacine : 1750												

mg/Kg, B6 :99 mg/Kg, K3 :190 mg/Kg, Acide folique : 35 mg/Kg, Biotine : 1 mg/Kg, Chlorure de choline : 25000 mg/Kg, Carbonte de fer : 2500 mg/Kg, Cuivre (sulfate) :970 mg/Kg, Zinc (sulfate) : 6080 mg/Kg, Manganèse (oxyde) : 7500 mg/Kg, Iode (iodate) :120 mg/Kg, Sélénium(sélénite) : 25 mg/Kg, et autres additifs ; DL-méthionine :180 g/kg, Antioxydant, Acide citrique, Acide orthophosphorique.

Une température variant entre 36 et 38°C a été maintenue durant les dix premiers jours grâce à des éleveuses à gaz ainsi que l'éclairement (24h/24h), qui a été ensuite réduit à 18 h de durée diurne pour 6 h nocturne. L'eau et l'aliment ont été distribués ad-libitum. Les poulets ont été vaccinés contre la maladie de Newcastle et la bronchite infectieuse au 7ème et 21ème d'élevage et contre la maladie de Gumboro à 14 jours d'âge (vaccin sans rappel). En plus un anti coccidien a été administré dans l'eau de boisson à 17 et 34 jours d'âge pendant deux jours consécutifs.

Les animaux ont été individuellement pesés à 10 ; 20 ; 33 ; 42 et 48 jours d'âge. Pendant le cycle d'élevage, l'aliment a été distribué à volonté après avoir été aspergé par 250ml/kg d'aliment, d'extrait du contenu de rumen et le refus pesé quotidiennement. Le taux de mortalité a été enregistré tous les jours durant la totalité de l'expérimentation.

Au 49 ème jour, 25 poulets pris aléatoirement dans chaque lot ont été sacrifiés. Le poids vif, le poids de la carcasse éviscérée, des pattes, de la tête, des plumes, du gésier, des viscères et du foie ont été déterminés.

2.2. Analyse statistique

La statistique descriptive et l'analyse de variance a un facteur (ANOVA), ont été effectuées avec le logiciel SPSS (version 21, 2012) pour l'analyse du poids vif (PV), du gain de poids quotidien (GMQ), de l'ingéré alimentaire et de l'indice de consommation (IC). L'utilisation du test post Hoc par l'application du test bilatéral de Dunnett, a permet d'estimer la signification ou l'homogénéité entre les différents sous ensembles (test de comparaison entre les moyennes). Les différences ont été considérées comme significatives avec un risque d'erreur de 5%.

3. RESULTATS

Durant l'ensemble de l'expérimentation, on n'a enregistré aucune mortalité. Les poids à 10 jours d'âge sont significativement identique ($p<0,05$) pour les lots 0 % (témoin), 20 % et 30 % de substitution du maïs par les rebuts de dattes, le lot 40 % ayant le plus faible poids (176 g) (Tableau 4).

Tableau 4 : Evolution de la croissance pondérale durant les phases de démarrage, de croissance et de finition en fonction du taux de substitution

	% de substitution				ESM	*p*
	0	20	30	40		
Phase de démarrage						
Poids initial (g)	25	25	25	25		
Poids à 10j (g)	185^{a}	180^{a}	182^{a}	176^{b}	2,60	0,03
GMQ_{1-10} (g/j/sujet)	16^{a}	15^{b}	16^{a}	15^{b}	0,28	0,03
Poids à 20j (g)	552^{a}	525^{b}	556^{a}	552^{a}	8,15	0,04
GMQ_{11-20}(g/j/sujet)	37^{a}	34^{b}	37^{a}	38^{a}	0,80	0,02
GMQ_{1-20} (g/j/sujet)	26	25	27	26	0,42	0,566
Phase de croissance						
Poids à 33 j (g)	1480^{a}	1520^{b}	1537^{b}	1542^{b}	19,83	0,03
GMQ_{21-33} (g/j/sujet)	71^{a}	76^{b}	75^{b}	76^{b}	1,48	0,04
Phase de finition						
Poids à 48j (g)	2607^{a}	2769^{b}	2689^{ab}	2638^{ab}	23,62	0,02
GMQ_{34-48} (g/j/sujet)	75^{b}	83^{a}	77^{b}	73^{b}	1,95	0,001
GMQ_{1-48} (g/j/sujet)	55	58	57	56	0,50	0,500

GMQ : gain moyen quotidien (les indices indiquent la période en jour sur laquelle ce paramètre a été

calculé).
La présence de différentes lettres sur la même ligne indiquent une différence significative entre les régimes alimentaires ($P < 0.05$).

Il se caractérise par un gain moyen quotidien (GMQ) de l'ordre de 15g, valeur identique au lot 20 %. Les lots 0 % et 30 % ayant des GMQ identiques (16 g). A 20 jours, la tendance semble s'inversée avec un poids significativement similaire pour les lots 0 %, 30 % et 40 % d'incorporation des rebuts de dattes, alors que le lot 20 % admet une régression du poids (525 g) qui se traduit par un faible GMQ (34 g) vis à vis des autres lots dont les GMQ sont significativement comparables. Cependant, le GMQ entre le 1er et le 20eme jour est similaire pour l'ensemble des lots ($p>0,05$). Durant la phase croissance, au 33eme jour d'âge, le lot témoin avec un poids de 1480g est le moins représentatif vis à vis des autres lots qui admettent des poids significativement supérieurs et sont proportionnels aux taux d'incorporation des rebuts de dattes. Le même constat est à faire pour les GMQ pour cette période. Durant la phase de finition, le taux de substitution du maïs par les rebuts de dattes a engendré des poids significativement plus important pour les lots expérimentaux par rapport au lot témoin ($p<0,05$), le lot 20 % ayant le poids le plus conséquent avec un GMQ de 83g significativement plus important que celui des autres lots. Le GMQ sur l'ensemble de l'élevage (1 au 48eme jour) est significativement identique pour l'ensemble des lots. L'ingéré alimentaire a été significativement similaire pour les lots 0 % (témoin), 20 % et 40 % durant l'ensemble de l'élevage, le lot 30 % consommant une quantité plus importante (6495 g) (Tableau 5), alors que l'indice de consommation des lots 0 % et 30 % reste identique et que le lot 20 % a développé une valeur la plus basse avec 2,26 ; le lot 40 % montre une valeur intermédiaire (2,38).

Tableau 5 : Evolution de l'ingéré alimentaire et de l'indice de consommation en fonction du taux de substitution

	% de substitution du maïs				ESM	*p*
	0	20	30	40		
Ingéré alimentaire (g)						
De 1 à 10 jours	162^{a}	159^{b}	164^{a}	146^{c}	1,52	0,01
De 11 à 20 jours	766^{a}	779^{b}	802^{c}	731^{d}	6,82	0,001
De 21 à 33 jours	1850^{a}	1811^{a}	1830^{a}	1928^{b}	10,24	0,03
De 34 à 48 jours	3497^{a}	3468^{a}	3699^{b}	3433^{a}	19,56	0,01
De 1 au 48 jours	6275^{a}	6217^{a}	6495^{b}	6238^{a}	53,8	0,02
Indice de consommation (g/g)						
De 1 à 10 jours	1,01^{a}	1,02^{a}	1,04^{a}	0,96^{b}	0,035	0,04
De 11 à 20 jours	2,08^{a}	2,26^{b}	2,14^{c}	1,94^{d}	0,566	0,007
De 21 à 33 jours	1,99^{a}	1,81^{b}	1,86^{b}	1,94^{a}	0,992	0,03
De 34 à 48 jours	3,09^{a}	2,7^{b}	3,21^{c}	3,13^{c}	0,127	0,04
De 1 au 48 jours	2,43^{a}	2,26^{b}	2,43^{a}	2,38^{ab}	0,32	0,01

La présence de différentes lettres sur la même ligne indiquent une différence significative entre les régimes alimentaires (P < 0.05).

Durant la phase démarrage, l'ingéré alimentaire évolue en dent de scie par rapport aux taux d'incorporation des rebuts de dattes dans les régimes alimentaires, le lot 40 % ayant un ingéré alimentaire significativement moins important (731 g), la même constatation est à faire pour l'indice de consommation (IC). En phase croissance, les lots 0 ; 20 et 30 % se caractérisent par un ingéré alimentaire identique mais au deçà de celui du lot 40 % (1928 g), alors que l'IC du lot 0 % reste similaire à celui du lot 40 %. En phase finition, le lot 30 % reste le plus expressif (3699 g) et les lots 0 ; 20 et 30 % ont des ingérés significativement similaires.
Les paramètres d'abattage restent similaires quelque soit le taux d'incorporation des rebuts de dattes dans les régimes alimentaires, exception faite pour le poids du foie qui reste moins important (<

50g) pour les lots expérimentaux et significativement diffèrent de celui du lot témoin (65 g) (Tableau 6).

Tableau 6 : Evolution des paramètres d'abattage en fonction du taux de substitution

	% de substitution du maïs				ESM	*p*
	0	20	30	40		
Paramètres						
Poids vif (g)	2793,5	2836,5	2921	2761,5	93,9	0,631
Poids carcasse éviscérée(g)	1979,5	2077,6	2130,8	1974,7	80,17	0,522
Poids des pattes(g)	105,5	105,5	107,5	108,5	5,54	0,989
Poids de la tête(g)	70,5	63,5	72,0	74,5	4,91	0,402
Poids des plumes(g)	112,0	99,5	100,5	100,5	10,1	0,608
Poids du gésier(g)	64,0	72,2	77,4	70,6	3,92	0,093
Poids des viscères(g)	431,0	386,9	408,2	401,8	17,51	0,299
Poids du foie(g)	65,0[a]	46,2[b]	50,8[b]	48,2[b]	3,30	0,00

La présence de différentes lettres sur la même ligne indiquent une différence significative entre les régimes alimentaires ($p < 0.05$).

- Aspect économique

Le coût d'alimentation (CA)

Il est défini par la formule suivante:

CA / phase en DZD = la quantité d'aliment consommé par sujet et par phase × le prix unitaire de cet aliment

Il ressort que les régimes expérimentaux influaient positivement sur le CA par l'amélioration des performances de croissance (poids vif final).

Le coût de production (CP)

En se référant aux résultats obtenus par Kaci, (2014), qui signale que la part de l'alimentation représente 60% du coût total de production, l'estimation des couts pour les différents lots, sont retracés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Indicateurs économiques selon les taux de substitution du maïs par les rebuts de dattes.

	% de Substitution											
	0			20			30			40		
Phase d'élevage	Prix unitaire DZD/kg	Quantité ingérée (g)	Prix total (DZD)	Prix unitaire DZD/kg	Quantité ingérée (g)	Prix total (DZD)	Prix unitaire DZD/kg	Quantité ingérée (g)	Prix total (DZD)	Prix unitaire DZD/kg	Quantité ingérée (g)	Prix total (DZD)
1-20j	51,68	928	47,95	52,73	938	49,45	51,65	966	49,89	50,77	877	44,52
21-33j	49,25	1850	91,11	50,02	1811	90,58	49,09	1830	89,83	48,17	1928	92,87
34-48j	47,04	3497	164,49	47,63	3468	165,18	46,62	3699	172,44	45,61	3433	156,57
Cout alimentaire total	303,57			305,22			312,17			293,97		
Poids vif final (g)	2 607			2 769			2 689			2 638		
Cout alimentaire/ kg de poids vif (DZD) (€)*	116,44 (0,862 €)			110,23 (0,816 €)			116,09 (0,859 €)			111,43 (0,825 €)		
Cout de production/Kg de poids vif en DZD (€)*	194,07 (1,437 €)			183,71 (1,36 €)			193,48 (1,433 €)			185,73 (1,375 €)		

Cout total/Kg de poids vif (DZD)	310,51	293,94	309,57	297,16
Marge/kg de poids vif (DZD)		+16,57	+0,94	+13,35

La marge par kilogramme de poids vif des lots expérimentaux reste positive par rapport au lot témoin avec une expression la plus marquée pour le lot 20 %.

4. DISCUSSION

A travers cette étude, il est intéressant de constater que quoique le poids initial aie été faible (25g) et se justifiant par l'utilisation d'une souche locale, rustique et répandu dans la région (Mahammi et al., 2014), il en ressort que le poids à 10 jours et le GMQ (16 g) restent comparables à ceux de la souche Isa Vedette et que la substitution partielle jusqu'à 40% du maïs par les rebuts de dattes induit un effet positif sur le poids vif et le GMQ avec une prédominance du taux de substitution de 20% (2769 g), le lot 40 % ayant un poids de 2638 g supérieur à celui du témoin (2607 g) et ceci avec l'addition d'extrait de contenu du rumen à raison de 250 ml/kg d'aliment.

Plusieurs auteurs ont signalés sur poulets de chair, l'effet régressif du taux d'incorporation de rebuts de dattes dans l'alimentation à des taux supérieur à 20 %, entrainant une diminution du poids vif et du GMQ (Méradi et al., 2016; Meradi et Alloui 2009; Masoudi et al., 2011). L'addition du pro biotique (extrait du contenu de rumen) a permis une valorisation des poids vif et du gain moyen quotidien jusqu'à concurrence d'un taux d'incorporation de 40 % comme le signale Kuçukersan et al. (2002). Globalement, les différents taux d'incorporation des rebuts de dattes dans les régimes alimentaires (0 à 40 %,) n'induisent pas de variation de l'ingéré alimentaire (Kuçukersan et al, 2002) mais une baisse significatif de l'indice de consummation du lot 40 % par rapport au lot témoin, constat qui est contraire à celui rapporté par ces mêmes auteurs et El-Deek et al. (2010). Les variations des caractéristiques des carcasses sont non significatifs comme signalé par Hmeidan et al. (1993) and Al-Homidan (2003) cependant Al Bowait et Al Sultan (2006) et Masoudi et al., (2011) signalent une régression de ces paramètres pour des taux d'incorporation progressif de rebuts de dattes dans l'alimentation.

5. CONCLUSION

L'incorporation des rebuts de dattes à raison de 40 % en substitution au maïs avec addition de 250ml par kilogramme d'aliment d'extrait de contenu du rumen, permet d'améliorer le poids vif, le gain moyen quotidien en induisant un ingéré alimentaire et un indice de consommation moins important. Les caractéristiques des carcasses restant constant.

REFERENCES

- Anjum, M.I., Khan, A.G., Azim, A. and Afzal, M. 2005 Effect of dietary supplementation of multi-strain probiotic on broiler growth performance. *Pak. Vet. J.*, 25: 25-29.

Al-Homidan AH 2003. Date waste, whole dates and date pits as ingredients in broiler diets. Egyptian Poultry Science Journal 23, 15–35

- Al-Bowait M, Al-Sultan S I 2006 Aspects of the serum biochemistry, carcass quality and organoleptic characteristics of broilers fed alkali-treated date pits. International Journal of Poultry Science, 5 (3): 284-288. http://scialert.net/qredirect.php?doi=ijps.2006.284.288&linkid=pdf
- Arbouche F et Arbouche H S 2008 Pédicelles de dattes du sud-est Algérien : effets du traitement à l'urée et du mode de stockage sur leur composition chimique et leur digestibilité. Livestock Research for Rural Development. Volume 20. Article #97. http://www.lrrd.org/lrrd20/6/arbo20097.htm

- Arbouche F 2012 Tables de composition et de valeur nutritive des matières premières produites en Algérie pour l'alimentation des ruminants. Institut National Recherche Agronomique Algérie Editeurs, Alger, 46 p.
- Arbouche F, Arbouche R., Arbouche Y., Arbouche H.S, Mennani A 2018 Tables de composition et de valeur nutritive des matières premières et sous produits agro-industriels de l'Afrique du Nord pour l'alimentation des ruminants Institut National Recherche Agronomique Algérie Editeurs, Alger, 89 p. (à paraître)
- Belhouadjeb F.A. et Chehat F, 2013 : Le coût de production et la compétitivité de la viande ovine Algérienne : cas de l'agneau de Djelfa. Les cahiers du CREAD n°104. 91-110.
- Chehma A., Longo H.F., Siboukeur A., 2000. Estimation du tonnage et valeur alimentaire des sous-produits du palmier dattier chez les ovins. Revue Rech. agron. Inraa, 7, 7-15.
- Chehma A, Benabdelhafid M et Hanani A 2009: Essais d'amélioration de la valeur azotée des sous-produits du palmier dattier (pédicelles de dattes et palmes sèches) par traitement à l'ammoniac et à l'urée. *Livestock Research for Rural Development. Volume 21, Article #77.* Retrieved March 19, 2017, from http://www.lrrd.org/lrrd21/5/cheh21077.htm
- Chehma A. et Longo H. F., 2004 : Bilan azoté et gain de poids chez le dromadaire et le mouton, alimentés à base de sous-produits du palmier dattier, de la paille d'orge et du drinn Aristidapungens. Cahiers Agricultures. Volume 13, Numéro 2, 221-6.
- **El-Deek A A, Attia Y A and Al-Harthi M A 2010** Including whole inedible date in the grower-finisher broiler diets and the impact on productive performance, nutrient digestibility and meat quality. Animal 4, 1647-1652. Retrieved February 14, 2018, from https://doi.org/10.1017/S1751731110000820
- Fernandes, J.I.M., Bortoluzzi, C., Junior, A.M.B., Rorig, A., Perini, R. and De Cristo, A.B. 2015 Effect of different enzymatic supplements in diets of broilers raised at high stocking density. J. Vet. Med. Res., 2: 1-4.
- Harun-Ar-Rashid, M., Ahmad, N., Amin, M.R. and Mollah, M.L. 2015 Effects of selected vitamins and min- erals on growth rate and hematological parameters in broilers. *Asian J. Med. Biol. Res.*, 1: 487-494.
- Hmeidan MCY, Al-Yousef NH and Al-Turki I 1993. Dates as an energy source in broiler rations. In Proceedings of the 3rd symposium of date palms, King Faisal University, pp. 401–413. Al-Hassa, Saudi Arabia
- Islam, M.S., Bhuiyan, M.E.R., Begum, M.I.A., Miah, M.A. and Myenuddin, M. 2004 Effect of vitamin-mineral pre- mix supplementation on body weight and certain haema- to-biochemical values in broiler chickens. Bangl. J. Vet. Med., 2: 45-48.
- Kuçukersan K., Tuncer S.D., Sanli Y., Midilli M., Goncuoglu E., Kuçukersan S. and Tan H., 2002 The effects of dietary stabilized rumen extract (SRE) and virginiamycine on performance and carcass yield of broilers. Revue Méd. Vét., 153, 11, 723-726.
- Mahammi F Z, Gaouar SBS, Tabet-Aoul N, Tixier-Boichard M, Saidi-Mehtar N. 2014 Caractéristiques morpho-biométriques et systèmes d'élevage des poules locales en Algérie occidentale (Oranie). *Cahiers Agricultures*, EDP Sciences, 23 (6), 382 - 392. ⟨10.1684/agr.2014.0722⟩. ⟨hal-01194077⟩
- Meradi S, Arbouche F et Arbouche R 2016: Valorisation de l'engraissement de la race ovine Hamra par les sous-produits de la datte. *Livestock Research for Rural Development. Volume 28, Article #70.* Retrieved March 1, 2017, from http://www.lrrd.org/lrrd28/4/arbo28070.html
- Meradi S et Alloui N 2009 Effets de la substitution partielle du maïs par les rebuts de dattes sur les performances de production du poulet du chair. Huitième Journées de la Recherche Avicole, St Malo, 25 et 26 mars 2009
- Masoudi A, Chaji M, Bojarpour M and Mirzadeh Kh 2011 Effects of different levels of date pits on performance, carcass characteristics and blood parameters of broiler chickens. Journal of Applied Animal Research, 39: 399-405
- Murakami, A.E., Fernandes, J.I.M., Hernandes, L. and Santos, T.C. 2012 Effects of starter diet supplementation with arginine on broiler production performance and on small intestine morphometry. *Pesq. Vet. Bras.*, 32: 259-266.

- Rahman, M.A., Parvin, M.S., Sarker, R.R. and Islam, M.T. 201) Effects of growth promoter and multivitamin-min- eral premix supplementation on body weight gain in broiler chickens. *J. Bangl. Agric. Univ.*, 10: 245-248.
- SanlI Y ., Filazi A . and Yarsan E . 1998 Et-tipi piliçlerde canllaglrllk üzerine stabilize rumen ekstraktlnln etkisi. Vet. Hek. Dern Derg. 69 (1-2), 57-60.
- Tuncer S.D., Anli Y., Küçukersan K., Filazi A., Ergani O., Çorlu M. and Imece E. 1999 Stabilize rumen ekstraktlnln broyler rasyonlarlnda kullanllmasl. VIV. Poultry Yutav 99 Uluslar arasl Tavukçuluk Konferansl. 3-6 Haziran, Istanbul.
- Zebrowska T., Ziolecka A. and Ziolecki A. 1989 The effect of stabilized rumen extract on growth and development of calves. 3. Digestion in small intestine. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr., , 61, 245-254.
- Ziolecka A., Ostricka Z. and Ziolecki A. 1984 The effect of stabilized rumen extract on growth and development of calves. 1. Liveweight gain and efficiency of feed utilization. Zeitschr. Tierphysiol. Futtermittelkunde, , 51, 13-20.

Production laitière et croissance des agneaux de la race Ouled Djellal mené en région semi-aride

Yasmine Arbouche[1], Rafik Arbouche[2], Achour Mennani[1], Fodil Arbouche[2], Halima Saâdia Arbouche[2]

[1]Department of Agronomy, Faculty of Science of Nature and Life, University of Setif, Algeria ;
[2]Department of Agronomy, Faculty of Science of Nature and Life, University of Ghardaia, Algeria;
Emails : Yasmine Arbouche : yas.arbouche@yahoo.fr
Rafik Arbouche: rafik_arbouche@yahoo.fr, Mennani Achour: achour_mennani@yahoo.fr, Fodil Arbouche: arbouchefodil@yahoo.fr, HSA: arbouchehs@yahoo.fr

RESUME

En Algérie, le cheptel ovin représente la plus grande ressource animale. La race la plus réputé est la race Ouled Djellal, ce travail à pour but la détermination de la quantité de lait produite par cette espèce et d'étudier les paramètres influençant la croissance des agneaux en milieu aride. 169 brebis d'âge différents, ont été alloties en 69 destinés à la reproduction naturelle et 100 menées en reproduction contrôlée à travers l'utilisation des éponges vaginales. La quantité produite a été estimée globalement à 1,36 kg durant le premier mois de lactation Les poids des agneaux : sont en moyenne de 3,80 à la naissance, 8,45 kg à 30 jours, 12,87 à 2 mois d'âge, 16, 13 kg à 3 mois d'âge et 18,68 kg à 4 mois d'âge. Les paramètres influençant la croissance des agneaux jusqu'à 120 jours d'âge sont : le mode de lutte a une influence très significatif ($p<0,001$) sur poids à 4mois ; le mode de naissance avec des résultats très significatifs ($p<0,001$) sur les poids à la naissance, 60 jours et 120 jours ; le mois de naissance qui influence hautement significativement ($p<0,0001$) sur le poids à la naissance et à 60 jours, le sexe qui influe sur le poids à 30 jours et la production laitière durant les dix premiers jours est significative sur le poids d'un mois d'âge ($p<0,05$). Les facteurs liés à la mère et les facteurs environnementaux influencent la croissance des agneaux de la naissance jusqu'au sevrage (120 jours).

Mots-clés : race Ouled djellal, production laitière, croissance, semi-aride.

SAMMARY

In Algeria, the sheep herd represents the largest animal resource. The most famous breed is the Ouled Djellal breed, this work aims to determine the quantity of milk produced by this species and to study the parameters influencing the growth of lambs in an arid environment. 169 ewes of different ages, were allotted in 69 for natural reproduction and 100 conducted in controlled reproduction through the use of vaginal sponges. The quantity produced was estimated at 1.36 kg overall during the first month of lactation. The average weight of lambs is 3.80 at birth, 8.45 kg at 30 days, 12.87 at 2 months of age, 16.13 kg at 3 months of age and 18.68 kg at birth. 4 months of age. The parameters influencing the growth of lambs up to 120 days of age are: the control mode has a very significant influence ($p <0.001$) on weight at 4months; the mode of birth with very significant results ($p <0.001$) on birth weights, 60 days and 120 days; month of birth that has a significant ($p <0.0001$) influence on birth weight and 60 days, , sex that affects weight at 30 days and milk production during the first ten days is significant on the weight of one month of age ($p <0.05$). Maternal factors and environmental factors influence lamb growth from birth to weaning (120 days).

Key words: Ouled djellal breed, dairy production, growth, semi-arid.

1. INTRODUCTION

En Algérie l'élevage ovin, malgré son importance économique et sociale est mal conduit, tant en organisation technique, qu'en fonctionnement de ses systèmes de production. L'amélioration des productivités numérique et pondérale d'un élevage ovin qui vont de pair avec la production laitière et la croissance des agneaux par le biais de la maîtrise de la reproduction. Elle permet de choisir la période de mise-bas, de diminuer les périodes improductives, d'optimiser la taille de la portée et d'accélérer le progrès génétique (Chemineau et al, 1996). Les méthodes de contrôle et de maîtrise de

la reproduction se répartissent en deux catégories, l'une de nature hormonale et l'autre par l'effet bélier.
L'utilisation des hormones a pour objectif de synchroniser les chaleurs en saison sexuelle et/ou de provoquer une activité sexuelle à contre saison (anoestrus saisonnier) de façon à permettre une reproduction tout au long de l'année (Cognié, 1988).
Plusieurs motivations incitent les éleveurs à grouper les chaleurs et à les déclencher hors saison pour : augmenter la productivité du troupeau, organiser et planifier la reproduction et rattraper la fécondation de certaines brebis non fécondées ou qui ont perdu accidentellement leurs portées. A travers la caractérisation de la production laitière et de la croissance des agneaux ainsi que l'étude de l'ensemble des facteurs les influençant, le mode de lutte agit- il seul ou de concert avec d'autres facteurs et quel impact a-t-il sur les variables étudiées. C'est le but du présent travail.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Milieu expérimental

La ferme privée se situe à 45 km du chef-lieu de wilaya de Sétif, au Nord-Est algérien, et se caractérisée par un climat semi-aride.

2.2. Matériel animal

L'expérimentation s'est effectuée sur un troupeau de 169 brebis, de race ovine Ouled Djellal dont le mode de conduite est en semi-intensif avec pâturage durant toute la journée et une complément alimentaire à base d'orge à raison de 1Kg/ovin adulte et de produit semi-fini (issues de meunerie). L'eau étant mise à disposition en ad libitum. Ce troupeau est subdivisé en deux lots :
Le premier lot a était mené en reproduction contrôlée (Synchronisation des chaleurs) avec monte naturelle. Il est constitué de 100 femelles, réparties en 80 brebis allaitantes, 20 non allaitantes, à âge hétérogène variant entre 18 mois et 6 ans avec un état corporel fluctuant entre 1,25 et 4,25.
Le second lot, mené en lutte naturelle sans synchronisation, comprenant 68 femelles dont 16 brebis allaitantes et 52 non allaitantes. L'âge compris entre 18 mois et 6 ans et l'état corporel entre 1,25 à 4,25.
Pour les mâles, 15 béliers sélectionnés en provenance du Centre d'Insémination Artificielle de la région d'Ouled Djellal (Wilaya de Biskra) ont été ramenés et mis à l'écart de la vue des brebis pour le maintien de l'effet bélier.

2.2.1. Equipement et produits d'induction et de synchronisation des chaleurs

Eponges vaginales de couleur blanche imprégnées de 60 mg de FGA (Fluoro GestoneAcetate).
Applicateur des éponges vaginales (Tubes et poussoir).
Seringues jetables
Spéculum et pince
Gants chirurgicaux
Compresses
Crème lubrifiante (Vaseline)
Antiseptique (Permanganate de potassium)
Désinfectant (Alcool chirurgical)
PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) (Folligon 1000 UI :lyophylisat injectable + solvant)

2.2.2. Equipement de détection des chaleurs

Tabliers
Harnais thoraciques marqueurs utilisés pour contrôler les accouplements (de différentes couleurs).

2.2.3. Equipement de pesée

Une balance mobile avec harnais de 0 à 100 kg.

2.3. Méthodes

Elles se basent sur l'évaluation de plusieurs facteurs inhérents au milieu ou intrinsèques au troupeau sur la production laitière et la croissance des agneaux :

- Facteurs externes : Ils sont communs aux deux lots : Alimentation, milieu (climat, température, latitude et saison), logement, hygiène.
- Facteurs internes : Ils sont liés au troupeau : mode de lutte, âge, parité, saison de lutte, mois de lutte, mois de naissance, saison de naissance, état corporel, état physiologique, mode de naissance, poids (à la naissance, à 60j et 90j), production laitière à 10j.

2.3.1. Induction et synchronisation des chaleurs

2.3.1.1. Pose des éponges

Cette opération est précédée au préalable par une préparation de tous les produits et équipements nécessaires à son bon déroulement.

Les éponges vaginales imprégnées de 60 mg de FGA (Acétate d'uorogestone), ont été posées pour chaque femelle pour une durée de 14 jours selon le protocole suivant :

- Avant la pose de l'éponge, l'applicateur est nettoyé avec de l'eau contenant un antiseptique (Permanganate de potassium), ainsi que l'extérieur du vagin à l'aide d'une compresse imbibée de ce désinfectant. Cette opération est obligatoire pour chaque sujet.
- Lubrification du tube avec de la vaseline pour faciliter sa pénétration dans le vagin et en évitant de blesser la paroi très fragile.
- Insérer le tube doucement dans le conduit vaginal en soudant le cervix avec le poussoir qui est maintenu à l'intérieur du tube.
- Laisser le tube sur place et retirer le poussoir.
- Placer l'éponge à l'intérieur de la section du tube.
- Pousser l'éponge en utilisant le poussoir jusqu'au cervix.
- Tirer le tube de quelques centimètres en laissant en place l'éponge jusqu'à l'expulsion du poussoir.
- Lâcher les fils de l'éponge et tirer l'ensemble de l'applicateur. Les fils resteront suspendus à l'extérieur du vagin, tirer les en bas doucement jusqu'ils se joignent.
- Marquer l'animal avant de le lâcher.

2.3.1.2. Retrait des éponges et injection de PMSG

Le retrait des éponges est suivi d'une injection de 500 UI de PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) par femelle de chaque lot. L'injection se fait par voie intramusculaire. En n'oubliant pas de changer l'aiguille de la seringue à chaque injection afin d'éviter toute contamination.

Pour l'efficacité du traitement, les femelles sont laissées au repos après cette opération pour éviter tout type de stress.

2.3.1.3. Conduite de la lutte

Elle a été menée selon le schéma suivant :

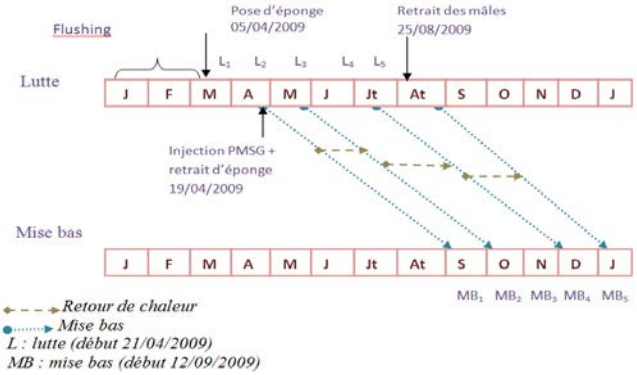


Photo 1 : conduite de la lutte

Pour le lot des 100 femelles synchronisées, une aire au sein de la bergerie a été dégagée et allouée dans une proportion de 1 mâle pour 8 à 9 femelles. L'accouplement a duré 3jours. Pour le lot témoin des 69 femelles (lutte naturelle), 3 mâles ont été utilisés.
La lutte a débuté le mois d'avril et une évaluation de l'état corporel a été réalisée à ce moment. Pour le lot synchronisé, les mâles ont été réintroduits après 17 jours, pour détecter et lutter les femelles ayant manifesté un retour de chaleur en utilisant des harnais marqueurs.
Un comptage des brebis luttées a été réalisé à l'aide d'enregistrement des marques trouvées au bas du dos des femelles durant toute la période de lutte. Une évaluation de l'état corporel a été effectuée.

2.3.1.4. Suivi de la gestation

Le suivi des brebis a été accompli quotidiennement pour éviter tout stress. Tout avortement, mortalité de brebis gestantes ou malades ont fait l'objet d'enregistrement sur fiche de suivi.

2.3.1.5. Déroulement de l'agnelage

Les agnelages pour le lot des femelles synchronisées ont débuté le début septembre et pour le troupeau témoin fin septembre.
Une surveillance permanente a été assurée lors de la mise-bas, et des soins particuliers ont été apportés au moment et après l'agnelage : Aide aux femelles présentant des difficultés (mauvaise position du fœtus, hémorragie, etc.). Aide au jeune après son expulsion (dégagement des naseaux, soulèvement par les pattes postérieures, désinfection du cordon ombilical "Cecaget ", Injection de multivitamines, tétée du colostrum. Aussi l'observation de l'instinct maternel.
Des informations ont été enregistrées selon le canevas suivant :

- Date de la mise-bas.
- L'âge de la mère.
- Le sexe du nouveau-né.
- Le mode de naissance du nouveau-né.
- La date de mortalité.
- Identification par une boucle d'oreille.

2.3.1.6. Etat corporel des brebis

Pour les mères l'opération du contrôle de la condition corporelle a été évaluée :

- Au début de l'étude (au moment du dépôt d'éponges).
- Au moment de la lutte.
- A la mise-bas.
- Un mois après la mise-bas.
- Deux mois après la mise-bas.
- Trois mois après la mise-bas.
- Quatre mois après la mise-bas.

2.3.1.7 Production laitière de la mise-bas à 30 jours

Elle a été calculée sur la base de l'équation proposée par Torres-Hernandez et Hohenboken (1980) :

$$PL/j = 0,92 + 3,03\ GMQ\ (kg)$$

2.3.1.8. Croissance des agneaux

La pesée des agneaux a été effectuée par regroupement du premier jour de naissance jusqu'à l'âge de 4 mois (correspondant à la période du sevrage) au moyen d'une balance.
Les paramètres de la croissance des agneaux étudiés ont été :

- Poids (0 à 10 jours) et GMQ (0/10).
- Poids à 30 jours et GMQ (10/30).
- Poids à 60 jours et GMQ (30/60).
- Poids à 90 jours et GMQ (60/90).

- Poids à 120 jours et GMQ (90/120) et GMQ (0/120).

2.3.1.9. Analyse statistique

La statistique descriptive et l'analyse de variance du model linaire général univarié (ANOVA), ont été effectuées avec le logiciel SPSW (version 18, 2008). Le model linaire général a été utilisé pour tester les effets des facteurs sur les variables, le test post Hoc par l'application du test S.N.K (Student-Newman-Keules) pour estimer la signification ou l'homogénéité entre les différentes sous-ensembles (test de comparaison entre les moyennes). Les fréquences de chaque variable quantitative ont été représentées graphiquement en utilisant le logiciel Excel (2003).

3. RESULTATS ET DISCUSSION

Les moyennes globales des poids, de la production laitière et des gains moyens journaliers sont recensées dans les tableaux 1, 2 et 3.

3.1. Moyennes globales des poids

Le tableau 1 résume la moyenne globale des poids des agneaux Ouled Djellal.

Table 1 : Moyennes globales des poids des agneaux.

	P à la naissance	P à 30 j	P 60 j	P 90 j	P 120 j
μ	3,86	$8,45^a$	12,87	16,13	$8,68^a$
e.s	0,13	0,194	0,475	0,737	0,559
E.T	0,864	2,285	3,257	3,961	4,373

µ : moyenne globale, s : erreur standard, ET : écart type, P : poids (kg), j : jours.

Les moyennes globales obtenues lors de notre expérience sont de 3,86 kg à la naissance, 8,45 kg à 30 jours d'âge, 12,87 kg à 60 jours, 16,13 kg à 90 jours et 18,68 kg à 120 jours (tab 1). Bouafia et Lamara (2009), ont enregistré des moyennes de 3,3kg à la naissance, 8,17kg à 30 jours, 12,47kg à 60 jours, 16,35kg à 90 jours et 20,11kg à 120 jours, sur le même site en 2009.

Les différences de poids à la naissance, à 30 jours et à 60 jours sont de 0,56kg, 0,28kg et 0,4kg, en faveur de l'année en cours, mais pour les poids de 90 jours et 120 jours (différence 0,22kg et 1,43kg respectivement) sont inférieurs à ceux de 2009. Ces différences sont à imputer à l'alimentation. Plusieurs auteurs ayant étudiés ces paramètres, avancent des résultats qui varient en fonction du milieu d'étude. Merghem (2008), a obtenu des moyennes de 3,51kg à la naissance, 9,24 kg à 30 jours, 12,91kg à 60 jours, 16,1kg à 90 jours et 20,15 kg à 120 jours, Dekhili (2004), a enregistré des résultats de 3,73kg à la naissance, 9,7kg à 30 jours, 13kg à 60 jours et 17,8 kg à 90 jours et Laib et Yahi (2008), ont constaté des poids de 3,93kg à la naissance, 8,38kg à 30 jours, 12,6kg à 60 jours, 16,11 à 90 jours et 19,59kg à 120 jours.

La race Ouled Djellal est subdivisée en trois sous-races, notre expérimentation a porté sur la Hodna, ce qui n'est pas précité chez les autres auteurs. Cependant, ITELV (2001), a rapporté que le standard de la race Ouled Djellal est de 3,5kg à la naissance, 12kg à 30 jours et 29 kg à 120 jours.

3.2. La production laitière

Les moyennes globales de la production laitière sont enregistrées dans le tableau 2.

Tableau 2: Moyennes globales de la production laitière (kg) sur plusieurs périodes.

PL	0 - 10 j	10 - 30 j	0 - 30 j
μ	1,58	1,25	1,36
e.s	1,29	1,21	1,268
E.T	0,87	0,78	0,57

La quantité de lait apportée par la mère durant le premier mois de lactation est de 1,36 kg/j. Selon

l'ITELV (2001), la quantité moyenne pour la race Ouled Djellal est de 3 à 1,6kg lors du premier mois de lactation. On peut constater que la production laitière de la brebis se divise en deux phases (Fig. 1).

La première phase ascendante, qui caractérise la période allant de la mise bas à 10 jours, atteint son optimal à 1,58 kg, elle englobe la production de colostrum qui a une haute valeur biologique et exerce un rôle important de protection contre les maladies, grâce aux immuno-globulines qu'il renferme. Ces propriétés laxatives lui permettent de nettoyer le tube digestif de tout ce qui a été accumulé durant la période fœtale. Il s'agit d'un aliment transhumant entre le sang de la mère (nourriture fœtale) et le lait, avec une digestibilité de 0,95 (Belaid, 1986).

La deuxième phase descendante (10 à 30 jours), est caractéristique de la persistance de la production et est fonction du niveau alimentaire assurée à la brebis. Les stimuli de la tétée tendent à maintenir le niveau de lactation, qui devient plus intense dans le cas des naissances gémellaires. La production laitière chute de 1,58kg à 1,25kg à 30 jours.

Selon Boukhliq (2002b), cette production laitière atteint son maximum au cours de la deuxième ou troisième lactation, puis diminue régulièrement.

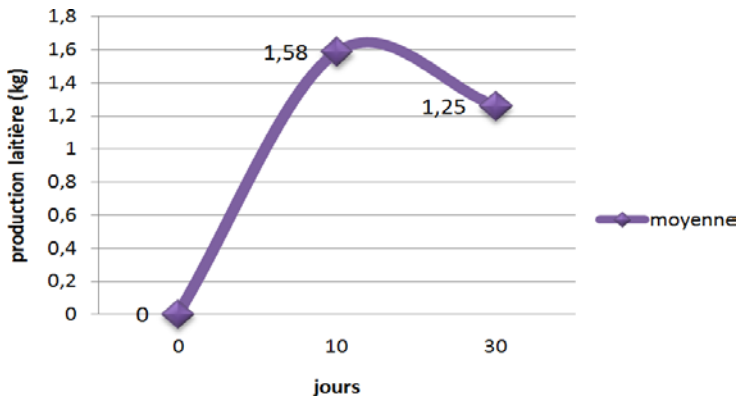


Figure 1: *Production laitière des brebis.*

3.3. Les moyennes globales des vitesses de croissance

Les moyennes globales sont enregistrées dans le tableau 3. Le gain de poids le plus important est enregistré pour la période allant de 0-30 jours. Belaid (1986) et Jarrige (1988) ont signalé que c'est au cours de cette phase que l'alimentation de l'agneau est exclusivement à base de lait maternel. A partir de cette période, comme l'a déterminé Soltner (1993), le GMQ diminue progressivement, et est fonction de la qualité des aliments de substitution. Bouafia et Lamara (2009), pour le même site, en 2009, ont enregistr´e des vitesses de croissance identiques de 0 `a 30 jours (159,6g/j) mais entre les périodes de 30 à 120 jours, plus importantes (140,26 g/j, 129,92g/j, 126,05 g/j, 235,02 g/j pour les périodes 30-60 ; 60-90 ; 90-120 et 0-90, respectivement). Cette différence est `a attribuer au facteur alimentaire.

Les gains moyens quotidiens des agneaux Ouled Djellal ont fait l'objet de plusieurs études. Merghem (2008) a enregistré des vitesses de croissance de 158,8 g/j (0-30) ; 125 g/j (30-60) ; 105 g/j (60-90) ; 138 g/j (90-120) et 134g/j (0-90), des GMQ de 168,3 g/j (0-30); 120,23 g/j (30-60); 122,83g/j (60-90); 91,49g/j (90-120) et 142,2g/j (0-90). Chikhi et Boujenane (2003, 2004), ont enregistré des résultats pour les GMQ de la naissance à 30 jours de 224 g/j et 213 g/j, respectivement. L'ITELV (2001) a mentionné que les GMQ du standard de la race Ouled Djellal étaient de 233 à 300 g/j entre 0-30 j et 120 à 140 g/j entre 0-120 j.

Tableau 3 : Moyennes globales des GMQ des agneaux sur différentes périodes.

GMQ	(0-30j)	(30-60j)	(60-90j)	(90-120j)	(0-90j)	(0-120j)
μ	160,22	129,02	133,13	98,04	132,75	119,47
e.s	14,62	10,5	11,38	17,31	12,56	11,38
E.T	61,284	62,29	62,91	104,19	51,09	39,98

μ : moyenne globale, e.s : erreur standard, ET : écart type, j: jours, GMQ: gain moyen journalier (g /j).

3.4. Les facteurs influençant la croissance des agneaux

3.4.1. Facteurs influençant les poids des agneaux

L'analyse de variance des facteurs influençant les poids à la naissance, 30 jours, 60 jours, 90 jours et 120 jours, est recensée dans le tableau 4.

Tableau 4: L'analyse de variation des facteurs influençant les poids (kg) des agneaux à différents âges.

		P N	P 30 jours	P 60 jours	P 90 jours	P 120 jours
Mode de lutte	ddl	2	2	2	2	2
		n.s (p>0,05)	n.s (p<0,05)	n.s (p<0,05)	n.s (p<0,05)	** (p<0,01)
Mode de naissance	ddl	1	1	1	1	1
		*** (p<0,001)	*(p<0,05)	**(p<0,01)	n.s (p<0,05)	*** (p<0,001)
Mois de naissance	ddl	3	/	3	3	/
		*** (p<0,001)	/	*(p<0,05)	n.s (p<0,05)	/
Saison de naissance	ddl	/	/	1	/	1
		/	/	n.s (p<0,05)	/	n.s (p<0,05)
Age	ddl	5	5	5	5	5
		n.s (p<0,05)	n.s (p<0,05)	n.s (p<0,05)	n.s (p<0,05)	n.s (p<0,05)
Sexe	ddl	1	1	1	1	1
		n.s (p<0,05)	** (p<0,01)	n.s (p<0,05)	n.s (p<0,05)	n.s (p<0,05)
PL 10 jours	ddl	/	31	28	/	/
		/	*(p<0,05)	n.s (p<0,05)	/	/
P 60 jours	ddl	/	/	/	68	56
	/	/	/	/	*** p<0,001)	*** (p<0,001)
P 90 jours	ddl	/	/	/	/	48
	/	/	/	/	/	** (p<0,01)
P 60j×P90 jours	ddl	/	/	/	/	15
		/	/	/	/	** (p<0,01)
Mode de lutte× Mode de naissancee	ddl	3	/	/	/	/
		*(p<0,05)	/	/	/	/
Mois de naissance × P 60 jours.	ddl	/	/	/	32	/
		/	/	/	*** (p<0,001)	/

n.s : non significatif, * : significatif, ** : tr`es significatif, *** : hautement significatif, ECMB : état corporel au moment de la mise bas, P : poids (kg), PL : production laitière (kg), PN : poids a` la naissance (kg), ddl : degré de liberté.

3.4.1.1. Le mode de lutte

Ce facteur est non significatif (p>0,05) pour la majorité des poids, à l'exception du poids a 120 jours où le mode de lutte a une influence très significative (p<0,01). Les agneaux nés durant la première

lutte (synchronisation) ont des poids à 120 jours de 18,05kg, alors que ceux nés du premier retour en chaleur ont un poids à 120 jours de 21,5kg. Pour le deuxième retour et le lot témoin, le poids est identique (16,5kg) (Fig. 2).

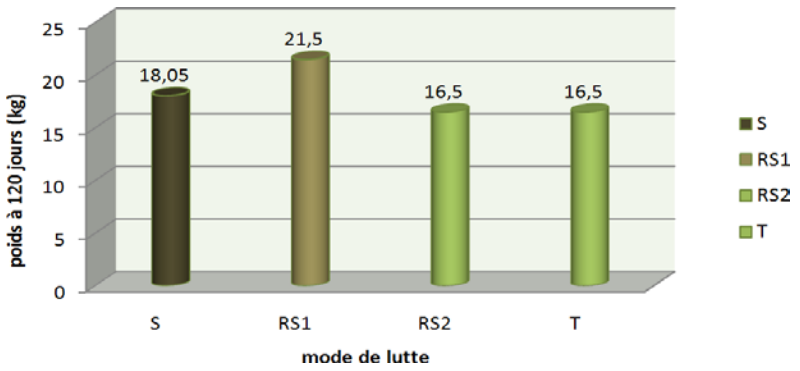


Figure 2 : Poids à 120 jours par rapport au mode de lutte. S : lot synchronisé, RS1 : premier retour après synchronisation des chaleurs, RS2 : deuxième retour après synchronisation, T : lot témoin.

3.4.1.2. *Le mode de naissance*

Ce facteur a une influence significative sur le poids à 30 jours ($p<0,05$), très significative sur celui à 60 jours ($p<0,01$), hautement significative sur les poids à la naissance et à 120 jours ($p<0,001$), mais non significative sur le poids à 90 jours ($p>0,05$).

Les agneaux nés simples sont plus lourds que les agneaux nés doubles (4,38 et 3,36 kg respectivement). De 30 jours à 60 jours d'âge, la tendance s'inverse, les jumelés deviennent plus lourds que les agneaux uniques avec une différence de 1,16 et 2,12 kg, respectivement.

A 90 jours, les poids des agneaux nés simples sont similaires à ceux des agneaux nés doubles (16,43 et 16,19 kg, respectivement), et à 120 jours, les agneaux nés doubles prennent plus de poids que les agneaux simples (21,78 et 17,47 kg, respectivement) (Fig. 3). Ceci s'explique par la croissance compensatrice induite chez les agneaux jumelés.

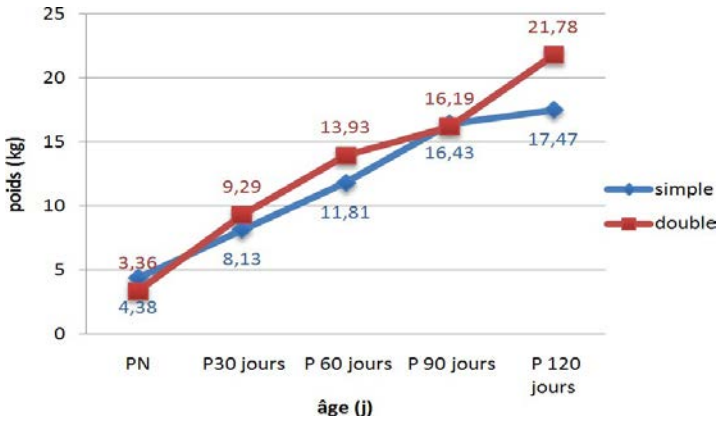


Figure 3 : Poids de la naissance à 120 jours par rapport au mode de naissance.

Maisonneuve et Larose (1993) et Rekik (2007) ont observé un effet hautement significatif ($p<0,001$) du mode de naissance sur la croissance des agneaux de 0 à 120jours. Pour la race D'man Karfel et al. (2005) ont fait la même constatation. Par contre, Chikhi et Boujennane (2004), ont constaté que le mode de naissance n'avait un effet hautement significatif qu'à partir du poids à la naissance jusqu'au poids à 90 jours.

3.4.1.3. Mois et saison de naissance

Le mois de naissance est un facteur hautement significatif ($p<0,001$) sur le poids à la naissance, significatif ($p<0,05$) sur le poids à 60 jours mais non significatif ($p>0,05$) sur les poids à 30 jours, 90 jours et 120 jours.

Les poids à la naissance sont similaires pour les mois de septembre et octobre (3,70kg et 3,71kg respectivement), lesquels sont inférieurs à ceux des mois de décembre et janvier (4,07 et 4,13 kg, respectivement). Le poids à 60 jours pour le mois de janvier (10,47 kg) est inférieur à ceux du mois de septembre, octobre, décembre (12,96, 12,31 et 12,48 kg, respectivement). Pour les poids à 30, 90 et 120 jours, ils ne diffèrent pas pas d'un mois à l'autre (Fig. 4).

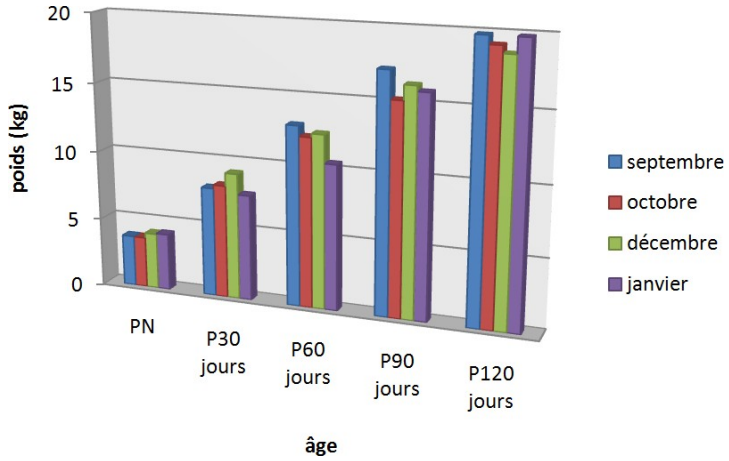


Figure 4 : Poids à différents âges par rapport aux mois de naissances.

La saison de naissance n'a pas une influence significative ($p>0,05$) sur les poids à 60 et 90 jours, ce qui peut s'expliquer par une saison automnale et hivernale sans grand changement climatique. Manoun (2000), Nianogo (1989), Merghem (2008) et Laib et Yahi (2008) ont observé que le mois et la saison de naissance ont une influence sur les poids des agneaux. Hadzi (1988) et Boujenane et khansari (2005) ont remarqué que l'effet de la saison est hautement significatif ($p<0,001$), du fait que les pâturages riches et diversifiés sont localisés en saison pluvieuse et que la saison sèche engendre des pâturages pauvres, lignifiés et déficients en protéines digestibles intestinales (PDI). Dekhili et Mehnane (2004) ont remarqué une supériorité pondérale des agneaux nés en été et en automne par rapport aux autres saisons. Le même constat a été fait par plusieurs auteurs (Adely, 1984; Valanderon, 1985; Belaid, 1986; Fal et al., 1988; Yapi et al., 1994; Lodan et al., 1996 cités par Gbangbouche, 2005 et par Kerfal et al., 2005).

3.4.1.4. L'âge de brebis

L'âge des brebis a un effet non significatif sur les poids de la naissance au sevrage. Cependant, Dekhili et Mehnane (2004), Kerfal et al. (2005) ont montré que l'âge des brebis de race Ouled Djellal a un effet hautement significatif ($p<0,001$) sur le poids des agneaux. Les agneaux des brebis multipares sont plus lourds à la naissance (4,0kg) et au sevrage (19,5kg) que les agneaux nés de primipares (poids à la naissance 3,2kg et poids au sevrage 16,3kg).

Bouafia et Lamara (2008), sur le même site, en 2009, ont constaté que l'âge de la mère a une influence significative ($p<0,05$) sur le poids à la naissance mais non sur les poids à 30 , 60, 90 et 120 jours. Les brebis âgées de 3, 4, 5, 6 ans mettent bas, des agneaux avec des poids à la naissance de 3.3, 3.44, 3.23 et 3.38 kg, respectivement; alors que les brebis âgées de 2 ans mettent bas, des agneaux de 2,9 kg à la naissance. Hadzi (1988) a observé que l'âge de la mère a une influence hautement significative ($p<0,001$) sur le poids à la naissance, à 30 jours et à 120 jours; les brebis âgées de 2, 3, 4 ans donnant des agneaux plus lourds que les brebis âgées de 1 an et que les vieilles brebis.

3.4.1.5. Le sexe

Cet élément est très significatif ($p<0,01$) sur le poids à 30 jours mais non significatif ($p>0,05$) pour le poids à la naissance. Les différences de poids entre les mâles et les femelles étant faibles (0.3 kg à la naissance, 1.6 kg à 30 jours, 0.9 kg à 60 jours, 0.4 kg à 90 jours et 0.3 kg à 120 jours), avec une supériorité pour les mâles (Fig. 5). Les mêmes observations ont été faites par Laib et al (2008). Boujanane et Chikhi (2004), Dekhili (2003) et Nianigo (1989) ont signalé que le sexe a un effet hautement significatif ($p<0,001$) sur le poids des agneaux. Kerfel et al (2005), ont constaté que la supériorité des mâles par rapport aux femelles est de 0,2kg à la naissance, 0,87kg à 30 jours, 3,4kg à 90 jours, 6,1kg à 135 jours. Cependant, selon Hadzi (1988), la supériorité des mâles par rapport aux femelles est très significative ($p<0,01$) sur le poids à la naissance et à 30 jours mais non significative sur le poids au sevrage ($p>0,05$). Pour Yapi (1992), le sexe a un effet significatif sur le poids à la naissance lequel s'amoindrit jusqu'au sevrage.

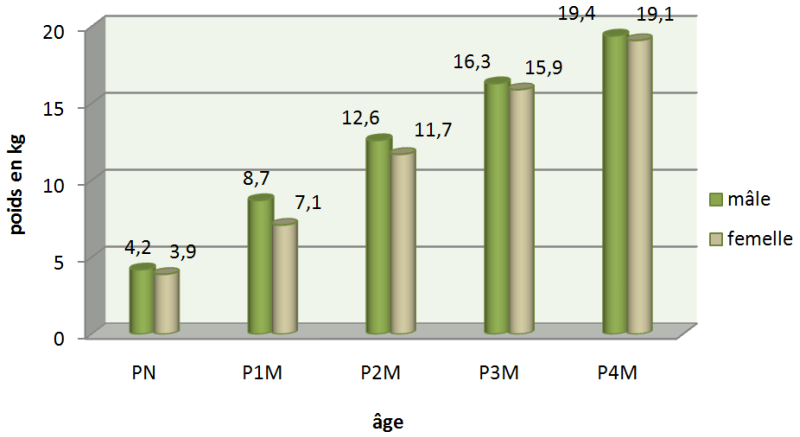


Figure 5 : Poids des agneaux à différents âges par rapport aux sexes

3.4.1.6. La production laitière jusqu'à 10 jours

Ce facteur a un effet significatif sur le poids à 30 jours. Mais non significatif ($p>0,05$) sur les poids à 60 jours. Durant les premiers jours, la production laitière de la mère est sous forme de colostrum à haute digestibilité et le régime lacté des agneaux jusqu'à 30jours est directement lié à la production laitière des brebis tant en quantité qu'en qualité. A partir de 30 jours, l'appréhension des aliments solides par l'agneau rend la liaison production laitière de la mère et croissance des agneaux moins dépendante de cette dernière.

3.4.1.7. Mode de lutte × Mode de naissance :

L'interaction des deux facteurs a une influence significative ($p<0,05$) sur le poids à la naissance, quoique le mode de lutte n'est pas un effet significatif ($p>0,05$) sur le poids à la naissance. Le mode de naissance est influencé par le mode de lutte, puisque l'utilisation de la PMSG selon les doses appliquées peut provoquer plusieurs ovulations, ce qui a pour but d'accroitre le nombre de jumelés.

3.4.1.8. Poids à 60 jours

Cette variable est hautement significative ($p<0,001$) sur le poids à 90 jours et à 120 jours. Un agneau ayant eu un bon développement jusqu'à l'âge de 60 jours, a toutes les chances de pouvoir mieux prendre du poids ultérieurement, afin qu'il puisse bien se développer entre 30 et 60 jours, l'alimentation protéique doit lui être assurée en qualité et quantité. Un bon développement à 60 jours lui procure une assurance de survie plus importante.

3.4.1.9. Le mois de naissance × Poids à 60 jours

Cette interaction est hautement significative ($p<0,001$) sur le poids à 90 jours malgré que le poids de naissance ne le soit pas. Un agneau né durant la saison hivernale, aura atteint 90 jours lors de la saison printanière qui se caractérise par l'apparition de pâturage riches en MAD (considéré comme un bon apport alimentaire). Alors que l'agneau né durant la saison printanière atteint ses 90 jours d'âge durant la saison estivale, où l'alimentation est basée principalement sur les chaumes qui sont pauvres en UFV et PDI nécessaires pour un bon développement corporel.

3.4.1.10. Le poids à 90 jours

Ce facteur est très significatif ($p<0,01$) sur le poids à 120 jours. Un agneau avec un bon état corporel à 90 jours d'âge atteint plus rapidement le poids voulu au sevrage tardif (120jours).

3.4.1.11. Le poids `a 60 jours × poids à 90 jours

Cette interaction est très significative ($p<0,01$) sur le poids à 120 jours, vu que le poids à 60 jours est hautement significatif ($p<0,001$) et que celui à 90 jours est très significatif.

3.5. Les facteurs influençant la production laitière

L'analyse de variance des facteurs influençant sur la production laitière sont recensés dans le tableau 5.

Table 5 : L'analyse de variation des facteurs influençant la production laitières.

Source de variation	ddl	Signification
Parité	1	n.s ($p>0,05$)
EC1M	10	** ($p<0,01$)
Mode de lutte	2	n.s ($p>0,05$)
Mois de naissance	3	** ($p<0,01$)
Mode de naissance	1	n.s ($p>0,05$)
Mois de naissance × Mode de naissance	3	* ($p<0,05$)

3.5.1. La parité

Elle n'a pas d'influence significative ($p>0,05$) sur la production laitière. Cependant, Hadzi (1988) a montré que les brebis multipares ont une production laitière élevée par rapport aux primipares. Selon Boukhliq (2002b) et Jarrige (1988), cette production atteint son maximum au cours de la deuxième ou troisième lactation, puis diminue régulièrement.

3.5.2. L'etat corporel de la brebis à 1 mois après mise bas

Celui-ci est très significatif ($p<0,01$) sur la production laitière. On remarque que la production la plus faible est attribuée aux brebis ayant une NEC de 1,25. Les brebis avec une note de 2,25 et 2,5 ont une production laitière de 1,4 kg et celles notées à 1,5 ; 1,75 ; 2 ; 3 ont une production de 1,5 kg (Fig. 6).

Selon Hassoun et Bocquier (2007), Fraysse et Guitard (1992), une sous-alimentation après l'agnelage, entraine une mobilisation excessive des réserves corporelles (essentiellement énergétiques), diminue la production laitière et peut engendrer un risque de trouble métabolique. Ce risque est d'autant plus grand que les brebis Ouled Djellal ont de bonnes facultés maternelles (Dekhili, 2003).

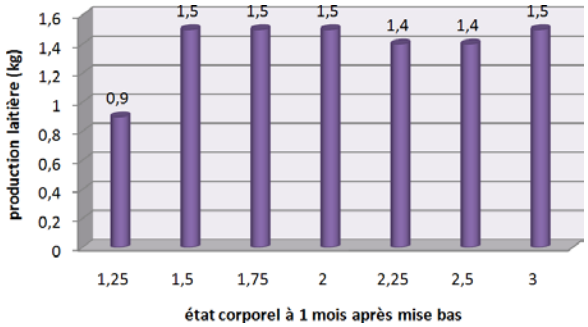


Figure 6 : Production laitière des brebis par rapport `a l'´etat corporel de la mère à 1 mois après mise bas.

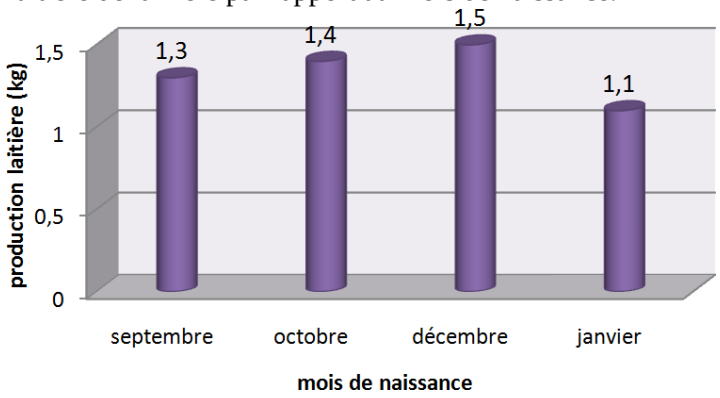
3.5.3. Le mode de lutte :

Le mode de lutte est non significatif sur la production laitière de la brebis ($p>0,05$).

3.5.4. Le mois de naissance :

Ce facteur a un effet très significatif ($p<0,01$) sur la production laitière. Cette dernière s'accroit progressivement pour atteindre son maximum au mois de décembre (1,3 ; 1,4 ; 1,5 kg, respectivement), le minimum étant obtenu pendant le mois de janvier (1,1 kg) (Fig. 7). Les mois de naissance étant intimement liés à l'état des pâturages qui sont fonction du climat du mois sus indiqué.

Figure 7 : Production laitière de la mère par rapport au mois de naissance.



3.5.5. Le mode de naissance :

Il est non significatif ($p>0,05$) sur la production laitière de la mère. Comme l'ont signalé Gardner et Hogue (1964) et Treacher (1983), le mode de naissance n'a pas d'effet sur la production laitière, les brebis ayant un seul agneau ont une production moyenne de 1,31 kg et celles ayant des jumelés atteignent 1,34 kg.

3.5.6. Le mois de naissance × mode de naissance :

Cette interaction est significative ($p<0,05$) quoique le mode de naissance ne le soit pas pour ce paramètre.

Tableau 6 : Production laitière des brebis par rapport au mode de lutte et au mois de lutte.

Mode de naissance	Mois de naissance	Moyenne	Ecart type
Simple	Septembre	1,30	0,05
	Octobre	1,31	0,04
	Décembre	1,42	0,06
	janvier	1,16	0,03

Double	Septembre	1,82	0,08
	Octobre	1,82	0,08
	Décembre	1,80	0,07
	janvier	0,06	0,03

La production laitière des brebis ayant des jumelés durant le mois de septembre, octobre et décembre est supérieure à celle des brebis ayant eu des agneaux simples avec une différence de 0,52 kg; 0,51kg et 0,38 kg, respectivement (Table 6). Pour le mois de janvier, la production laitière des brebis est fonction de l'état des pâturages qui pour ce mois sont maigres, entrainant une meilleure restitution de l'alimentation des agneaux simples par rapport aux doubles.

3.6. Les facteurs influençant la vitesse de croissance (GMQ)

L'analyse de variance des facteurs influençant le gain moyen quotidien des poids à naissance jusqu'à 30 jours (0-30), de 30 jours à 60 jours (30-60), de 60 jours à 90 jours (60-90), de 90 jours à 120 jours (90-120), de la naissance à 90 jours (0-90) et de la naissance jusqu'au sevrage (0-120), est reportée dans (Table 8).

Tableau 8 : Analyse de variance des facteurs influençant sur les GMQ.

		(0-30 j)	(30-60 j)	(60-90 j)	(90-120 j)	(0-90 j)	(0-120 j)
Mode de lutte	ddl	2	2	2	2	2	2
		n.s (p>0,05)	n.s (p>0,05)	n.s (p>0,05)	n.s (p>0,05)	n.s (p>0,05)	n.s (p>0,05)
Mode de naissance	ddl	1	1	/	1	1	1
		** (p<0,01)	** (p<0,01)	/	n.s (p>0,05)	** (p<0,01)	n.s (p>0,05)
Mode de lutte x mode de naissance	ddl	/	2	/	/	/	/
		/	* (p<0,05)	/	/	/	/
Parité	ddl	1	/	/	1	/	1
		n.s (p>0,05)	/	/	* (p<0,05)	/	n.s (p>0,05)
Age	ddl	/	4	4	/	/	/
		/	* (p<0,05)	n.s (p>0,05)	/	/	/
Saison de naissance	ddl	/	/	/	/	/	1
		/	/	/	/	/	* (p<0,05)
Mois de naissance	ddl	/	3	/	3	3	/
		/	* (p<0,05)	/	n.s (p>0,05)	n.s (p>0,05)	/
EC1M	ddl	10	/	/	/	/	/
		* (p<0,05)	/	/	/	/	/
EC3M	ddl	/	/	8	/	/	/
		/	/	* (p<0,05)	/	/	/
EC4M	ddl	/	/	/	/	/	11
		/	/	/	/	/	n.s (p>0,05)
PN	ddl	8	/	8	/	/	8
		n.s (p>0,05)	/	* (p<0,05)	/	/	* (p<0,05)

3.6.1. Le mode de lutte :

Il est non significatif (p>0,05) pour l'ensemble des GMQ.

3.6.2. Le mode de naissance :

Ce facteur est très significatif (p<0,01) pour les GMQ (0-30), GMQ (30-60), GMQ (0-90) mais non significatif pour le GMQ (90-120) (fig 9).

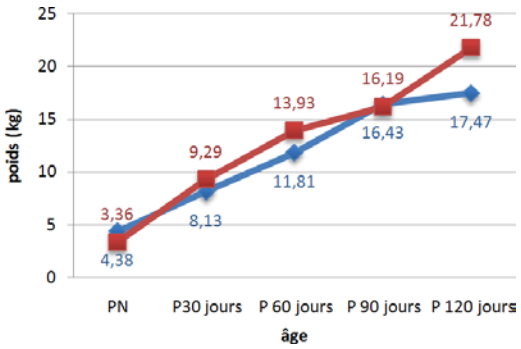


Figure 9 : GMQ par rapport au mode de naissance.

Les agneaux nés doubles ont des GMQ (0-30) et (30-60) respectivement de 48g / j et 46g/ j, supérieurs aux agneaux nés simples (fig 9). Ces résultats sont confortés par Laib et Yahi (2008), mais pour les races prolifiques, Kerfel et al. (2005) ont remarqué que les agneaux nés simples ont une supériorité par rapport aux agneaux nés doubles de 111g/j entre 10-30jours et 36g/j entre 30-90jours pour la race D'man.

L'influence du mode de naissance sur le GMQ est différemment appréciée selon les auteurs. Merghem (2008), a constaté que le mode de naissance a une influence significative (p<0,05) sur le GMQ (30-60), hautement significative (p<0,001) sur le GMQ (0-30) et (0-90) et non significative (p>0,05) sur le GMQ (60-90) et (90-120), par contre Rekik et al (2007), ont observé que le mode de naissance n'est significatif que sur le GMQ (10-30) et non significatif sur les GMQ (30-60) et GMQ (30-90). Par contre, Chikhi et Boujenane (2004) ont mentionné que le mode de naissance a un effet significatif sur tous les gains de poids.

3.6.3. La parité et âge des brebis

La parité a une influence (p<0,05) sur les GMQ (90-120) et non significative pour le GMQ (0-120) (p>0,05). Les agneaux des primipares ont des GMQ (90-120) plus élevés que ceux des multipares (Fig. 10).

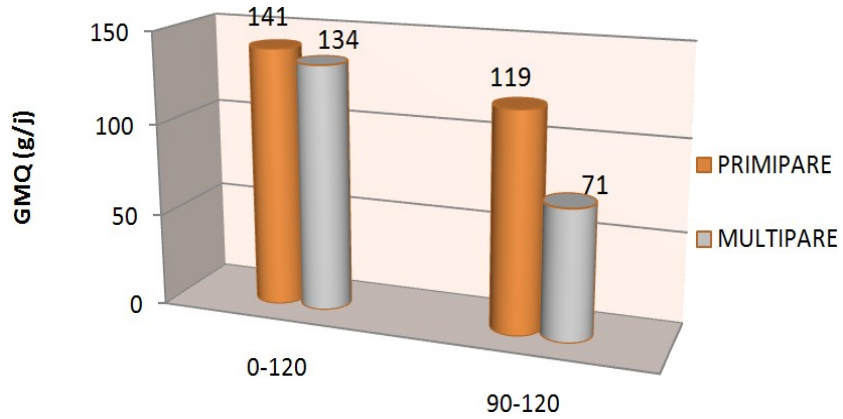


Figure 10 : GMQ (0-120 j) et (90-120 j) par rapport `a la parité

L'âge des brebis influe significativement sur les GMQ (30-60j) et non sur les GMQ (60-90j) (p>0,05) (Fig. 11).

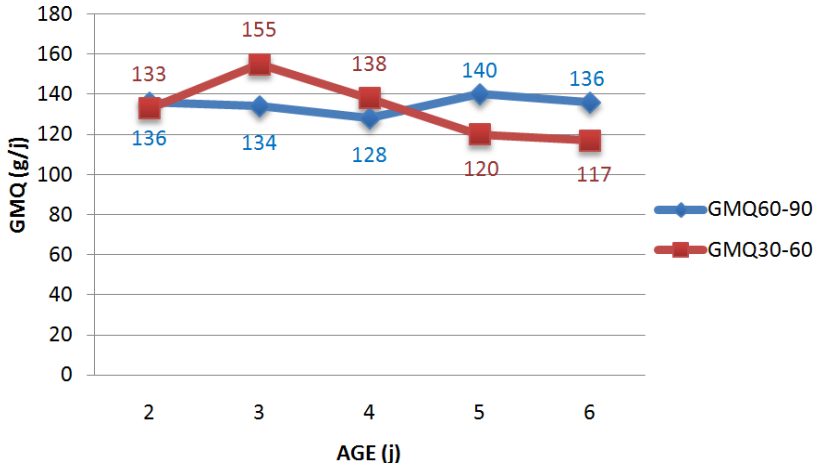


Figure 11 : GMQ (30-60) et (60-90) par rapport à l'âge des brebis.

Les GMQ (30-60j) des agneaux des brebis âgées de 3 ans ont une supériorité par rapport aux agneaux des brebis âgées 2, 4, 5, 6 ans (Fig. 11). Boujenane et Chikhi (2006) ont obtenu de faibles performances de croissance des agneaux de race Boujaâd pour les brebis âgées de 78 mois et pour la race Sardi, chez les agneaux issus de brebis de 54 à 66 mois.

3.6.4. Le mois et la saison de naissance :

Le mois de naissance est significatif (p<0,05) sur le GMQ (30-60j) et non significatif (p>0,05) sur le GMQ (90-120j) et (0-90j).

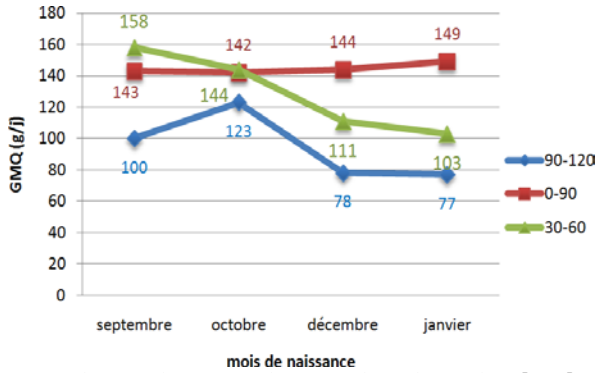


Figure 12 : GMQ (30-60j), GMQ (90-120j) et (0-90j) selon le mois de naissance.

Les GMQ (0-90j) et (30-60j) sont plus élevés pour le mois de septembre (143 et 158 g/j, respectivement) et octobre (142g/j et 144g/j respectivement) (Fig. 12). Les valeurs les plus basses sont enregistrées en décembre (78 et 111 g/j) et janvier (77 et 103 g/j). L'effet de la saison de naissance est significatif sur le GMQ (0-120j). En effet, la saison automnale est plus propice à l'acquisition d'un bon GMQ (0-120j) par rapport à la saison hivernale avec une différence de 21g/j (Fig. 13). C'est ce qu'ont rapporté Laib et Yahi (2008), pour les GMQ (0-90 j), en observant une supériorité des gains de poids pour les agneaux nés en septembre (177,73 g/j) et plus faible pour les agneaux nés en décembre (120,7 g/j).

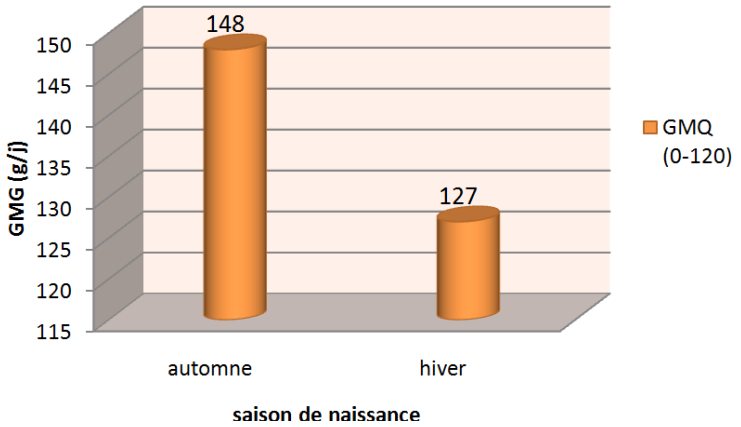


Figure 13 : GMQ (0-120j) suivant la saison de naissance.

En littérature, le mois et la saison de naissance sont interprétés différemment selon les auteurs. Pour Merghem (2008), le mois de naissance est hautement significatif ($p<0,001$) sur le GMQ (0-30j) et (90-120j) et non significatif ($p>0,05$) sur le GMQ (30-60 j), (60-90 j) et (0-90 j) mais pour Manoun (2000) et Nianogo (1989), la saison et le mois de naissance ont un effet significatif sur la croissance des agneaux. Hadzi (1988) et Boujenane et Khansari (2005) ont signalé que la saison de naissance a un effet hautement significatif ($p<0,001$). Selon Gbengbouche et al (2005), les températures sèches inhibent l'appétit des brebis et des agneaux, ce qui défavorise la croissance des agneaux. Sibonama et al (1987), ont indiqué que l'influence de la saison et du mois ne dure que 550 jours et que les agneaux nés en novembre et décembre sont plus avantagés. Cependant Etienne et al (1989), ont noté que les agneaux nés en avril présentaient une croissance plus élevée.

3.6.5. Etat corporel à 1 mois (EC1M), 3 mois (EC3M) et 4 mois (EC4M) après mise bas

L'EC1M est significatif ($p<0,05$) sur le GMQ (0-30 j) et l'EC3M à ($p<0,05$) sur le GMQ (60-90j). L'EC4M n'est pas significatif ($p>0,05$) sur le GMQ (0-120j).

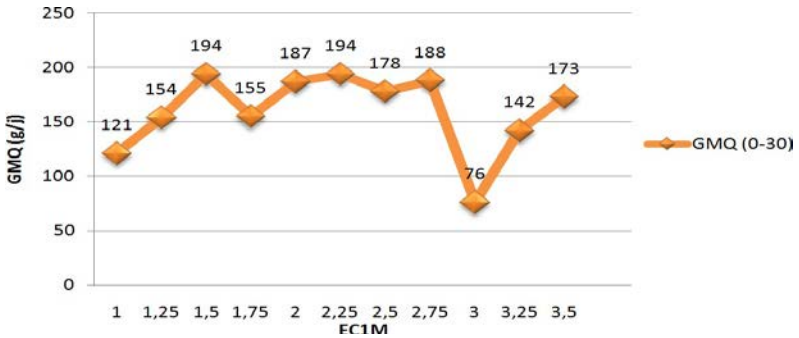


Figure 13 : GMQ (0-30j) pour les NEC `a 30 jours après mise bas.

– *EC1M : état corporel à 1 mois.*

Le GMQ (0-30j) croit pour des NEC allant de 1 à 1,5. On note une flexion pour NEC (1,75 et 3) (Fig. 14). L'analyse de variance faite sur la production laitière de la brebis a montré que l'EC1M influence significativement la production laitière des brebis. De ce fait, les agneaux issus de mères bonnes productrices de lait ont des GMQ plus accrus

à mode de naissance égal.

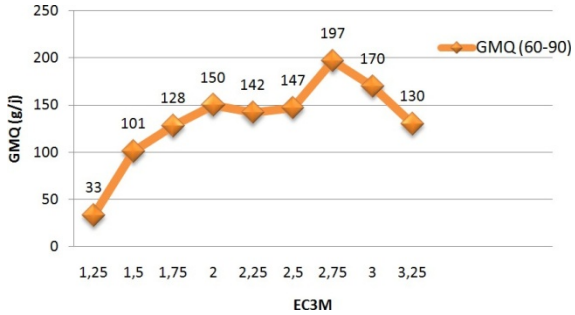


Figure 14 : GMQ (60-90j) pour les NEC `a 90 jours après mise bas.

- EC1M : état corporel à 3 mois.

Le GMQ (60-90j) s'accroit avec l'amélioration de la NEC. Le maximal étant atteint à la NEC de 2,75 pour ensuite décroitre (Fig. 15). L'alimentation maternelle étant à ce stade complémentaire, l'appréhension des aliments solides est aussi influente sur le GMQ (60-90j). Selon Atti et al (1995), le gain moyen de la naissance jusqu'au sevrage est significatif pour la NEC à la mise bas. Le gain moyen quotidien naissance -sevrage des agneaux est corrélé avec la NEC de la mise bas jusqu'au sevrage mais avec un coefficient de corrélation faible (r2=0,13 à 0,30). Cependant, Molina et al (1991), ont trouvé des coefficients de corrélation entre la NEC et les paramètres de production plus élevés (r^2=0,52).

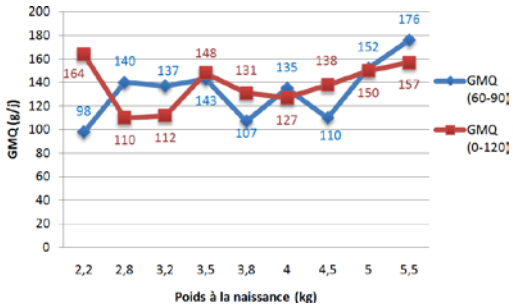


Figure 15 : GMQ (60-90 j) et GMQ (0-120 j) selon le poids à la naissance.

3.6.6. Le poids à la naissance

Il est significatif sur les GMQ (60-90j) et (0-120j) et non significatif sur le GMQ (0-30j). Le GMQ (60-90j) varie en dent de scie selon le poids à la naissance (Fig. 15). Pour les GMQ (0-120j), les moins expressifs sont attribués aux poids 2,8 et 3,2kg et évoluent positivement à partir du poids à la naissance de 4kg. Selon Belaid (1986), les agneaux les plus lourds à la naissance sont ceux qui ont le plus de chance de se développer car ils auront plus de vigueur et s'épuiseront moins à la recherche de la tétée qui sera plus fréquente. De plus, Boukhliq (2002b), a constaté que les agneaux lourds à la naissance s'adaptent plus rapidement à l'alimentation solide.

4. CONCLUSION

La production laitière de la brebis Ouled Djellal n'a subis aucune influence par le mode de lutte mais associé au mode de naissance, il est significatif ($p<0,05$). Donc la synchronisation des chaleurs va nous aidais à mettre en reproduction cette femelle en contre saison car cet animal est très influencé par le photopériodisme pour sa mise à la reproduction.

Par contre, le mode de lutte a eu une action très significative ($p<0,01$) sur la croissance des agneaux surtout sur le poids à 120jours. L'interaction mode de lutte × mode de naissance a une signification ($p<0,05$) sur le poids à la naissance. De plus, ce facteur est significatif ($p>0,05$) sur les différents GMQ.

REFERENCES

- Atti N et Abdennebi L., 1995. Etat corporel et performance de la race ovine Barbarine. CIHEM. Options Méditerranéennes.
- Belaid D., 1986 et 1993. Aspect de l'élevage ovin en Algérie. OPU (Office des publica- tions universitaires) Alger : 107p.
- Bouafia I, Lamara A., 2009. Analyse des performances de reproduction et de pro- ductivité de la brebis Ouled Djellal dans la ferme Ben Aïchouche à B.B.A.86p.
- Boujenane I, Khansari J., 2005. Productivité des brebis Timahdit et croisées D'man x Timahdit en station et chez les éleveurs au Maroc. Revue. Ele. Vét. Pays trop, 58(1.2) : 75-79.
- Chemineau P., Cognie Y, Heyman Y., 1996. Maitrise de la reproduction des mammifères d'élevage. INRA. Prod. Anim hors série : 5-15.
- Chikhi H, Boujenane I., 2004. Paramètres génétiques des performances de crois- sance des agneaux de race Boujaâd. 11ème Renc. Rech. Ruminants : 408p.
- Chikhi H, Boujenane I., 2006. Performances d'engraissement et caractéristiques des carcasses des agneaux Boujaâd et Sardi au Maroc. Revue. Elev. Vét. Pays trop, 58(4) : 22-267.
- Cognie Y., 1988. Nouvelles methods utilisées pour améliorer les performances de repro- duction chez les ovins. INRA. Prod. Anim, 1(2) : 83-93.
- Dekhili M., 2003. Relation entre le poids à la naissance des agneaux (Ouled Djellal) et le taux de sevrage à 90 jours.10ème Renc. Rech. Ruminant. 116p.
- Dekhili M., 2004. Etude de la productivité d'un troupeau de brebis de race Ouled Djellal. 11ème Renc. Rech. Ruminant.
- Dekhili M, Mehnane E., 2004. Facteurs de l'accroissement en poids des agneaux (Oulled Djellal) de la naissance au sevrage. Renc. Rech. Ruminant.
- Etienne M., Napoleone P., Juillian M, Lachaux., 1989. Elevage ovin et protection de la forêt méditerranéenne contre les incendies.
- Fraysse JL, Guitard J P., 1992. Produire de la viande ovine. Edition. France agricole ; Paris.
- Gardner RW., DE Hogue. 1964. Effects of energy intake and number of lambs suckled on milk yield, milk composition and energetic efficiency of lactating ewes. J. Aoim. Sci. 23 : 935.
- Gbengbouche AB., Hornick JL., Adamo N., Diadye M., Edarthe AP., Farnier F., Abiola A, Leroy P L., 2005. Caractérisation et maitrise des parameters de reproduction et de la croissance des ovins Djallonké. Ann. Méd : 148-160.
- Hadzi TN., 1988. Facteurs de variation de mortalité et de croissance des agneaux Djallonté au centre d'appui technique de Kolokopé au Togo.
- Hanzen CH., 2008. La détection de l'œstrus chez les ruminants. Cours de reproduction des ruminants, Faculté des Sciences Vétérinaires. Université de Liège.
- Itelv., 2001. Standard de la race ovine Ouled Djellal.
- Jarrige r., 1988. Alimentation des bovins, ovins et caprins. INRA. Paris. 476 p.
- Kherfal M., Chikhi A, Boulanouar B., 2005. Performances de reproduction et de croissance de la race D'man au domaine expérimental de l'INRA d'Er-Rachidia (Maroc). 12ème Renc. Rech. Ruminants : 206
- Laib N, Yahi F., 2008. Contribution à l'étude de la croissance des agneaux de la naissance à 4 mois. Mémoire d'ingénieur agronome. Université de Sétif. 61p.
- Maisonneuve, Larose. 1993. LE MOUTON. La croissance des jeunes agneaux. Tome I
- Manoun L., 2000. Projet d'essai d'allaitement artificiel d'agneaux et chevreaux avec les produits d'allaitement sevral.
- Merghem M., 2008. Caractérisation des paramètres zootechniques des ovins dans la région de Sétif. Mémoire de Magister en agriculture et développement durable. Université de Sétif : 22.
- Molina A., Gallego L., Palaza M, Gomez C., 1991. The evalution of body condition score of Manchega breed ewes according to lambing season and birth type, and its effect on lamb growth. Option Méditerranéennes -série Séminaires, 13 : 103-108.
- Nianogo AJ, 1989. Paramètres de production des ovins Mossi de Gampela.
- Rekik A., Bengara A., Rouissi H., Bakara FA, Khaldi Z., 2007. Performances de croissance des agneaux de la race D'man dans les Oasis tunisiennes. Centre de recherche sur l'agriculture

oasienne. Dégué che (Tunisie).
- Sibonama G., Myrasji TH., Sayers AR, Wilson RT., 1987. Performances pondérales du mouton africain de l'Est à longue queue grasse en station au Rwanda.
- Soltner D., 1993. La Reproduction Des Animaux d'élevage - Tome 1, 2ème Édition
Ed : Sciences et techniques agricoles
- Torres-Hernandez G., Hohenboken W., 1980. Relationships between ewe milk production and composition and preweaning lamb weight gain. J. Anim. Sci. 50, 597-603.
- Treacher T.T. 1983. Nutrient requirements for lactation in the ewe. In : W. Haresign (Ed.) Sheep Production. pp133-153. Butterworths, London
- Yapi CV., 1992. Caractères phénotypiques de différentiation et de croissance des agneaux de la race pure Djallonké et croisée Sahélien x Djallonké : Institut de Savane (IDESSA).

Contribution des migrants au développement de l'agriculture oasienne: une perspective économique

Taoufik Gammoudi
Laboratoire d'Economie et Sociétés Rurales
Institut des Régions Arides de Médenine
Email: Taoufik.gammoudi@ira.rnrt.tn

RESUME
Dans le monde rural agricole à forte tendance migratoire, la migration internationale peut jouer un rôle prépondérant dans le processus de développement agricole, comme elle pourra avoir des impacts négatifs. La compréhension fine de ce processus passe par l'évaluation d'indicateurs agro-économiques au niveau des ménages et de la localité de départ des migrants. L'objet de ce travail est de contribuer à l'analyse de la migration internationale dans l'oasis continental de Fatnassa du Sud tunisien et son impact sur l'agriculture oasienne au travers des résultats statistiques des enquêtes réalisées dans le cadre des activités de recherche de l'institut des Ragions Arides de Médenine.
Ce travail a finalement montré que l'agriculture traditionnelle a connu un recul ou parfois un déclin par rapport à la modernisation du système oasien. Il s'est avéré que la richesse issue de la migration a influencé les inputs et les outputs agricoles. L'amélioration du revenu et l'adoption des nouvelles techniques agricoles constituaient les principaux facteurs agissant sur la croissance économique et le développement de l'agriculture oasienne.
Mots-clés: migration internationale, revenu, acquis technologiques, agriculture oasienne, oasis littorale de Mareth

1. INTRODUCTION

La migration internationale, était et reste l'une des stratégies d'adaptation des populations face aux crises socio-économiques et environnementales de plus en plus accentuées. En 2015, on comptait 244 millions des migrants à l'échelle internationale, soit une augmentation de 40 % pour cent depuis 2000, dont 150 millions de travailleurs migrants. Une grande partie d'entre eux sont originaires des zones rurales (FAO, 2016).
La migration s'est révélée la principale stratégie d'accroissement des revenus, étant même considérée parfois comme une simple stratégie de « survie » pour les ménages ruraux. En se sens, le fait de partir à la recherche d'une source de revenus qui assure les besoins des ménages non satisfaits dans leurs régions de départ permet aux migrants de contribuer de façon directe ou indirecte à atténuer la pauvreté dans leurs lieux d'origine (Taylor, 2001). Le départ de l'un de membre de la famille pour travailler dans un marché étranger n'empêche pas ceux qui restent de bénéficier de cette migration. L'impact de transfert de fonds sur le reste de la famille est toujours positif et cette externalité peut même contribuer à l'accroissement de la productivité dans la communauté d'origine des migrants (Stark et Bloom, 1985). Cette source de revenus peut représenter un capital vital pour les ménages bénéficiaires, mais aussi une source importante de devises pour l'économie des pays. Selon les estimations de la Banque Mondiale, le montant transféré dans le monde a atteint 583 milliards de dollars en 2014, soit une augmentation de 8 % par rapport à 2013 (World Bank, 2015). Environ 40 %des transferts d'argent sont destinés aux zones rurales (FAO, 2016).
La problématique de développement rural associé au statut d'un migrant renvoie à l'idée qu'ils s'établissent parfois des liens entre la migration, l'agriculture et le développement rural.
La migration internationale peut constituer un facteur d'accroissement de la productivité agricole en prenant en charge la totalité des dépenses induites par le cycle de production (Taylor, 2001). En effet, le revenu migratoire peut servir à investir dans l'acquisition de nouvelles terres agricoles, à améliorer les techniques de production et à employer une main-d'œuvre agricole pour compenser le départ d'un ouvrier agricole. Ce revenu peut donc contribuer de façon directe ou indirecte à atténuer

la pauvreté dans les zones rurales. Comme il peut diminuer le risque engendré par les activités productives des ménages pauvres et créer de nouvelles sources de revenus et d'assurance locale pour ces ménages (Taylor, 1999; World Bank, 2006). Mais, leur rôle sur le développement peut être insignifiant dans le cas d'un transfert faible. Ainsi, « si les transferts des migrants améliorent la situation des familles sur le lieu d'origine, ce n'est pas pour autant qu'ils constituent un moteur de développement. Cela est trivial dans le cas où les transferts sont peu élevés » (Guilmoto et Sandron, 2003).

Devant l'ampleur des débats théoriques et empiriques autour de cette thématique de recherche, il ne fait aucun doute que les réflexions sur les modèles de développement, sur les flux migratoires ainsi que sur les interactions entre la migration et le développement, s'avèrent utile. De là émergent les questions suivantes : quelle est l'apport des migrants dans le processus de développement économique des zones de départ ?

La compréhension fine de ce processus passe par l'évaluation de quelques indicateurs économiques au niveau des ménages et de la localité de départ des migrants. L'oasis de Fatnassa du Sud-ouest tunisien a constitué un bon exemple permettant de répondre à cette question de recherche. Appartenant aux oasis continentales de la Tunisie, Fatnassa, au long de son histoire, a souvent été une zone de migration. La migration qui avait débutée avant la période coloniale (1881) par un exode massif vers les agglomérations tunisiennes à fort potentiel économique et par la suite vers les pays arabes et européens, s'est largement accrue, durant les années 1960, pour se concentrer essentiellement vers l'Europe, notamment la France. L'absence des données statistiques officielles sur les flux migratoire dans cette oasis nous a empêchés de faire le bilan et l'évolution de ce phénomène. En se référant aux études menées dans cette oasis par Gammoudi (2014) et Sghaier (2000), nous pouvons par conséquent énoncer le constat que cette région a connu une forte tendance à la migration vers l'étranger.

L'objet de ce travail est d'aborder les retombées économiques de la migration dans un cadre de réflexion qui tient en compte les formes complexes et variées des relations entre le patrimoine agricole existant et potentiel, le savoir-faire et l'oasis à forte tendance migratoire. Il s'agit d'analyser l'impact de la migration internationale sur quelques indicateurs économique au niveau des ménages et de la localité de départ des migrants moyennant un important travail de recherche mené dans le cadre de projet IMAROM[9]au sein de l'Institut des Régions Arides de Médenine.

Ce travail se structure en trois parties. Il commence par une brève présentation de démarche méthodologique suivie tout au long de ce travail. La deuxième partie discute les résultats obtenus. Enfin, le document s'achève par une conclusion.

2. MATERIEL ET METHODES

Les analyses menées dans ce travail reposent s'appuie principalement sur des recherches documentaires et des analyses statistiques de données d'enquêtes. L'échantillon de l'enquête a été conçu de façon à ce que les caractéristiques observées dans l'enquête aient une représentation statistique significative pour l'ensemble de la population résidente dans l'oasis de Fatnassa. A cette fin, les ménages faisant l'objet de l'enquête ont été tirés suivant les groupes des superficies et les statuts migratoires des chefs des ménages. 92 ménages ont été ainsi retenus dont 67 chefs de ménages non migrants et 25 migrants (Tableau 1). La répartition des ménages enquêtés est choisie d'une façon hétérogène dans cette oasis.

L'information sur les ménages consiste à déterminer leurs caractéristiques, notamment le revenu agricole et non agricole, les envois des fonds, les dépenses de consommation courante, l'investissement dans le secteur agricole et non agricole.

[9] IMAROM: Integration between Migration Land and Water Management and Resource Exploitation in the Oases of the Maghreb. Ce projet est soutenu par l'Université d'Amsterdam (NO.IC18-CT97-0134, INCO-DC/DG XII).

Tableau 1 : La répartition de l'échantillon suivant les superficies et les statuts migratoires

Superficie en ha	Non migrants	Migrants
[0 ; 0,25]	30	8
[0,25 ; 0,5]	15	7
[0,5 ; 1]	14	7
=>1	8	3
Total	67	25

3. RESULTATS

3.1. Une aperçu sur l'oasis de Fatnassa

Le bioclimat de l'oasis est caractérisé par une forte amplitude thermique journalière et saisonnière et une pluviométrie irrégulière et très faible qui ne dépasse pas le 90 mm/an. Le système productif oasien connaît la coexistence de trois étages de culture : un étage supérieur occupé par les palmiers dattiers, un étage moyen formé par les arbres fruitiers (oliviers, figuiers, grenadiers, etc.) et un étage inférieur constitué par les cultures herbacées (les cultures fourragères et / ou maraîchères). Le palmier dattier est la culture principale qui caractérise l'économie de la région et même l'économie nationale.

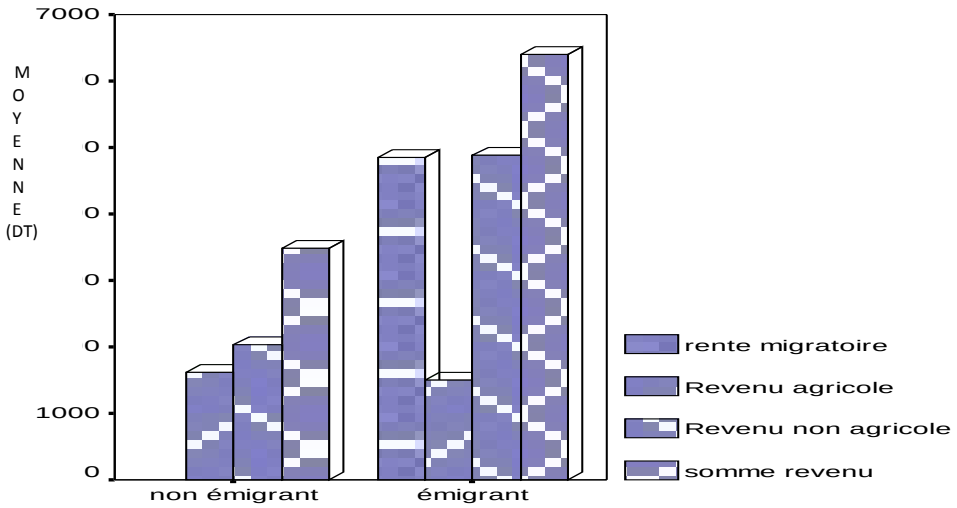
Les ressources réelles de l'oasis étaient principalement agricoles. A l'époque, les agriculteurs étaient classés suivant l'importance de leurs propriétés foncières. L'homme était confronté à un environnement très difficile et à des contraintes économiques et sociales. La plupart des migrants étaient des Khammès[10] . A côté d'eux vivaient des petits propriétaires et des bergers. Comme réponse à la crise du système oasien pendant les années soixante, la migration internationale est déclenchée. Les migrants ont cherché tout d'abord la satisfaction de leurs besoins de base. Les migrants ont choisi la France comme destination principale. Les destinations ont concerné particulièrement les régions de Lyon, Saint Etienne et Marseille. Cette migration qui a fortement débuté en 1956 avec un taux de 3,4 % a atteint un seuil maximum en 1969 avec 20, 7% (Gammoudi, 2006).

3.2. Les structures des revenus des ménages

Les envois de fonds qui expriment certainement une sorte de solidarité familiale et « font partie d'un arrangement contractuel volontaire entre la famille et les migrants » (Lucas et Stark 1985), sont le plus souvent émises d'une façon régulière de la part des ménages migrants. Que cette opération soit effectuée par les chefs de ménage, par les épouses ou par les enfants, les transferts sont généralement effectués par circuits postaux, bancaires ou à travers des circuits informels. Les importantes sources des revenus des ménages avec migrants sont à la fois les transferts migratoires et les activités non agricoles. Pour le cas des non migrants les revenus sont principalement générés des activités extra agricoles (Figure 1).

La diversité des modalités de transfert migratoire, dont l'importation de biens de consommation, contribue à créer un ensemble de richesses économiques en faveur des ménages. L'importation des biens durables est donc un élément déterminant des transferts migratoires. Ces biens consommables, qui sont difficiles à quantifier, peuvent aussi avoir une fonction d'épargne, car ils peuvent être revendus d'occasion en cas de besoin. Les transferts effectués sous forme de marchandises importées ont contribué au développement de petites activités économiques locales d'appoint. L'objectif est alors de vendre ses biens de manière à en tirer un revenu qui est parfois destiné à la dépense immédiate.

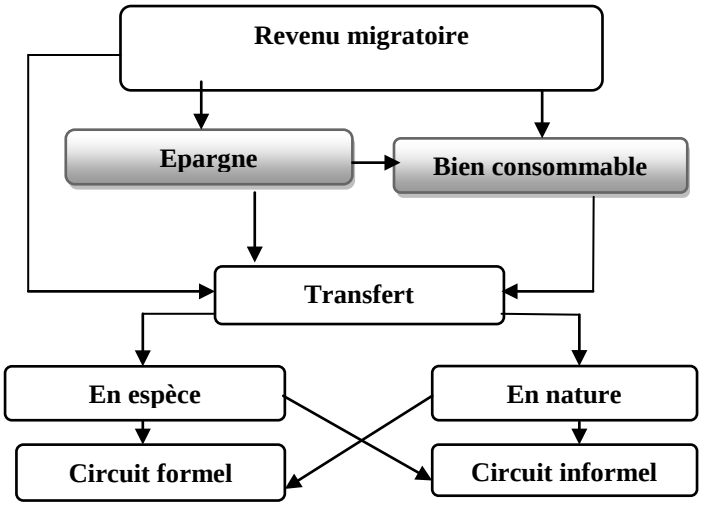
[10] Les Khammès sont les métayers qui offrent leurs forces de travail pour avoir 1/5 de la production agricole.



Source : enquête IMAROM

Figure 1 : La structure du revenu des ménages dans l'oasis

Pour synthétiser ce qui précède, qu'il s'agisse des transferts formels ou informels, en espèces ou en nature, le schéma suivant explique le mode de l'opération de transfert migratoire (Figure 2).



Source : enquête IMAROM

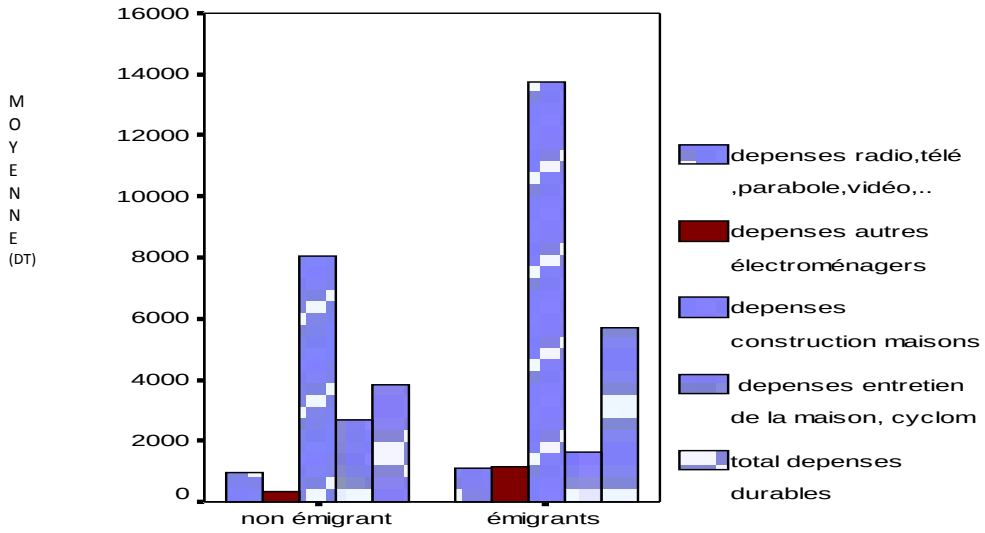
Figure 2: Schéma des modes de transfert des migrants

3.3. L'impact des transferts de fonds sur l'économie oasienne

Généralement, les migrants jouent le rôle d'intermédiaires pour leurs régions d'origine. Le fait d'envoyer un membre de la famille travaillé sur un marché de l'emploi étranger permet à ce ménage d'accéder à une plus grande liquidité grâce aux envois de fonds. En effet, la migration permet à des familles d'obtenir du capital à travers les transferts dans des situations sans marchés financiers et services bancaires permettant l'accroissement de la productivité dans la communauté d'origine. La comparaison entre la situation de départ et la situation actuelle des ménages montre des différences importantes en termes de changements économiques et sociaux. En passant d'une situation sociale et économique qui était très précaire à une situation plutôt favorable, la migration semble avoir de ce point de vue un impact positif sur les ménages migrants. Elle s'est traduite par une croissance du revenu et une amélioration des opportunités pour les ménages de vivre dans un environnement qu'ils jugent plus favorable.

3.3.1. Vers un mode de dépense durable des ménages

Comme pour le revenu, il s'agit ici d'une information sur la répartition des dépenses durables d'une manière globale pour l'ensemble des ménages et à titre de comparaison entre les migrants et les non migrants. Les dépenses pour l'entretien et la construction des maisons, cyclomoteur, voiture, camion, etc., sont remarquables dans cette oasis. A titre d'exemple, la moyenne dépensée pour la construction des maisons est de 13750 DT chez les migrants et 8064 DT chez les non migrants. La seule dépense qui parait faible pour les deux types des ménages est liée à la dépense radio, télé, parabole, vidéo et dépense autres électroménagers (Figure 3). Pour les migrants, on peut expliquer cette faiblesse par l'importation de leurs besoins de l'étranger.

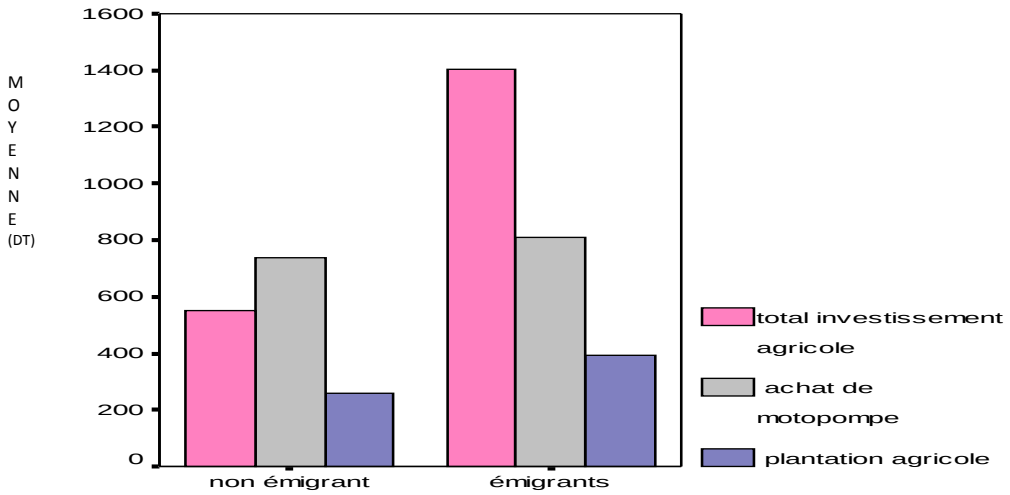


Source : enquête IMAROM

Figure 3 : La répartition des dépenses durables des ménages par statut migratoire

3.3.2. L'investissement agricole

L'investissement dans le secteur agricole est un deuxième indice permettant d'expliquer la situation économique dans l'oasis. Ce secteur, qui est passé à la phase de modernisation, a connu une évolution permettant aux habitants de vivre dans des conditions économiques plus favorables. L'idée selon laquelle la migration avait des retombées en termes d'investissement agricole a été quelque peu remise en cause. La grande majorité des transferts ne sont pas directement productifs, les préoccupations principales des migrants étant avant tout d'améliorer leurs conditions de vie et celui des membres de leur famille restés sur place, notamment à travers les dépenses de consommation courante et l'amélioration de l'habitat. En effet, les transferts sont rarement utilisés à des investissements en faveur de l'agriculture malgré leurs potentialités d'améliorer le système de production et de réduire la pauvreté (Figure 4).



Source : enquête IMAROM

Figure 4 : La structure de l'investissement agricole des ménages à Fatnassa

L'impact de la migration sur le secteur agricole reste limité, même s'il y a une prise de conscience que les transferts peuvent participer de manière positive à un certain processus de développement. Ainsi, l'apport des transferts migratoires est estimé positif lorsqu'ils sont dépensés dans des projets agricoles générant des emplois pour les travailleurs dans les lieux d'origine des migrants (PNUD, 2009). L'approche qui vise une meilleure contribution des migrants à des projets générateurs d'emploi est très limitée. Cause ou effet, la plupart des migrants n'ont souvent pas même l'intention d'y investir dans ce secteur. Malgré les efforts consacrés au développement de l'agriculture oasienne dans la région du Sud-est tunisien, il nous semble que les montants financiers et les compétences acquises devraient être mieux valorisés avec l'appui d'acteurs d'une dimension plus large que les migrants eux-mêmes. Il s'agit de voir comment mieux valoriser ce phénomène migratoire vers le développement agricole dans un sens plus global. C'est une approche qui intègre les différents acteurs susceptibles d'influencer et d'agir sur le processus de développement. En effet, l'approche participative des migrants, la politique de gouvernance locale peuvent participer à la constitution de règles permettant à la fois la mise en place d'une action collective de développement durable et une gestion concertée des flux migratoires.

3.3.3. Mode de gestion de l'eau

La gestion hydraulique dans l'oasis est assurée par un Groupement d'Intérêt Collectif (GIC) qui contrôle et gère le tour d'eau. Actuellement, les ressources en eau d'irrigation sont constituées d'un forage artésien dans le Continental Intercalaire (CI) et de deux pompages dans la Complexe Terminal (CT). Ces trois forages alimentent les deux oasis de Fatnassa Nord et Sud. La distribution de l'eau se fait à travers des antennes qui alimentent les parcelles sous forme d'un tour d'eau et à travers un réseau de seguias bétonnées avec un débit de l'ordre de 197 litres par seconde (GIC Fatnassa, 2005). Le besoin de chaque ménage est défini suivant la superficie occupée. En effet, chaque exploitant dans l'oasis légale dispose d'un droit d'usage de l'eau d'irrigation proportionnelle à ses besoins agricoles. D'âpres le résultat d'enquête, la cotisation moyenne annuelle est d'environ 100 DT / exploitant. La moyenne est de l'ordre de 121 DT / an pour les migrants et de 88 DT / an pour les non migrants.

4. **CONCLUSION**

Face à l'aridité climatique, les oasis ont toujours été confrontées à un environnement naturel très difficile et à des contraintes socio-économiques liées à l'incertitude climatique et à la faible étendue possible des activités génératrices des revenus. En l'absence des politiques de gouvernance et des stratégies de développement durable, l'application d'une approche dite « développement local » des oasis continue à être problématique pour satisfaire durablement les besoins tant alimentaires que

financiers des ménages et stabiliser les gens dans leurs régions d'origine. Cependant, ce processus qui vise une meilleure contribution au développement de ces oasis à forte tendance migratoire et qui présente des richesses naturelles à valoriser n'est pas encore vraiment opérationnel. Si les expériences passées en matière de développement et des conservations des ressources naturelles et culturelles ont été variées, elles ont montré leurs limites (Elloumi, 2006), la population continuant à migrer. Le modèle de développement de ces oasis souffre de contraintes conjoncturelles relatives à la rareté des ressources naturelles, à la pauvreté et au chômage qui s'accumule année après année.

Dans les oasis, le secteur agricole représente une alternative prometteuse pour le développement. Les opportunités qu'elles présentent sont incontestables, mais les contraintes de ce secteur ne sont pas moins importantes à considérer. Les terres qui constituent le fondement du revenu agricole sont soumises à une dégradation par désertification (Sghaier et al. 2003). La population finit par abandonner la terre et l'activité agricole et partir à la recherche d'autres sources de revenu.

Tout en gardant à l'esprit le retour à leur région d'origine, la plupart des migrants souhaitent travailler dans le secteur agricole afin de s'assurer au mieux un avenir stable. Développer le secteur agricole par le biais de processus d'intégration de la migration est une priorité de développement. La migration peut jouer un rôle capital tant pour les ménages des migrants que pour les oasis, via les transferts des devises et les investissements dans ce secteur.

Le migrant ne peut pas affronter seule les problèmes du développement. Le rôle des acteurs économiques, sociaux et politiques dans ce processus est un élément déterminant. La mise en valeur économique est un problème de gouvernance, elle reste d'abord un problème de gouvernance du développement. C'est la manière dont les institutions locales gèrent ces ressources sociales et économiques pour un développement équilibré. Vouloir mieux développer cet agro-système dépend nécessairement des stratégies et des politiques d'organisation des différentes relations entre les opérateurs intervenants au niveau des oasis.

REFERENCES

- Elloumi, M. (2006) : « Les politiques de développement rural en Tunisie : Acquis et perspectives », *Options Méditerranéennes*, Sér. A, n°71, pp.55-65.
- FAO(2016) : *Migration, agriculture et développement rural Affronter les causes profondes de la migration et exploiter son potentiel pour le développement*, Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture, 20p
- Gammoudi T. (2014) : « L'impact de l'émigration sur la consommation des ménages : cas de l'oasis de Fatnassa du Sud-Oeust tunisien », Actes du 4ème Meeting International « Gestion des Ressources et Applications Biotechnologiques en Aridoculture et Cultures Oasiennes: Perspectives pour un Développement Durable des Zones Arides », *Revue des Régions Arides(Tunisie)*, n° 35 (3/2014), p.2091-2096.
- Gammoudi, T. (2006) : L'impact de l'émigration sur la région de départ : cas de l'oasis continentale de Fatnassa (gouvernorat de Kébili). Mémoire de mastère, Institut National Agronomiques de Tunisie, 90p.
- Guilmoto C.Z., Sandron F. (2003) : *Migration et développement*, la documentation française, Paris, 142 p.
- **Lucas R. E. B., Stark O *(*1985**): «Motivations to Remit: Evidence from Botswana», Journal of Political Economy, 1985, vol. 93, n° 5, pp. 901-919.**
- PNUD (2009) : *Rapport mondial sur le développement humain 2009 Lever les barrières : Mobilité et développement humains*. Programme des Nations Unies pour le développement, 237p.
- Sghaier M., Picouet M., Gammoudi T., Fetoui M., Issoui M. (2003) : *La désertification dans la Jeffara Sud-est Tunisien : structure démographiques, activités socio-économiques des ménages et évolution foncières*, Rapport scientifique final du thème 3, projet de Jeffara : « la désertification dans la Jeffara tunisienne : pratiques et usages des ressources, techniques de lutte et devenir des populations rurales », CSFD, SERST, IRD, IRA, 80 p.
- Stark O., Bloom D.E. (1985): «The New Economics of Labor Migration», *American Economic Review*, n°75, pp. 173-78.

- Taylor J. E. (1999): «The New Economics of Labour Migration and the role of Remittances in the Migration Process», *International Migration*, vol.37, n°1, pp.63-88.
- Taylor J.E. (2001): « Migration: New dimensions and characteristics, causes, consequences and implications for rural poverty» in K.G. Stamoulis (ed.)," **Current and Emerging Issues for Economic Analysis and Policy Research,** Rome, Food and Agriculture Organization pp.167-201
- World Bank (2015): Report on global trends for remittance prices, 13p.
- World Bank (2006): Global *Economic Prospects: Economic Implications of Remittances and Migration*, Washington, DC, 157p.

Effet du mode de reproduction sur les performances zootechniques de la race ovine Ouled Djellal colonisatrice des oasis du sud (Algérie)

Achour Mennani[1], Rafik Arbouche[2], Yasmine Arbouche[1], Fodil Arbouche[2], Halima Saâdia Arbouche[2]

[1]Département des Sciences Agronomiques, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Université FERHAT ABBAS, Sétif 1, Algérie

[2]Département des Sciences Agronomiques, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Université de Ghardaïa, Algérie

Email: achour_mennani@yahoo.fr

RESUME

Le présent travail vise à déterminer l'influence du mode de reproduction sur les paramètres de reproduction et de productivité des brebis Ouled Djellal en milieu oasien. Au total 445 brebis et 29 béliers adultes ont été utilisés. Ce troupeau a été réparti en trois lots selon le mode de reproduction appliqué : Lot I, en lutte contrôlée, formé de 148 brebis réparties aléatoirement dans 15 groupes de 9 à 10 brebis avec un bélier chacun; Lot II, mené en insémination artificielle (I.A) et constituait de 153 brebis ; le troisième lot (lot III), constitué de 144 brebis mené en lutte naturelle avec 14 béliers.

Sur l'ensemble des facteurs testés (âge de la brebis, parité de brebis, saison de saillie, mois de saillie, sexe de l'agneau, mode de naissance et le poids à la naissance), sur les paramètres reproductifs et de productivité des brebis de race Ouled Djellal, le mois et la saison de saillie agissent significativement ($P<0.01$) sur la fertilité et la fécondité des brebis, le mois de saillie a eu une influence significative sur tous les paramètres étudiés sauf sur le taux de viabilité. Le sexe et le poids à la naissance ont une influence positive sur le taux de sevrage ($P<0.05$). L'utilisation de l'insémination artificielle avec synchronisation des chaleurs permet d'améliorer les performances de l'élevage ovin Ouled Djellal en milieu oasien, notamment le taux de prolificité et de productivité numérique des brebis, ainsi que la vitesse de croissance des agneaux.

Mots-clés : Brebis, Insémination artificielle IA, mode de reproduction, Ouled Djellel, paramètres reproductifs, productivité.

SUMMARY

The present work aims at determining the influence of the mode of reproduction on the parameters of reproduction and productivity of Ouled Djellal ewes in oasis environment. A total of 445 ewes and 29 adult rams were used. This herd was divided into three lots according to the method of reproduction applied: Lot I, in controlled breeding, was formed of 148 ewes distributed randomly in 15 groups of 9 to 10 ewes with a ram each; Lot II, conducted in artificial insemination (AI) and constituted 153 ewes; the third lot (lot III) consisted of 144 ewes carried out in natural accouplement with 14 rams. Out of all the factors tested (age of the ewe, ewe parity, breeding season, breeding month, sex of the lamb, mode of birth and birth weight), on the reproductive and productivity parameters of Ouled Djellal ewes, the month and the breeding season had a significant effect ($P<0.01$) on the fertility and fecundity of the ewes, the month of breeding had a significant influence on all the parameters studied except on the viability rate. Sex and birth weight have a positive influence on the weaning rate ($P<0.05$).The use of artificial insemination with heat synchronization makes it possible to improve the performance of the Ouled Djellal sheep farm in the oasis environment, notably the prolificity and numerical productivity of the ewes, as well as the speed of growth of the lambs.

Key words: Ewes, artificial insemination AI, reproduction mode, Ouled Djellel, reproductive parameters, productivity.

1. INTRODUCTION

Le cheptel ovin en Algérie se compose de plusieurs races dont la race Ouled Djellal est numériquement la plus importante du cheptel national, elle représente environ 50% de ce cheptel. Cette race est exploitée fondamentalement pour la production de viande (Chellig, 1992). En effet cette race ovine souffre d'un manque d'étude faite à son égard (Dekhili et Aggoun, 2006).

L'élevage ovin est en fonction des espèces et des régions, ce qui a créé en Algérie un système de production variée et dynamique, en revanche sa gestion se fait uniquement à l'échelle exploitation, il n'existe pas encore une politique nationale et une organisation globale, à l'échelle raciale et nationale, ainsi que les structures indispensables à la conservation, la réhabilitation et la valorisation du matériel génétique des races ovines, où le complexe ovin-céréale-pâturage domine (Madani et al, 2004).

Il est essentiel ainsi d'améliorer les performances de croissance avant et après le sevrage des agneaux et de produire des carcasses lourds et d'améliorer les performances de reproduction qui sont indispensables à l'augmentation de la production numérique des troupeaux, la réussite de la de la reproduction dépend essentiellement de la bonne conduite et la maitrise de la reproduction en choisissant les meilleurs moments de lutte et le mode de lutte approprié à chaque période, ainsi que le bon choix de reproducteurs mâles et femelles qui ont l'aptitude à être gestantes (fertilité) et prolifique, et par conséquent du nombre de jeunes nés. Ce qui constitue le but du présent travail.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Matériel animal

Au total 445 brebis et 29 béliers adultes (élevés dans les oasis de Biskra du sud Algérien) ont été utilisés, Ce troupeau a été réparti en trois lots selon le mode de reproduction appliqué : Lot I, en lutte contrôlée avec synchronisation des chaleurs, été formé de 148 brebis reparties aléatoirement dans 15 groupes de 9 à 10 brebis avec un bélier chacun ; Lot II, mené en insémination artificielle (I.A) et constituait de 153 brebis ; le troisième lot (lot III), été constitué de 144 brebis mené en lutte naturelle avec 14 béliers. Au sein de ces deux premiers lots (I et II), une opération d'induction et de synchronisation des chaleurs a été appliquée avec des éponges vaginales imprégnées de 40 mg de FGA. Leur retrait après 15 jours a été accompagné par une injection intramusculaire de PMSG à raison de 400 UI par brebis. Le troisième lot (lot III) mené en lutte naturelle sans synchronisation des chaleurs et injection de PMSG. Le choix des reproducteurs se base généralement sur la conformation de l'animal. La synchronisation des chaleurs a été réalisée durant le mois de mars pour lot mené en insémination artificielle et durant le mois d'avril pour le lot mené en lutte contrôlée (tableau 4), par contre la lutte a été réalisée durant le mois d'avril pour tous les lots (lutte contrôlée, insémination artificielle, lutte naturelle). La lutte de rattrapage a été fait 17 jours après chaque lutte, les béliers menés des harnais marqueurs ont été réintroduits au sein du troupeau pour détecter et lutter les femelles ayant manifesté un retour de chaleur (non fécondées dans la première lutte).

Pour les béliers utilisés en lutte contrôlée et lutte naturelle, ils ont été ramenés du Centre Régional d'Insémination Artificielle et d'amélioration génétique de la région d'Ouled Djellal (Wilaya de Biskra au sud de L'Algérie). De l'autre côté les béliers de même race ont servi pour la collecte de la semence dans le centre de l'insémination artificielle d'Ouled Djellal wilaya de Biskra pour la pratique de l'insémination artificielle.

2.2. La conduite alimentaire des troupeaux

L'alimentation du troupeau est basée essentiellement sur le pâturage. Le flushing (technique alimentaire avant la lutte) a été appliqué 30 jours avant la mise à la lutte à base d'orge en grains durant le mois de mars et début d'avril à raison de 200 g /brebis / j, ainsi que le steaming (technique alimentaire en fin de gestation) a été appliqué 30 jours avant l'agnelage des brebis(durant le mois d'août) à raison de 150 g /brebis/j.

Les aliments distribués à l'auge sont généralement constitués de foin d'avoine, la paille de blé dur et le son de blé en association avec l'orge en grain , la quantité distribuée varie au cours de l'année d'un mois à l'autre selon la fréquence et la possibilité du pâturage.

2.3.Variables analysées

Les variables analysées sont : Taux de fertilité, taux de fécondité, taux de prolificité, le taux de productivité numérique (TPN), le taux de productivité pondérale (TPP), et le taux de sevrage.

2.4. Analyse statistique

Les variables de la reproduction ont été soumises à une analyse descriptive et une analyse de variance par les moindres carrées on utilisant le model linéaire général univarié, cette analyse a été effectuée avec le logiciel SPSS (version 18). Le model linéaire général a été utilisé pour tester les effets des facteurs sur les différentes variables, la signification et l'homogénéité entre les différentes sous-ensembles (test de comparaison entre les différentes moyennes) ont été réalisées par l'application du S.N.K test (Student-Newman-Keules).

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Effet des facteurs non liés au mode de reproduction sur les paramètres de reproduction et de productivité des brebis Ouled Djellal

Les résultats de l'analyse de la variance du tableau 1 montrent que le facteur mois de saillie a eu une influence très significative ($P<0.01$) pour la fertilité, la fécondité, le taux de productivité pondérale, la Prolificité et pour le taux de productivité numérique ($P<0.05$), et non significative pour le taux de sevrage ($P>0.05$). Ces résultats se diffèrent aux résultats de Dekhili et Aggoun (2006), qui ont constaté que le mois de saillie a un effet hautement significatif ($P<0.01$) sur le taux de productivité pondérale (TPP). Ainsi, Dekhili et Benkhlif (2005), Dekhili et Aggoun (2006), ont trouvé que le mois de saillie a eu une influence très significative ($P<0.01$) sur le taux de productivité numérique (TPN).

Le facteur saison de saillie a eu une influence hautement significative ($P<0.01$) pour les variables de fertilité et fécondité, et a un effet non significatif sur la prolificité, le taux de productivité pondérale (TPP), le taux de productivité numérique (TPN) et le taux de sevrage (TS). Ces résultats sont diffères aux résultats constatés par Dekhili (2010), qui a trouvé que la saison de saillie affecte positivement la fécondité ($P<0.03$) et n'a aucun effet sur les variables de prolificité, le taux de productivité pondérale (TPP), le taux de productivité numérique (TPN) et le taux de sevrage (TS).

Les facteurs poids à la naissance (PN) des agneaux et le sexe ont une influence significative ($p<0.05$) pour le taux de sevrage (TS). Ces résultats se diffèrent aux résultats de Dekhili (2003, 2010), qui ont constaté que le sexe a un effet non significatif ($P>0.05$) sur le taux de sevrage (TS). De sa part Dekhili (2003) a signalé que le poids à la naissance a eu une influence hautement significative ($P>0.01$) sur le taux de sevrage.

Le facteur Mode de naissance a été non significatif pour le taux de sevrage ($P>0.05$), cette constatation est la même que celle de Dekhili (2003).

Le facteur âge de brebis a eu un effet non significatif ($P>0.05$) sur les paramètres de reproduction étudiés (Fert, Fec, Prol, TPN, TPP et TS). Ces résultats sont similaires aux résultats de Dekhili (2004), qui avait constaté que l'âge des brebis n'influé jamais les variables de la prolificité, TPN, TPP et le Ts. Nos constatations sont opposés aux résultats de Tennah (2007), qui a rapporté que la fertilité chez la brebis Ouled Djellal est faible chez les brebis âgées de moins de 2ans et importante chez celles âgées de plus de 3 ans, ainsi Boujenane et Chikhi (2007), ont constaté l'effet très significatif ($P<0.01$) de l'âge sur la fertilité et son effet significatif ($P<0.05$) sur la prolificité et la fécondité. Dekhili (2002, 2004 et 2005) a montré que l'effet de l'âge de la brebis est très important ($P<0.01$) sur la fécondité, la prolificité et le TPN et que les brebis âgées présentant les meilleurs performances.

Le facteur parité de la brebis, comme le facteur de l'âge, a eu aussi une influence non significative ($P>0.05$) sur les variables de reproduction étudiés (fertilité, fécondité, prolificité, TPN, TPP et TS), ces résultats sont opposés aux résultats de Kerfal et al. (2005), qui ont trouvé que les brebis primipares âgées moins de 2 ans présentent les performances les plus faibles en terme de fertilité et fécondité alors que les meilleures performances attribuées aux brebis multipares âgées de 3 à 4 ans. Un autre constat qui a été signalé par Dekhili (2004) qui a indiqué que les brebis multipares âgées

de 3 à 5 ans sont plus fécondes (+0.22 %), plus prolifiques (+ 0.2%), plus productives numériquement (+0.26%) par rapport aux brebis primipares âgées de moins de 2 ans.

3.1.1. Moyennes globales des poids

Le tableau 2 résume les moyennes globales des variables de la reproduction et la productivité «Fertilité, Fécondité, Prolificité, TPN, taux de sevrage (viabilité) et TPP» des brebis *Ouled Djellal*.

Selon le tableau 2, le taux globale de la fertilité dans la présente étude est de 87.8 %, ce taux est inférieur au taux enregistré chez la race Ouled Djellal (100%) (Chellig 1992) , avec une déférence de 12,2 % et aux taux enregistrés chez la brebis Ouled Djellal décrites par Dekhili (2004) d'où la valeur de la fertilité a été de 92.1% avec une déférence de (+4.3%), selon l'ITELV (2001), le taux est de 89%, et chez certaines races marocaines décrites par Chikhi et Boujenane (2003) comme la race Boujaad , Sardi et Timahdite qui ont des moyennes de fertilité variées, respectivement, de 98 , de 85 à 92% et de 77 à 95 %. Ces déférences peuvent s'expliquer par la conduite d'élevage surtout la conduite alimentaire durant la période de lutte (technique de flushing), de leur part O'brien (2002), Abdennebi et Khaldi (1995), Abbas et al. (2002), Paquay et al. (2004),Atti et Abdennabi (1995), Kerfal et al. (2005) rapportent qu'une alimentation de bonne qualité durant la saille améliore la fertilité des brebis.

Le taux de fécondité dans la présente étude est de 99.8%, ce taux est inférieur au taux enregistré par Dekhili (2002, 2004) qui a constaté des taux de 110% et 128 % respectivement, cette différence est le résultat de l'introduction des nouvelles techniques telle que l'I.A et l'introduction de nouveaux béliers avec un nombre très important (15 béliers reproducteurs) qui sont moins maîtrisés. Ces différences enregistrées d'un auteur à l'autre sont les résultats de mode de conduite des troupeaux, notamment la conduite de la reproduction.

La prolificité des brebis est de 115.2%, ce taux est supérieur au celui enregistré par. L'ITELV (2001) et Dekhili (2002) ont constaté des résultats de 110% et 110 % respectivement, ces différences sont généralement l'effet de la zone d'étude qui représentées par Dhekhili et Aggoun (2007) qui ont enregistré des taux de 109% et 123% pour les régions Nord et Sud de Sétif, respectivement. Ainsi, Chentouf et al. (2003) rapportent que la distribution d'une supplémentation aux brebis avant et durant la lutte améliore le taux d'ovulation et par conséquent le taux de prolificité, de leurs parts Clément et al. (1997) montrent qu'une alimentation en quantité suffisante de bonne qualité pourrait favoriser les naissances doubles.

La moyenne du taux de sevrage (TS) ou la viabilité des agneaux enregistrés dans cette étude est de 82,6%. Un taux de sevrage (viabilité) de 82,6% signifié la présence d'un taux de mortalité (100-82,6) un peu élevé qui a été de 17,4 %. Dekhili (2004) rapporte un taux de viabilité similaire (identique) à nos résultats (moyenne) dans la région Nord de Sétif qui est 82 % de viabilité , et une autre moyenne supérieur soit 95 %, cette différence est due à l'effet du milieu (Nord et Sud). D'ailleurs cette moyenne de viabilité (82,6%) est supérieure à la moyenne des résultats de Dekhili (2010),. A cet égard, Dekhili (2010) montre que tout effort qui sera fourni (s'il y a), sera voué à l'échec à cause d'une viabilité des agneaux très faibles, causées par des sources multiples : mauvaises préparations de l'agnelage. Et dans ce sens, on observe que le taux le plus élevé de mortalité est enregistré en premières semaines de vie.

Le taux de productivité numérique est de 102.4 %, ce taux est supérieur aux taux constaté par Dekhili (2002, 2004) et Dekhili et Benkhlif (2005) qui ont constaté des moyennes de 80, 122 et 99%, respectivement. Selon Dekhili et Aggoun (2007), le taux de productivité numérique est influe par la latitude, il est supérieur dans la région sud par rapport à la région nord avec 115 et 88%, respectivement.

Le taux de productivité pondérale (TPP Kg) est de 16,01 Kg il est inférieur aux celles obtenues par Dekhili (2002, 2004) qui ont été de 17,2 et 19,60 Kg, respectivement, pour des brebis de la race Ouled Djellel avec des différences de 01 Kg, ceci peut expliquer par la mauvaise conduite, les faible poids à la naissance et les tailles des portés de 2 et 3 agneaux par porté qui sont le résultats de l'utilisation des hormones (PMSG et FGA à la fois), ce qui induit un poids à la naissance faible, ainsi que l'utilisation des fourrages pauvres en énergie pendant la lactation, ce qui influe négativement sur le poids des agneaux au sevrage.

Tableau 1 : Effet des facteurs non liés au mode de reproduction sur les paramètres de reproduction et de productivité des brebis Ouled Djellal.

Facteurs	Fertilité	Fécondité	Prolificité	TPN	TPP	TS
Age brebis	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
Parité	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
Saison saillie	P<0.01	P<0.01	n.s	n.s	n.s	n.s
Mois saillie	P<0.01	P<0.01	P<0.01	P<0.05	P<0.01	n.s
Sexe agneau	-	-	-	-	-	P<0.05
Mode naissance	-	-	-	-	-	n.s
PN	-	-	-	-	-	P<0.05

n.s: différences non significatives (p>0.05); P<0.05 : différences significatives au seuil de 5% ; P<0.01: différences hautement significatives(P<0.01) au seuil de 1 ; (-) absence de facteur.

Tableau 2 : Moyennes globales des variables de la reproduction et de productivité « Fertilité, Fécondité, Prolificité, TPN, taux de sevrage (viabilité) et TPP » des brebis.

	Fertilité	Fécondité	Prolificité	Viabilité	TPN	TPP (kg)
Moyenne	87.8±0.04	99.8±0.07	115.2±0.06	82.6±0.04	102.4±0.06	16.01±0.9

3.2. L'effet de mode de reproduction sur les performances reproductives et productives des brebis

Selon le tableau 3, le mode de lutte a eu une influence très significative (P<0.01) sur les variables de fertilité, fécondité, prolificité, le taux de sevrage, TPN et TPP. Donc le mode de lutte constitue une très importante source de variation pour ces variables. Ces résultats sont similaires à ceux mentionnés par Lamrani et al. (2008) et Harket et Lafri (2007) qui ont constaté que le mode de saillie et le mode d'indiction des chaleurs (traitement hormonal) a un effet très significatif sur les performances reproductives de la brebis *Ouled djellal*, notamment la fertilité, la fécondité et la prolificité.

Tableau 3: Effet du mode de reproduction sur la fertilité, fécondité, prolificité, TPN, TPP (kg) et le taux de sevrage (Ts).

Facteur	Fertilité	Fécondité	Prolificité	Ts	TPN	TTP(kg)
Mode de lutte	P<0,01	P<0,01	P<0,01	P<0,01	P<0,01	P<0,01
Moyenne	0,45±0,03	0,59±0,05	1,31±0,06	0,86±0,03	1,14±0,06	18,82±0.81

3.2.1. Moyennes globales des variables de la reproduction selon le mode de lutte

Les moyennes générales des variables de la reproduction du troupeau étudie sont représentées dans le tableau 4. Les résultats motrent que les moyennes de fertilité inférieures à la moyenne générale (45%) ont été enregistrées dans le lot subit la lutte contrôlée (Figure 1) avec synchronisation des chaleurs et le lot subit l'insémination artificielle soit 17 et 43%? respectivement, par contre la fertilité est maximale et supérieur à la moyennes générale, qui a été de 75%, ce mode de lutte est considéré comme la meilleur mode par rapport aux autres mode de saillie (I.A et lutte contrôlé) ou les performance sont jugées faible lorsque elles sont comparées avec les résultats de Caston Guay et al. (1999) qui ont constaté que l'utilisation de I.A avec l'injection de 500 U.I de PMSG après 55 H de raterait (presque la même durée que nous) permet un taux de fertilité de 50% pour les races non prolifiques, et si on considère la race *Ouled Djellal* comme une race non prolifique, cette différence du taux de fertilité (-7%) peut être expliquée par l'utilisation de 400 U.I de PMSG seulement dans notre expérimentation. La même constatation a été fait par Harek et Lafri (2007), qui ont constaté que la lutte avec synchronisation des chaleurs à l'aide de (FGA+ PMSG) donne un taux de fertilité de 79.2% soit une différence de (+62.2) par rapport à notre résultat qui est de 17% seulement ce faible taux est expliqué par subit un entrainement avant la mise à la lutte, où il est normalement appliqué selon Harkat et Lafri (2007), une semaine avant la lutte.

Tableau 4: Moyennes de fertilité, fécondité, prolificité, TPN, TPP (kg) et le taux de sevrage (Ts) selon le mode de reproduction.

	Fertilité(%)	Fécondité(%)	Prolificité(%)	Ts(%)	TPN	TPP (Kg)
Lutte naturelle	75^{a}	91^{a}	121^{b}	88^{a}	$1,06^{b}$	$15,95^{c}$
lutte contrôlée	17^{c}	21^{c}	124^{b}	85^{b}	$1,05^{b}$	$18,63^{b}$
I.A	43^{b}	65^{b}	149^{a}	86^{b}	$1,31^{a}$	$21,9^{a}$
Moyenne	45±3,2	59±5,4	131±6,2	86±3,5	1,14±6,7	18,82±0.81

Les chiffres affectés par des lettres différentes sont significativement différentes.

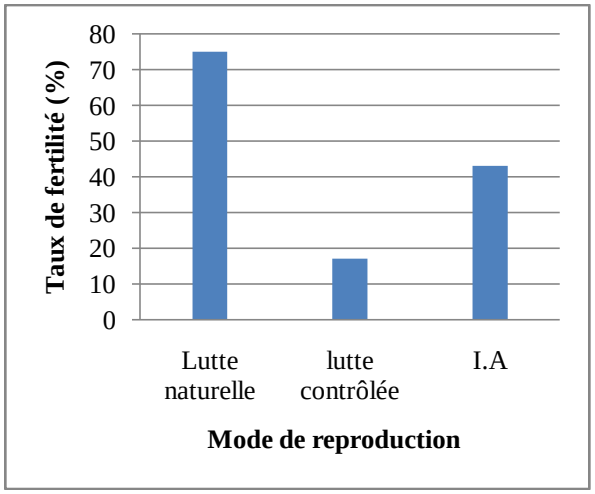


Figure 1 : Effet du mode de reproduction sur la fertilité de la brebis *Ouled Djellel.*

La variabilité de la fécondité constitue aussi une source de variation pour le mode de lutte, la fécondité est de 65, 21 et 91% pour les modes de lutte I.A, lutte contrôlée avec synchronisation des chaleurs et la lutte naturelle respectivement (Figure 2). Harket et Lafri (2007) ont démontré que l'utilisation de 400 U.I de PMSG donne un taux de fécondité de 65%. De même, Bister et Raes (2005) ont trouvé que l'utilisation de I.A a donné un taux de fécondité qui reste proche de 95% soit (+30%) par rapport aux nos résultats en cas d'I.A et en cas de la lutte naturelle la fécondité était de 66.7% selon Lamrani et al. (2007).

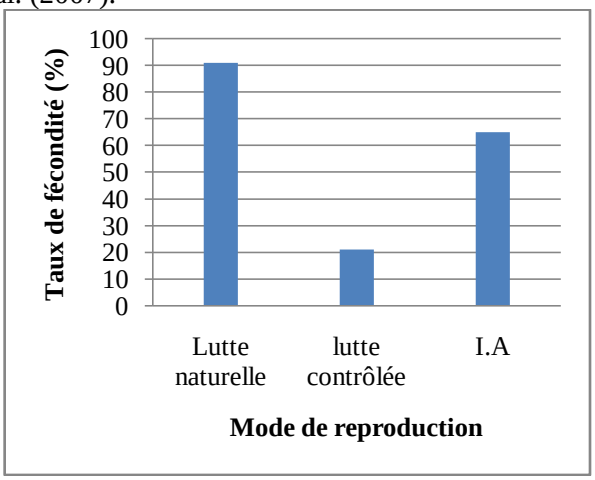


Figure 2 : Effet du mode de reproduction sur la fécondité de la brebis *Ouled Djellel.*

La prolificité est plus élevée en cas d'I.A avec 150%, soit +18% par rapport à la moyenne générale qui est de 131%, par contre le mode de lutte contrôlé est identique au mode de lutte naturelle qui ont provoqué des résultats faibles soit 124 et 121%, respectivement (Figure 3). Les résultats de ces

derniers mode de lutte sont inferieurs par rapport à la moyenne général, et aux résultats de Dekhili (2004) qui a constaté un taux de prolificité de 131% en cas de lutte naturelle, ces résultats sont similaires à ceux de Bister et Raes (2005) qui ont constatés que l'I.A avec une dose de PMSG entre 400 U.I favorise et améliore la qualité et le nombre des ovulations et donc la prolificité varie selon la dose de PMSG injectée en cas de synchronisation des chaleurs avec les éponges vaginales (PMSG + FGA).

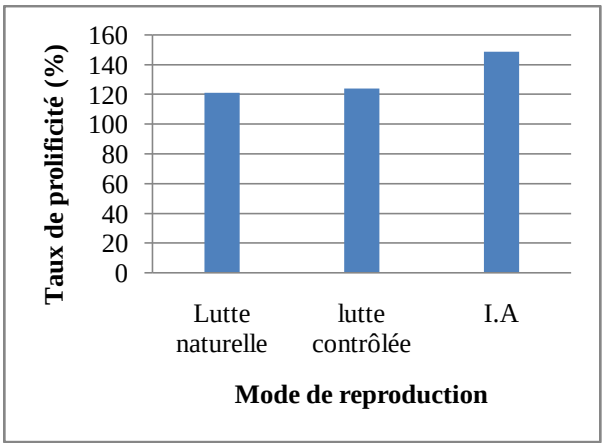


Figure 3 : Effet du mode de reproduction sur la prolificité de la brebis *Ouled Djellel*

Pour le taux de productivité numérique (TPN) des brebis, les valeurs ont été aussi supérieurs chez les brebis inséminées soit 1,31 par rapport aux autre modes de lutte où le TPN est de 1,05 et 1,06 pour la lutte contrôlée avec injection de PMSG et la lutte naturelle, respectivement (Figure 4).

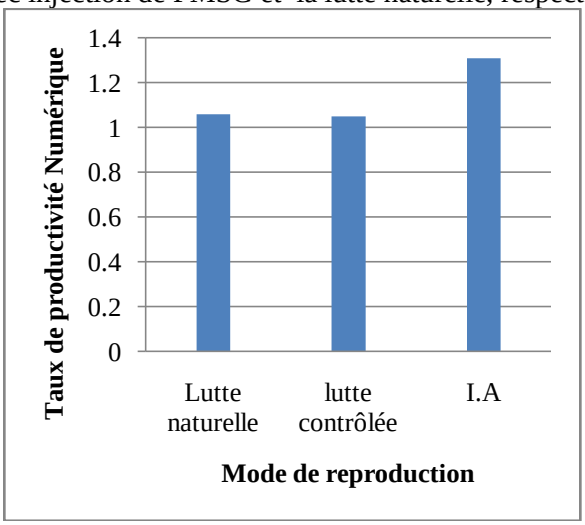


Figure 4 : Effet du mode de reproduction sur le TPN de la brebis *Ouled Djellel.*

En terme de productivité pondérale (TPP Kg), on observe qu'il est supérieur en cas d'utilisation de l'I.A soit une valeur de 21,9 Kg avec un écart de 3.08 Kg par rapport à la moyenne globale qui est de 18.82 Kg, ainsi que l'utilisation de la lutte contrôlée (PMSG + FGA) a donné une faible valeur en terme de productivité pondérale soit 15,95 Kg (Figure 5).

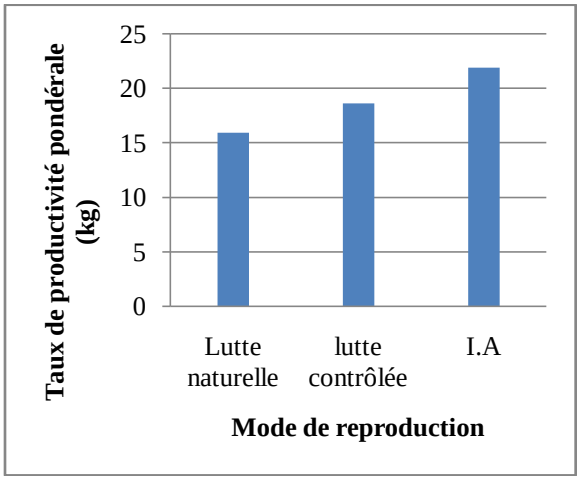


Figure 5 : Effet du mode de reproduction sur le TPP de la brebis *Ouled Djellel.*

Pour le taux de sevrage (viabilité à 90 jours), les meilleurs résultats ont été obtenu avec l'utilisation de la lutte naturelle soit 88% de viabilité (Figure 6). Ce taux est supérieur par rapport aux autres modes de lutte où le TS a été jugé identique soit 85% pour l'I.A et 86% pour la lutte contrôlée avec l'utilisation des éponges. Pour cette variable et dans le même site d'étude, Bouafia et Lamara (2009) ont constaté que le taux de sevrage (TS) est influencé par le mode de lutte, ce taux a été de 89% en lutte contrôlée (FGA + PMSG) et 78% en cas de lutte naturelle.

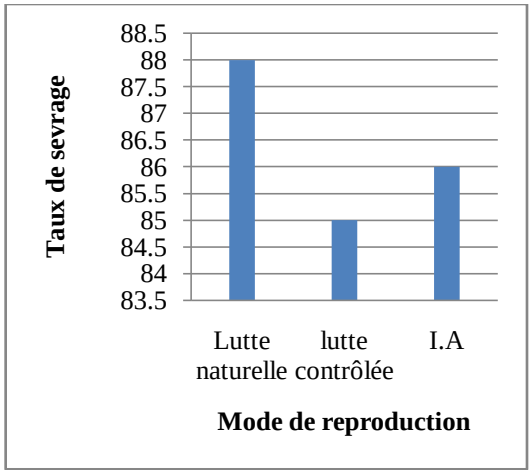


Figure 1 : Effet du mode de reproduction sur le taux de sevrage chez la race *Ouled Djellel*

4. CONCLUSION

Les résultats obtenus dans cette étude menée dans les Oasis de Sud algérien (wilaya de Biskra), montrent que parmi les facteurs testés dans cette étude (âge de la brebis, parité de brebis, saison de saillie, mois de saillie, sexe de l'agneau, mode de naissance et le poids à la naissance), et qui ont un effet sur les paramètres reproductifs et de productivité des brebis de race Ouled Djellal, seulement le mois et la saison de saillie agissent significativement ($P<0.01$) sur la fertilité et la fécondité des brebis, le mois de saillie a eu une influence significative sur tous les paramètres étudiés sauf le taux de viabilité. Pour cela il faut bien choisir le mois et la saison de lutte pour améliorer le maximum de ces performances reproductives et que la lutte en mois d'Avril constitue le bon choix du fait de son effet sur la majorité de ces variables notamment la fertilité, la fécondité, la prolificité, le TPN et le TPP.

Le mode de reproduction a eu une influence très significative ($P<0.01$) sur les variables de fertilité, fécondité, prolificité, le taux de sevrage, TPN et TPP, ($P<0.01$). Donc le mode de reproduction constitue une très importante source de variation pour ces variables. Ces résultats suggèrent qu'il est

possible d'utiliser les hormones de FGA avec PMSG en combinaison avec l'I.A comme un moyen efficace d'intensification de l'élevage ovin notamment pour améliorer la prolificité et le TPN de ces élevages ainsi que la vitesse de croissance (GMQ) des agneaux. La lutte naturelle reste une solution idéale pour obtenir un taux de sevrage (TS%) important et donc améliorer le nombre des agneaux destinés à l'abattage.

REFFERENCES

- Abbas K., Chouya., et Madani T., 2002. Facteurs d'amélioration de la reproduction dans les systèmes ovins en zones semi-arides algériennes. Renc Rech. Ruminant, 2002. 9.
- Abdennabi L, Khaldi G 1995. Performances de reproduction d'un troupeau ovin prolifique de race barbarine .Ann. INRAT (sous presse).
- Atti N,t Abdennebi L., 1995. Etat corporel et performance de la race ovine Barbarine. CIHEM. Options Méditerranéennes.
- Bister JL., Raes, M. 2005. Analyse de certains paramètres pouvant influencer les résultats d'insémination artificielle chez la brebis. Filière Ovine et Caprine, 11, 10-11.
- Bouafia I, Lamara A. 2009. Analyse des performances de reproduction et de productivité de la brebis Ouled Djellal dans la ferme Ben Aïchouche à B.B.A. Thèse d'ingénieur d'Etat UFAS.86p.
- Boujenane I, CHIKHI A. 2006. Paramètres génétiques et phénotypiques des performances de reproduction des brebis des races Boujaâd et Sardi au Maroc. Revue.élev. vét. Pays trop, 59(1-4) : 51-57.
- Castonguay F., Dufour JJ., Laforest JP, Deroy LM. 1999. Synchronisation des chaleurs avec la GnRH pour utilisation en insémination chez les ovins. Rapport de re- cherche remis au CORPAG.
- Chellig R., 1992. Les races ovines algériennes. OPU, Alger, 80p.
- Chikhi H, Boujenane I. 2004. Paramètres génétiques des performances de croissance des agneaux de race Boujaâd. 11ème Renc. Rech. Ruminants : 408p.
- Dekhili M, Aggoune A. 2006. Paramètres génétiques de la productivité numérique des brebis Ouled Djellal. 13ème Renc. Rech. Ruminants :221.
- Dekhili M, Benkhlif R. 2005. Bilan portant sur les performances reproductives d'un troupeau de brebis Ouled Djellal. 12ème Renc. Rech. Ruminant.p 162.
- Dekhili M. 2002. Performances reproductives des brebis Ouled Djellal nées simples et doubles. 9ème. Renc. Rech. Ruminant.155p.
- Dekhili M. 2003. Relation entre le poids à la naissance des agneaux (Ouled Djellal) et le taux de sevrage à 90 jours.10ème Renc. Rech. Ruminant. 116p.
- Dekhili M. 2004. Etude de la productivité d'un troupeau de brebis de race Ouled Djellal. 11ème Renc. Rech. Ruminant.234p.
- Dekhili M. 2010. Fertilité des élevages ovins type « Hodna » en extensif dans la région de Sétif. www.uni-sétif.dz/revue « agriculture », n°0, 1-8.
- Harkat S, Lafri M. 2007. Effet des traitements hormonaux sur les paramètres de reproduction chez les brebis Ouled Djellal. Courrier du savoir n° 8 : 125-132.
- ITELV., 2001. Standard de la race ovine Ouled Djellal. Doc- Institut technique des ´elevages. Ain M'lila.9 p.
- Kerfal M., Chikhi A, Boulanouar B. 2005. Performances de reproduction et de croissance de la race D'man au domaine expérimental de l'INRA d'Er-Rachidia (Maroc). 12ème Renc. Rech. Ruminants: 206
- Lamrani F., Benyounes A., El Bouyahiaoui R., Toumi F, Sebbagh L. 2008. Effet du mode d'induction de la synchronisation des chaleurs sur le rendement productif des brebis Ouled Djellal. INRAA, 21 : 56-71.
- O'Brien A. 2002. Factsheet animal science: Flushing the ewe Flock: is it beneficial? Ontario. Ministry of agriculture and food. Order n° 02-055-AGDEX 433/22.
- Paguay R., Bister JL., Wergifosse F, Pirotte C. 2004. Effet de l'évolution du poids vif sur les performances de reproduction des brebis. 11ème Renc. Rech. Ruminants.397p.

- Tennah S. 1997. Contribution à l'étude des facteurs influençant les performances de reproduction des brebis Ouled Djellal sous différents traitements de synchronisation des chaleurs. Mémoire d'ingénieur agronome. INA El- Harrach. 93p.

أشغال الملتقى الدولي السادس
حول زراعة المناطق الجافة والواحات

« زراعة الواحات والتنمية المستدامة »

جرجيس- تونس

19-21 ديسمبر 2018

ر د م د 0330 - 7956

مجلة المناطق القاحلة

تصدر عن معهد المناطق القاحلة - مدنين - الجمهورية التونسية

عدد خاص

أشغال الملتقى الدولي السادس
حول زراعة المناطق الجافة والواحات

«زراعة الواحات والتنمية المستدامة»

جرجيس - تونس
19-21 ديسمبر 2018

جزء 2

46 (2020/1)

ديسمبر 2020