



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf

Faculté des Sciences de la nature et de la vie

Département de Biotechnologie

THÈSE

En vue de l'obtention du
Diplôme de Doctorat en Sciences

Présentée et Soutenue par :
Mebarki Lakhdar

Intitulé
Recherche d'activité biologique de molécules végétales
pour la lutte contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*.

Spécialité : *Biotechnologie*
Option : *Biotechnologie*

Le jury est composé de :

<i>Grade, Nom & Prénom</i>	<i>Statut</i>	<i>Domiciliation</i>
Pr Djabeur Abderrazak	Président	USTOMB
Pr Kaid Harche meriem	Rapporteur	USTOMB
Pr Kacem Mourad	Examineur	U Oran 1
Pr Fortas Zohra	Examineur	U Oran 1
Dr Makhloufi Ahmed	Examineur	U Bechar
Dr Benahmed Bouhafsoune Aicha	Examineur	USTOMB

Année Universitaire 2015 / 2016

Dédicace

Avec l'aide de Dieu tout puissant, j'ai pu achever ce travail que je dédie :

- *A la mémoire de mon très cher père.*
- *A ma très chère mère.*
- *A ma femme.*
- *A mes très chers enfants.*
- *A tous mes frères et mes beaux frères.*
- *A toutes mes sœurs et mes belles sœurs.*
- *A tous mes neveux et nièces.*
- *A tous mes cousins et cousines.*
- *A mon oncle et ma tante.*
- *A toute ma famille.*
- *A tous mes collègues et amis.*

Remerciements

الحمد لله رب العالمين

Ce travail a été réalisé sous la direction de Madame Kaid Harche Meriem, professeur et directrice du laboratoire de recherche de production, valorisation végétale et microbienne à l'université des sciences et de la technologie de Mohamed Boudiaf à Oran. Je suis très heureux de la exprimer ma très grande reconnaissance et le témoignage de mon profond attachement pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant la direction de ce travail. Pour l'attention qu'elle a porté à cette thèse, pour ses conseils et sa rigueur dans le travail. J'ai eu le privilège de bénéficier de son savoir et de sa grande expérience qui, alliés à ses qualités humaines resteront pour moi un modèle.

Un grand merci à Monsieur Djabeur Abderrazak, professeur à l'université des sciences et de la technologie de Mohamed Boudiaf à Oran, pour avoir assuré la présidence du jury de cette thèse, malgré toutes ses responsabilités et ses nombreuses occupations. Je le remercie très vivement et le prie de trouver ici un témoignage de mes sentiments respectueux.

J'exprime mes remerciements les plus sincères à Madame Benahmed Bouhafoun Aicha, maitre de conférences à l'université des sciences et de la technologie de Mohamed Boudiaf à Oran qui a bien voulu examiner ce manuscrit et juger ce travail, malgré ses multiples charges. Qu'elle trouve ici mes sincères remerciements et mon profond respect.

Je suis également très honoré que Monsieur Kacem Mourad et Melle Fortas Zohra, professeurs à l'université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella, ont accepté de juger et de siéger dans le jury de ma thèse. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance et de ma respectueuse gratitude.

Je dois remercier particulièrement Monsieur Makhloufi Ahmed, maitre de conférences et doyen de la faculté des sciences de la nature et de la vie à l'université de Tahri Mohamed à Bechar, d'avoir accepté de juger mes travaux de thèse en tant qu'examinateur. Qu'il trouve ici le témoignage de ma reconnaissance et de ma respectueuse gratitude, tout le plaisir est pour moi.

Je tiens à remercier aussi très chaleureusement Monsieur Benlarbi Larbi maitre assistant à l'université de Tahri Mohamed à Bechar pour sa franche collaboration dans la

fourniture du matériel fongique et l'identification moléculaire. Qu'il soit assuré de ma respectueuse et très sincère gratitude.

Evidemment, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur Boulenouar Ali maître assistant à l'université de Tahri Mohamed à Bechar et Monsieur Krim Mohamed directeur de l'Institut Technique De Développement De L'agronomie Saharienne à Abadla, pour leur aimable et efficace collaboration dans la fourniture des palmes de la variété de Takerbucht et la variété de Deglet Nour. Qu'ils trouvent ici mes sincères remerciements et mon profond respect.

Un grand merci à Mr. Akermi moulay m'hamed, maître assistant à l'université de Tahri Mohamed de Bechar pour sa précieuse aide et son soutien. Qu'il trouve ici l'expression de ma haute considération.

Mes remerciements sont également adressés à Monsieur Bouchta Baghdad, pour son aide précieuse au moment de l'étude statistique de mes résultats.

Je profite de cette occasion d'exprimer ma profonde reconnaissance à mon très cher frère Abderrazak, enseignants d'anglais et à Monsieur Ghomri Tedj, maître de conférences à l'université de Tahri Mohamed à Bechar, pour la lecture attentive de mes articles de publication en anglais.

Il m'est particulièrement agréable d'adresser un remerciement très chaleureux et très particulier à mes collègues enseignants de biologie à l'université de Tahri Mohamed à Bechar.

Je tiens à remercier aussi très chaleureusement tout le personnel des laboratoires pédagogiques de biologie à l'université de Tahri Mohamed à Bechar, et notamment: Missoum Mansour, Dahane Omar, Bendahou Bachir, Malouk Abdelkarim, El-arabi Abdelghani et Kadri Fatna.

Mes vifs remerciements s'adressent : A la lumière de ma vie, le plus beau don de dieu, avec elle je partage le plus sacré lien spirituel et affectif : ma mère ; que dieu la gardent.

Je remercie toutes les personnes qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à l'aboutissement de ce travail.

Merci 

***P*ublications et communications**

Ce travail a fait l'objet des publications et communications suivantes :

PUBLICATIONS INTERNATIONALES :

- 1. Mebarki Lakhdar**, Kaid Harche Meriem, Benlarbi Larbi, Kasmi Hamza, Matrouine Mohamed. 2015. *Bubonium graveolens* extracts for controlling *Fusarium oxysporum* f. *sp. albedinis*. Romanian Biotechnological Letters. 20(1):10026-10035.
- 2. Mebarki Lakhdar**, Kaid Harche Meriem, Benlarbi Larbi, Rahmani Amina and Sarhani Aicha. 2013. Phytochemical Analysis and Antifungal Activity of *Anvillea Radiata*. World Applied Sciences Journal. 26 (2): 165-171.

COMMUNICATIONS INTERNATIONALES AFFICHEES :

- 1. Mebarki L**, Kaid Harche M, Benlarbi L et Makhloufi A. « Effet antifongique des extraits de deux plantes médicinales sur *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis* : agent causal du bayoud ». 1^{er} Symposium International sur le Palmier Dattier, 13 et 14 Novembre 2011 ALGER, ALGERIE.
- 2. Mebarki L**, Kaid Harche M. « Antivirulence activity of flavonoids ». 5th BBBB International Conference, from Drug discovery and formulation strategies to Pharmacokinetics-pharmacodynamics. ATHENS on 26-28 September 2013.
- 3. Mebarki L**, M. Kaid Harche, L. Benlarbi, N. C. Archaoui, N. Gafa, H. Hasni. « In vitro antifungal effect of some *Cotula cinerea* extracts against the causative agent of bayoud disease and soil population assay ». The Second Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants. Antalya – TURKEY on April 22-25th, 2015.

العنوان: البحث عن النشاط البيولوجي لجزيئات نباتية لمكافحة الفيزاريوم وأوكسيبوروم ن ف البيدينييس

ملخص:

تهدف هذه الدراسة إلى البحث عن النشاط ضد الفطري لبعض المواد النباتية تجاه الفيزاريوم وأوكسيبوروم ن ف البيدينييس المسبب للذبول الوعائي لنخيل التمر. لهذا الغرض، تم تحضير مستخلصات فلافونويدية و أخرى متعددة السكر الجدرانية (السليروز، الهيميسيليلوز و البكتينات المثيلية) من أوراق و أزهار ثلاثة نباتات طبية (*Cotula cinerea* و *Bubonium graveolens* ، *Anvillea radiata*) تم قلعها من منطقة بشار، جنوب غرب الجزائر) ثم بعدها تم اختبار نشاطها ضد الفطري تجاه الفيزاريوم وأوكسيبوروم ن ف البيدينييس. بالمقابل، تم إجراء تحليل فيتوكيميائي أثبت غنو هذه النباتات بالمركبات الثانوية. عملية استخلاص المواد المراد دراستها أثبتت أن مردود السليروز كان معتبرا متبوعا بالهيميسيليلوز فالبكتينات المثيلية ثم الفلافونويدات. نتائج النشاط ضد الفطري أثبتت أن الفلافونويدات كانت لها أكثر فعالية على النمو الفطري العرضي مقارنة بإنبات الأبواغ و تشكل الأبواغ. في حين أن مجموعة الهيميسيليلوز و البكتينات المثيلية كانت أكثر تثبيطا لإنبات الأبواغ و تشكل الأبواغ مقارنة بالنمو الفطري العرضي. كذلك أوساط الاستنبات المشكلة من السليروز كانت لها أكثر فعالية على إنبات الأبواغ و تشكل الأبواغ مقارنة بالنمو الفطري. المستخلصات السليروزية استعملت أيضا في تشكيل أوساط استنبات سائلة أين تمت دراسة قدرة الفطر على تشكيل الكتلة الحيوية، حيث أظهرت النتائج أن الكتلة الحيوية المشكلة في أوساط الاستنبات ذات الدعامة السليروزية كانت ضعيفة مقارنة بتلك المشكلة في وسط PDB. من جهة أخرى، تمت معالجة عينات من التربة المعقمة بالمستخلصات المدروسة فتم التوصل إلى أن هذه المستخلصات كانت فعالة في 59.16% من الاختبارات. بعد ذلك، تم تقييم فعالية الفلافونويدات تجاه السمية النسبية، تشكل السموم و على نشاط إنزيم السليلاز لدى الفطر. أظهرت النتائج أن الفلافونويدات أنقصت السمية النسبية للفطر في 80% من الحالات. في حين أن الفلافونويدات المستخلصة من نبات *Bubonium graveolens* وحدها التي تثبتت تشكل السموم لدى الفطر. من جهة أخرى تم تثبيط نشاط إنزيم السليلاز من طرف الفلافونويدات المستخلصة من جميع النباتات.

الكلمات المفتاحية: بشار، النشاط البيولوجي، الفلافونويدات، الفيزاريوم وأوكسيبوروم ن ف البيدينييس،

جزيئات نباتية، متعددات السكر الجدرانية.

Title: Search of biological activity of plant molecules for controlling *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*.

Abstract:

This work focuses on the research of the antifungal activity of some plant substances against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa), the causal agent of vascular wilt of date palm. For this, flavonoid extracts and cell wall polysaccharide extracts (cellulose, hemicellulose and methylated pectins (MP)) were prepared from the leaves and flowers of three medicinal plants (*Anvillea radiata*, *Bubonium graveolens* and *Cotula cinerea* which were harvested in the region of Bechar, southwest of Algeria) and then were evaluated for their antifungal effect against Foa. Parallel to this study, a phytochemical analysis was performed for these three species and it has shown that they are rich in secondary metabolites. The extraction showed that the yield of cellulose was the most important, followed by hemicellulose, MP and flavonoids. The results of the antifungal activity showed that the flavonoids are more fungitoxic on mycelial growth compared with the germination and the sporulation. By cons, hemicelluloses and MP are more effective on sporulation compared with the germination and the radial growth. Similarly, cellulose-based media were more effective on germination and sporulation compared with the radial growth. The cellulosic extracts were also used to reconstitute a liquid medium on which the development of the fungal biomass was investigated. The biomass formed into cellulose-based media of 3 medicinal plants was less important compared to the PDB. In another part, these extracts were added to soil inoculated with Foa. The results of this test indicated that the various extracts used were active in 59.16% of the tests. Thereafter, Flavonoids were evaluated for their effects on relative virulence, mycotoxigenese and cellulase activity of Foa. The results have shown that flavonoids have reduced the relative virulence of Foa in 80% of tests. By cons, only the flavonoids of *B. graveolens* have prevented the synthesis of Foa toxins. Moreover, the cellulase activity was inhibited by the flavonoid extracts of all plants tested.

Keywords: Bechar; biological activity; flavonoïdes ; cell wall polysaccharides; *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*; plant molecules.

Titre : Recherche d'activité biologique de molécules végétales pour la lutte contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*.

Résumé :

Ce travail s'intéresse à la recherche de l'activité antifongique de quelques molécules végétales vis-à-vis *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa), agent pathogène responsable à la fusariose vasculaire chez le palmier dattier. Pour cela, des extraits flavonoïdiques et polysaccharidiques pariétaux (cellulose, hémicellulose et pectines méthylées (PM)) ont été préparées à partir des feuilles et des fleurs de trois plantes médicinales (*Anvillea radiata*, *Bubonium graveolens* et *Cotula cinerea*, récoltées dans la région de Bechar, sud ouest Algérien) et ont ensuite été évalués pour leur effet antifongique contre Foa. Parallèlement à cette étude, une analyse phytochimique a été effectuée pour ces trois espèces dont elle a montré leur richesse en métabolites secondaires. L'extraction a montré que le rendement en cellulose était le plus important suivi par l'hémicellulose, les PM et en fin les flavonoïdes. Les résultats de l'activité antifongique ont montré que les flavonoïdes sont plus fongitoxique sur la croissance mycélienne que sur la germination et la sporulation. Par contre, les hémicelluloses et les PM sont plus efficaces sur la sporulation que sur la germination et la croissance radiale. De même, les milieux à base de cellulose sont montrés plus efficaces sur la germination et la sporulation que sur la croissance radiale. Les extraits cellulosiques ont été utilisés aussi pour reconstituer un milieu liquide sur lequel le développement de la biomasse du champignon a été étudié. La biomasse formée en milieux à base de cellulose des 3 plantes médicinales était moins importante comparativement au PDB. Dans une autre partie, ces mêmes extraits ont été additionnés à des sols inoculés par Foa. Les résultats de ce test ont indiqué que les différents extraits utilisés sont montrés actifs dans 59.16 % des tests. Par la suite, Les flavonoïdes ont été évalués pour leurs effets sur la virulence relative, la mycotoxigenèse et l'activité cellulasique du Foa. Les résultats ont témoigné que les flavonoïdes ont réduit la virulence relative du Foa dans 80% des tests. Par contre, seuls les flavonoïdes de *B. graveolens* ont permis d'empêcher la synthèse des toxines chez le Foa. D'autre part, l'activité cellulasique a été inhibée par les extraits flavonoïdiques de toutes les plantes étudiées.

Mots clés : Bechar ; activité biologique ; flavonoïdes ; *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* ; molécules végétales ; polysaccharides pariétaux.

LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

Ø	Phase
ADN	Acide désoxyribonucléique
C.A.B.I	Centre international pour l'agriculture et les biosciences
CCM	Chromatographie sur couche mince
CLA	Cellulose des feuilles d' <i>Anvillea radiata</i>
CRA	Cellulose des fleurs d' <i>Anvillea radiata</i>
CLB	Cellulose des feuilles de <i>Bubonium graveolens</i>
CRB	Cellulose des fleurs de <i>Bubonium graveolens</i>
CLC	Cellulose des feuilles de <i>Cotula cinerea</i>
CRC	Cellulose des fleurs de <i>Cotula cinerea</i>
DP	degré de polymérisation
ED	Eau distillée
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
FAO	Food and Agriculture Organization
FLA	Flavonoides des feuilles d' <i>Anvillea radiata</i>
FRA	Flavonoides des fleurs d' <i>Anvillea radiata</i>
FLB	Flavonoides des feuilles de <i>Bubonium graveolens</i>
FRB	Flavonoides des fleurs de <i>Bubonium graveolens</i>
FLC	Flavonoides des feuilles de <i>Cotula cinerea</i>
FRC	Flavonoides des fleurs de <i>Cotula cinerea</i>
ha	Hectare
HLA	Hémicelluloses des feuilles d' <i>Anvillea radiata</i>
HRA	Hémicelluloses des fleurs d' <i>Anvillea radiata</i>
HLB	Hémicelluloses des feuilles de <i>Bubonium graveolens</i>
HRB	Hémicelluloses des fleurs de <i>Bubonium graveolens</i>
HLC	Hémicelluloses des feuilles de <i>Cotula cinerea</i>
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute
HRC	Hémicelluloses des fleurs de <i>Cotula cinerea</i>
J.-C	Jésus Christ
MEB	Microscope électronique à balayage
mM	milli molaire
mn	Minutes
nm	Nanomètre
O.E.P.P	Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes
PDA	Potatoes Dextrose Agar
PDAa	Potatoes Dextrose Agar acidified
PDB	Potatoes Dextrose Broth
PM	Pectines méthylées
PLA	Pectines hautement méthylées des feuilles d' <i>Anvillea radiata</i>
p/p	Rapport poids / poids
PR	protéines PR
PRA	Pectines hautement méthylées des fleurs d' <i>Anvillea radiata</i>
PLB	Pectines hautement méthylées des feuilles de <i>Bubonium graveolens</i>

PRB	Pectines hautement méthylées des fleurs de <i>Bubonium graveolens</i>
PLC	Pectines hautement méthylées des feuilles de <i>Cotula cinerea</i>
PRC	Pectines hautement méthylées des fleurs de <i>Cotula cinerea</i>
PTN	Poids des tissus nécrosés
p/v	Rapport poids / volume
RAPD	Random Amplification of Polymorphic Deoxyribonucleic acid
rf	Rapport frontal
t/mn	Tours par minute
UFC	Unité formant une colonie
UV	Ultra violet
VDN	Variété déglet noir
VR	virulence relative
v/v	Rapport volume / volume
VT	Variété Takerbucht
YES	Yeast Extract Sucrose

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 01: Morphologie du palmier dattier.	08
Figure 02: Régions phœnicicoles d'Algérie.	10
Figure 03: Organisation morphologique du Foa.	17
Figure 04: Cycle infectieux de <i>Fusarium oxysporum</i>	18
Figure 05: Situation épidémiologique du « Bayoud » du palmier dattier.	20
Figure 06: Origine biosynthétique des métabolites primaires et secondaires.	29
Figure 07: Aspect de la paroi cellulaire végétale en microscopie Electronique.	30
Figure 08: Vue perspective d'une paroi ligneuse.	31
Figure 09: Représentation schématique de la paroi primaire végétale des plantes à fleurs (type I) pendant l'élongation cellulaire.	32
Figure 10: Représentation schématique de la paroi primaire végétale des plantes à fleurs (type I).	32
Figure 11: Composés chimiques de la paroi des cellules de bois (exprimés en % massique) et leur distribution.	33
Figure 12: Liaisons hydrogène intra et intermoléculaires dans la cellulose.	35
Figure 13: Exemples de structures d'hémicelluloses.	36
Figure 14: Monomères constitutifs de la lignine.	38
Figure 15 : Structure de base des flavonoïdes.	41
Figure 16: Structure des différentes classes de flavonoïdes.	42
Figure 17: Schéma simplifié de la biosynthèse des flavonoïdes.	44
Figure 18: Morphologie générale d' <i>Anvillea radiata</i> Coss et Dur.	51
Figure 19: Morphologie générale de <i>Bubonium graveolens</i> .	52
Figure 20: Morphologie générale de <i>Cotula cinerea</i> .	52
Figure 21: Situation géographique de la région de récolte.	58
Figure 22: Protocole d'extraction des flavonoïdes.	65
Figure 23: Protocole experimental pour la préparation du résidu pariétale.	67

Figure 24:	Protocole d'extraction de la cellulose et des hémicelluloses.	69
Figure 25:	Protocole d'extraction des PM.	70
Figure 26:	Schéma représentant l'effet des flavonoïdes sur l'activité cellulasique du Foa	76
Figure 27:	Séquence génomique de la région de l'ARN 18S de la souche fongique	144
Figure 28:	Résultats de l'alignement de la séquence obtenue utilisant le programme BLAST	145
Figure 29:	Taux d'humidité et de la matière sèche.	79
Figure 30:	Rendement de l'extraction.	81
Figure 31:	Effet des flavonoïdes sur la germination des spores.	82
Figure 32:	Effet des extraits polysaccharidiques pariétaux sur la germination des spores.	83
Figure 33:	Effet des extraits sur la croissance mycélienne de Foa.	86
Figure 34:	Evolution du diamètre du tapis mycélien en fonction du temps et de la source de cellulose.	88
Figure 35:	Effet des flavonoïdes sur la sporulation.	89
Figure 36:	Effet des extraits polysaccharidiques pariétaux sur la Sporulation.	90
Figure 37:	Chromatogramme des filtrats de cultures de FOA en présence des extraits des flavonoïdes.	100
Figure 38:	Effet des flavonoïdes sur l'activité cellulasique.	100

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 01: Production mondiale des dattes.	13
Tableau 02: Classification botanique des plantes étudiées.	50
Tableau 03: Appellations vernaculaires des plantes étudiées.	50
Tableau 04: Caractéristiques techniques de l'identification moléculaire	144
Tableau 05: Echelle de notation.	72
Tableau 06: Résultats de l'analyse phytochimique de la partie aérienne plantes étudiées.	80
Tableau 07: Notations attribuées aux cultures fongiques après 7 jours d'incubation.	88
Tableau 08: Résultats statistiques de l'effet des extraits sur la germination des spores.	149
Tableau 09: Résultats statistiques de l'effet des extraits sur la croissance mycélienne.	150
Tableau 10: Résultats statistiques de l'effet des extraits sur la sporulation.	151
Tableau 11: Aptitude de productivité des souches en biomasses dans des milieux liquides à base de cellulose.	91
Tableau 12: Densités de la population du Foa dans le sol en fonction du temps après un traitement du sol par les flavonoïdes.	92
Tableau 13: Densités de la population du Foa dans le sol en fonction du temps après un traitement du sol par les extraits PM.	93
Tableau 14: Densités de la population de Foa dans le sol en fonction du temps après un traitement du sol par les extraits Hémicellulosiques.	94
Tableau 15: Densités de la population du Foa dans le sol en fonction du temps après un traitement du sol par les extraits cellulosiques.	96
Tableau 16: Résultats comparatifs indiquant la densité de la population du Foa dans le sol en fonction du temps après un traitement	

	du sol par les différents extraits.	97
Tableau 17:	Résultats statistiques de l'effet des extraits sur la densité fusarienne dans le sol.	152
Tableau 18:	Effet des flavonoïdes sur la virulence relative de Foa.	98
Tableau 19:	Table de Fisher.	154

LISTE DES PHOTOS

	Page
Photo 01: Organes de reproduction asexuée de Foa au MEB.	17
Photo 02: 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.	21
Photo 03: Photos de terrain des pieds entiers des plantes médicinales dans la région de Ksi-ksou (Béchar)	59
Photo 04: Culture de Foa sur milieu PDA.	78
Photo 05: Observation microscopique de la souche Foa après micro-culture.	78
Photo 06: Observation des spores germées et non germées sous microscope optique x40.	82
Photo 07: Résultats de la croissance radiale du Foa en présence des flavonoïdes.	87
Photo 8: Culture de Foa sur milieux cellulose-agar et sur milieu PDA.	88
Photo 9: Effet nécrotique du Foa.	99

DEDICACE	
REMERCIEMENTS	
PUBLICATIONS ET COMMUNICATION	
ملخص	i
ABSTRACT	ii
RESUME	iii
Liste des abréviations	iv
Liste des figures	vi
Liste des tableaux	viii
Liste des photos	x
Table des matières	xi
Introduction générale	01

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 :

LA FUSARIOSE VASCULAIRE CHEZ LE PALMIER DATTIER

1. Introduction	06
2. La plante-hôte	06
2.1. Systématique du palmier dattier	06
2.2. Description botanique du palmier dattier	07
2.3. Ecologie du palmier dattier	08
2.4. Diversité génétique du palmier dattier	09
2.5. Répartition géographique de la culture du palmier dattier	09
2.6. Mode de propagation du palmier dattier	11
2.7. Importance de la culture du palmier dattier dans le monde et en Algérie	12
2.8. Contraintes de la culture du palmier dattier	14
3. L'agent pathogène du Bayoud	15
3.1. Taxonomie	15
3.2. Morphologie, biologie et épidémiologie de Foa	16
3.3. Production de toxines chez Foa.....	19
4. La fusariose vasculaire du palmier dattier	20
4.1. Origine et distribution géographique du bayoud	20
4.2. Symptomatologie du bayoud	20
4.3. Importance des dégâts du bayoud	22
4.4. Mécanismes de défense et de résistance du palmier dattier	22
4.5. Notions de cultivars résistants	24
4.6. Stratégies de lutte contre le bayoud	24
4.6.1. Mesures prophylactiques	24
4.6.2. Techniques culturales.....	25
4.6.3. Lutte chimique	25

4.6.3. Lutte génétique	25
4.6.4. Lutte biologique	26

CHAPITRE 2 :

APERÇU SUR LES POLYSACCHARIDES PARIETAUX ET LES FLAVONOÏDES

1. Introduction	29
2. Les polysaccharides pariétaux	30
2.1. Organisation de la paroi végétale	30
2.2. Les principaux constituants de la paroi végétale	34
2.2.1. La cellulose	34
2.2.2. Les hémicelluloses	35
2.2.3. Les pectines	37
2.2.4. Les lignines	37
2.2.5. Autres constituants.....	39
2.3. Activités biologiques des polysaccharides végétaux	39
2.4. Rôles des polysaccharides pariétaux dans la défense plantes	40
3. Les flavonoïdes.....	41
3.1. Définition	41
3.2. Structure chimique et classification.....	41
3.3. Distribution et localisation	42
3.4. Biosynthèse des flavonoïdes.....	43
3.5. Activités biologiques des flavonoïdes	44
3.6. Rôles des flavonoïdes chez les plantes	45

CHAPITRE 3 :

GENERALITES SUR LES PLANTES MEDICINALES

1. Historique	48
2. Domaine d'application	48
3. Présentation des plantes étudiées	49
3.1. Famille des Astéracées	49
3.2. Classification botanique des plantes étudiées	49
3.3. Nomenclature vernaculaire	50
3.4. Description botanique	51
3.5. Répartition géographique	53
3.6. Composition chimique	53
3.7. Utilisation traditionnelle des plantes étudiées	54

PARTIE EXPERIMENTALE

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel fongique	57
1.1. Provenance de la souche.....	57
1.2. Conservation de la souche	57

1.3. Tests de confirmation de l'identité de la souche fongique.....	57
1.3.1. Identification morphologique	57
1.3.2. Identification moléculaire.....	58
2. Matériel végétal et sa provenance	58
3. Détermination de la teneur en eau dans le matériel végétal	60
4. Analyses phytochimiques	60
5. Préparation des extraits	64
5.1. Extraction des flavonoïdes	64
5.2. Préparation des extraits polysaccharidiques	66
5.2.1. Préparation du résidu pariétal	66
5.2.2. Extraction des hémicelluloses et isolement de la cellulose	68
5.2.3. Extraction des pectines méthylées.....	70
6. Testes antifongiques.....	71
6.1. Effet des extraits sur la germination des spores.....	71
6.2. Effet des extraits sur la croissance mycélienne.....	71
6.3. Effet des extraits sur la sporulation	72
6.4. Production de la biomasse dans des milieux liquides à base de cellulose	72
6.5. Effet des extraits sur la densité de population du Foa dans le sol en laboratoire	73
6.6. Effet des flavonoïdes sur la virulence relative de Foa	73
6.7. Effet des flavonoïdes sur la mycotoxinogénèse et la production de biomasse.....	74
6.8. Effet des flavonoïdes sur l'activité cellulasique du Foa	75
7. Etude statistique	76

RESULTATS

1. Tests de confirmation de l'identité de la souche fongique.....	78
1. Détermination de la teneur en eau dans le matériel végétal	79
2. Analyses phytochimiques	79
3. Rendement de l'extraction	80
4. Tests antifongiques	81
4.1. Effet des extraits sur la germination des spores	81
4.2. Effet des extraits sur la croissance mycélienne.....	84
4.3. Effet des extraits sur la sporulation	89
4.4. Production de la biomasse dans des milieux liquides à base de cellulose	91
4.5. Effet des extraits sur la densité de population du Foa dans le sol en laboratoire	92
4.6. Effet des flavonoïdes sur la virulence relative de Foa.....	98
4.7. Effet des flavonoïdes sur la mycotoxinogénèse et la production de biomasse.....	99
4.8. Effet des flavonoïdes sur l'activité cellulasique du Foa	100

DISCUSSION

1. test de confirmation de l'identité de la souche fongique.....	102
2. Analyses physicochimiques	103
3. Effet des extraits sur les différents stades de vie de Foa	104

3.1. Effet des flavonoïdes	104
3.2. Effet des polysaccharides	105
4. Production de la biomasse dans des milieux liquides à base de cellulose	107
5. Effet des extraits sur la densité de population du Foa dans le sol en laboratoire	108
6. Effet des flavonoïdes sur la virulence relative du Foa.....	109
7. Effet des flavonoïdes sur la mycotoxinogénèse et la production de biomasse.....	110
8. Effet des flavonoïdes sur l'activité cellulasique du Foa	111
<hr/>	
<i>CONCLUSION GENERALE</i>	113
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	118
<i>ANNEXES</i>	143
<hr/>	

Introduction Générale

Introduction générale

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) causée par un champignon d'origine tellurique *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* (**Killian et Maire 1930**), est la maladie la plus destructive et la plus menaçante dans l'Afrique du nord. Elle est répandue surtout au Maroc et dans une grande partie des palmeraies de l'Algérie (**Pereau Leroy 1958 ; Djerbi 1982 ; Robert et Benkhalifa, 1991**). En effet, au cours d'un siècle, il a détruit plus de dix millions de palmiers au Maroc (**Pereau Leroy 1958**) et trois millions en Algérie (**Djerbi, 1982**). 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 phoeniculteurs qui finissent par céder.

En effet, diverses méthodes de lutte ont été élaborées dans la stratégie de contrôle de cette maladie. Face aux nombreux problèmes socio-économiques et environnementaux liés à la lutte chimique, des méthodes de lutte basées sur la résistance variétale ont été explorées (**Kra et al., 2009**). 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**). Au Maroc, des palmiers que l'on croyait résistants se sont avérés sensibles 8 à 10 ans après leur plantation (**Bounaga et Djerbi, 1990**). De même et selon **Dihazi (2012)**, De nombreux efforts ont été déployés pour lutter contre cette maladie mais aucun n'a apporté des mesures efficaces susceptibles de limiter les dégâts dus à cette menace.

Dans ce contexte, des méthodes alternatives de lutte contre les phytopathogènes ont été étudiées en mettant l'accent sur de nouveaux composés dérivés de sources végétales (**Garibaldi et al., 1990 ; Alabouvette, 1999**). En effet, les plantes médicinales et leurs extraits ont également été signalés comme agents antimicrobiens efficaces contre les champignons de stockage des aliments et de céréales, contre les agents pathogènes foliaires, les pathogènes du sol et dans le contrôle de la fusariose vasculaire de plusieurs cultures (**Bowers et Locke, 2000 ; Kra et al., 2009 ; Soro et al., 2010 ; Hadian et al., 2011 ; Doumbouya et al., 2012**). Or, les plantes médicinales sont biodégradables et ne causent aucun problème de pollution dans la nature. Dans ce sens, les plantes médicinales représentent une source inépuisable des substances et composés naturels bioactifs. En effet,

La plante possède un métabolisme primaire qui lui permet d'élaborer des molécules indispensables à son cycle biologique telles que les polysaccharides qui assurent d'importantes fonctions, comme la régulation de la croissance, la défense contre les agents pathogènes et les stress environnementaux. De plus, plusieurs études montrent que les polysaccharides ont plusieurs activités biologiques et ils sont dotés de propriétés pharmacodynamiques permettant leur valorisation dans le domaine de la santé (**Diallo et al., 2001**). D'autre part, les plantes sont capables de produire aussi une grande diversité de produits ne participant pas à leur métabolisme de base, mais représentant plutôt des produits du métabolisme secondaire. Nous pouvons citer comme exemple les flavonoïdes qui sont des molécules synthétisées par les végétaux pour se défendre contre les agressions environnementales. De même, de nombreuses études ont prouvé que ces substances étaient capables d'inhiber différents types de microorganismes : bactéries, levures, moisissures, protozoaires et même virus (**Cushnie et Lamb, 2005**).

Les travaux de recherche de la présente thèse s'inscrivent dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules bioactives vis-à-vis du bayoud à partir de plantes spontanées connues pour leurs propriétés en médecine traditionnelle. Nous nous sommes proposés de cibler les polysaccharides pariétaux et les flavonoïdes (molécules présentant à la fois un rôle défensif chez les végétaux et des activités antimicrobiennes diverses) de trois plantes médicinales (*Anvillea radiata*, *Bubonium graveolens* et *Cotula cinerea*, espèces de la famille des Astéracées) et de les évaluer pour leurs activités antifongiques vis-à-vis *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. En effet, très peu d'études ont été réalisées.

Notre manuscrit est divisé en deux grandes parties : la première est une synthèse bibliographique comportant trois volets. Le premier présentera l'état des connaissances sur *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis* et la plante hôte ainsi que sur les différents moyens de lutte. Dans le deuxième volet, les principales caractéristiques structurales et biologiques des polysaccharides pariétaux et des flavonoïdes seront exposées. Enfin, un troisième volet donnera une description ethnobotanique des trois plantes médicinales utilisées dans cette étude.

La deuxième partie du manuscrit présentera le matériel et méthodes ainsi que les stratégies de la recherche mises en place. Dans cette partie seront détaillées les différents modes de préparation des extraits ainsi que les méthodes de l'évaluation de leurs activités antifusarienne. Les résultats obtenus au cours de ce travail seront présentés et discutés dans cette même partie.

Le manuscrit se termine par une conclusion générale et des perspectives.

Partie Bibliographique

Chapitre 1 :

**LA FUSARIOSE VASCULAIRE CHEZ
LE PALMIER DATTIER**

1. Introduction :

Plusieurs maladies affectent les plantes. En moyenne, chaque type de plante peut être affecté par une dizaine de maladies. Des pathogènes peuvent avoir comme spectre d'hôte quelques dizaines voire centaines d'espèces végétales. Les phytopathologies sont parfois regroupées par types de symptômes (pourriture racinaire, flétrissement, taches foliaires, rouilles, broussures, niellure), par type d'organe qu'elles affectent (maladies des racines, maladies des tiges, maladies des feuilles), par type de plantes affectées (herbacées, maraichères, ...), mais le critère le plus utile reste la classification du phytopathogène. Cette dernière classification présente un avantage qui réside dans le fait qu'elle permette de déterminer la cause de la maladie, son probable développement, les risques d'épidémie et les mesures de contrôle à prendre. Dans ce contexte, le genre *Fusarium* constitue généralement 5 à 10% de la population fongique des sols des régions sahariennes (**Amir et al., 1985**). Dans ce genre, l'espèce *F. oxysporum* est souvent un agent de trachéomycoses attaquant nombreuses plantes maraichères (tomate, cucurbitacées,...) et ornementales (œillet), ainsi que pour des cultures en plein champ telles que le coton, le bananier (la maladie de Panama) et le palmier dattier (maladie du Bayoud) causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa).

Le présent chapitre s'intéressera à un aperçu bibliographique sur la fusariose vasculaire du palmier dattier revêt donc, un caractère théorique en vue de familiariser le lecteur d'une part, au palmier dattier, son cycle de développement, sa multiplication,..., et d'autre part à l'agent pathogène, la maladie du « Bayoud » et les moyens de lutte contre cette maladie.

2. La plante-hôte :

Le palmier-dattier représente la plante-hôte principale menacée par la maladie du Bayoud est (**EOPP, 1994**). Le palmier dattier : *Phoenix dactylifera* L., provient du mot "*Phœnix* " qui signifie dattier chez les phéniciens, et *dactylifera* dérive du terme grec "*dactulos* " signifiant doigt, allusion faite à la forme du fruit (**Djerbi, 1994**).

2.1. Systématique du palmier dattier :

Le palmier dattier appartient à l'une des plus grandes familles d'angiospermes monocotylédones, celle des Palmaceae ou Arecaceae, représentée par 200 genres et 2700 espèces. Elle est répartie en six sous-familles. La sous-famille des Coryphoïdeae est elle même subdivisée en trois tribus. Le palmier dattier fait partie de la tribu des

Phœniceae qui ne comporte qu'un seul genre : «Phœnix» (**Bounaga, 1991**). Ce genre comprend plus d'une douzaine d'espèces qui semblent parfaitement distinctes selon **Barrow (1998)**.

La classification du palmier dattier donnée par **Djerbi (1994)**, est la suivante :

Groupe : *Spadiciflora*

Embranchement : *Angiospermes*

Classe : *Monocotyledones*

Ordre : *Palmales*

Famille : *Palmaceae*

Sous famille : *Coryphoideae*

Tribu : *Phœniceae*

Genre : *Phoenix*

Espèce : *Phoenix dactylifera* L.

2.2. Description botanique du palmier dattier :

Le palmier dattier est une plante monopodiale, basée sur un stipe ou tronc (pouvant atteindre 30 à 40 m de hauteur) cylindrique, robuste, droit, sans ramification, couverts par les bases de palmes mortes et couronné au sommet par une touffe de feuilles (palmes) vivantes (Figure 1), (**Munier, 1973 ;Zaid, 2002; EL Hadrami et El Hadrami, 2009**). Les palmes sont des feuilles composées, pennées insérées en hélice très rapprochées sur le stipe, par une gaine pétiolaire (= rachis) bien développée qui donne après sénescence un tissage fibreux (fibrillium) à feutrage appelé Lif; il apparaît 10 à 30 palmes par an et leurs croissance est basale (**Ouinten, 1996**). Les folioles sont disposées en position oblique le long du rachis, pliée longitudinalement en gouttière, la base du rachis porte des épines sur une longueur assez importante (**Munier, 1973**). Les palmes mesurent de 2 à 6 m de longueur et vivent 3 à 7 ans (**Toutain, 1979**).

Le palmier dattier est une plante dioïque avec un nombre chromosomique $2n = 36$, présentant un pied male et un pied femelle. Sur ce dernier sont récoltés les fruits sous forme de régimes de dattes formés à la suite d'une pollinisation croisée (allogame) assistée par l'homme dans le cas de plantations commerciales de dattiers (**Ben Abdallah, 1990**).

Le système racinaire est fasciculé et constitué de nombreuses racines grêles et longues qui explorent une grande surface verticale et horizontale du sol pour l'alimentation de la plante (**Munier, 1973**).

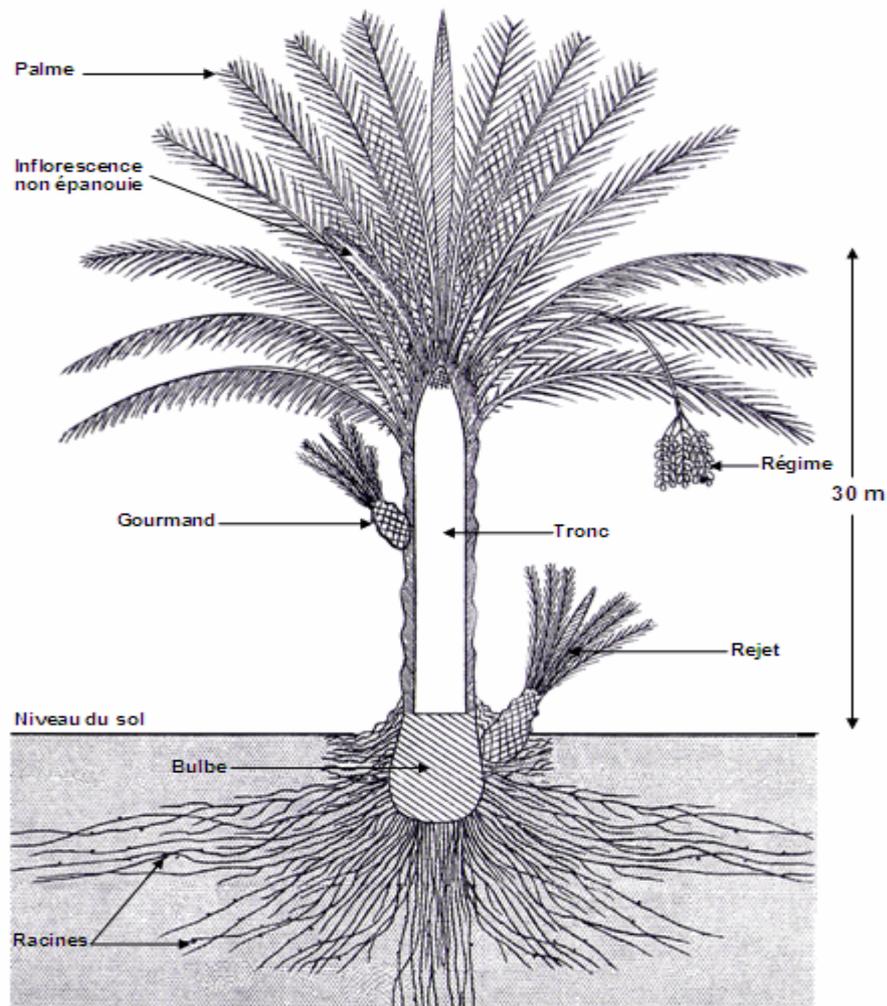


Figure 1: morphologie du palmier dattier (Munier, 1973)

2.3. Ecologie du palmier dattier :

Le palmier dattier à l'inverse de certaines *Arecaceae* ne vit pas en région tropicale humide, mais en région subtropicale sèche, valable pour les palmeraies algériennes. Il vit spontanément dans la plupart des régions du vieux monde où la pluviométrie est inférieure à 100 mm par an. Il a été introduit dans de nombreuses autres régions notamment en Argentine, au Brésil, en Afrique du Sud, aux USA, etc. Malgré, cette adaptation aux zones sèches, le palmier ne peut vivre sans eau souterraine disponible et/ou sous irrigation. Il est donc considéré comme une plante phréatophyte et héliophile. Il peut encore vivre et être productif en altitude, comme dans les oasis du plateau du Tassili et du Tibesti qui atteignent 1000 à 1500 m d'altitude (Munier, 1973).

2.4. Diversité génétique du palmier dattier :

Les différences existantes dans la qualité et la morphologie des fruits ont permis de distinguer ce que l'on appelle communément des variétés qui ne sont, en réalité que, des races ou métis ou phénotypes (**Munier, 1973 ; Bouguedoura, 1991**). La notion de variété repose essentiellement sur les caractéristiques du fruit. On ne peut donc appliquer le concept qu'aux individus femelles (**Bouguedoura, 1991**). Selon **Tirichine (1997)**, un cultivar (variété cultivée) désigne un ensemble d'individus aux caractéristiques phénotypiques homogènes et portant localement le même nom.

L'allogamie stricte, mode de reproduction du palmier dattier, favorise l'obtention d'hybrides, ce qui entraîne un nombre de génotypes sans cesse croissant. Le patrimoine phœnicicole mondial renferme plus de trois mille (3000) variétés réparties dans son aire de culture d'origine (**Zaid et al., 2002**).

L'inventaire variétal, réalisé dans une quinzaine de régions algériennes, a montré que les palmeraies conservent encore une importante diversité. En effet, 940 cultivars ont été recensés par **Hannachi et al. (1998)**. Mais, **Ben Khalifa (1989)** a dénombré 270 cultivars dans la seule région Ouest algérien. Dans le patrimoine phœnicicole algérien, la variété Deglet Nour représente la moitié des palmiers cultivés. D'autres variétés qui possèdent des caractéristiques intéressantes comme la résistance au bayoud (Takerboucht), la précocité (Ferrana, Chikh Mhammed, Warglya), la grosseur des dattes (Deglet Talmine) et la productivité (Deglet Jdir) sont également multipliées (**Hannachi et al., 1998**). La majorité de ces cultivars a fait l'objet de recherches sur l'évaluation de la diversité génétique à l'aide de marqueurs biochimiques et moléculaires corrélés à des caractéristiques intraspécifiques. Les marqueurs RAPD (= **Random Amplification of Polymorphic DNA**) révèlent de faibles polymorphismes et ne permettent pas de distinguer des groupes clairement distinctes (**Sedra et al., 1998a**).

Vu l'hétérozygotie des individus et l'hétérogénéité des descendances, les variétés sont propagées par plantation des rejets (djebbars) qui se forment naturellement à la base des stipes (**Saaidi et al, 1981**).

2.5. Répartition géographique de la culture du palmier dattier :

Le palmier dattier était primitivement cultivé dans les zones arides et semi-arides chaudes de l'ancien monde. Par la suite, il fut propagé en dehors de son aire d'extension et de culture (**Munier, 1973**). La majorité des dattiers près de 50%, se trouve en Asie particulièrement en Iran et en Irak. Le patrimoine phœnicicole de l'Afrique du Nord est

estimé à 26% du total mondial. Les limites extrêmes de développement du dattier se situent entre la latitude 10° Nord (Somalie) et 39° Nord (Elche en Espagne) (Toutain, 1973). L'aire principale est toutefois comprise entre 24° et 34° latitude Nord, où les meilleures conditions écologiques pour cette espèce sont réunies (Maroc, Algérie, Tunisie, Libye, Egypte, Irak ...). Aux Etats-Unis d'Amérique, le palmier dattier se trouve entre 33° et 35° latitude Nord (Toutain, 1973).

En Algérie, le palmier dattier constitue la principale culture au Sahara algérien entre 25° et 35° latitude Nord (Figure 2). Il occupe toutes les régions situées au Sud de l'Atlas saharien, depuis la frontière marocaine à l'Ouest jusqu'à la frontière tuniso-libyenne à l'Est (Djerbi, 1988), sur une superficie de 154.372 ha (FAO, 2007). Plus de 940 cultivars de dattiers sont inventoriés pour 16,5 millions de palmiers dattier (Ministère de l'Agriculture, 2006).

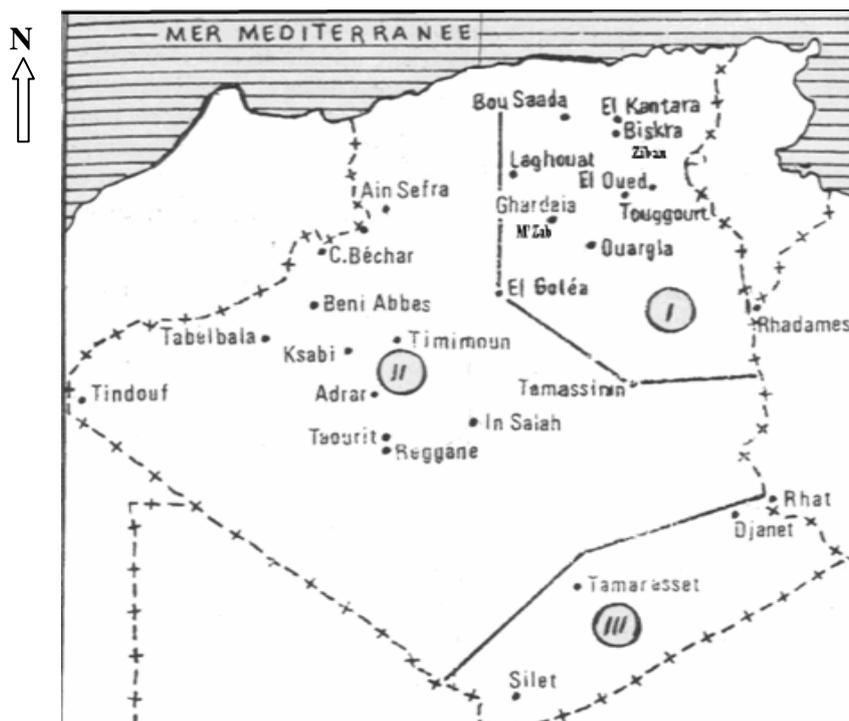


Figure 2 : Régions phœnicicoles d'Algérie (Munier, 1981).

I : Palmeraie orientale ou zone Est. II : Palmeraie occidentale

ou zone Ouest. III : Palmeraie méridionale ou zone

La composante variétale de l'ensemble des oasis Algériennes se caractérise par :

- Une prédominance totale de la Deglet Nour dans la zone Est englobant les Zibans, Oued Righ, Oued Souf, et à un degré moindre dans le M'Zab. Il faut noter en outre la présence dans ces palmeraies des cultivars Ghars, Mech Degla, Degla beïda et Akerbouch (**Hannachi et al., 1998**).
- Une dominance exclusive des variétés dites communes à faible valeur marchande dans la zone Ouest et la zone sub-saharienne. Les principales sont : Takerboucht, Cherka, Feggous, Hartane, et Timliha (**Hannachi et al., 1998**).

2.6. Mode de propagation du palmier dattier :

La multiplication du palmier dattier peut être réalisée par voie sexuée ou asexuée. Le dattier est dioïque : il existe des plants mâles et d'autres femelles. Seuls ces derniers sont producteurs de dattes, après pollinisation (naturelle ou artificielle). Les plants issus de reproduction sexuelle présentent un taux d'hétérozygotie élevé. Cette voie de multiplication par semis (par graine) présente un premier inconvénient : on est contraint d'attendre plusieurs années avant de pouvoir différencier les plants femelles des plants mâles et éliminer ces derniers. De plus, les qualités parentales sont très diluées dans des descendance génétiquement hétérogènes (**Fernandez et al., 1995**).

De ce fait, Les agriculteurs ont donc recours à la reproduction végétative réalisée par la transplantation des rejets émis au niveau de la base du tronc, permettant la reproduction à l'identique des caractères du pied-mère (multiplication végétative clonale), ce qui ne peut être réalisable avec le semis de graines (graine portant la moitié du stock génétique de chacun des parents, donc, une origine de la non-conformité génétique). Cependant, cette voie végétative s'avère un mode de propagation très limité. En effet, les rejets sont formés uniquement pendant la phase jeune du dattier et leur nombre est restreint (dix à quinze rejets) et ne peut répondre par conséquent aux besoins importants exigés par l'extension rapide des palmeraies. En outre, ce mode de multiplication est la principale cause de la dissémination de certaines maladies (**El Hadrami, 1995**).

Tous ces inconvénients conduisent à chercher de nouvelles méthodes de multiplication. En effet, L'application des biotechnologies au palmier dattier par la culture *In Vitro* réalisée avec les techniques de l'organogenèse et l'embryogenèse somatique constitue la voie la plus prometteuse pour multiplier cette espèce. Cependant, cette approche a nécessité le passage par des travaux sur la connaissance de la biologie du palmier (**Bougedoura et al., 1980 ; Bougedoura, 1982, 1991**). Ces techniques reposent sur le fait que les cellules

végétales sont totipotentes. Cette propriété fondamentale signifie que des cellules d'un tissu déjà spécialisées, donc différenciées, peuvent d'abord perdre cette spécialisation en revenant à un état méristématique, observé au niveau d'un cal (amas de cellules dédifférenciées) puis se différencient de nouveau pour redonner des cellules spécialisées d'un autre tissu.

Les cultures *In Vitro* consistent par conséquent à faire pousser en milieu aseptique des plantes entières, des fragments, des organes voire des cellules dans des milieux liquides ou solides et dans des conditions environnementales (température et photopériode) contrôlées. Tout cela en présence de régulateurs de croissance (phytohormones) naturels et/ou de synthèse qui permettent d'orienter le programme cellulaire vers les cals, les racines ou même la régénération de plantes entières (**Laberche, 1999**). Malgré l'avantage considérable de la conformité génétique des vitro-plants, les deux techniques de micro-propagation se trouvent limitées par de nombreux facteurs. Il s'agit notamment :

- De la lenteur dans la réactivité des explants.
- Des contaminations endophytiques.
- Des coefficients de multiplication faibles et aléatoires chez certains cultivars.
- Du brunissement des tissus et des milieux.
- De l'enracinement précoce des bourgeons et de la vitrification des tissus.
- Des pertes à l'acclimatation. (**El Hadrami, 1995**).

2.7. Importance de la culture du palmier dattier dans le monde et en Algérie :

La culture du palmier dattier représente une spéculation de subsistance extrêmement importante dans la plupart des régions désertiques. Indépendamment de la valeur énergétique des dattes, plus de 130 usages de ces dernières ont été identifiés auprès des populations oasiennes. Le palmier dattier a eu de tout temps une place privilégiée dans l'existence et le développement des oasis. Ceci s'explique essentiellement par des raisons agro-économiques. En effet, Le palmier dattier joue un rôle primordial sur le plan économique, grâce à la production de la datte, fruit et sous produits (pâte, farine, sirop, vinaigre, levure,...), qui sont la base de l'alimentation humaine et animale de ces régions.

Le nombre de palmiers dans le monde peut être estimé à plus de 100 millions d'arbres répartis essentiellement au Proche-Orient et en Afrique du Nord (**FAO, 2007**). L'Algérie a un effectif de plus de 16 millions de palmiers, dont plus de 4 millions de la variété Deglet-Nour (**Ministère de l'Agriculture, 2006**).

La production de dattes génère une importante activité commerciale et constitue une source de devises appréciables pour les pays producteurs. Cette production est principalement localisée dans les régions arides du nord de l'Afrique (Egypte, Algérie, Libye, Maroc, Tunisie, Soudan) et du sud-ouest de l'Asie (Iran, Arabie Saoudite, Iraq, Pakistan, Emirats Arabes Unis, Oman, Yémen, Qatar, Bahreïn, Jordanie).

Le rendement moyen mondial pour l'année 2004 était estimé à 5.353.090 tonnes et de 58,264 q/ha pour l'année 2005 provenant de 34 pays (FAO, 2004 ; FAO, 2007). Bien qu'une partie de la production mondiale de la datte soit autoconsommée, il existe un grand marché d'exportation estimé à 512.829 tonnes, notant que la France et l'Inde, sont les plus grands importateurs de dattes (FAO, 2004). Avec cette production mondiale, le palmier dattier compte parmi les principales productions fruitières tropicales et subtropicales.

La production annuelle de dattes en Algérie est de 516.293 tonnes dont 230.000 tonnes sont exportées, il s'agit de la variété Deglet Nour, elle représente à elle seule 2,43 millions de pieds, soit 47% de l'effectif total (Ministère de l'Agriculture, 2006). Les principales régions productrices de dattes sont (Tableau 1) :

Tableau 1 : Production mondiale des dattes (FAO, 2007).

Pays	Quantité de production (1000 tonnes)	(%)
Monde	5 087	100%
Méditerranée	2 075	41%
Egypte	1 170	23%
Iran	997	20%
Arabie Saoudite	970	19%
Algérie	516	10%
Pakistan	497	10%
Soudan	328	6%
Libye	181	4%
Chine	130	3%
Tunisie	125	2%
Maroc	48	1%

En plus de l'importance économique que revêt la phœniciculture, celle-ci joue également un rôle social car elle assure une certaine stabilité aux populations des Oasis (la datte et ses sous-produits constituent, le plus souvent, la base alimentaire humaine et animale).

Par ailleurs, cette culture assure un rôle écologique. En effet, le palmier dattier constitue l'élément fondamental de l'écosystème oasien, en freinant l'avancée du désert tout en créant sous son couvert un microclimat favorable au développement de nombreuses cultures sous-jacentes (arbres fruitiers, céréales, légumes...) (**Tirichine, 1997 ; Battesti, 2005**).

2.8. Contraintes de la culture du palmier dattier :

La culture du palmier dattier est confrontée à plusieurs contraintes abiotiques (sécheresse, stress salin) qui sont principalement dues au fait qu'il se développe sous des conditions désertiques hostiles. De plus, il est aussi confronté à plusieurs contraintes biotiques correspondant aux ravageurs du dattier. Les ravageurs du dattier s'attaquent à la plante elle-même et aux dattes sur pied, ou même entreposées. Certains ravageurs engendrent souvent des pertes économiques importantes sur la production de dattes. Parmi ces prédateurs, on peut citer:

- La Cochenille blanche (*Parlatoria blanchardi* Targ) qui colonise les différentes parties du palmier (palmes, hampes florales, fruits, ...) et forme un encroûtement qui peut recouvrir de grandes surfaces, empêchant la respiration et la photosynthèse ; la conséquence est un vieillissement rapide et une mort prématurée.
- Le Ver de dattes (*Ectomyelois ceratoniae* Zeller) qui infeste les dattes sur pied en plein champ et la prolifération se poursuit ensuite en entrepôts. Les chenilles issues des œufs pénètrent dans les fruits et donnent des dattes véreuses.
- Le Boufaroua (*Olygonychus afrasiaticus*), un acarien qui attaque surtout les dattes, leur donne un aspect rugueux, recouvert de toile et une couleur rougeâtre. Les fruits deviennent impropres à la consommation (**Munier, 1973**).
- Une nouvelle maladie appelée "Maladie des feuilles cassantes" à laquelle se trouve confronter le palmier dattier commence à prendre des proportions alarmantes. Cette maladie dont la cause demeure encore indéterminée a été découverte en Tunisie (**Takrouni et al., 1988; Triki et al., 2003**). Par la suite, elle a été signalée en Algérie dans les régions d'Adrar et du M'zab (**Djerbi, 1983**). Récemment, sa présence a été confirmée avec certitude dans la région de Biskra (**Saadi et al., 2006**).

- Le "Bayoud" est la principale maladie cryptogamique qui attaque le palmier dattier, elle est causée par *Fusarium oxysporum* f. sp. *albendis* (Foa). Elle a causé des dégâts importants dans les palmeraies marocaines et algériennes (**Djerbi, 1988; Fernandez et al., 1995**).

3. L'agent pathogène du Bayoud :

Le parasite responsable du Bayoud a été isolé pour la première fois en 1921, mais identifié seulement en 1934 par Malençon. Il 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**).

3.1. Taxonomie :

Le genre *Fusarium* appartient au phylum des Deutéromycètes (champignons imparfaits), car la plupart des espèces étaient d'abord décrites sur la base de caractères morphologiques et une reproduction sexuée n'a pas été observée. Ces formes imparfaites (anamorphes) sont caractérisées par un mycélium septé et la production de conidies hyalines généralement unicellulaires sur des conidiophores libres; elles sont classées dans le groupe des Moniliales (**Lepoivre, 2003**). De plus, *Fusarium* produit des macroconidies composées de 2 à plusieurs cellules. Leur forme recourbée typique avec une cellule apicale plus ou moins pointue est un des critères d'identification des représentants du genre ; dans beaucoup d'espèces on observe une cellule basale en forme de pied (**Seifert, 2001**). La production de métabolites secondaires et notamment de toxines (mycotoxines et phytotoxines) est courante parmi les *Fusarium*, et le profil de ces composés peut être utilisé pour la classification des espèces (**Thrane, 2001**).

Des formes sexuées (téléomorphes) ont été maintenant observées pour certaines espèces de *Fusarium*. Elles font toutes partie des Ascomycètes, de la famille des Nectriales et notamment des genres *Gibberella* et *Nectria* (**Seifert, 2001**).

Ainsi, *Fusarium oxysporum* est considéré comme ascomycète bien que le stade sexuel n'est pas encore déterminé. Il est proposé d'être plutôt proche du groupe téléomorphique *Gibberella* que *Nectria* (**Di Pietro et al., 2003, Michielse et Rep, 2009**). Au sein de

l'espèce *F. oxysporum* on distingue plus de 120 formes spéciales en fonction de leur pathogénicité sur des plantes hôtes (**Ramírez-Suero, 2009**).

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*

3.2. Morphologie, biologie et épidémiologie de Foa :

Les souches de Foa isolées du rachis de palmes infectées présentent une morphologie caractéristique : thalle de couleur rose saumon et mycélium frisé. Par contre, celles provenant du sol, de racines de palmiers et de certaines plantes de culture associées (Luzerne, Henné) considérées comme porteurs sains présentent une morphologie variée (**Djerbi et al., 1985 et 1985a; Sedra et Djerbi, 1985**).

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 3 et 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**).

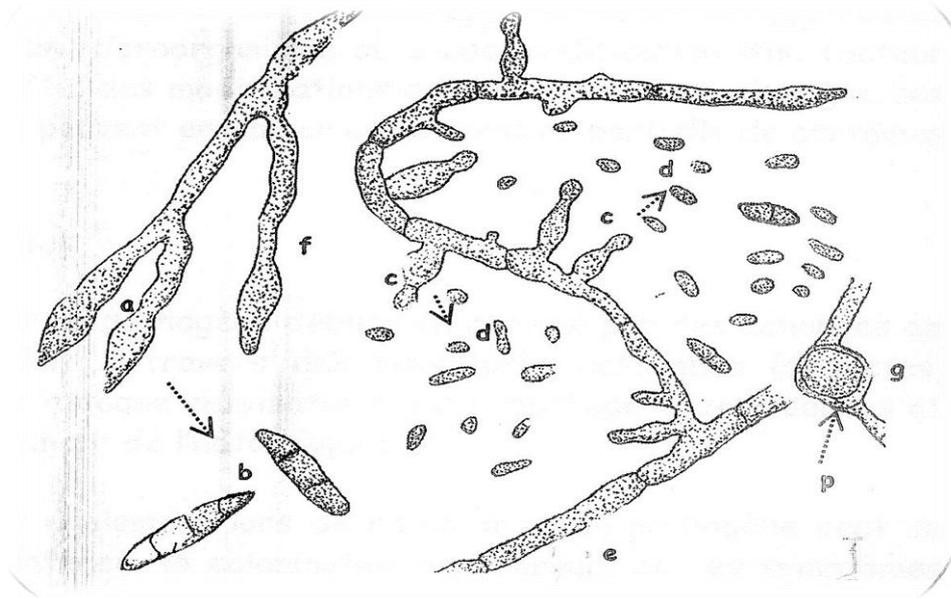


Figure 03 : Organisation morphologique du Foa (Boukaràa et Sissaoui, 1991).

a : macrophialides, b : macroconidies, c : microphialides, d : microconidies, e : mycélium hyalin et cloisonné, f : sporodochies, g : chlamyospore, p : paroi épaisse.

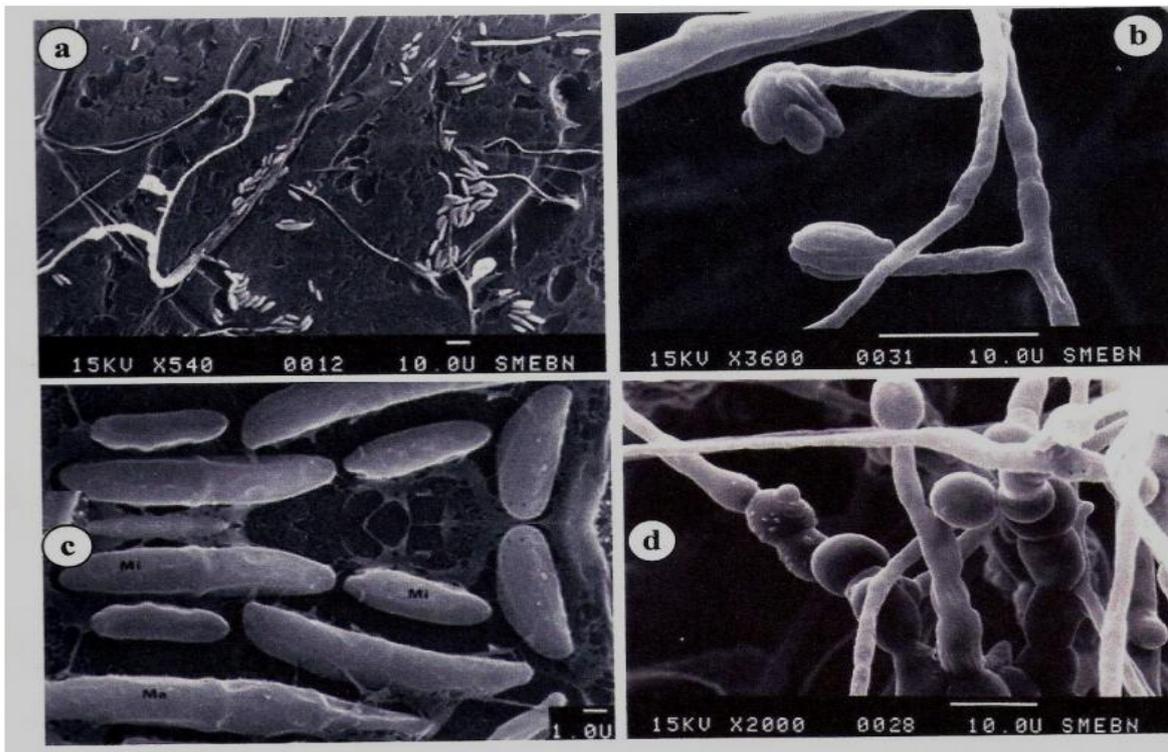


Photo 1 : Organes de reproduction asexuée de Foa au MEB (Rahmania, 2000).

a : mycélium et microconidies ; b : microphialides ; c : micro et macroconidies (Ma : macroconidies ; Mi : microconidies) ; d : chlamydoconidia formées à partir d'articles mycéliens.

Les chlamydo-spores 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 chlamydo-spores 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 (figure 4). Après la mort de l'arbre, le mycélium continue à se développer dans les tissus morts et forme de nombreuses chlamydo-spores dans les cellules du sclérenchyme (Louvet, 1977 ; Nelson, 1981).

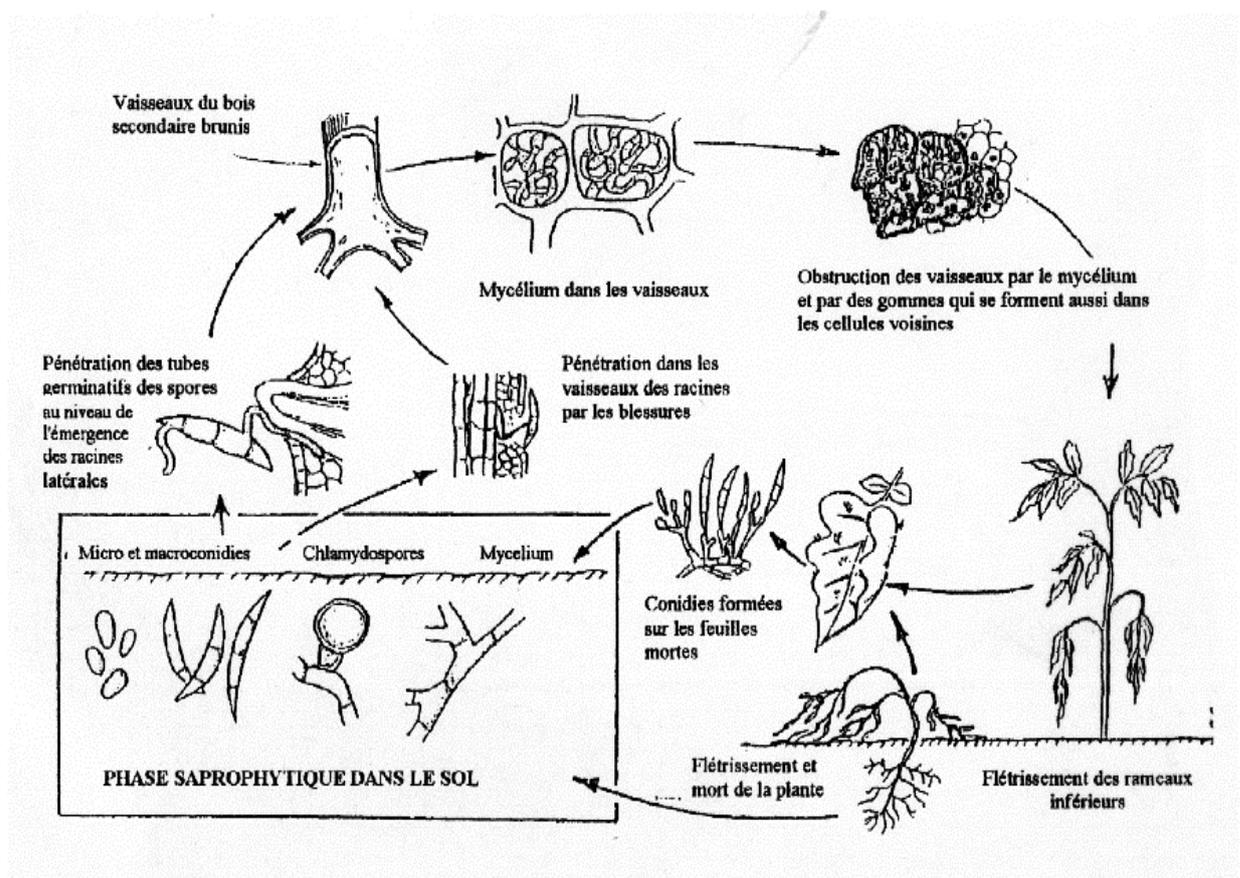


Figure 4 : Cycle infectieux de *Fusarium oxysporum* (Agrios, 1970).

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 (Louvet et Toutain, 1973; Sedra, 2003).

3.3. 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 (Moukhliiss, 1987) tels que les dérivés des acides fusariques. De même, le filtrat de culture du parasite a permis 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 (Amraoui et al., 2005; Sedra et al., 2008; 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). De plus, il existe une corrélation entre la sporulation, la croissance du champignon et la production quantitative des toxines. 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).

4. La fusariose vasculaire du palmier dattier :

4.1. Origine et distribution géographique du bayoud :

Le Bayoud fut observé pour la première fois vers 1870 dans la vallée du Draa au nord de Zagora et il a ensuite progressé vers l'ouest et surtout vers l'est en suivant les cordons des palmeraies (**Pereau-Leroy, 1958**) (Figure 5). En 1898, ce fléau atteint les palmeraies de Figuig et Béni Ounif situées côte à côte des deux côtés de la frontière algéro-marocaine (**Pereau-Leroy, 1958**). Entre 1920 et 1950, la maladie a contaminé les palmeraies du Sud algérien, puis durant la période 1960-1978, elle a gagné des palmeraies du centre de Sud algérien, la région de Mzab et El Goléa (**Djerbi, 1982**).

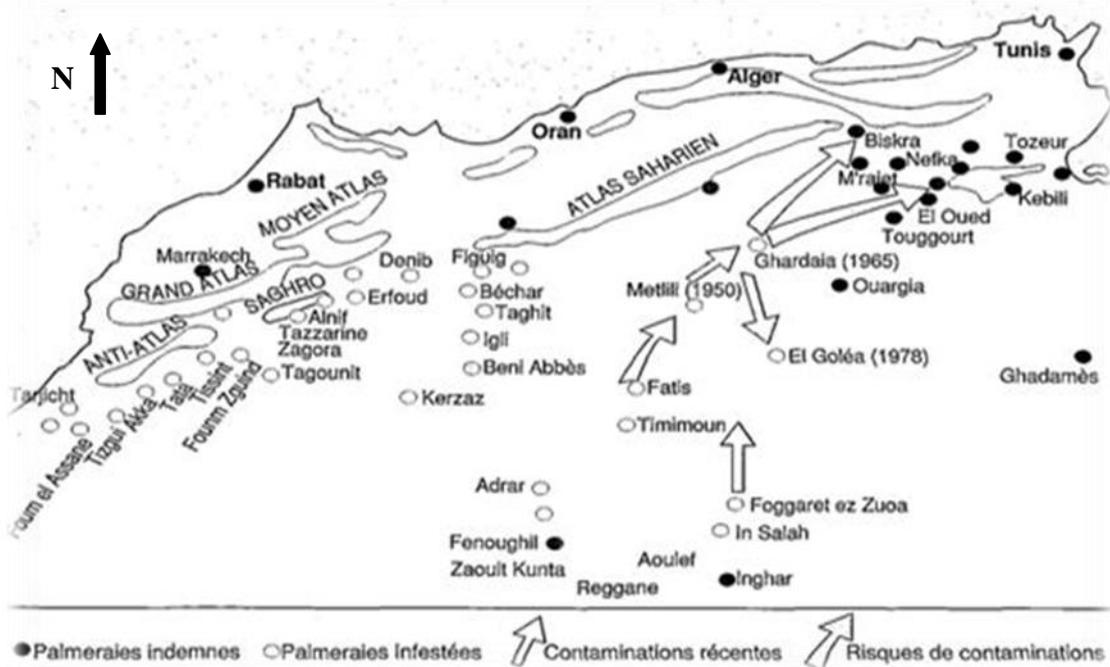


Figure 5: Situation épidémiologique du « Bayoud » du palmier dattier
(**Fernandez et al., 1995**).

La maladie a été découverte aussi dans les palmeraies mauritaniennes à Adrar et à Tagant, respectivement en 1995 et 2002 (**Sedra, 1995a, 1999a, b, 2003**). Les derniers foyers déclarés au Maroc en 1996 sont situés dans la Vallée de Ait Mansour (région de Tafraoute) (**Sedra, 1996**).

4.2. 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) (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 sont 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**).

4.3. Importance des dégâts du bayoud :

Le Bayoud est la maladie la plus destructive et la plus menaçante dans les pays maghrébins. En effet, cette maladie a détruit plus de 10 millions de palmiers au Maroc et plus de 3 millions en Algérie incluant surtout les variétés et les cultivars vigoureux et productifs et dont la datte s'avère de grande valeur commerciale. En effet, pendant 50 ans environ, l'effet destructeur de cette menace au Maroc a conduit à une réduction au 1/10 de l'effectif de la variété 'Mejhoul' et une disparition de deux cultivars Idrar et Berni. En outre, le Bayoud a non seulement entraîné une érosion génétique dans la population hôte mais aussi une accélération du phénomène de désertification et de l'exode rural des phoéniculteurs vers les grands centres urbains. Devant cette situation alarmante de l'extension de la maladie et vu l'importance des dégâts qu'il a occasionné, le Bayoud devient un ennemi majeur de la culture du palmier dattier dans le monde (**Sedra, 2013**).

4.4. Mécanismes de défense et de résistance 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 (**Heil, 2002 ; 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;
- 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.

4.5. Notions de cultivars résistants :

Selon **Fernandez et al., (1995)**, un inventaire du comportement des variétés traditionnelles a été réalisé à partir d'enquêtes sur le terrain ou d'essais en parcelles infestées naturellement. Il a été observé qu'une variation pratiquement continue de la sensibilité au Bayoud depuis des variétés totalement résistantes jusqu'aux plus sensibles comme la Bou Feggous, pratiquement disparue du Maroc. Toutefois, un classement a été établi qui sépare les variétés en trois catégories : résistante, tolérante et sensible. Les variétés tolérantes sont difficiles à caractériser. Certains arbres présentent des symptômes de Bayoud mais sont capables de survivre plusieurs années, contrairement aux palmiers de variétés sensibles. D'autres semblent sains, mais le parasite peut être isolé de leurs racines, ce qui n'est jamais le cas chez les plants résistants.

Dans ce contexte, plusieurs recherches ont montré que tous les cultivars nord-africains de qualité sont sensibles (Deglet Nour, Ghars, etc.). Certains cultivars ont une bonne résistance (Bou Sthammi noir, Bou Sthammi blanc, Tadment, Iklane, Sair Laylet, Bou Feggous ou Moussa au Maroc et Takerbucht en Algérie) mais, parmi ces cultivars, seuls Sair Laylet et Takerbucht sont de qualité acceptable, quand même inférieure à celle de Deglet Nour ou Mejhoul (**Toutain et Louvet, 1974; Saaidi, 1979**).

4.6. Stratégies 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 (**Bulit et al., 1967 ; Djerbi, 1982 ; Louvet et Toutain, 1973 ; Saaidi, 1979**).

4.6.1. 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 (**Quinten, 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 (OEPP, 1990 ; 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).

4.6.2. 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 ; Ollaguiet et Renard, 1976). 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).

4.6.3. 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 (Fredericks et al., 1988). 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.

4.6.3. 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. (Djerbi, 1991 ; 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 ont 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).

4.6.4. 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 (Sedra et Rouxel, 1989 ; 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 *Penicillium* (Chakroune et al., 2008). Il a été aussi montré que l'inoculation des racines de palmier dattier par des souches hypoaggressives 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 du Foa (**Boulenouar, 2011**) et sur son pouvoir de germination et de sporulation, ainsi que sur sa densité dans le sol (**Simoussa et al., 2010 ; Mebarki et al., 2013**).

Chapitre 2 :

APERÇU SUR LES POLYSACCHARIDES PARIÉTAUX ET LES FLAVONOÏDES

1. Introduction :

Bien que l'homme dépende des végétaux pour sa nutrition, l'humanité a souvent considéré les plantes comme des êtres primitifs, juste capables de croissance végétative intense. En fait, les plantes tirent leur énergie de la photosynthèse qui transforme l'eau et le gaz carbonique en matières plus ou moins complexes. L'énergie photosynthétique se répartit entre métabolisme primaire et métabolisme secondaire (Figure 6). Les molécules du métabolisme primaire (Acides organiques, acides aminés, protéines, sucres simples (polysaccharides), acides gras ou lipides) sont indispensables à la croissance et au développement du végétal. Maintenus à des concentrations stables, elles assurent l'intégrité structurale et fonctionnelle des cellules végétales. Par contraste, les molécules du métabolisme secondaire (Alcaloïdes, polyphénols, terpènes, stéroïdes) ne sont pas indispensables à la survie individuelle du végétal mais sont indispensables à la survie de la population. Leur fonction consiste à moduler les interactions de la plante avec son environnement (écran UV, défenses anti-pathogènes, molécules anti-oxydantes, signaux d'attraction des pollinisateurs ou d'insectes auxiliaires...).

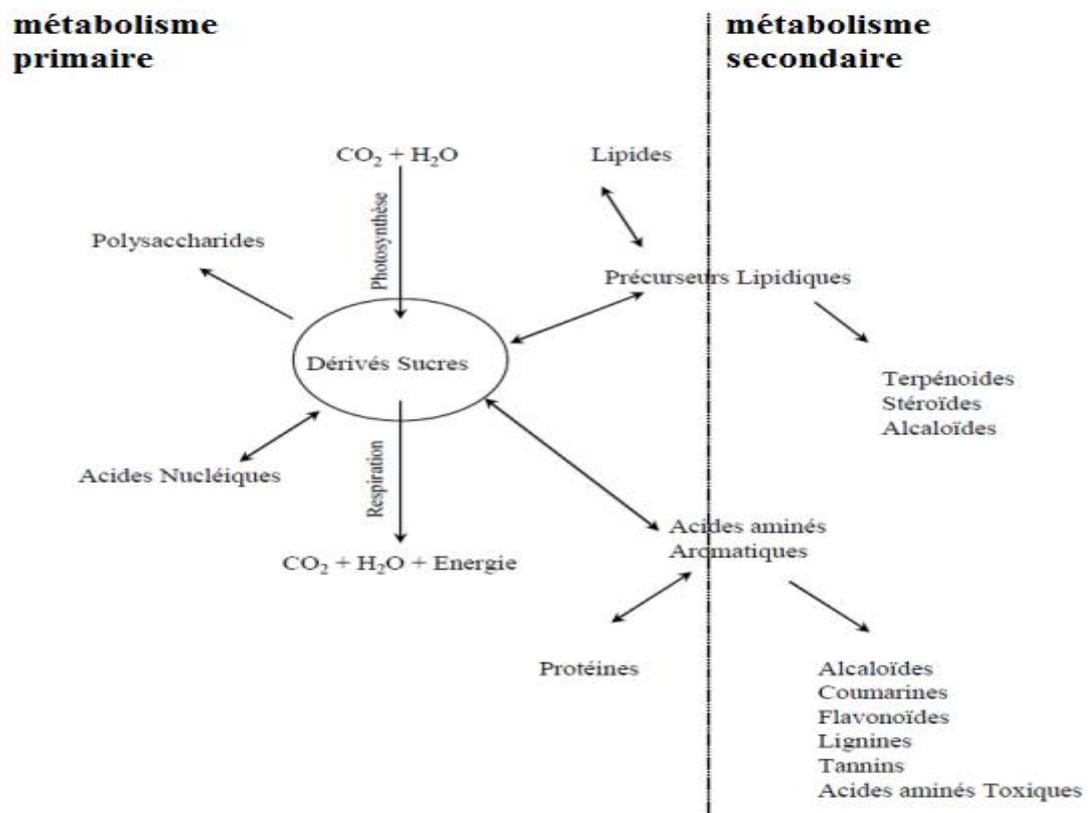


Figure 6 : Origine biosynthétique des métabolites primaires et secondaires.

Dans ce présent chapitre nous rapporterons les caractéristiques des principaux polysaccharides pariétaux et des flavonoïdes chez les végétaux supérieurs et leurs intérêts dans la défense des plantes contre les phytopathogènes.

2. Les polysaccharides pariétaux :

2.1. Organisation de la paroi végétale :

La paroi végétale est une structure extracellulaire organisée et complexe enveloppant la membrane cytoplasmique des cellules végétales, est un édifice multimoléculaire qui assure la rigidité et qui évolue en fonction de l'âge des tissus végétaux. Elle est composée de polymères dont la structure et a fortiori les voies de biosynthèse sont parmi les plus complexes connues dans la nature. De par sa position, la paroi fait le lien entre le milieu extérieur et le plasmalemme. C'est une structure rigide micro-fibrillaire enrobée d'une matrice hydrosoluble et gélifiante. Différents niveaux d'organisation vont lui conférer son aspect dynamique et rigide. En effet, elle doit être modelable au rythme de la croissance chez les cellules jeunes, tout en restant ferme afin d'assurer son rôle de barrière protectrice et permettre la cohésion des cellules. Elle doit s'opposer aux chocs osmotiques, à la dessiccation, aux rayons ultraviolets tout en permettant les échanges intercellulaires et le passage des substances nécessaires au métabolisme cellulaire (Moine, 2005). Ces exigences à la fois antagonistes et complémentaires, sont à l'origine de la complexité de la paroi cellulaire végétale dont l'organisation repose sur trois territoires bien identifiés (figure 7 et 8):

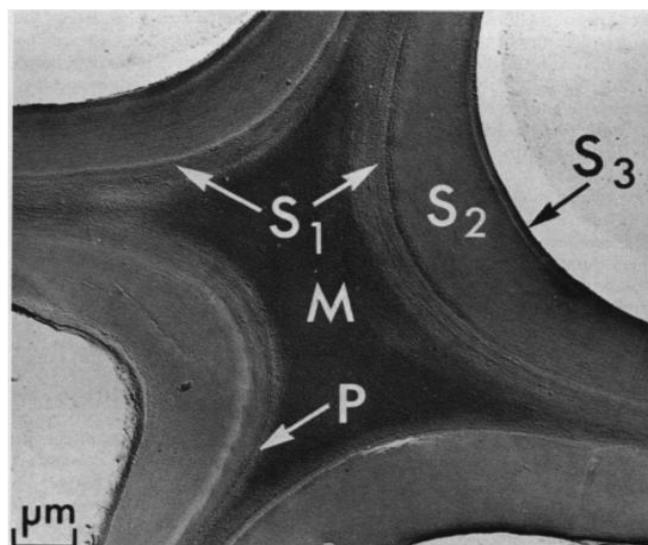


Figure 7 : Aspect de la paroi cellulaire végétale en microscopie électronique d'après Sjöström et Westermarck (1999). M : lamelle moyenne ; P : paroi primaire ; S1, S2, S3 : paroi secondaire.

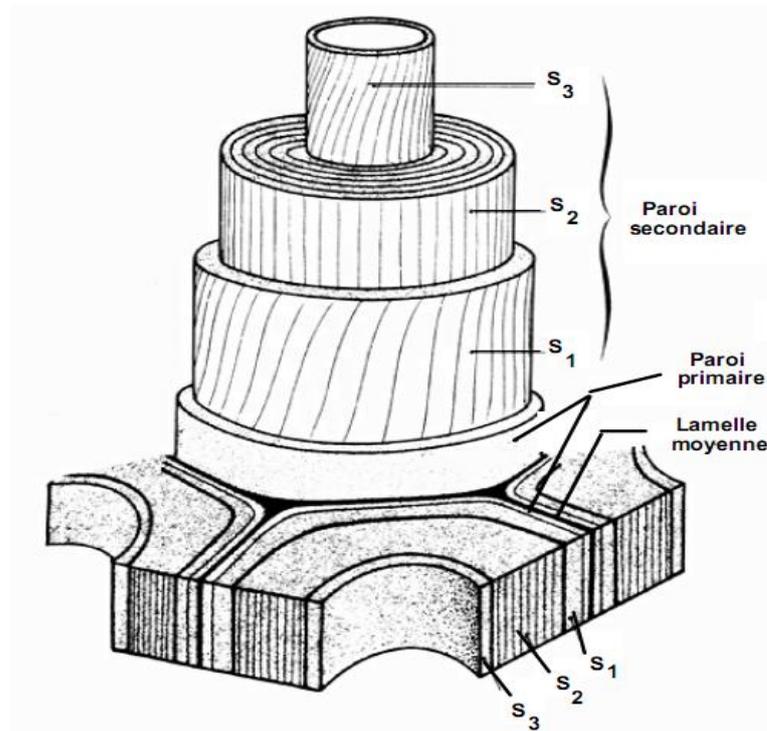


Figure 8 : Vue perspective d'une paroi ligneuse, d'après **Roland (1980)**.

- La lamelle moyenne, jonction intercellulaire, permet la cohésion cellulaire. Son épaisseur varie de 0,2 à 1 μm . Elle est riche en pectines et dépourvue de cellulose (**Barbat, 2009**).

- La paroi primaire : la plus mince (0,1-0,2 μm), constituent la seule enveloppe fibrillaire des cellules en croissance et montre une grande plasticité. Elle présente une structure bi-phasique, où les microfibrilles de cellulose sont dispersées dans une matrice amorphe fortement hydratée composée de substances pectiques, d'hémicelluloses et de protéines. La paroi cellulaire primaire est composée de 9-25% de cellulose, de 25-50% d'hémicellulose, 10-35% de pectines et 10% de protéines (**Bidlack et al., 1992**).

De plus, deux types de paroi cellulaire végétale primaire (paroi de type I et de type II) sont considérés par **Carpita et Gibeault (1993)** (Figure 9) et repris par **Carpita et McCann (2000)** (Figure 10). Ces deux types de paroi sont essentiellement basés sur les différences chimiques observées entre la paroi des plantes à fleurs (type I) et certaines espèces herbacées comme les graminées (type II). La paroi primaire de type I est composée principalement de cellulose, de xyloglucanes, de pectines et d'extensine (Figure 10A). La paroi primaire de type II est essentiellement composée de cellulose, de glucuronoarabinoxylanes et comprend des groupements phénoliques (Figure 10B).

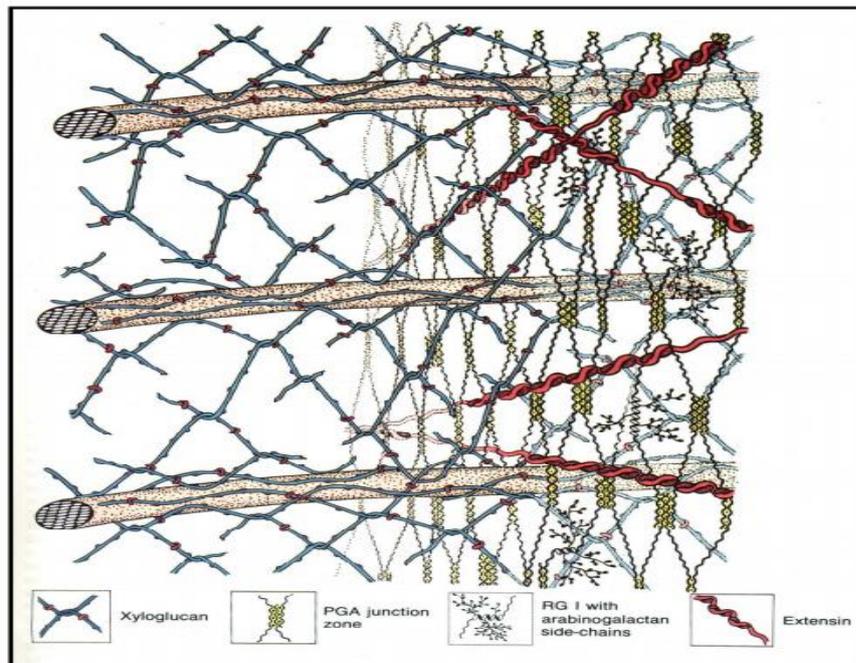


Figure 9 : Représentation schématique de la paroi primaire végétale des plantes à fleurs (type I) pendant l'élongation cellulaire. Schéma tiré de **Carpita et Gibeault (1993)**.

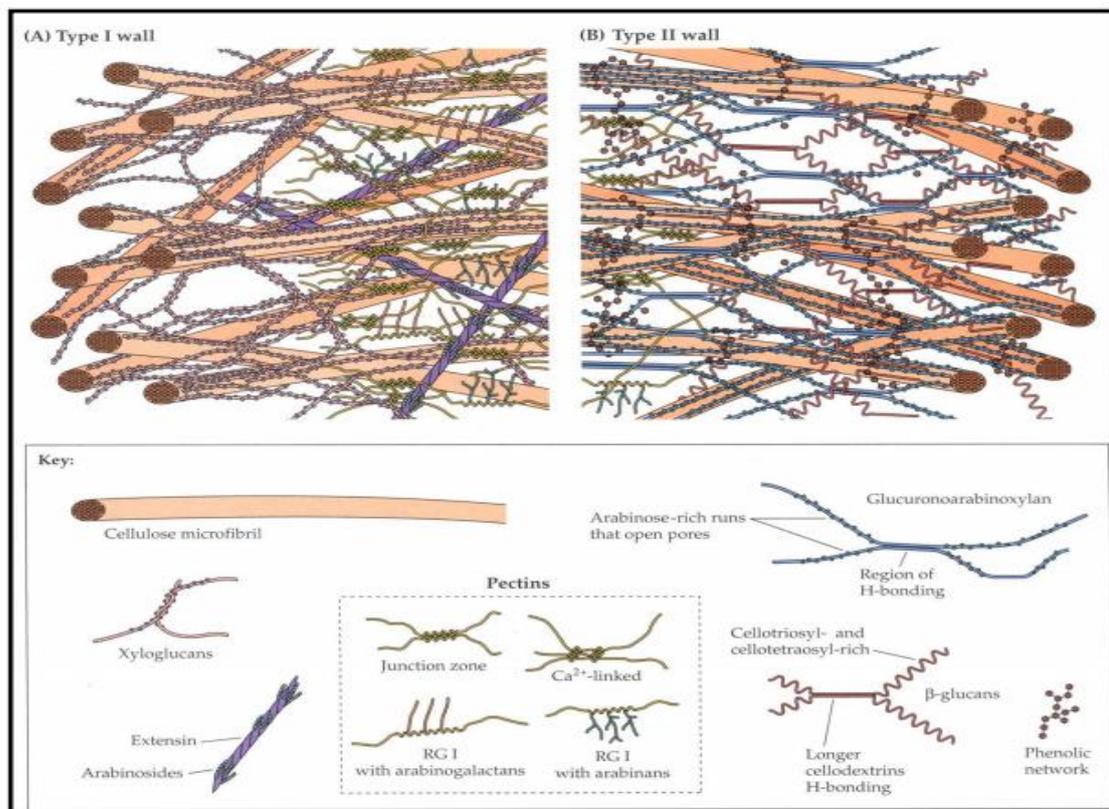


Figure 10 : Représentation schématique de la paroi primaire végétale des plantes à fleurs (type I) (A) et de certaines espèces monocotylédones herbacées (type II) (B).

Schémas tirés de **Carpita et McCann (2000)**.

- La paroi secondaire : Très épaisse (1 à 5 μm) est ajoutée à la paroi primaire lorsque la cellule a cessé de croître. Elle est constituée d'un réseau fibrillaire de cellulose cristalline et d'hémicellulose. En fonction de l'orientation des fibrilles de cellulose, trois régions distinctes sont définies (S1, S2, S3). Ces fibrilles de cellulose ont une orientation déterminée qui change rythmiquement et varie d'une strate à l'autre (**Brudieux, 2007**).

D'autre part, Il existe une relation directe entre la conformation d'un polysaccharide et sa fonction à l'intérieur de la paroi. En effet, ces polymères jouent le rôle de matériaux de construction dans la consolidation de la paroi végétale. Ainsi la cellulose constitue l'armature de la paroi de par sa conformation rigide, alors que les hémicelluloses et les pectines, matériaux tampons, assurent une certaine flexibilité qui permet la croissance de la cellule; enfin la lignine cimente l'édifice. Ces différentes macromolécules forment un réseau tridimensionnel dont la cohésion est assurée aussi bien par des liaisons de faible énergie, comme les liaisons de Van der Waals et des liaisons hydrogènes, que par des liaisons ioniques et covalentes. La proportion des quatre grandes catégories de molécules (cellulose, pectines, hémicelluloses et lignine) est fonction de la localisation dans la paroi cellulaire végétale (Figure 11) (**Brudieux, 2007 ; Moine, 2005**). De plus, les espèces végétales peuvent présenter des différences de structure moléculaire pariétale ainsi que des variations de l'architecture pariétale (**Harche et al., 1991**).

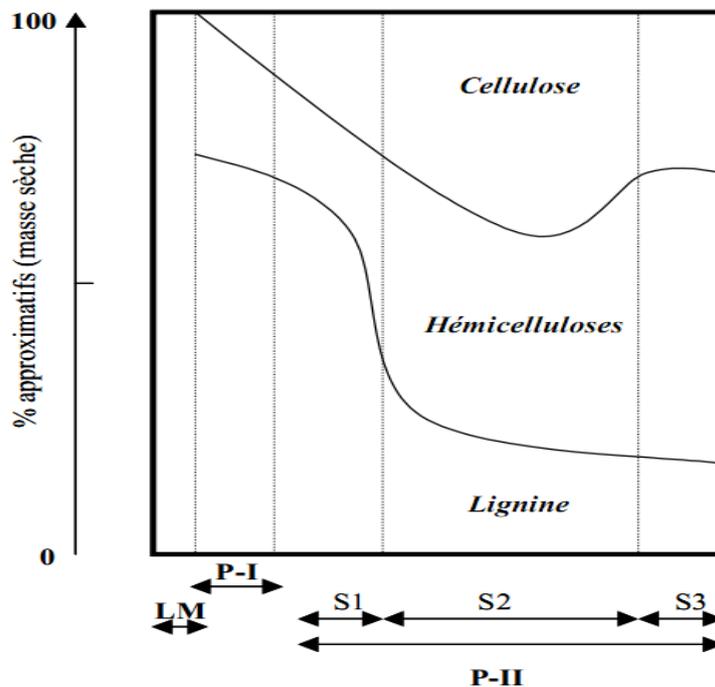


Figure 11 : Composés chimiques de la paroi des cellules de bois (exprimés en % massique) et leur distribution d'après **Popa (1996)**. LM : Lamelle Moyenne ; P-I : Paroi primaire ; P-II : Paroi secondaire.

2.2. Les principaux constituants de la paroi végétale :

Les parois végétales sont composées de polymères ainsi que de molécules de faible poids moléculaire, comme les sucres circulants. Les polymères sont en deux types : les polymères non glucidiques (lignines et tanins) et les polymères glucidiques (cellulose, hémicelluloses et substances pectiques). Nous sommes particulièrement intéressés aux polymères végétaux.

2.2.1. La cellulose :

La cellulose est la molécule la plus abondamment synthétisée sur Terre en représentant au moins la moitié de la biomasse (**Robert et Roland, 1998**). C'est aussi le polymère naturel le plus valorisé, que ce soit sous forme de fibres textiles, de papiers ou à l'état modifié d'esters (acétates ou nitrates de cellulose) ou encore d'éthers. La composition chimique élémentaire de la cellulose a été déterminée en 1839 par le chimiste français Anselme Payen (**Brongniart et al., 1839**): 44% carbone, 6% hydrogène et le reste étant de l'oxygène. La formule de base de cellulose ($C_6H_{10}O_5$) ne sera établie que bien plus tard en 1913 (**Ben Mabrouk, 2011**), grâce à l'avènement de techniques puissantes d'analyses de structures, telles que la diffraction des rayons X et la spectroscopie IR. Cet homopolymère linéaire a pour unité de répétition le cellobiose, motif composé de deux D-glucopyranoses en conformation C₄ liés par une liaison glucidique β (1→4). Le degré de polymérisation (DP) qui représente le nombre d'unités glucosidiques par chaîne de cellulose est très difficile à estimer et ce pour deux raisons. La première est la difficulté de solubiliser la cellulose sans la dégrader. La seconde provient du fait de la très grande variabilité des DP selon la provenance et la situation de la cellulose au sein de la paroi, allant de quelques centaines à plusieurs milliers (**Brudieux, 2007**). La disposition des hydroxyles libres des glucoses permet l'établissement de liaisons hydrogènes intramoléculaires, stabilisant la cellulose dans son orientation linéaire ce qui lui confère une certaine rigidité, et des liaisons intermoléculaires qui relient plusieurs macromolécules et les maintiennent disposées parallèlement (Figure 12). Ainsi, l'association de nombreuses chaînes de cellulose favorise l'établissement d'un état solide ordonné, pseudo-cristallin et permet la formation de microfibrilles (**Moine, 2005**). La structure fibrillaire très condensée de la cellulose explique sa résistance mécanique à la traction, ainsi que son caractère non-soluble dans l'eau. Pratiquement, la fraction cellulosique est considérée comme étant le résidu insoluble après l'extraction complète des autres polysaccharides de la paroi par des agents chélateurs et /ou des bases minérales (**Barbat, 2009**).

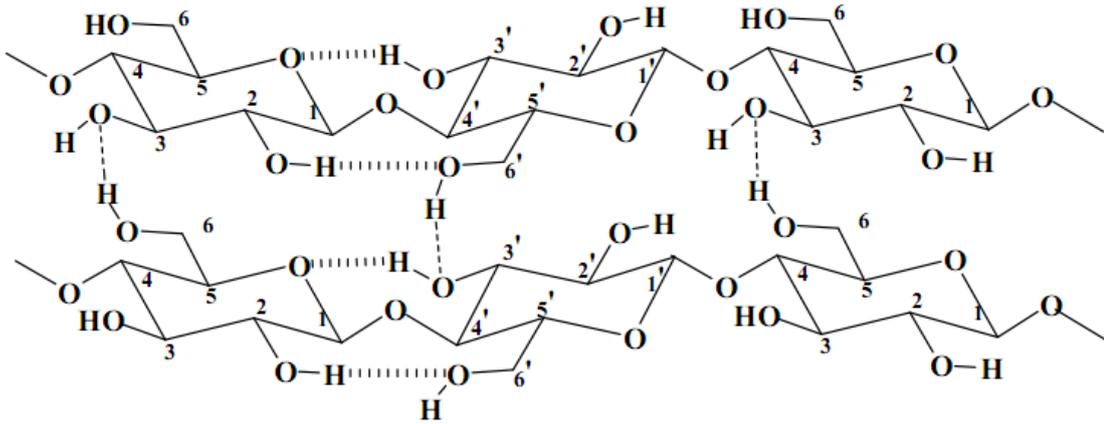


Figure 12 : Liaisons hydrogène intra et intermoléculaires dans la cellulose (Moine, 2005 ; Brudieux, 2007 ; Barbat, 2009).

2.2.2. Les hémicelluloses :

Les hémicelluloses sont des polysaccharides communément présents dans les végétaux. Elles désignent à l'origine les polysaccharides pariétaux alcalinosolubles ; cependant certains tels que les arabinanes et les arabinogalactanes sont extraits par l'eau. Par extension, les hémicelluloses regroupent donc tous les polysaccharides présents dans les parois des cellules végétales qui ne sont ni cellulosiques, ni pectiques. Comparativement à la cellulose, les hémicelluloses possèdent une grande variété structurale qui dépend de l'origine botanique, de l'âge des cellules et de leur localisation dans la paroi végétale. Les hémicelluloses sont souvent ramifiées et leur degré de polymérisation ne dépasse pas 150. Les unités glucidiques peuvent s'agencer de multiples façons dans les hémicelluloses, ce qui explique leur grande diversité. Toutefois, les hémicelluloses sont décrites comme étant constituées d'un axe osidique principal linéaire sur lequel peuvent être fixés des motifs variés. La variation de ces composés selon l'origine, le tissu ou le type cellulaire et selon le stade de maturation des tissus, génère une grande diversité structurale. On distingue les hémicelluloses homopolysaccharidiques, tels que : les glucanes, xylanes, mannanes... et celles hétéropolysaccharidiques, comme : les xyloglucanes, glucomannanes, glucuronoxylanes, glucuronoarabinoxylanes (Ben Mabrouk, 2011) et les arabinoxylanes (Benahmed Bouhafsoun, 2008 ; Chaa, 2008 ; Ben Mabrouk, 2011)

La nomenclature de ces différentes hémicelluloses est déterminée de la manière suivante :

- Dans le cas d'un polymère linéaire, le suffixe-ose du glucide constituant la chaîne est remplacé par le suffixe -ane (ex : xylane).

- Dans le cas d'un polymère ramifié, les glucides greffés au squelette de base seront des préfixes alors que les unités glucidiques de la chaîne principale porteront le suffixe -ane (ex : glucuronoxylane).
- Dans le cas des polymères « entrecoupés », l'unité glucidique la plus représentée portera le suffixe -ane et les autres seront en préfixe (ex : glucomannane).

Les hémicelluloses peuvent être classées selon cinq grandes familles : les xyloglycanes (ou xylanes), les mannoglycanes (ou mannanes) (**Figure 13**), les xyloglucanes, les β -D-glucanes (avec des liaisons mixtes 1 \rightarrow 3 et 1 \rightarrow 4) et les arabinogalactanes (**Ebringerová et al., 2005**).

Une étude de caractérisation des hémicelluloses pariétales d'un tissu foliaire d'*Aristida pungens*, Poacée vivace des régions subdésertique d'Algérie (Afrique du Nord) a montré la présence de deux fractions d'arabinoxylanes, constituées d'une chaîne principale de résidus β -Xyl- (1 \rightarrow 4), plus ou moins substitués latéralement par des motifs arabinosyls branchés sur le C(3) du xylose (**Chaa, 2008**).

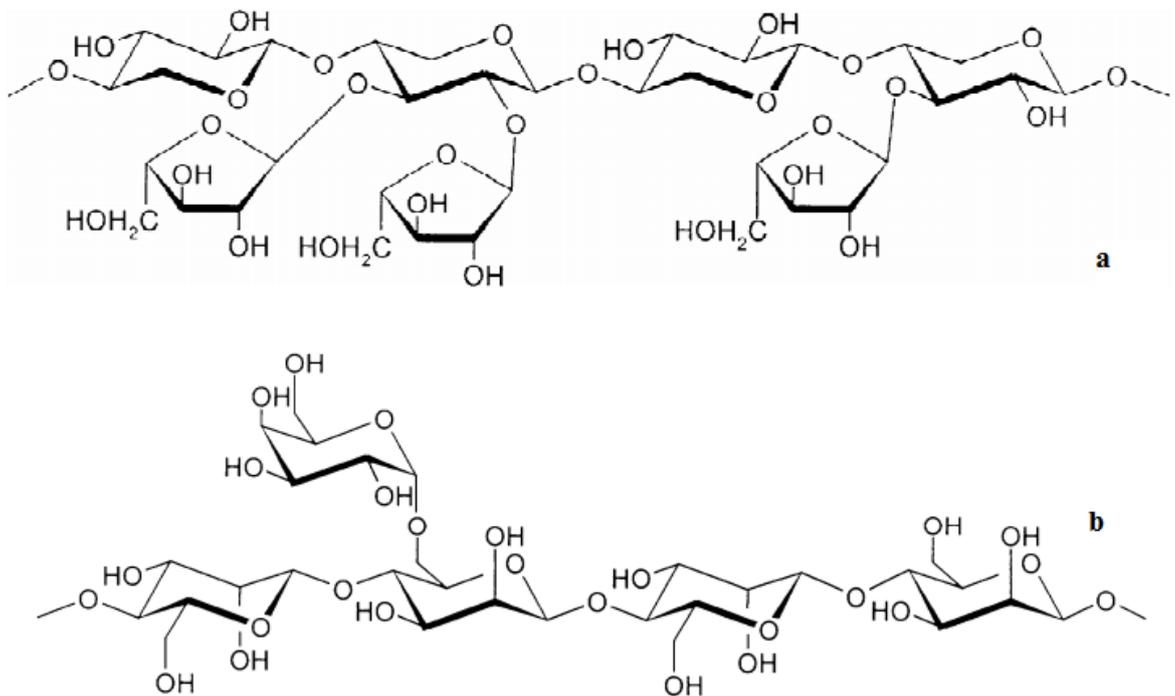


Figure 13 : Exemples de structures d'hémicelluloses : **a** : un L-arabino-D-xylane (AX) ;
b : un D-galacto-D-mannane selon **Ebringerová et al., (2005)**

2.2.3. Les pectines :

Les substances pectiques ou pectines sont présentes dans des proportions variées dans la plupart des végétaux supérieurs. Elles constituent l'essentiel des lamelles moyennes qui assurent la cohésion entre les cellules. On parle alors de ciment pectique. Sur le plan structural, les pectines sont formées de chaînes linéaires faiblement polymérisées d'acides galacturoniques liés en α -(1→4) et (1→2), appelé acide polygalacturonique, sur lesquelles s'insèrent des résidus de L-rhamnose. Cette zone est qualifiée de lisse. Chaque unité rhamnose introduit dans la chaîne un coude et confère donc à l'ensemble une configuration en zig-zag. Des chaînes latérales de natures diverses, arabinanes, galactanes et arabinogalactanes sont aussi greffées sur le squelette rhamnogalacturonique, d'où la grande diversité de ces polymères. Cette structure ramifiée est aussi appelée zone chevelue. Les fonctions acides sont souvent estérifiées par des groupements méthyles ou salifiées par des ions monovalents ou divalents tels que le potassium, le sodium ou le calcium (**Barbat, 2009**). Cette estérification joue un rôle important sur les propriétés physico-chimiques des pectines, notamment sur la formation de gels. D'autres glucides sont présents dans les pectines, comme le β -D-galactose, le β -D-glucose, le β -L-arabinose, le β -D-xylose et le α -D-fucose (**Whistler et Feather, 1965**).

La solubilité des substances pectiques dépend de leur masse moléculaire, de la présence de chaînes latérales, ainsi qu'au degré de méthylestérification et de la distribution de ces groupements méthyles. Selon **Moine (2005)**, les pectines peuvent être classées selon leur mode d'extraction, soit à l'eau chaude pour les pectines hautement méthylestérifiées, soit par des agents chélateurs de cations divalents (EDTA, oxalate d'ammonium) pour les pectines faiblement méthylestérifiées et à l'acide dilué à chaud pour la protopectine (acide polygalacturonique).

Les pectines jouent un rôle important dans le maintien de l'architecture cellulaire et participent au métabolisme végétal, surtout au niveau de l'expansion et de la défense cellulaire (**Willats et al., 2001**).

2.2.4. Les lignines :

Après la cellulose, la lignine est la matière organique renouvelable la plus abondante à la surface de la terre. La lignine originelle ou "protolignine" est la plus importante fraction non saccharidique des fibres végétales. C'est la matière "incrustante" de la cellulose (**Valette et Choudens, 1989**). Elles sont des polyphénols, macromolécules tridimensionnelles hydrophobes de haut poids moléculaire. Il s'agit d'un polymère ayant

une structure complexe qui peut varier en fonction de l'espèce végétale (**Harche et al, 1991**), de l'âge, des conditions climatiques environnantes, etc... (**Ben Mabrouk, 2011**). A l'inverse de la cellulose, la lignine ne comporte pas de motifs répétitifs et possède une grande diversité de liaisons interrnomériques (**Sarkanen et Ludwig, 1971**). Leur structure résulte de la copolymérisation de trois monomères aromatiques de type phénylpropène: l'alcool coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique, que l'on désigne sous le terme général de monolignols (Figure 14); leurs précurseurs, les acides hydroxycinnamiques (ou alcools phénylpropénoïques), sont produits au niveau du réticulum endoplasmique des cellules en voie de lignification, à partir de la phénylalanine, désaminée en cinnamate, hydroxylée, méthylée et réduite en alcool au niveau de la fonction carboxyle. Au niveau de la paroi cellulaire, les monolignols sont oxydés en radicaux libres sous l'influence d'enzymes (laccases et peroxydases); ces radicaux polymérisent, plus ou moins au hasard et sans intervention enzymatique, ce qui explique la variabilité importante dans la structure des lignines. Cette polymérisation in situ s'accompagne de la formation de liaisons covalentes avec les glycanes de la paroi. A la fin du développement cellulaire la lignine incruste ainsi la cellulose et les hémicelluloses, son rôle consiste donc à colmater les espaces entre les microfibrilles, et agit comme matière de cimentation en conférant la rigidité de la paroi (**Brudieux, 2007**).

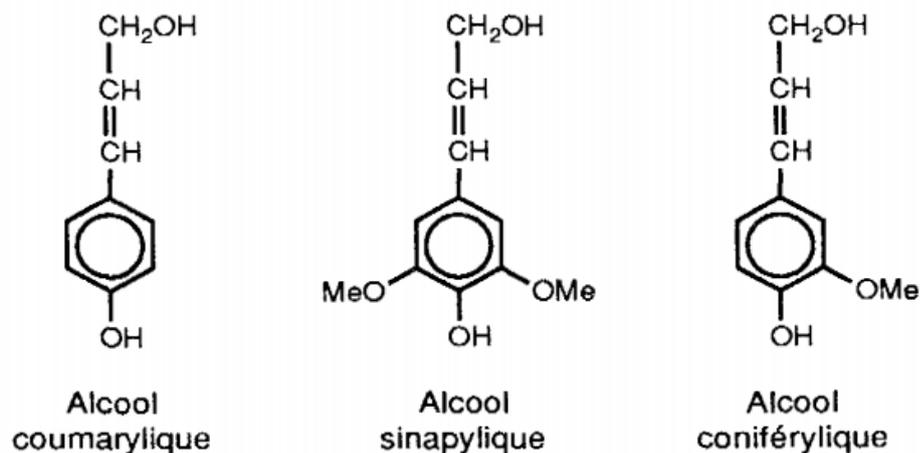


Figure 14: Monomères constitutifs de la lignine.

2.2.5. Autres constituants:

En marge de ses constituants polysaccharidiques principaux, la paroi végétale comporte d'autres catégories de polysaccharides. C'est notamment le cas de la callose, un β -(1,3) glucane (**Aspinall et Kessler, 1957**). Cette dernière est souvent détectée en réponse à des blessures ou des infections par des pathogènes. Par ailleurs, les arabinogalactanes protéines peuvent être extraits d'un grand nombre de tissus. Elles sont composées de 10% de protéines riches en hydroxyproline, serine, alanine et glycine et de 90% de polysaccharides composés essentiellement d'Arabinose, Galactose, Rhamnose, Mannose, Glucose (**Tucker et Mitchell, 1993**).

La paroi ne contient pas que des polysaccharides. Les substrats lignocellulosiques renferment également des lipides, des protéines ainsi que des substances de faible poids moléculaire, tels que les extraits et minéraux, spécifiques à chaque espèce végétale. La paroi contient généralement entre 3 et 6% de protéines, souvent sous forme de glycoprotéines, dont les extensines. Les autres sont des enzymes telles que la peroxydase ou diverses glycosidases (**Moine, 2005**).

La paroi contient aussi des substances extractibles par l'eau ou les solvants organiques polaires qui sont essentiellement les composés aromatiques et phénoliques comme les tanins, les flavonoïdes, ainsi que des petites molécules telles que des sucres circulants. Les graisses, les cires et les terpènes constituent les principales substances extractibles par les solvants apolaires (**Moine, 2005**). D'autres composés phénoliques ont été détectés au niveau des résidus pariétaux de quelques espèces végétales tels que : l'acide p-coumarique et l'acide férulique (**Harche et al., 1991**) et leurs esters, en monomères ou en dimères (**Benahmed Bouhafsoun, 2008**). La paroi peut contenir même l'acide p-hydroxybenzoïque (**Benahmed Bouhafsoun, 2008**).

2.3. Activités biologiques des polysaccharides végétaux :

Les parois cellulaires végétales sont des réservoirs potentiels de polysaccharides biologiquement actifs (**Hensel et al., 1998**). Il a été démontré que ces polysaccharides sont dotés de propriétés pharmacodynamiques permettant leur valorisation dans le domaine de la santé (**Diallo et al., 2001**). Ils assurent d'importantes fonctions, telles la régulation de la croissance, la défense contre les agents pathogènes et les stress environnementaux. Plusieurs études montrent qu'ils agissent sur le diabète (**De Paula et al., 2005**), sur le cancer (**Ishurd et Kennedy 2005**) et aussi sur les virus (**Cassolato et al., 2008**).

Aujourd'hui, il y a peu de drogues immunostimulantes disponibles, or des polysaccharides étant des constituants immunostimulants les plus efficaces, dépourvus de toxicité et issus des plantes médicinales, peuvent être des bonnes molécules pour améliorer le système immunitaire dans le cas d'une fragilité de ce système par des maladies telles que le cancer, le sida, le paludisme (**Aboughe, 2010**). Aussi, de nombreux articles attestent des propriétés antioxydantes de xylanes de diverses plantes médicinales (**Ebringerová et al., 2002 ; Kardosová et al., 2004 ; Nabarlatz et al., 2007**)

De plus, les Polysaccharides naturels issus de certaines plantes médicinales, algues et microorganismes ont suscité un grand intérêt en tant qu'agents antimicrobiens (**Mizuno et al., 1995; Tzianabos 2000; Smith et al., 2002**). Dans les dernières décennies, sur la base des méthodes biotechnologique, une série de nouveaux agents antimicrobiens à base de polysaccharides a été développée. Ils sont aujourd'hui utilisés dans diverses applications, par exemple dans l'industrie alimentaire pour remplacer des conservateurs traditionnels, et en bactériologie comme inhibiteurs de la croissance bactérienne (**Chang et al. 2000**).

De même et plus précisément, l'activité antifongique des extraits polysaccharidiques a également été confirmée expérimentalement dans plusieurs études (**Ballance et al., 2007 ; Meera et al., 2011 ; Chen Hao et al., 2012**).

2.4. Rôles des polysaccharides pariétaux dans la défense plantes :

La paroi végétale constitue une barrière physique à la pénétration des agresseurs. Pour la contourner, les agents pathogènes développent différentes stratégies notamment la production d'enzymes hydrolytiques dégradant la paroi végétale (**Walton, 1994**). Les défenses de la plante comprennent un ensemble de mécanismes conduisant à modifier et à renforcer la paroi contre les dégradations enzymatiques générées par les pathogènes. Ils incluent la production de glycoprotéines riche en hydroxyprolines (**Benhamou, 1996**), le dépôt de la callose et la synthèse des composés polyphénoliques tels que la lignine (**Boudart et al., 1995**). Dans ce contexte, les glycoprotéines riches en hydroxyprolines sont induites dans diverses interactions plantes-pathogènes (**Esquerré-Tugayé et al. 1979**). Elles jouent un rôle dans l'organisation de la paroi primaire et servent comme point d'initiation de la polymérisation de la lignine (**Bolwell et al., 1995**). D'autre part, La lignification permet de renforcer la paroi végétale la rendant plus résistante aux attaques des enzymes hydrolytiques des agents pathogènes (**Kawasaki et al, 2006**). Une corrélation a pu être établie entre la lignification et la résistance aux maladies, les plantes résistantes montrent une augmentation du dépôt de lignine plus importante que celle des

plantes sensibles (Soylu, 2006). De plus, la callose, un constituant des appositions pariétales a été considérée comme un facteur important dans la résistance à la pénétration des agents pathogènes (Brown et al., 1998). En effet, des plantes qui ont montré une réduction de dépôt de callose ont montré une sensibilité accrue envers les pathogènes.

3. Les flavonoïdes:

3.1. Définition :

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes (Lhuillier, 2007). Ils occupent une place prépondérante dans la famille des polyphénols, ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs et des fruits (Ghestem et al., 2001). Les flavonoïdes sont présents d'une manière très générale dans toutes les plantes vasculaires où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles (Marfak, 2003).

3.2. Structure chimique et classification:

La classe des flavonoïdes est l'une des plus abondantes et à ce jour, plus de 9000 structures naturelles ont été isolées et caractérisées (Harborne et Baxter, 1999). Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous la même structure dont elle s'organise toujours autour d'un squelette de base à quinze atomes de carbones constitué de deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3 (Figure 15) (Bruneton, 1999).

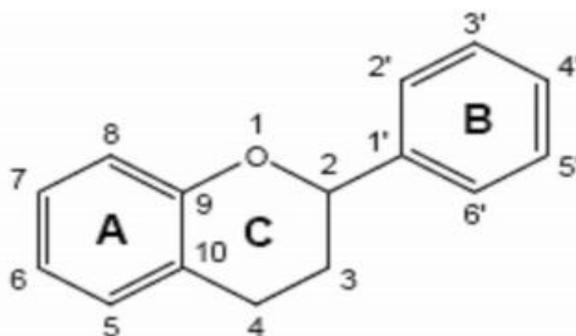


Figure 15 : Structure de base des flavonoïdes (Bruneton, 1999).

Les flavonoïdes se répartissent en plusieurs sous-classes qui se distinguent par une diversité fonctionnelle au niveau des positions 2, 3 et 4 du cycle C (Pietta, 2000), dont les plus importantes sont les Flavones, Flavonols, Flavanones, Dihydroflavonols, Isoflavones, Flavanols, Chalcones, Aurones et anthocyanes (Figure 16) (Hadj Salem, 2009).

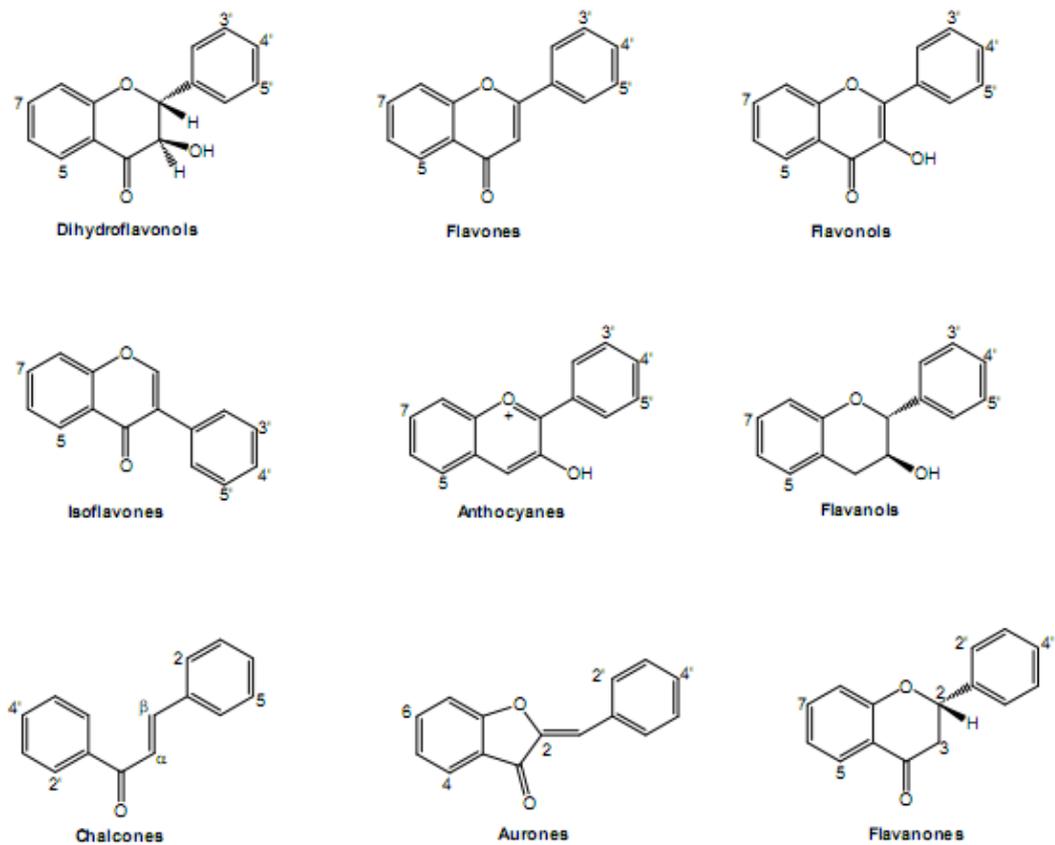


Figure 16 : Structure des différentes classes de flavonoïdes (Hadj Salem, 2009).

3.3. Distribution et localisation :

Les flavonoïdes sont largement rencontrés dans le règne végétal. Il est à signaler qu'environ 2% de la proportion du carbone photosynthétique global incorporé dans la biosynthèse flavonoïdique. Selon **Hadi (2004)**, les flavonoïdes se trouvent en abondance dans les familles : Polygonacees, Rutacees, Fabacees, Apiacees et Asteracees. Ils sont cependant rares chez les végétaux inférieurs. De plus, leur localisation au sein de la plante est caractéristique. En effet, Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fruits, graines, bois, pollens (**Verhoeven et al, 2002**). La répartition de ces composés montre des accumulations très localisées, généralement en relation avec une fonction physiologique ou avec l'interaction de la plante avec son environnement. Ainsi, les flavonoïdes qui ont une localisation épidermique ont un rôle d'écran vis-à-vis des rayonnements solaires, tandis que ceux qui sont impliqués dans les mécanismes de défense ont plutôt une localisation sous épidermique (**Boudet, 2000**).

Au niveau cellulaire, il est observé que les flavonoïdes, sous forme d'hétérosides, sont dissous dans le suc vacuolaire ou localisés dans les chloroplastes et les membranes des végétaux. Lorsque les flavonoïdes sont présents dans la cuticule foliaire, il s'agit presque toujours de génines libres dont la lipophilie est accrue par la méthylation partielle ou totale des groupes hydroxyles (**Bruneton, 1993**).

3.4. Biosynthèse des flavonoïdes:

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune, à l'origine, les flavonoïdes proviennent de la désamination d'un acide aminé essentiel, la phénylalanine (figure 17). La réaction de désamination est catalysée par la phényl ammonia lyase (PAL) et conduit à la formation de cinnamate. Ce dernier est ensuite transformé en acide coumarique puis en 4-coumaroyl-coenzyme A, respectivement par l'enzyme cinnamate-4-hydroxylase (C4H) et la CoA-ligase (4CL). Cette synthèse précède la biosynthèse de tous les flavonoïdes mais également celle d'autres composés de la voie des phénylpropanoïdes, composés très importants pour la vie d'un végétal. Le coumaroyl-CoA est ensuite transformé en chalcone en faisant intervenir le malonyl-CoA, et la chalcone synthase. Le motif chalcone est ainsi le point de départ de la synthèse des différents groupes des flavonoïdes (**Sebastien, 2006**).

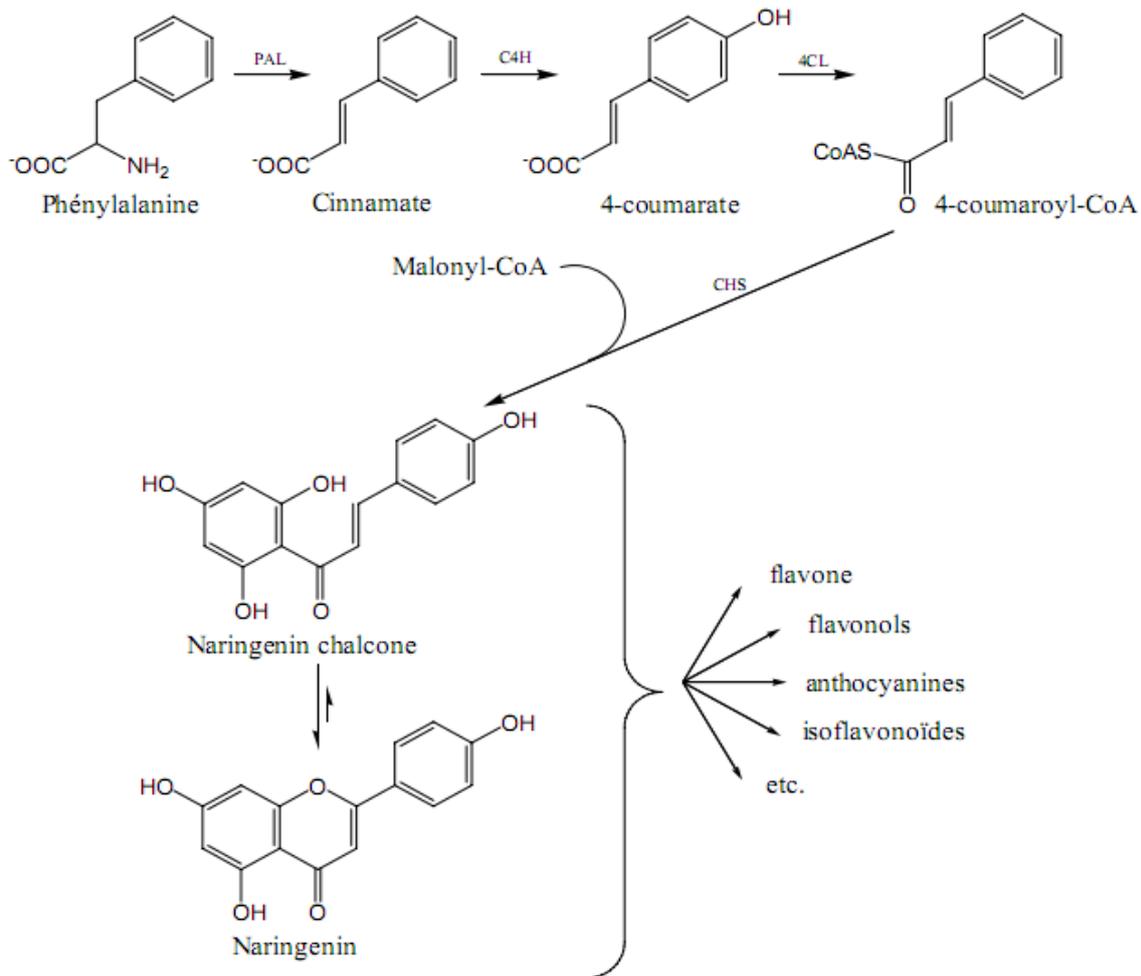


Figure 17 : Schéma simplifié de la biosynthèse des flavonoïdes (Sebastien, 2006).

3.5. Activités biologiques des flavonoïdes :

Les flavonoïdes constituent un groupe de substances très importantes qui présentent un grand intérêt dans beaucoup de domaines. Actuellement, les flavonoïdes sont connus par de remarquables activités pharmaco-biologiques comme entre autres des effets hypocholestérolémiants (Formica et Regelson, 1995) antiviraux, antimicrobiens, et anticancéreux (Narayana et al., 2001 ; Seyoum et al., 2006) antiallergiques, anti-inflammatoires, anti-thrombotiques, anti-tumoraux et hépato protecteurs (Middleton et al., 2000). Ces activités sont attribuées en partie aux propriétés anti-oxydantes de ces composés naturels (Saija et al., 1995). Nous voulons indiquer dans ce paragraphe leurs activités antimicrobiennes. Dans ce contexte, Selon Cushnie et Lamb (2005), différents types de flavonoïdes (flavones, isoflavones, flavonols...) ont présenté une activité

antifongique, antivirale et antibactérienne. **Picman et al., (1995)** ont suggéré que théoriquement, les flavonoïdes pourraient exercer des effets antibactériens puisqu'ils sont de puissants inhibiteurs *in vitro* de l'ADN gyrase. Dans ce sens, plusieurs études ont montré l'effet bactéricide de différentes flavanones sur un *Staphylococcus aureus* (**Sato et al., 1995**) et plusieurs souches de bactéries gram (+) et gram (-) ont été montrées sensibles envers un flavonoïde glycoside (**Harikrishna et al., 2004**). D'autre part, L'activité antifongique des flavonoïdes est aussi établie, En raison de la capacité répandue des flavonoïdes d'inhiber la germination des spores des phytopathogènes, on leur a proposé pour l'usage contre les pathogènes fongiques de l'homme (**Harborne et Williams, 2000**). Deux nouveaux flavonoïdes, un flavone et un flavanone, respectivement isolés des fruits de *Terminalia bellerica* et de l'arbuste *Eysenhardtia texana* ont été efficace contre le pathogène opportuniste *Candida albicans* (**Valsaraj et al., 1997 ; Wachter 1999**). Deux autres flavones isolés de la plante *Artemisia giraldi* ont été rapportés inhibiteurs de l'espèce *Aspergillus flavus*, une espèce de mycète qui cause la maladie envahissante chez les patients immunosuppresseurs (**Zheng, 1996**). Galangin, un flavonol généralement trouvé dans des échantillons de propolis a été montré inhibiteur contre *Aspergillus tamarii*, *A. flavus*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium italicum* (**Afolayan et Meyer, 1997**).

Le mécanisme des effets antimicrobiens des flavonoïdes peut être du à l'inhibition de la synthèse d'acide nucléique (**Hilliard, 1995**), l'inhibition des fonctions de la membrane cytoplasmique (**Tsuchiya et Iinuma, 2000**), la séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou l'inhibition du métabolisme énergétique microbien (**Haraguchi et al., 1998**).

3.6. Rôles des flavonoïdes chez les plantes :

Les flavonoïdes sont des pigments quasiment universels des végétaux. Ils sont synthétisés au niveau des fleurs, des fruits, des feuilles et des graines d'un grand nombre de végétaux. Leur accumulation confère des avantages écologiques et physiologiques majeurs (**Harborne et Williams, 2000**). Une des propriétés majeures des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes et notamment à celle des fleurs. Or, c'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant par ce biais une étape fondamentale de sa reproduction. Il est à noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable,

peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes. Les flavonoïdes montrent d'autres propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance (**Chebil, 2006**). D'autre part, les plantes utilisent la capacité d'adsorption entre 280 et 315 nm de tous les flavonoïdes comme un filtre de protection contre les dommages pouvant être causés par les radiations UV-B sur leur ARN (**Harborne et Williams, 2000**). Certains flavonoïdes jouent également un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire des métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries (**Marfak, 2003**). Dans ce sens, Beaucoup de flavonoïdes possèdent des propriétés antifongiques par inhibition de cellulases microbiennes, de xylanases, pectinases, chélation de métaux nécessaire aux enzymes, formation d'une structure dure et cristalline agissant comme une barrière physique aux pathogènes. Les flavonoïdes pourraient entraîner des changements dans la différenciation des tissus et ainsi promouvoir la formation de thylle et de cal, empêchant ainsi l'agression par des agents invasifs. De même, Les flavonoïdes jouent aussi un rôle important dans la résistance fongique, après la récolte, des fruits et des légumes. De fortes concentration en flavonoïdes dans les fruits sont, en effet, très souvent corrélées avec une faible incidence de pathogène. Cette constatation est d'ailleurs mise à profit pour mieux conserver les fruits. Par exemple, l'irradiation UV de *Citrus aurantium* entraîne une augmentation de la concentration en flavonoïdes et réduit la contamination par *Penicillium digitatum* (**Treutter, 2005**).

Chapitre 3 :

**GÉNÉRALITÉS SUR LES PLANTES
MÉDICINALES**

1. Historique :

Une plante médicinale est une plante que l'on cultive ou que l'on cueille dans son milieu naturel pour ses propriétés médicinales. L'être humain utilise des plantes depuis des milliers d'années pour traiter divers maux, le monde végétale est à l'origine d'un grand nombre de médicaments. Récemment, des chercheurs ont estimé qu'il existe environ 400000 espèces de plantes dans le monde, dont environ le quart ou le tiers ont été utilisées par les sociétés à des fins médicinales (**Delaveau, 1974**).

Dans toutes les parties du globe, les civilisations ont montré un intérêt manifeste pour les plantes aromatiques en médecine, en cuisine et en parfumerie. Et l'histoire le témoigne en multiples manières d'expressions, que l'on retrouve dans les littératures ; Hippocrate (460-v.377 avant J.-C.); Dioscoride (Ier siècle après J.-C.), Galien (v. 131-v. 201) (**Iserin, 2001**). Les Arabes avaient aussi leurs spécialistes en médecine et en pharmacie : Abu Bakr al-Razi ou Rhazès (865-925), Ibn Sina ou Avicenne (980-1037) qui écrivit le "Canon de la médecine". Ce livre servira de base à l'enseignement de la médecine dans les universités de Louvain et de Montpellier jusqu'aux environs de 1650 (**Mohammedi, 2006**). Ibn Rushd ou Averroès (1126-1198), son œuvre médicale la plus connue est "Kitab Al-Kulliyate fil-Tibb" ("Livre de Médecine Universelle"). Ecrit avant 1162, cet ouvrage fut traduit en latin par Bonacosa en 1255, sous le titre de «Colliget», et en hébreu. Il fut publié en 1482 et en 1560 à Venise, il fût enseigné officiellement dans les Facultés et écoles de Médecine occidentales jusqu'au XVIIe et XVIIIe siècles (**Bonan et al., 2009**). Ibn al Baytar (1197-1248) rédigea le très complet Somme des Simples : ce livre contenait une liste de 1400 préparations et plantes médicinales dont un millier étaient connues des auteurs grecs (**Mohammedi, 2006**).

2. Domaine d'application :

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples dans l'industrie, en alimentation, en cosmétologie et en pharmacie. La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles, ou des matières premières pour la semi synthèse (**Bahorun, 1997**) ainsi que l'assaisonnement des boissons, des colorants et des composés aromatiques, les épices et les herbes aromatiques utilisés dans l'alimentation sont pour une bonne part responsables des plaisirs de la table (**Delaveau, 1987**). Il y a eu donc un réveil vers un intérêt progressif dans l'utilisation des plantes médicinales dans les pays développés

comme les pays en voie de développement, parce que les herbes fines guérissent sans effet secondaire défavorable (**Mohammedi, 2006**).

Les métabolites secondaires sont également d'un intérêt en raison de leur utilisation comme colorants, fibres, colles, huiles, cires, agents aromatisants, des médicaments et des parfums, et ils sont considérés comme des sources potentielles de nouveaux médicaments naturels, des antibiotiques, insecticides et les herbicides (**Eddy, 2010 ; Kumpawat et al., 2010**). Ces dernières années, le rôle de certains métabolites secondaires comme conservateur des produits alimentaires est devenu un domaine de plus en plus important de la recherche en nutrition humaine. En outre, Ils peuvent avoir des effets favorables dans la prévention de cancers et de nombreuses maladies chroniques, tels que les maladies cardiovasculaires et le diabète de type II, qui touchent les populations à une fréquence croissante et inquiétante (**Selles, 2012**).

3. Présentation des plantes étudiées :

3.1. Famille des Astéracées :

Ce sont des plantes herbacées, rarement arbustives, arborées ou rampantes. Elle comporte plus de 13 tribus, 1000 genres et 23000 espèces (**Guignard, 2001 ; Gausson et Leroy, 1982**). En Algérie, il en existe 109 genres et 408 espèces (**Quezel et Santa, 1963**). Une des propriétés typiques de cette famille est sa richesse en composés naturels divers, on y trouve des terpénoides, des flavonoïdes et des alcaloïdes (**Harborne et Swain, 1969**).

La famille Asteraceae est parmi les familles les plus représentatives en nombre d'espèces, elle renferme plus de 30 espèces (**Kaabeche, 2003**). Les feuilles sont le plus souvent alternées, mais aussi opposées ou radiales, simples exstipulées (**Paulian, 1967**). Les fleurs sont généralement dissemblables dans un même capitule, celles du centre ayant à la fois étamines et pistil tandis que celles de la périphérie sont ordinairement et uniquement femelle. Les fruits sont des achènes, c'est-à-dire des fruits secs, indéhiscent et contenant chacun une seule graine (**Harborne et Swain, 1969**).

3.2. Classification botanique des plantes étudiées :

Les plantes étudiées sont regroupées dans le tableau 2 selon la classification botanique d'**Ozenda (2004)**.

Tableau 2 : Classification botanique des plantes étudiées.

	<i>Anvillea radiata</i>	<i>Bubonium graveolens</i>	<i>Cotula cinerea</i>
Règne :	plantae	plantae	plantae
Embranchement :	Spermaphytes	Spermaphytes	Spermaphytes
Classe :	Eudicots	Eudicots	Eudicots
Ordre :	Astérales	Astérales	Astérales
Famille :	Asteraceae	Asteraceae	Asteraceae
Genre :	<i>Anvillea</i>	<i>Bubonium.</i>	<i>Cotula</i>
Espèce :	<i>radiata</i>	<i>graveolens.</i>	<i>cinerea</i>
Nom scientifique :	<i>Anvillea radiata</i> Coss et Dur (Maiza et al, 1993).	<i>Bubonium graveolens</i> (Djelaila, 2007).	<i>Cotula cinerea</i> (Ozenda, 1977)

3.3. Nomenclature vernaculaire :

Les Nomenclature vernaculaires des plantes diffèrent d'une région à une autre. Une recherche bibliographique non exhaustive révèle les noms regroupés dans le tableau 3

Tableau 3 : Appellations vernaculaires des plantes étudiées.

Plantes	Appellation vernaculaire
<i>Anvillea radiata</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Negd (Ghourri et al., 2012). • Chadjeret eddhob (Maiza et al., 1993).
<i>Bubonium graveolens</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Tafs. (Djalaila, 2006). • Noug el ibel ou gensa (Dans le Sud-Est marocain) ; • Tafsa (Dans la région de Tindouf).
<i>Cotula cinerea</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Gartoufa (El rhaffari et Zaid, 2002); • Robita, chiriya (Benhouhou); • Chouhiya (dans la région d'El-Goléa et Ouargla) (Maiza et al., 1993); • Gartoufa Beida (dans la région de Béni Abbesse) (Maiza et al., 1993). • Takkélt (chez Targui) (Abdoun, 2002).

3.4. Description botanique :

3.4.1. *Anvillea radiata* :

Plante arbuste très rameux, boisé, en masse embranché, 20-50 cm de haut. **Feuilles** ; petites, rudement triangulaires, avec un grand pétiole et un membre fortement denté, un grands capitules solitaires ont un diamètre de 3-5 cm avec de longues ligules. **Fleurs** ; sont toutes jaune-orange, l'extérieur ceux 25 millimètres. **Le fruit** est un non-fleshy; cypsella prismatique indéhiscent (achène de deux carpelles) (figure 18). Il fleurit habituellement au printemps, mais peut fleurir tout au long de l'année (**Águeda et al., 2006**)

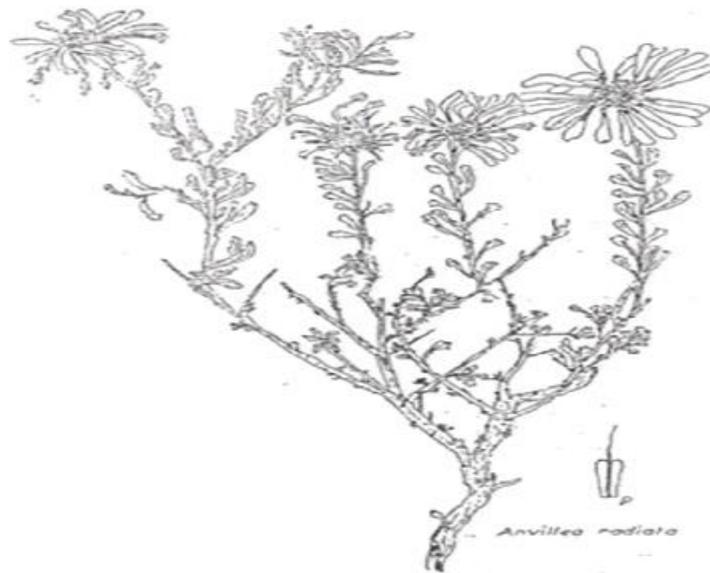


Figure 18 : Morphologie générale d'*Anvillea radiata* Coss et Dur (**Ozenda, 1967**).

3.4.2. *Bubonium graveolens* :

Est une arbuste bas, à écorce blanche et crevassée dans les parties âgées , à rameaux très étalés naissant peu au-dessous des capitules, feuilles d'un vert pale, étroites et profondément découpées, très velues, les supérieures presque entières et entourant le capitule qu'elle dépassent longuement, involucre à bractées coriaces, indurées à maturité, fleurs jaune, écailles du réceptacles allongées et dures, dépassant longuement les achaines, ceux-ci en cône renversé, arqués, velus, à quatre cotés très saillantes, tronqués au sommet et à aigrette remplacée par une couronne de quatre écailles membraneuses déchiquetées très commun dans tous le Sahara, surtout dans les dépressions argilo-sablonneuses (figure 19) . (**Ozenda, 2004**).



Figure 19 : Morphologie générale de *Bubonium graveolens* (Ozenda, 2004).

3.4.3. *Cotula cinerea*

Est une plante annuelle herbacée vivace de 25cm de hauteur. **Tiges ;** ramifiées depuis la base blanc pubères de 10 à 40 cm, couchées puis redressées, capitules de 6 à 10 mm de diamètre. **Feuilles ;** laineuses blanchâtres, épaisses, couchées puis redressées, 3 à 5 dents obtuses alternes, capitules de 6 à 10 mm de diamètre, à involucre laineux.

Fleurs ; tubuleuses, brunes en boutons puis jaune d'or, commun dans les sols Saharo-arabie sols un peu sablonneux (figure 20) (Ozenda, 2004 ; Abdoun, 2002).



Figure 20 : Morphologie générale de *Cotula cinerea* (Ozenda, 1967).

3.5. Répartition géographique :

3.5.1. *Anvillea radiata* :

Est une plante arbuste très rameux, endémique du Sud-ouest Algérien et Sud-est Marocain, (**Ozenda, 1983**). Cette espèce accepte une large variété d'états de sol et se développe sur les sols caillouteux des oueds, sur les regs environnants (plateaux rocheux répandu avec de petits cailloux) et dans les dayas. Elle prospère en conditions climatiques graves à moins de 100 millimètres de précipitations par année. (**Guzmán et Vargas, 2009**).

3.5.2. *Bubonium graveolens* :

Est une plante aromatique herbacée, endémique du Sud-ouest Algérien et Sud-est Marocain, elle se trouve, généralement dans les dépressions argilo sablonneuses (**Ozenda, 1983 ; Quenzel et Santa, 1963**).

3.5.3. *Cotula cinerea* :

Une petite plante annuelle qui se développe dans des conditions désertiques avec une moyenne de 100 mm de Pluie par an et favorise les sols silico-argileux. Elle se trouve généralement sur la non-solution saline les lits des oueds, sur les sols graveleux sableux (**Benhouhou**). Très fréquente dans le Sahara algérien, elle est courante dans tout le Sahara, y compris la région de la mer Rouge et le Sinaï (**Ozenda, 1983 ; Quezel et Santa, 1963**)

3.6. Composition chimique :

3.6.1. *Anvillea radiata* :

Sur le plan composition chimique, peu d'étude ont été réalisées sur cette plante. Dans ce sens **Djellouli et al., (2013)** ont montré que cette plante est un réservoir riche en phytocomposants tels que les Alcaloïdes, saponins, Terpènes, Tanins, Flavonoïdes, Steroïdes et les Cardenolides. De même 13 flavonoïdes dont 4 aglycones et 9 flavonol glycosides ont été isolés (**Dendougui et al., 2006**).

3.6.2. *Bubonium graveolens* :

D'après la recherche bibliographique que nous avons menée, peu d'études ont été réalisées sur cette espèce. Ces quelques études ont montré la richesse de cette plante en huiles essentielles dont 43 composés identifiés, ces derniers sont présents dans les feuilles et des fleurs (**Chérity A et al., 2005**), et en phyto-constituants comme les flavonoïdes, les

saponosides, les tanins, les alcaloïdes, les stéroïdes, les stérols insaturés, les terpènes, les cardénolides (Djelaila, 2007).

3.6.3. *Cotula cinerea* :

Une étude chimique d'un échantillon de *Cotula cinerea* récolté du Sahara marocain, à indiquer que, les stérols, terpènes proanthocyanes, tanins et les flavonoïdes semblent être les composés majoritaires contenus dans cette plante (Markouk, 2008).

3.7. Utilisation traditionnelle des plantes étudiées :

3.7.1. *Anvillea radiata* :

Cette plante est largement utilisée en médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies comme le diabète, l'indigestion, les courbatures, le refroidissement pulmonaire, ainsi que, pour le traitement des gastro-entérites, des spasmes et colique, des arthrites et des rhumatoïdes. (Maiza et al, 1993 ; Bellakhdar, 1997).

3.7.1. *Bubonium graveolens* :

Cette plante est utilisée dans le traitement des troubles gastro-intestinaux, la fièvre, les maux céphaliques, les bronchites et comme anti-inflammatoire. La poudre de la plante (feuilles) est prise en cataplasme sur la tête et pour dégager les sinus quand on est enrhumé par inhalation (Cheriti, 2000 ; Djelaila, 2007).

3.7.3. *Cotula cinerea* :

Utilisée pour les troubles broncho-pulmonaire, toux, problèmes digestifs (nausées, des vomissements et des douleurs à l'estomac). L'insolation et les rhumatismes. Elle est utilisée comme fébrifuge, pour combattre les coliques, les diarrhées, la toux, le refroidissement broncho-pulmonaire de plus cette plantes est utilisé pour aromatisé le lait. (Benhouhou ; Maiza et al, 1993).

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes:

1. Matériel fongique:

1.1. Provenance de la souche:

Le matériel fongique utilisé dans cette étude correspond à une souche de *Foa*, fournie par le laboratoire de valorisation des ressources biologiques et de la sécurité alimentaire dans les zones semi-arides, au sud ouest de l'Algérie, Université de Béchar (Code : KE21). La souche a été isolée à partir d'un rachis d'une palme adulte infectée, présentant les symptômes typiques de la maladie du Bayoud dans la palmeraie de Kenadsa (Béchar).

1.2. Conservation de la souche :

La souche a étéensemencée sur milieu PDA acidifié et a été conservée à 4°C jusqu'à son utilisation.

1.3. Tests de confirmation de l'identité de la souche fongique:

L'identification des moisissures a pendant longtemps été exclusivement basée sur l'observation des caractères cultureux et morphologiques (Tabuc, 2007). De plus, selon Sedra et Djerbi (1985), pour confirmer la présence de *Foa* parmi des isolats de *F. oxysporum* issus de palmiers, de porteurs sains ou de terre, les caractéristiques culturelles du champignon obtenues par une culture monospore; permettent une identification rapide et précise du pathogène sans recours à des inoculations artificielles.

1.3.1. Identification morphologique :

L'identification morphologique d'une espèce fongique repose sur l'analyse de critères cultureux (température et vitesse de croissance, ...) et morphologiques. Ces derniers sont constitués des paramètres :

- **Macroscopiques** : aspect des colonies, de leur revers,.... Ces critères ont été étudiés par un repiquage d'un implant mycélien de 6 mm de diamètre de l'isolat, dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDAA (Chabasse et al., 2002).

- **Microscopiques** : aspect du mycélium, des chlamydospores, des conidies,....

L'examen microscopique a été effectué par la technique de micro-culture qui consiste à inoculer les spores des moisissures sur une lame menée de petits carrés, de milieu PDA acidifié et les recouvrir par une lamelle. Les spores sont ensemencées sur les limites périphériques du milieu pour leur fournir un potentiel d'oxygène nécessaire à leur germination. L'ensemble est conditionné dans une chambre stérile et humide puis incubé à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 3 à 5 jours. Après incubation, les lamelles auxquelles s'adhèrent le mycélium sont transférées sur d'autres lames stériles contenant quelques gouttes de bleu de

méthylène. Les observations microscopiques aux grossissements 40 et 100 sont suffisantes pour mettre en évidence la plupart des éléments importants (Haris, 1989).

1.3.2. Identification moléculaire :

Chez une espèce donnée la variation des caractères physiologiques ou l'absence d'un métabolite d'une souche à une autre. D'où l'intérêt d'associer l'identification moléculaire qui offre une plus grande variabilité de caractères génétiques utiles à la taxonomie des champignons, grâce au séquençage de l'ADN ribosomal ou de gènes codant pour certaines protéines (Geiser *et al.*, 2007).

Dans cette partie, l'ADN génomique a été extrait et purifié, puis, la région de l'ARN 18S a été amplifiée en utilisant une amorce générique. Ensuite, le fragment amplifié a été séquencé (les caractéristiques techniques sont résumées dans le tableau 4 annexe 1). (Ces étapes ont été effectuées par l'Institut Universitaire des Maladies Tropicales et la Santé Publique des Iles Canaries, université de la laguna, Tenerife, Espagne).

2. Matériel végétal et sa provenance:

Les plantes sujets d'étude (Planche 3) ont été récoltées au stade de floraison (pendant la saison hivernale et printanière pour les années de 2009 à 2012) dans la région de Ksi-ksou (Latitude 31° 9' 54.072", Longitude -2° 31' 24.924" en degrés, minutes, secondes) 60 km au sud ouest de la ville de Béchar, sud ouest algérien (Figure 21). Les parties récoltées (feuilles et fleurs) ont été séchées à l'ombre dans une salle sèche et aérée, puis broyées et conservées séparément dans des récipients fermés, à une température ambiante et à l'abri de la lumière jusqu'à leur utilisation.



Figure 21 : Situation géographique de la région de récolte (Google earth, 2015).

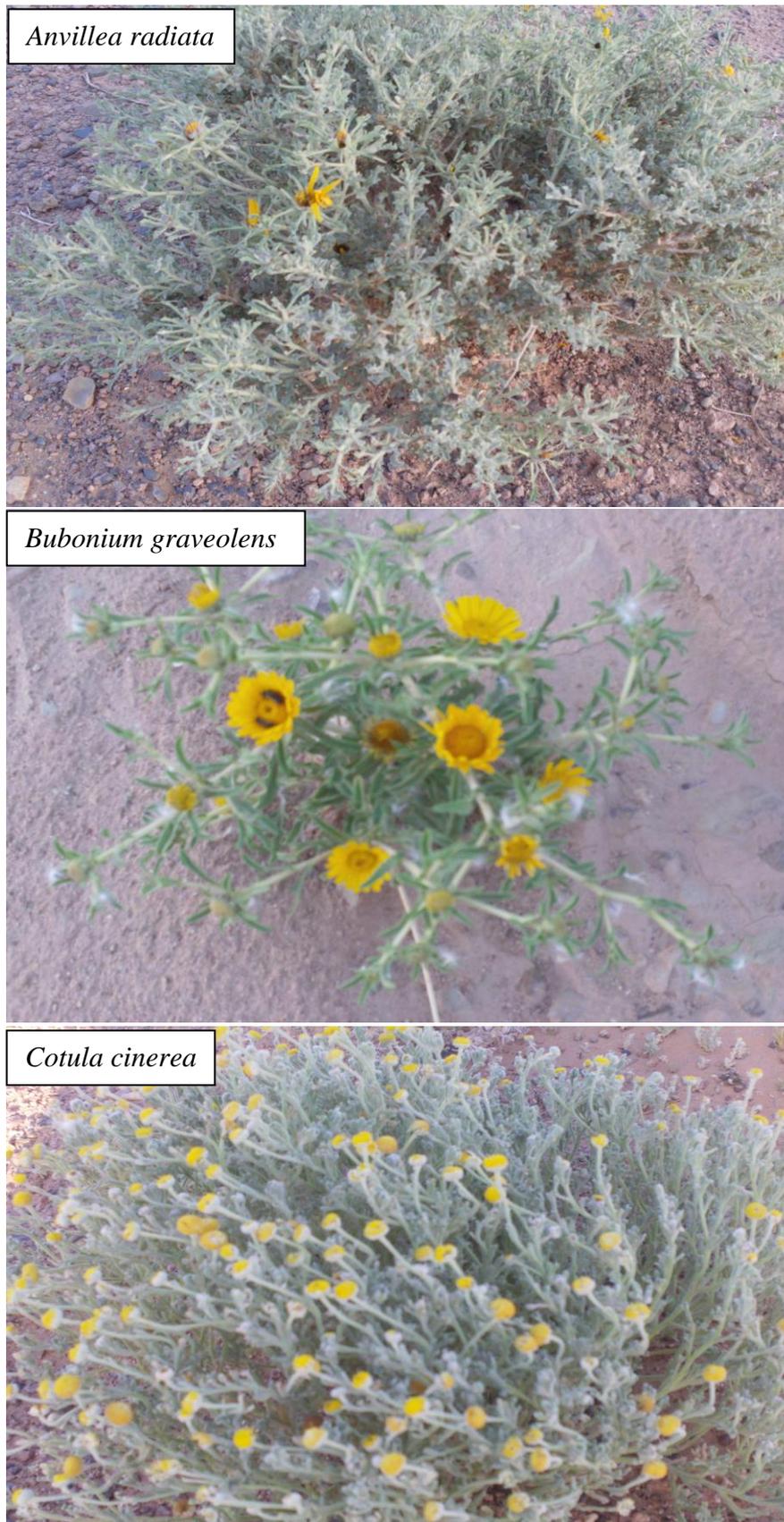


Planche 3: Photos de terrain des pieds entiers des plantes médicinales dans la région de Ksi-ksou (Béchar) (Mebarki, 2015).

3. Détermination de l'humidité dans le matériel végétal:

Le taux d'humidité a été déterminé par séchage (étuvage jusqu'à l'obtention d'un poids constant. C'est une méthode gravimétrique qui consiste en la détermination de la perte de poids par dessiccation (**Lazouni et al., 2007**).

3.1. Mode opératoire :

- Sécher des capsules vides à l'étuve pendant 15 mn à 103°C ;
- Tarer les capsules après refroidissement dans un dessiccateur ;
- Peser la prise d'essai de la plante (partie aérienne) et la placer dans l'étuve réglée à 60 °C pendant 1 heure ;
- Retirer les capsules de l'étuve, les placer dans le dessiccateur pendant 15 min, et après refroidissement, les peser. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

3.2. Expression des résultats : La teneur en eau est exprimée selon la formule suivante :

$$H(\%) = [(M_1 - M_2) / P] \times 100$$

H(%) : taux d'humidité

M₁ : Masse de la capsule + matière fraîche avant passage à l'étuve.

M₂ : Masse de l'ensemble après passage à l'étuve.

P : Masse de la prise d'essai.

4. Analyses phytochimiques :

L'analyse phytochimique est le moyen indispensable pour mettre en évidence la présence des groupes de familles chimiques présentes dans une drogue donnée. Il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation (**Yemoa et al., 2008**). La révélation des différentes familles a été effectuée à partir du végétal épuisé par différents solvants de polarités différentes. Les saponosides, stérols et stéroïdes, flavonoïdes, tanins, coumarines, alcaloïdes, anthracénosydes, anthocyanosides et les anthraquinones ont été identifiés selon les tests phytochimiques qualitatifs décrits par les méthodes de **Fachmann et Kraut (1995)** et **Wichtl et Anton (1999)**.

4.1. Produit végétal épuisé par l'eau :

Dans un ballon surmonté d'un réfrigérant, 50 g de la poudre végétale ont été introduits dans un volume de 300 ml d'eau distillée, l'ensemble a été porté à reflux pendant 1h. Après refroidissement, le mélange a été filtré, puis, a été soumis aux tests suivants.

- **Caractérisation d'amidon :**

Traiter 5 ml de l'extrait aqueux avec le réactif d'amidon (1,2 g d'I₂ et 2,5 g de KI solubilisés dans 500 ml d'eau distillée). L'apparition d'une coloration bleue-violacée indique la présence d'amidon.

- **Caractérisation des composés réducteurs :**

Traiter 1 ml de l'extrait aqueux avec 5 à 8 gouttes de la liqueur de Fehling puis chauffer. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge brique.

- **Caractérisation des saponosides :**

Ajouter à 2 ml de la solution aqueuse un peu d'eau distillée et agiter vigoureusement pendant 2 mn. La formation d'une colonne de mousse d'environ 1 cm persistant pendant au moins 15 minutes indique la présence des saponosides.

- **Caractérisation des tanins :**

Traiter 1 ml de la solution aqueuse avec 1 ml d'eau distillée et 1 à 2 gouttes de solution diluée de FeCl₃. L'apparition d'une coloration verte ou bleu verte indique la présence des tanins.

- **Caractérisation des alcaloïdes :**

Mettre 15 ml de l'extrait aqueux dans un ballon bicol. Ajouter NH₄OH 10%, jusqu'à pH=9. Extraire avec 3x10ml de chloroforme. Laver la solution chloroformique avec 3x2ml d'HCl 10%. La solution aqueuse de lavage est divisée en trois parties égales. Tester les échantillons avec les réactifs de Mayer et Wagner. Le troisième tube est considéré comme témoin. La formation d'un précipité jaune avec le réactif de Mayer ou la formation d'un précipité brun avec le réactif de Wagner indique la présence des alcaloïdes.

- **Caractérisation des acides gras :**

Acidifier la solution aqueuse alcaline, puis l'extraire avec l'éther diéthylique. Concentrer la solution étherique à sec. Le test positif est révélé par l'obtention d'un résidu gras.

4.2. Produit végétal épuisé par l'éthanol :

Dans un ballon, surmonté d'un réfrigèrent, mettre 50 g de poudre de la plante dans un volume de 300 ml l'éthanol (95%), puis porter l'ensemble à reflux pendant 1h. Après refroidissement, filtrer le mélange et le soumettre aux tests suivants :

- **Caractérisation des alcaloïdes :**

Evaporer 20ml de la solution éthanolique à sec. Ajouter 5 ml HCL 2N au résidu et chauffer au bain marie. Filtrer le mélange puis diviser le filtrat en trois parties égales. Tester les échantillons avec les réactifs de Mayer et Wagner. Le troisième tube est

considéré comme témoin. La formation d'un précipité jaune avec le réactif de Mayer ou la formation d'un précipité brun avec le réactif de Wagner indique la présence des alcaloïdes.

- **Caractérisation des flavonoïdes :**

Traiter 5 ml d'extrait alcoolique avec quelques gouttes d'HCl concentré et 0.5 g de tournure de magnésium. L'apparition d'une coloration rose ou rouge après trois minutes indique la présence des flavonoïdes.

- **Caractérisation des tanins :**

Prendre 1 ml de la solution alcoolique, ajouter 2 ml d'eau distillée et 2 à 3 gouttes de solution de $FeCl_3$ diluée. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-noire, verte ou bleu-verte et un précipité, selon que les tanins sont catéchiques, gallique ou ellagique.

- **Caractérisation des composés réducteurs :**

Traiter 1 ml de l'extrait alcoolique avec 2 ml d'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling puis chauffe le mélange. Un test positif se traduit par la formation d'un précipité rouge-brique.

- **Caractérisation des anthracénosides et anthocyanosides:**

25 ml de l'extrait éthanolique sont introduits dans un ballon surmonté d'un réfrigérant et contenant 15 ml d'HCl à 10%. le mélange ainsi formé est porté à reflux pendant 30 mn. Après refroidissement, on extrait la solution 3 fois avec 15 ml d'éther diéthylique afin d'obtenir deux phases, aqueuse et étherique. Ensuite, les deux phases sont traitées séparément.

Test des anthracénosides : Traiter 8 ml de la phase étherique extractive avec le réactif de Borntraeger. Le test considéré positif par l'apparition d'une coloration rouge orangée au violet pourpre.

Test des anthocyanosides : Doser la phase aqueuse acide par une solution de soude (NaOH). Un virage de couleur à pH différent indique la présence des anthocyanosides (pH < 3 la solution se colore en rouge. $4 < \text{pH} < 6$ la solution se colore en bleu).

- **Caractérisation des terpènes et stéroïdes :**

Test 1 : évaporer 10 ml d'extrait éthanolique et traiter le résidu obtenu avec 10 ml de chloroforme anhydride. Après filtration, mélanger 5 ml de la solution chloroformique avec 5 ml d'anhydride acétique. Ajouter quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Agiter puis laisser reposer. L'apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert confirme la présence des hétérosides stéroïdiques (maximum d'intensité en 30 min à 21°C).

Test 2 : 5 ml d'extrait sont mélangés avec 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré. Une couleur rouge-marronne de la couche d'interface indique la présence des triterpène hétérosidique.

4.3. Produit végétal épuisé par l'éther diéthylique:

Dans un ballon, surmonté d'un réfrigérant, mettre 50 g de poudre de la plante en présence de 300 ml d'éther diéthylique. Porter l'ensemble à reflux pendant 1h. Après refroidissement, filtrer le mélange et le soumettre aux différents tests suivants.

- **Caractérisation des alcaloïdes :**

Évaporer 10 ml de l'extrait étherique, ensuite dissoudre le résidu obtenu dans 1.5 ml de HCl (2%). la formation d'un précipité blanc jaunâtre après l'ajout de 1 à 2 gouttes de réactif de Mayer à cette solution indique la présence des alcaloïdes.

- **Caractérisation des anthraquinones:**

Évaporer 3 ml de l'extrait étherique, puis ajouter 1 ml d'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH) concentré. L'apparition d'une teinte vive variant de l'orangé rouge au violet pourpre, indique la présence des emodols.

- **Caractérisation des huiles volatiles :**

Évaporer 20 ml de solution étherique et dissoudre le résidu obtenu dans l'éthanol, puis concentrer la solution éthanolique à sec. Le test est positif se traduit par l'obtention d'un résidu aromatique.

4.4. Produit végétal épuisé par l'éther de pétrole :

Dans un ballon, surmonté d'un réfrigérant, mettre 5 g de poudre de la plante dans un volume de 30 ml d'éther de pétrole. Ensuite, porter l'ensemble à reflux pendant 1h. Après refroidissement, filtrer le mélange et le soumettre aux tests suivants.

- **Caractérisation des stérols et triterpenes :**

Évaporer 10 ml de l'extrait étherique. Dissoudre le résidu dans 0.5 ml d'anhydride acétique et 0.5 ml de chloroforme, puis ajouter 2 ml d'acide sulfurique concentré. Un anneau rouge brun ou violet dans la zone de contact avec le surnageant ou une coloration violette indique la présence des stérols et triterpènes.

- **Caractérisation des polyuronides :**

10 ml d'éthanol sont placés dans un tube à essai, 2ml de l'extrait étherique sont ajoutés gouttes à gouttes .L'apparition d'un précipité violet ou bleu indique la présence d'un mucilage.

5. Préparation des extraits végétaux:

5.1. Extraction des flavonoïdes :

L'extraction des flavonoïdes a été faite selon la méthode de **Lee et al. (1995)**. Le matériel végétal (feuilles et fleurs de chaque plante) réduit en poudre a été chauffé à 90 °C sous reflux dans un mélange eau distillée/ éthanol absolu pour (250 ml : 250 ml) pendant quatre heures. L'extrait a été filtré à travers le papier filtre. La phase hydro-éthanolique a été évaporée pour éliminer l'éthanol est ensuite extraite par 100 ml de n-butanol puis acidifiée par HCL à 10 % jusqu'au pH =3, la phase n-butanolique a été évaporée à sec. Le résidu sec a été extrait trois fois par 200 ml du mélange eau distillée / acétate d'éthyle) (v/v) pendant une heure, la phase organique a été alcalinisée par NaOH jusqu' au pH=9. Après 15 minutes de repos la phase organique obtenue représente les flavonoïdes elle a été évaporée à sec, pesée et reprise par l'éthanol à 1% pour les tests biologiques. (Figure 22).

Rendement des flavonoïdes :

Le rendement a été calculé selon la formule suivante : $Re = P \times 100 / P_{initial}$

Soit : **Re** : Le Rendement (%).

P : Poids des flavonoïdes en gramme.

P_{initial} : Poids initial de l'organe végétal au début de l'extraction.

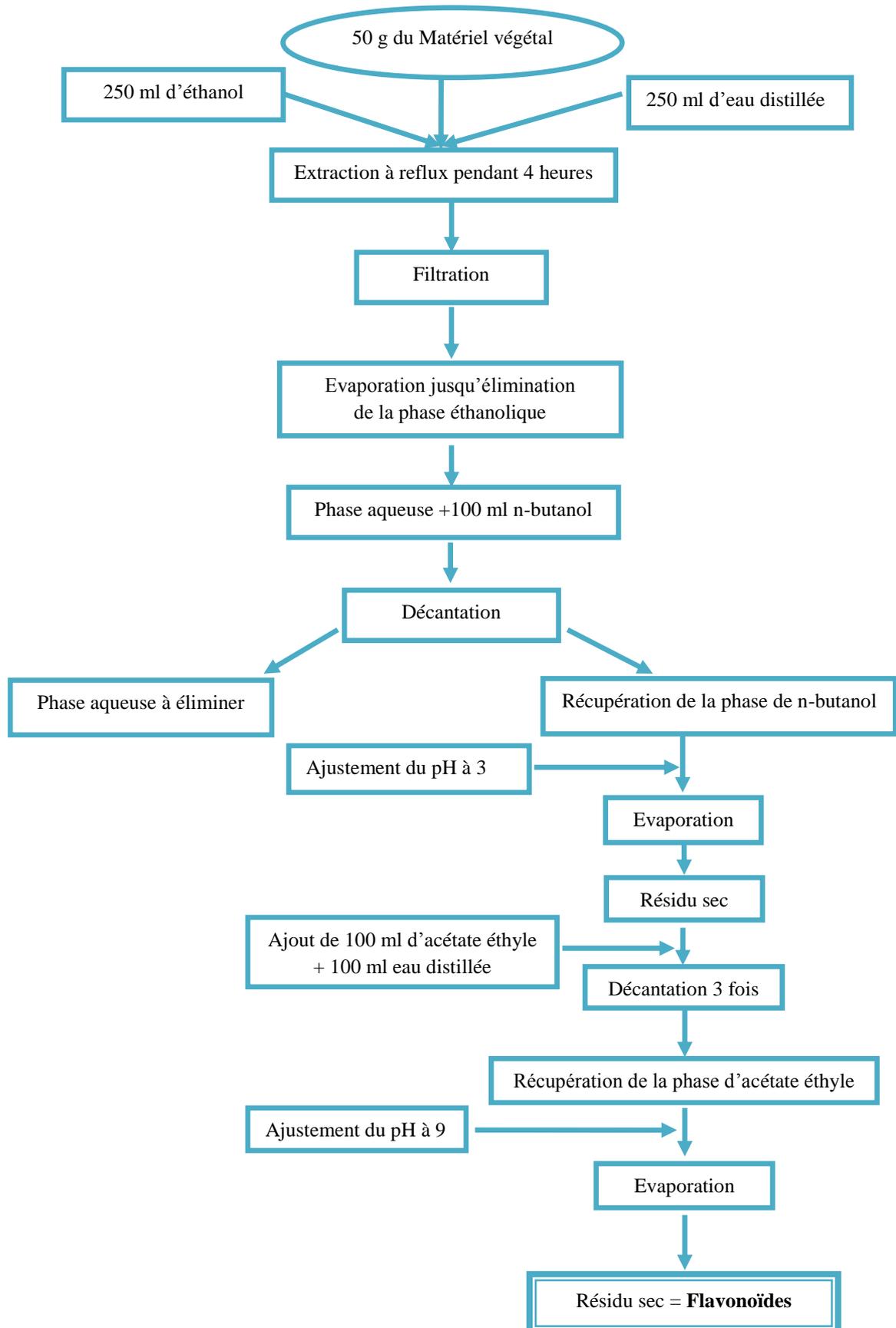


Figure 22: Protocole d'extraction des flavonoïdes selon Lee *et al.* (1995).

5.2. Préparation des extraits polysaccharidiques :

L'extraction des polysaccharides pariétaux nécessite une opération préliminaire consiste à la préparation du résidu pariétal (**Harche et al., 1991**).

5.2.1. Préparation du résidu pariétal :

30 g de la poudre végétale ont été introduits dans un erlen contenant un mélange de méthanol et chloroforme (1V-1V) et ont été mises sous agitation pendant 14 heures sous hotte afin d'éliminer les lipides solubles, les tanins et autres constituants cytoplasmiques, l'opération a été répétée deux fois. Après filtration, le résidu a été mis dans l'éthanol 95 % pendant 2 heures sous agitation afin d'éliminer les traces de chloroforme, puis a été remis dans l'éthanol 95 % bouillant pendant 2 heures pour une meilleure élimination des traces de chloroforme. Le résidu a été ensuite mis à sécher à l'étuve à 60 °C pendant 48 heures (figure 23) (**Redgwell et Selvendran, 1986 ; Harche et al., 1991**).

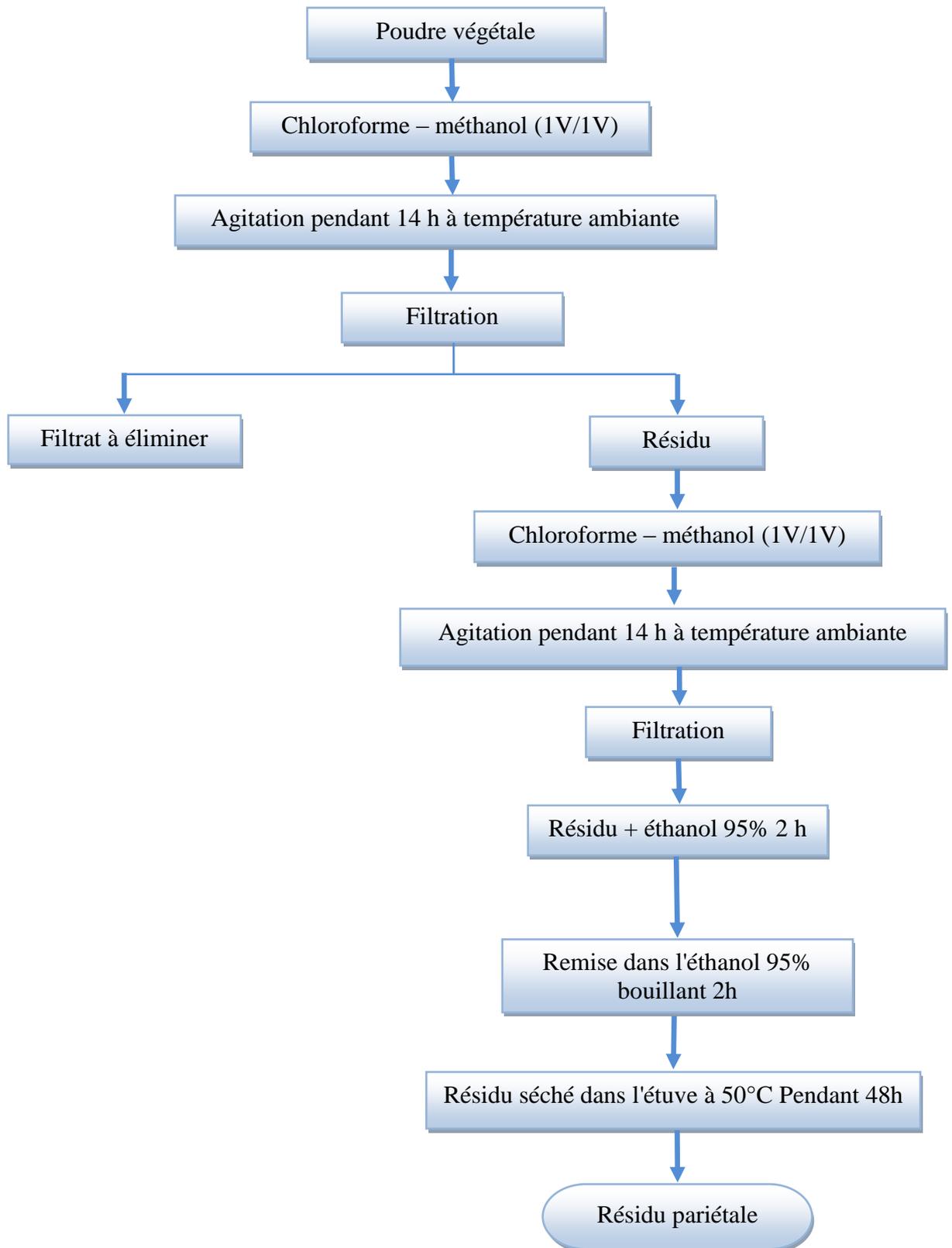


Figure 23: Protocole expérimental pour la préparation du résidu pariétale selon Redgwell et selvendran (1986)

5.2.2. Extraction des hémicelluloses et isolement de la cellulose :

Le choix des conditions opératoires et la méthode d'extraction sont essentiels pour garantir la fiabilité de l'extraction des polysaccharides et les résultats ultérieurs de leur valorisation. Il existe plusieurs protocoles d'extraction permettant l'extraction et la purification des polysaccharides. Dans la littérature, on parle rarement de l'extraction de la cellulose mais plutôt de la purification de la cellulose. Cette purification résulte de l'élimination des autres extractibles qui peuvent exister.

Selon **Kebir (2009)**, l'extraction par voie alcaline selon le protocole de **Chanda et al. (1950)** constitue une bonne méthode d'extraction des hémicelluloses. Pour ce faire, 5g de résidu pariétal sont introduits dans un erlen contenant du NaOH à 4% et mis sous agitation pendant une nuit. Cette opération est renouvelée sur le résidu pour récupérer le maximum des hémicelluloses. Après filtration à travers un buchner à verre fritté, le résidu est lavé avec l'eau distillée puis avec l'acétone, ensuite lyophilisé ou séché à l'étuve à 60°C pendant une nuit et en fin pesé, il représente la fraction cellulosique (Figure 24).

Les deux filtrats obtenus sont neutralisés par l'acide acétique pur, puis précipités dans l'éthanol (1V-3V) pendant une nuit. Après centrifugation à 3600 t/min pendant 30 minutes, le culot est lavé par l'eau distillée puis à l'acétone, ensuite séché à l'étuve à 60°C pendant 14 heures et enfin pesé. Cela représente la fraction hémicellulosique (**Chanda et al., 1950**).

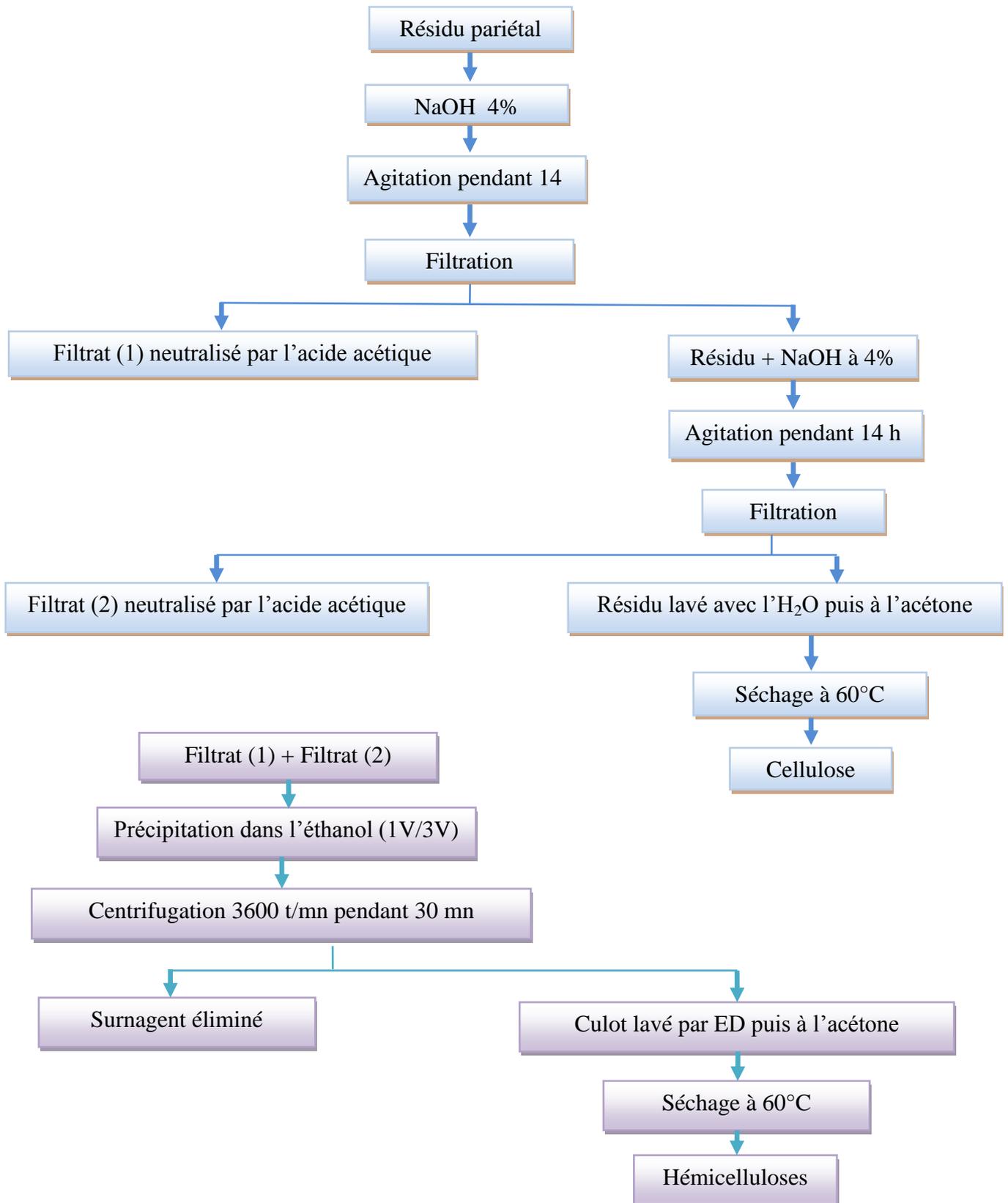


Figure 24: Protocole d'extraction de la cellulose et des hémicelluloses d'après Chanda et al., (1950)

5.2.3. Extraction des pectines méthylées :

Les pectines méthylées (PM) ont été extraites à l'eau bouillante selon le protocole de **Thibault (1980)**. 5 g de résidu pariétal ont été mis dans un erlen contenant 100 ml d'eau distillée sous agitation pendant 14 heures à la température ambiante, puis ont été mis à ébullition sous reflux deux fois deux heures. Après filtration, le filtrat a été concentré au rotavapor. Puis a été précipité dans l'acétone à froid (1V-2V) pendant 14 heures, après centrifugation, le culot a été lavé à l'eau distillée, à l'alcool puis a été séché à l'étuve à 50 °C et a été pesé. Il constitue les PHM (Figure 25).

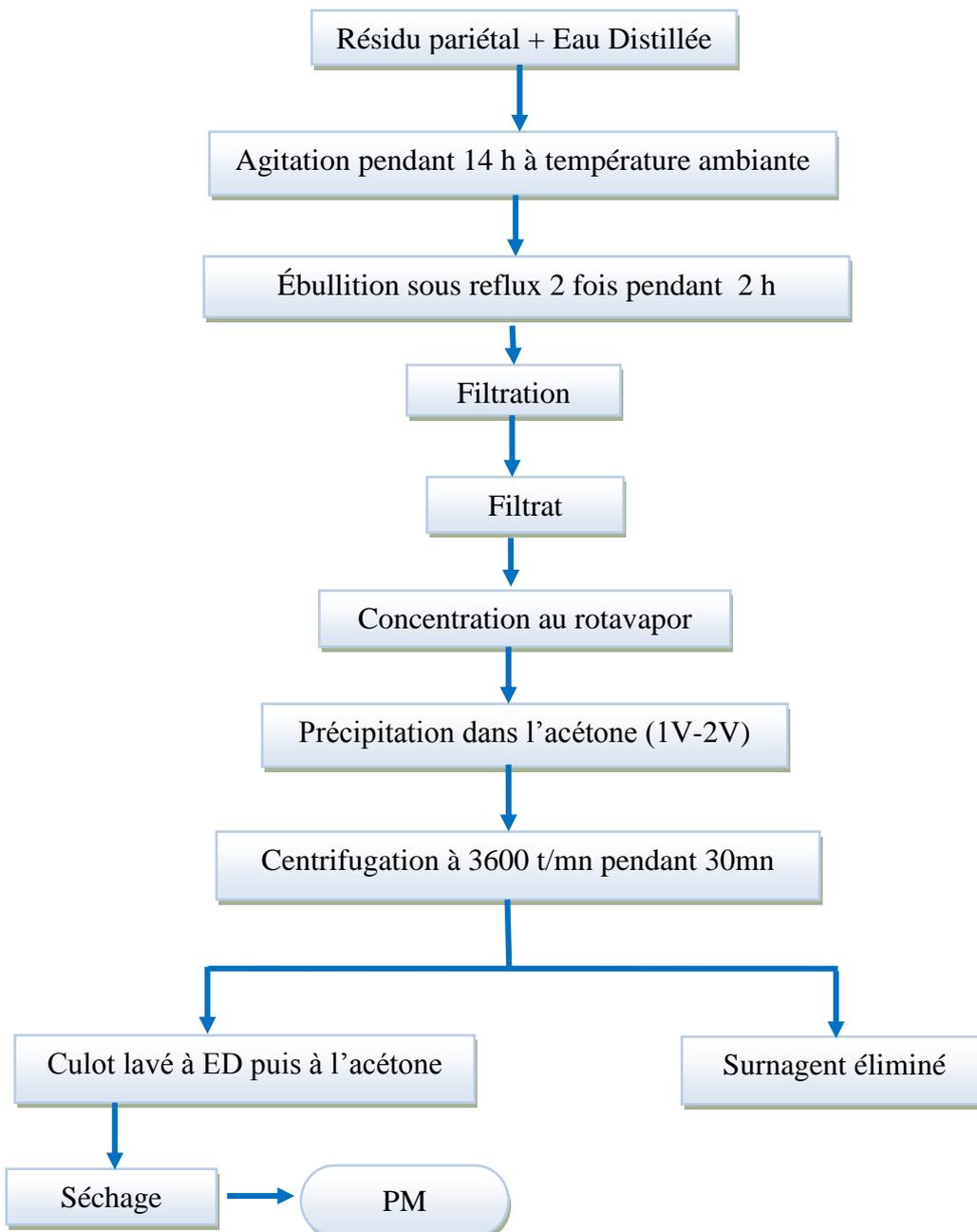


Figure 25: Protocole d'extraction des PM selon **Thibault (1980)**.

6. Testes antifongiques:

Avant d'être ajoutés au milieu de culture PDAA (Potato dextrose agar acidifié), les flavonoides, les hémicelluloses et les PM ont été solubilisés dans l'éthanol 1% (Bouchelta *et al.*, 2005), une solution de NaCl (5 mM) et dans de l'eau distillée stérile (Kebir, 2009) respectivement. Une gamme de concentrations (0.25, 0.5, 1, 2, 4 mg/ml de milieu de culture) a été préparée et utilisée. Par contre, la cellulose a été destinée pour reconstituer des milieux solides et liquides à base de cellulose (composition en annexe 3), sur lesquels le développement du Foa a été étudié.

6.1. Effet des extraits sur la germination des spores:

Un volume de 0,1 ml d'une suspension sporale de Foa ajustée à 10^5 spores/ml d'eau distillée stérile (comptage à l'aide d'une cellule de Malassez) a été étalé sur des boîtes de Pétri contenant un milieu PDAA additionné des différentes concentrations d'extraits (flavonoides, hémicelluloses et PM) et sur le milieu cellulose-agar. L'incubation a été faite à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 24 heures. Le comptage des spores, germées ou non a été déterminé sous microscope sur un total de 200 spores. Une spore est considérée germée si la longueur du tube germinatif est supérieure à son plus petit diamètre (Maouni *et al.*, 2001).

6.2. Effet des extraits sur la croissance mycélienne :

Des boîtes de Petri contenant le milieu PDAA (incorporé par les différentes concentrations (0.25, 0.5, 1, 2, 4 mg/ml) de chaque extrait : flavonoïdes, extrait hémicellulosique et PM) et d'autres contenant le milieu cellulose-agar ont étéensemencées avec des disques mycéliens (5 mm de diamètre) issus d'une culture jeune de Foa (culture de 4 jours). L'incubation a été effectuée à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ et la croissance mycélienne des colonies a été estimée après 7 jours d'incubation en calculant la moyenne des deux diamètres mesurés sur deux axes perpendiculaires (Hassikou *et al.*, 2002).

Pour les cultures réalisées sur les milieux à base de cellulose, Des mesures diamétrales ont été effectuées chaque jour à partir du 3^{ème} jusqu'au 7^{ème} jour d'incubation, une note a été attribuée en fonction du diamètre de la colonie et de la densité apparente du mycélium selon l'échelle de notation de Benkirane *et al.*, (1995) (tableau 5).

Tableau 05: Echelle de notation de **Benkirane et al., (1995)**.

Diamètre de la Colonie (mm)	Densité			
	Très peu dense	Peu dense	Dense	Très dense
0 à 30	0	0	1	2
30 à 60	0	1	2	3
60 à 90	1	2	3	3

6.3. Effet des extraits sur la sporulation :

Toutes les colonies ayant servi à évaluer la croissance mycélienne ont été incubées jusqu'au 10^{ème} jour à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pour étudier l'effet des extraits sur la sporulation. Quatre rondelles de 5 mm de diamètre ont été prélevées le long du diamètre d'une même colonie et ont été réunies dans un tube contenant 1 ml d'eau distillée stérile. Après agitation au vortex pendant 30 secondes, les spores ont été comptées à l'aide d'une cellule de Malassez à raison de trois comptages par suspension (**Maouni et al., 2001**).

Dans tous les tests précédents, des tests témoins ont été réalisés dans les mêmes conditions en absence d'extraits. Le taux d'inhibition de chaque extrait a été déterminé selon la formule ci-dessous (**Amadioha, 2003**):

$$I (\%) = (T - E) \cdot 100 / T.$$

I : Taux d'inhibition en %.

T: estimation de la germination (la croissance mycélienne ou de la sporulation) dans le milieu sans extrait (témoin).

E: estimation de la germination (la croissance mycélienne ou de la sporulation) en présence d'extrait (essai).

6.4. Production de la biomasse dans des milieux liquides à base de cellulose :

Cette culture a été réalisée selon le protocole de **Lekchiri et al. (2006)** : dans des flacons contenant 50 ml du milieu à base de cellulose foliaire des 3 plantes étudiées. Un disque mycélien de *Foa* a été ajouté, le tout a été incubé sous agitation (60 t/mn) à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 3 jours. La biomasse du champignon a été déterminée par poids sec (**Garcia et al., 1997**), le mélange a été filtré à travers un tissu de filtration pesé à vide (P_0) puis à travers

un papier filtre. L'ensemble (tissu et biomasse du champignon) a été séché à température ambiante pour la détermination de son poids (P_1).

La biomasse sèche du champignon a été obtenue selon la relation de **Garcia et al. (1997)**,

$$P = P_1 - P_0$$

Soit:

P: Poids de la biomasse.

P₀: Poids du tissu de filtration.

P₁: Poids du tissu et la biomasse du champignon après le séchage.

La biomasse sèche obtenue a été comparée avec celle obtenue après la même culture mais en présence de cellulose microcristalline commercialisée et d'autres provenant de la partie foliaire des deux variétés de palmier dattier (*Phoenix dactylifera*) l'une résistante au bayoud (variété Takerbucht) et l'autre sensible au bayoud (appelée Deglet Nour).

6.5. Effet des extraits sur la densité de population du Foa dans le sol en laboratoire :

Les flavonoïdes, la cellulose, l'hémicellulose et les PM ont été ajoutés séparément à un sol de palmeraie (préalablement tamisé et stérilisé à 120 C° pendant 20 minutes) avec des concentrations de 1 %, 5 % et 10 % (p/p). Le sol a été ensuite inoculé par une suspension sporale, ajustée à 10⁶ spores/ml, afin d'obtenir 10⁶ spores/g de sol. L'incubation a été faite à 25 ± 2°C. La densité de population de Foa a été déterminée en utilisant la technique de la plaque de dilution à temps 0 (avant le traitement du sol), 1, 3, 7, 14 et 21 jours après le traitement du sol (**Bowers et Locke, 2000**). 0.5g de sol (unité d'échantillonnage) de chaque récipient a été placé dans 5 ml d'eau distillée stérile, après homogénéisation, des dilutions décimales ont été effectuées. Un millilitre de la dilution appropriée (en fonction du traitement) a été étalonné sur une boîte de Pétri contenant le milieu PDAA. L'incubation a été faite à 25 ± 2°C pendant 24 à 48 heures, et les unités formant des colonies ont été dénombrées au niveau des boîtes de Pétri puis rapportées par gramme de sol (**Simoussa et al., 2010**).

6.6. Effet des flavonoïdes sur la virulence relative de Foa :

De nombreuses espèces de *Fusarium* sont des pathogènes graves de plantes, provoquant des symptômes tels que des lésions nécrotiques, la pourriture, et le flétrissement. La virulence dans cette étude a été recherchée *in vitro* sur des tissus des tubercules de pomme de terre.

Le test de virulence a été réalisé comme décrite par **Herrmann et al, (1996)** avec légère modification. Des tubercules de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) ont été stérilisés en surface par l'hypochlorite de sodium à 1% pendant 5min puis ont été lavées trois fois avec l'eau distillée stérile. Après leur séchage, les tubercules ont été coupées en tranches de 6mm d'épaisseur et placées sur un papier filtre stérile, imbibé d'eau distillée stérile dans des boîtes Pétri stériles. Différentes charges (0,25 mg, 0,5 mg, 0,750 mg et 1 mg) de l'extrait de flavonoïde ont été déposées au centre des tranches de pomme de terre. Après 5 min, chaque tranche de pomme de terre a été inoculée par un disque mycélien (1cm, coté mycélien vers le bas) de 7jours de culture de Foa (culture sur PDAA) ; après couverture par papier aluminium les boîtes ont été incubées à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 7 jours au bout desquels les tissus nécrosés ont été pesés (par mesure du poids de la boîte entière avant et après l'incubation). Les résultats ont été comparés à la virulence de Foa (tranche de pomme de terre inoculée par un disque mycélien de Foa mais sans extrait flavonoïde) en tant que virulence relative (VR).

6.7. Effet des flavonoïdes sur la mycotoxinogénèse et la production de biomasse:

Ce test a pour objectif d'évaluer l'effet des flavonoïdes sur la production des toxines chez Foa : Dans des flacons stériles contenant 45 ml du milieu YES, 5ml de l'extrait flavonoïdes ont été ajoutés (a fin d'obtenir une concentration de 4 mg de flavonoïdes par ml de milieu de culture). Ensuite, le mélange a été inoculé par 30 μl d'une suspension sporale (10^5 spores/ml). Le tout a été mis dans l'incubateur à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 15 jours sous agitation. Un témoin (culture sans flavonoïdes) a été réalisé dans les mêmes conditions. Après 15 jours d'incubation, le tout a été filtré à travers un papier filtre et la biomasse formée a été pesée après séchage pour voir l'effet des flavonoïdes sur la biomasse (**Garcia et al, 1997**).

D'autre part, le filtrat obtenu a été additionné à 162 ml de chloroforme, le tout a été vigoureusement agité pendant 30 mn. Ensuite, le mélange a été laissé à décanter en utilisant une ampoule à décantation. La phase chloroformique ainsi obtenue a été filtrée à travers un papier filtre plissé, puis a été concentrée par évaporation sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif jusqu'à un volume de 2 à 3 ml qui a été ensuite destiné à une analyse chromatographique sur couche mince (CCM) où le mélange toluène, acétate d'éthyle et l'acide formique (50/40/10 ml) a été utilisé comme éluant. Lorsque l'éluant atteint le front de la plaque, cette dernière a été retirée de la cuve et puis séchée. Ensuite, a été examinée sous UV à 365nm. La présence des mycotoxines se traduit par des fluorescences

caractéristiques (Multon, 1982). Les taches fluorescentes sont caractérisées par un facteur de rétention (R_f) qui est défini comme étant le rapport entre la distance parcourue par les substances (X) sur la distance parcourue par l'éluant (Y).

6.8. Effet des flavonoïdes sur l'activité cellulasique du Foa :

6.8.1. Obtention de la cellulase :

Dans des flacons stériles contenant 50 ml du milieu liquide à base de cellulose (comme seule source de carbone), une culture de Foa a été préparée en inoculant ce milieu par un disque mycélien à partir d'une culture jeune de Foa, l'incubation a été faite à $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ sous agitation (60 t/mn) pendant 7 jours, puis le milieu de culture a été filtré à travers un papier filtre, le filtrat ensuite a été utilisé dans le test d'inhibition de la cellulase.

6.8.2. Test d'inhibition de la cellulase :

L'activité cellulasique a été mesurée par la méthode de diffusion sur gélose (Leuchtenberger, 1989). Dans des boîtes de Pétri, une gélose à base de cellulose incorporée par l'extrait des flavonoïdes (à raison de 4mg/ml de milieu de culture) a été coulée. Après solidification, 4 puits de 6 mm de diamètre ont été creusés dans la gélose, puis, le filtrat obtenu dans l'étape précédente a été réparti dans les puits à raison de 30 μl par puits. Enfin les boîtes ont été incubées à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 4 heures (Badid et al, 2001). Un témoin (milieu de culture sans extrait de flavonoïde) a été réalisé dans les mêmes conditions. Les éventuelles zones d'hydrolyse de la cellulose se colorent en marron foncé autour des puits après révélation (10 ml d'une solution d'iode (2% p/v) et d'iodure de potassium (3% p/v) dans l'éthanol (70%) pour une durée de 5 min, ensuite lavée à l'eau distillée). (Kasana et al, 2008 ; Abu-Bakar et al, 2010). Les diamètres des zones d'hydrolyse ont été mesurés dans les boîtes témoins et dans celles contenant les extraits des flavonoïdes (Figure 26). Ensuite, le taux d'inhibition de l'activité cellulasique exercée par ces extraits a été déterminé par la formule suivante :

$$T_i(\%) = [(D_t - D_h) / D_t] \times 100$$

Avec :

T_i : Taux d'inhibition de l'activité cellulasique en %.

D_t : Diamètre de la zone d'hydrolyse dans les boîtes témoins.

D_h : Diamètre de la zone d'hydrolyse dans les boîtes avec extrait.

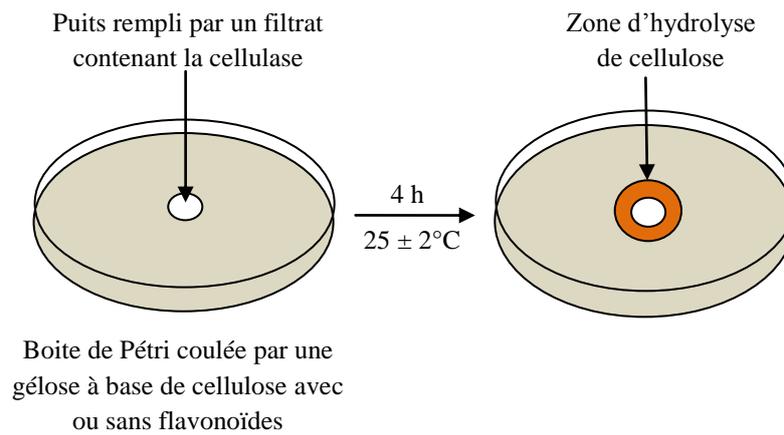


Figure 26 : Schéma représentant l'effet des flavonoïdes sur l'activité cellulasique du Foa

7. Etude statistique :

Une étude statistique (Test de Fischer avec le logiciel Microsoft Office Excel 2007 à un critère au seuil de 5%) a permis de comparer l'effet des organes pour chaque plante et l'effet de la variation de la concentration pour chaque extrait sur les différents stades de vie du Foa (germination des spores, croissance mycélienne et sporulation).

Les résultats de l'effet des extraits sur la densité de population du Foa dans le sol en laboratoire ont été aussi soumis à ce test en comparant l'effet de la concentration et la durée de l'incubation.

Résultats

Résultats :

1. Tests de confirmation de l'identité de la souche fongique :

1.1. Identification morphologique : Après 7 jours d'incubation, les colonies sont généralement caractérisées par un morphotype cotonneux, présente un mycélium aérien très abondant, épais et dense avec une couleur blanche et sont roses sur le revers de la boîte et à croissance lente (6,0 –8,5 cm de diamètre à 25 °C sur milieu PDA) (photo 4).

L'observation microscopique révèle un mycélium fin blanc, ramifié (photo 5). Les chlamydospores sont intercalaires, formées dans le mycélium, sub-globuleuses et hyalines. Le mycélium produit des spores caractéristiques du genre *Fusarium* : des microconidies souvent unicellulaires et quelques fois bicellulaires et des macroconidies variables, ovales à ellipsoïdes, droites à légèrement courbées, cloisonnées et pointues aux deux extrémités.

1.2. Identification moléculaire : le séquençage du fragment amplifié révèle la présence de 631 nucléotides comme c'est indiqué dans la figure 27 (annexe 1). L'identification de cette séquence nucléique utilisant le programme BLAST d'alignement (The **Basic Local Alignment Search Tool**) montre que ce fragment présente 98% d'homologie avec les souches appartenant au *Fusarium oxysporum* (figure 28, annexe 1). Il est à noter qu'aucune séquence spécifique pour la forme spéciales « *albédinis* » n'a été trouvée dans ce moteur d'alignement.



Photo 4: Culture de Foa, sur milieu PDA.

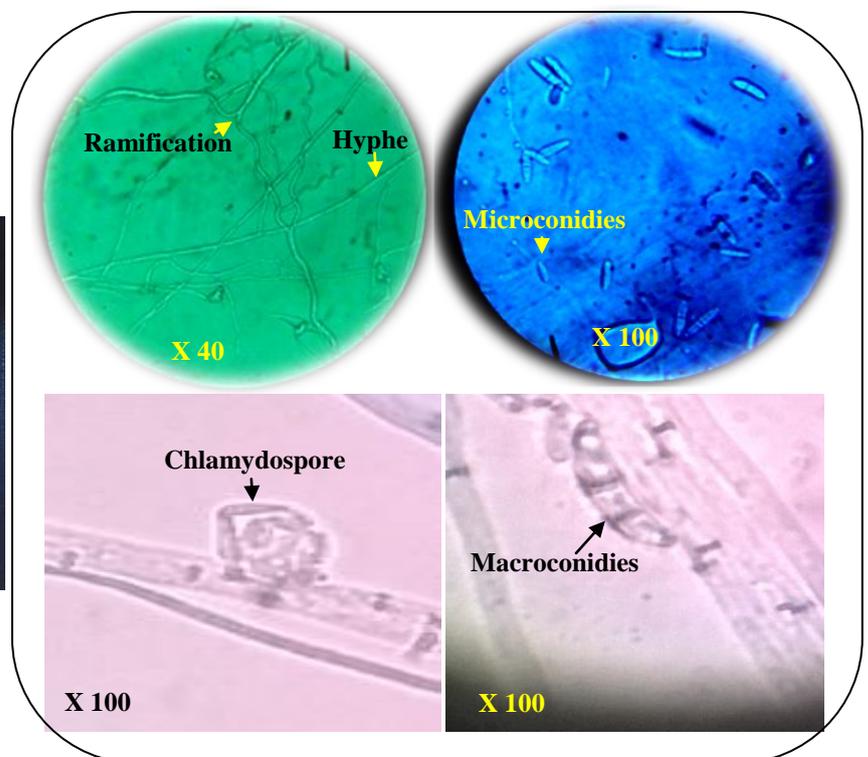


Photo 5: Observation microscopique de la souche Foa après micro-culture.

1. Détermination de la teneur en eau dans le matériel végétal:

La détermination de l'humidité des plantes étudiées a révélé leur richesse en eau dont le taux d'humidité est entre 70 et 80% (figure 29). Ce qui signifie que 20 à 30% représente le taux de la matière sèche ayant servi réellement à l'extraction des flavonoïdes et des polysaccharides pariétaux.

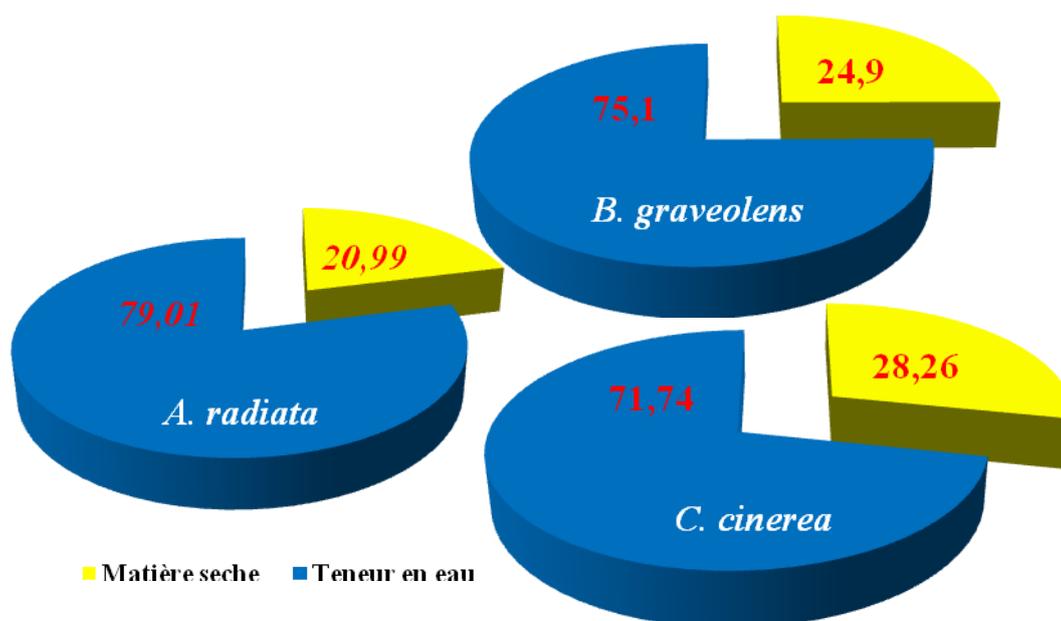


Figure 29: Taux d'humidité et de la matière sèche.

2. Analyses phytochimiques :

L'analyse phytochimique a été effectuée sur les trois plantes en utilisant cinq solvants de polarité différente. Ce screening a permis d'avoir une idée claire sur les différents composés présents dans les espèces étudiées. Les résultats mentionnés dans le tableau 6 indiquent la présence des saponosides, tanins, acides gras, flavonoïdes, anthracénosides, huiles volatiles, terpènes et stéroïde, alcaloïdes, stérols et triterpènes dans les trois plantes, par contre, ces dernières sont dépourvues de l'amidon et des composés réducteurs, de plus, on a constaté la présence des emodols et les polyuronides uniquement dans *A. radiata*. Les anthocyanosides ont été détectés seulement chez *C. cinerea*.

Tableau 6: Résultats de l'analyse phytochimique de la partie aérienne des trois plantes étudiées.

Composé recherché	Espèces végétales		
	<i>A. radiata</i>	<i>B. graveolens</i>	<i>C. cinerea</i>
Amidon	-	-	-
Composés réducteurs	-	-	-
Saponosides	+	+	+
Tanins	+	+	+
Alcaloïdes	+	+	+
Acides gras	+	+	+
Flavonoïdes	+	+	+
Anthracénosides	+	+	+
Anthocyanosides	-	-	+
Anthraquinones	+	-	-
Huiles volatiles	+	+	+
Terpènes et stéroïde	+	+	+
Stérols et triterpènes	+	+	+
Polyuronides	+	-	-

(-) absence, (+) présence.

3. Rendement de l'extraction :

Le rendement de tel extrait est exprimé par le poids de cet extrait obtenu pour 100 g de matière végétale sèche. La figure 30 illustre les rendements des flavonoïdes et des différents polysaccharides ciblés. Il s'avère que les rendements en flavonoïdes sont relativement moins importants pour toutes les espèces étudiées dont les plus faibles ont été obtenus par *B. graveolens* dont ils sont de l'ordre de 1.13% et 2.59% pour les fleurs et les feuilles respectivement. *C. cinerea* a fourni un extrait flavonoïde avec des rendements voisins, 2,85% pour les feuilles et 3% pour les fleurs. En revanche, les meilleurs rendements ont été obtenus par *A. radiata*, où les valeurs varient de 3.52% pour les fleurs à 4.24% pour les feuilles.

Pour les PM, les taux des rendements sont compris entre 2,18% (obtenu à partir des feuilles d'*A. radiata*) et 10,5% (obtenu à partir des fleurs de *C. cinerea*). De même ces

résultats indiquent que l'extraction des hémicelluloses a donné des rendements qui diffèrent d'une espèce à une autre, dont le moins important est de l'ordre de 6,05%, a été obtenu par les fleurs d'*A. radiata* et le plus important est de l'ordre de 13,85%, a été obtenu par les feuilles de la même espèce. Il ressort aussi de la figure 28 que les rendements en cellulose sont relativement élevés par rapport aux autres extraits. L'extraction de la cellulose a fourni des extraits avec un taux allant de 13,86% (obtenu à partir des fleurs de *C. cinerea*) jusqu'au 27,23% (obtenu à partir des fleurs de *B. graveolens*). Le suivi de la teneur en polysaccharides pariétaux dans ces espèces a permis de faire un certain classement par ordre décroissant, soit : cellulose > hémicellulose > PM.

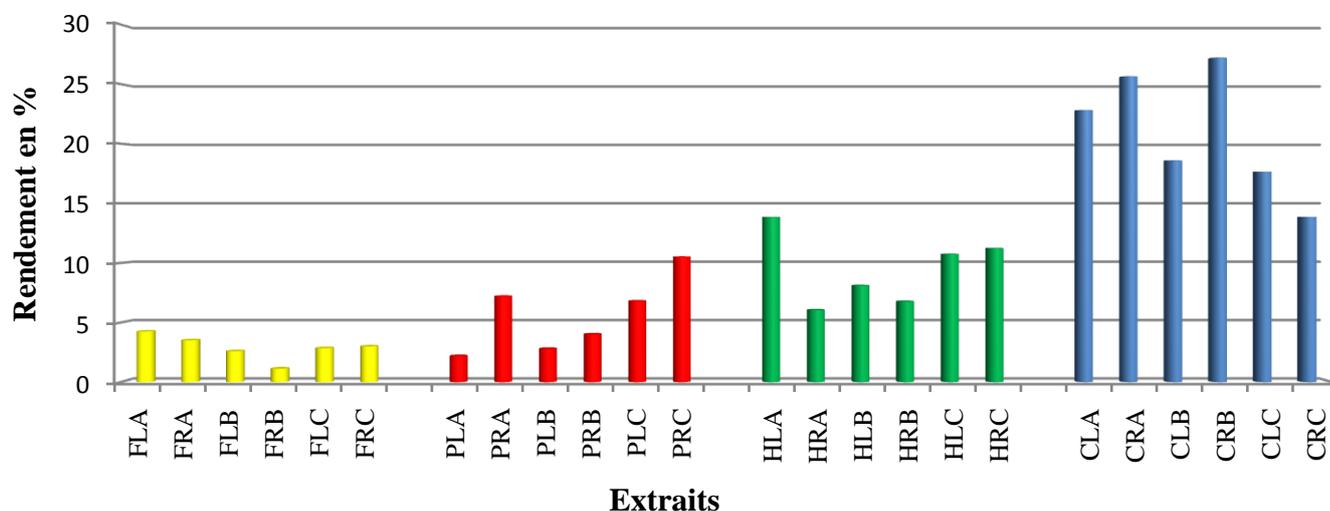


Figure 30: Rendement de l'extraction.

4. Tests antifongiques :

4.1. Effet des extraits sur la germination des spores :

L'évaluation de l'efficacité des extraits testés sur la germination des spores repose sur le calcul du pourcentage de la germination en présence de l'extrait et dans les boîtes témoins. Une spore est considérée germée si la longueur du tube germinatif est supérieure à son plus petit diamètre (Photo 6). Les résultats obtenus révèlent que le taux de germination des spores a été réduit en présence des flavonoïdes foliaires et floraux d'*A. radiata* et de *C. cinerea* par rapport au témoin (83,44%) quelle que soit la concentration des flavonoïdes dans le milieu de culture, contrairement à ceux obtenus à partir de *B. graveolens* qui n'ont entraîné aucune réduction de la germination qu'à des concentrations plus élevées (figure 31). Il est à noter que l'effet des organes de la même plante est presque

similaire. Il ressort donc de ces présents résultats, que les extraits d'*A. radiata* et de *C. cinerea* ont exercé un effet inhibiteur dont l'inhibition augmente avec l'augmentation de la concentration. En comparant l'activité antifongique de ces deux dernières plantes, on constate que *C. cinerea* s'est révélée la plus antifongique où le taux de la réduction de la germination a atteint 18%. Ces résultats témoignent aussi que les extraits de *B. graveolens* aux faibles doses ont stimulé un peu la germination.



Photo 6: Observation des spores germées et non germées sous microscope optique x40.

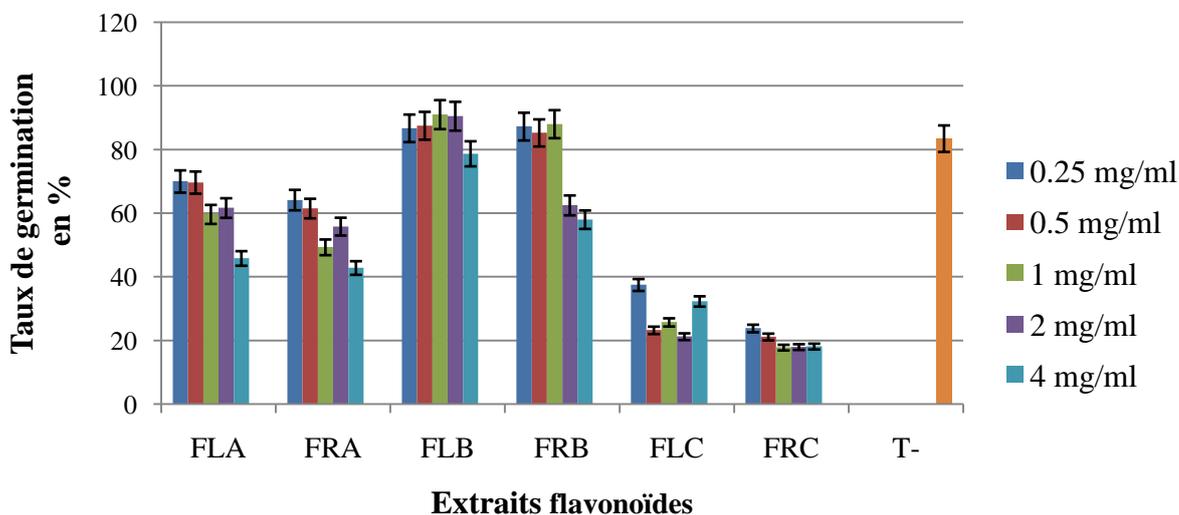


Figure 31: Effet des flavonoïdes sur la germination des spores.

Parmi tous les extraits hémicellulosiques et pectiques testés, seuls les extraits de *C. cinerea* ont présenté une inhibition vis-à-vis de la germination des spores. L'augmentation de la dose ne s'accompagne pas forcément d'une meilleure efficacité, car le bon effet réducteur a été exercé par les PHM foliaires et les hémicelluloses foliaires à 2 mg/ml et à 1 mg/ml respectivement (figure 32).

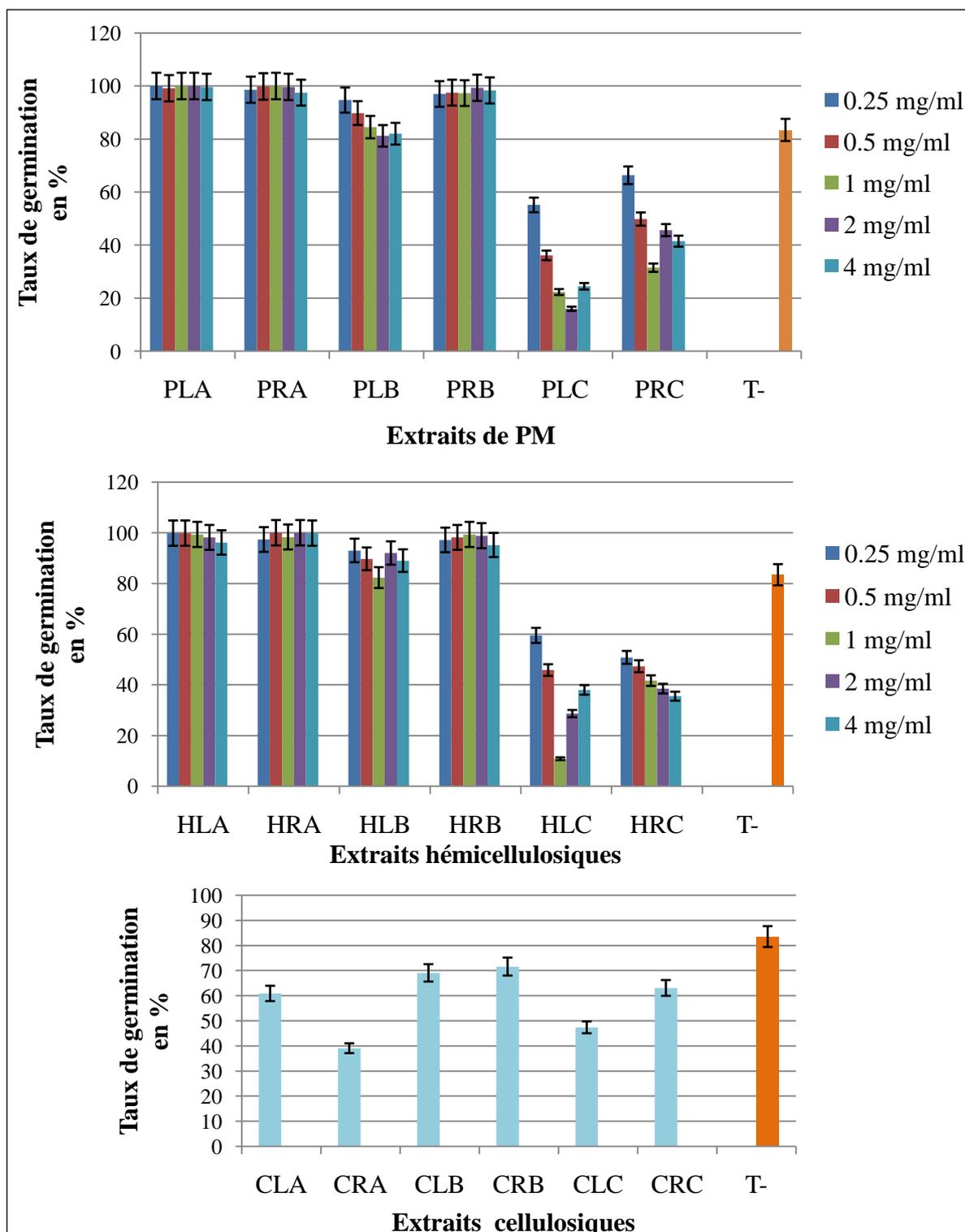


Figure 32: Effet des extraits polysaccharidiques pariétaux sur la germination des spores.

Les résultats obtenus montrent que *Foa* a montré globalement un fort niveau de résistance vis-à-vis les extraits hémicellulosiques et pectiques d'*A. radiata* et de *B. graveolens* au cours de la germination dont le taux de la germination a atteint 100%.

La germination des spores a été inhibée sur tous les milieux de culture à base de cellulose, cette activité inhibitrice est faible à moyenne, l'effet inhibiteur a dépassé 50% sous l'action de la cellulose foliaire d'*A. radiata*.

4.2. Effet des extraits sur la croissance mycélienne:

La croissance mycélienne en présence des différents extraits a été évaluée après incubation à une température de 25°C correspondant à l'optimum de la croissance du *Foa* (Hibar et al., 2002). La figure 33 résume les résultats obtenus pour ce test.

Il ressort de ces résultats que 67 tests parmi 90 (soit 74,44%) ont exercé une activité inhibitrice de *Foa* au cours de sa croissance mycélienne, mais cette inhibition varie selon la nature de l'extrait, sa source et sa dose dans le milieu de culture. En effet, tous les flavonoïdes étudiés ont présenté un effet inhibiteur sur la croissance mycélienne du pathogène, l'augmentation de la dose s'accompagne d'une meilleure efficacité. Le champignon a été inhibé presque de manière similaire par les flavonoïdes de toutes les espèces. La réduction de la croissance mycélienne allant jusqu'à 2,61cm en comparaison avec le témoin, avec un équivalent en taux d'inhibition de l'ordre de 50,38% sous l'effet des flavonoïdes foliaires de *C. cinerea* à 4 mg/ml. De plus, l'observation macroscopique indique que l'isolat de *Foa* a développé des colonies mycéliennes (en présence des flavonoïdes) entourées par des amas durs et très denses appelés sclérotés (Planche 7).

La figure 33 met en évidence une variabilité de réaction de *Foa* vis-à-vis les extraits pectiques. En effet, *Foa* a montré également une résistance en présence des PHM des deux organes de *C. cinerea*, comme il est faiblement sensible sous l'effet des PM foliaires de *B. graveolens*. La croissance mycélienne du pathogène a été inhibée par les extraits pectiques d'*A. radiata* et le maximum d'inhibition a atteint 37,69% sous l'action de l'extrait foliaire à la concentration de 4 mg/ml.

En présence des extraits hémicellulosiques, le champignon a présenté une sensibilité à quelques concentrations des extraits testés. Les hémicelluloses foliaires d'*A. radiata* et de *B. graveolens* et ceux des deux organes de *C. cinerea* ont exercé une certaine fongitoxicité à des degrés faibles et voisins, notant que l'augmentation de la concentration a été sans effet. En plus, La réduction de la croissance mycélienne était encore nettement plus importante quant à la présence des extraits hémicellulosiques des fleurs d'*A. radiata* et

surtout de *B. graveolens* dont les pourcentages d'inhibition ont dépassé 25% avec un maximum de 40,39% à la faible dose.

Le développement du mycélium sur gélose à base de cellulose des feuilles et des fleurs a été suivi en fonction du temps en parallèle avec celui sur milieu PDAA (figure 34). Le profil des courbes de croissance révèle que l'élongation des hyphes mycéliens du *Foa* sur milieux solides à base de cellulose a été effectuée d'une façon presque similaire que celle sur PDAA sans additif. Les diamètres des tapis mycéliens après 7 jours d'incubation ont été entre 5,38 et 7,55 cm. La différence significative c'est que les milieux cellulose-agar ont développé des mycéliums très faiblement denses auxquels on a attribué une notation de 1 par rapport à ceux sur PDAA (une notation de 3) (tableau 7 et photo 8).

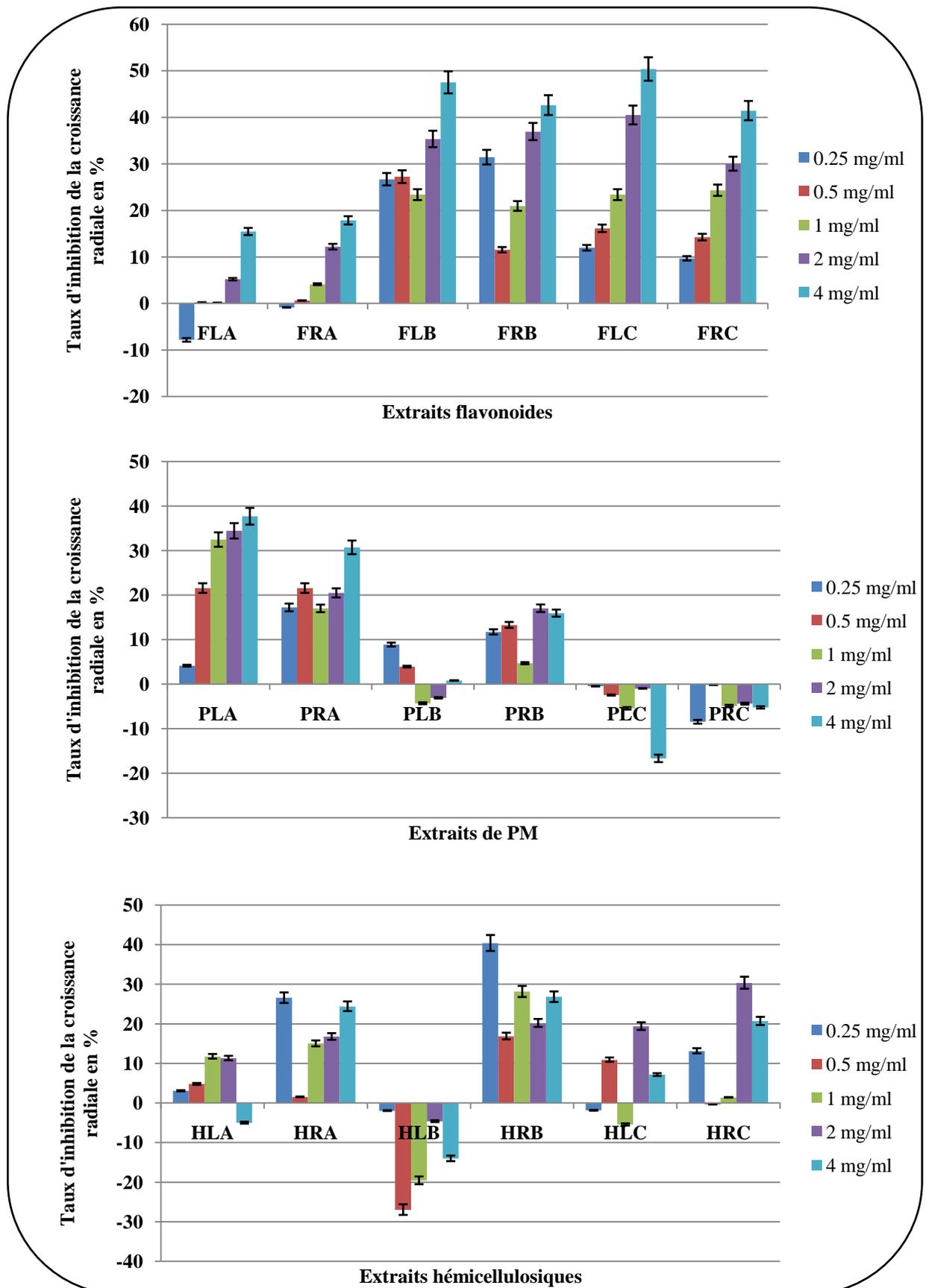


Figure 33 : Effet des extraits sur la croissance mycélienne du Foa

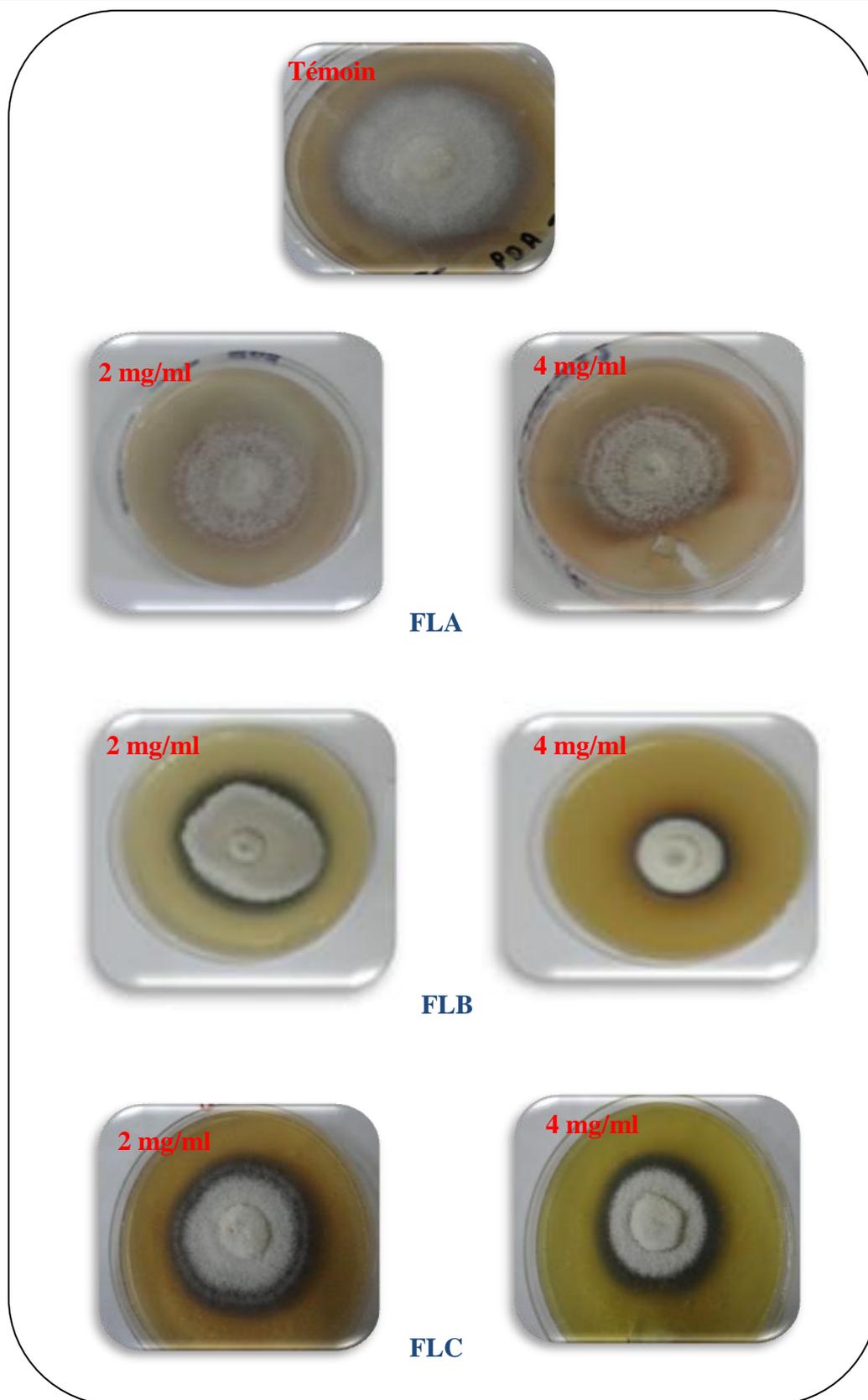


Planche 7 : Résultats de la croissance radiale du Foa en présence des flavonoïdes

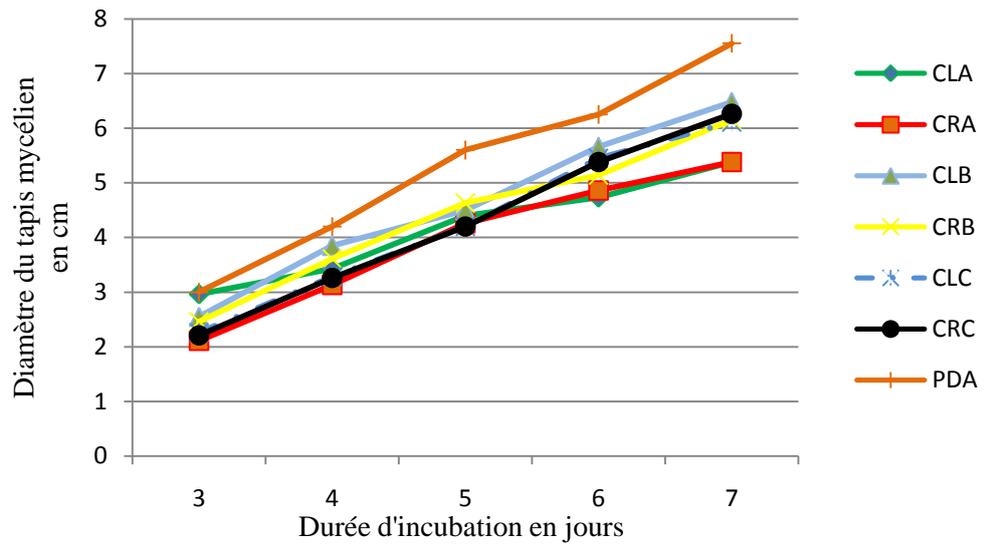


Figure 34: Evolution du diamètre du tapis mycélien en fonction du temps et de la source de cellulose.

Tableau 7 : Notations attribuées aux cultures fongiques après 7 jours d'incubation.

Organe	Source de la cellulose			PDA	Notation
	<i>A. radiata</i>	<i>B. graveolens</i>	<i>C. cinerea</i>		
Feuilles	1	1	1	3	
Fleurs	1	1	1	3	

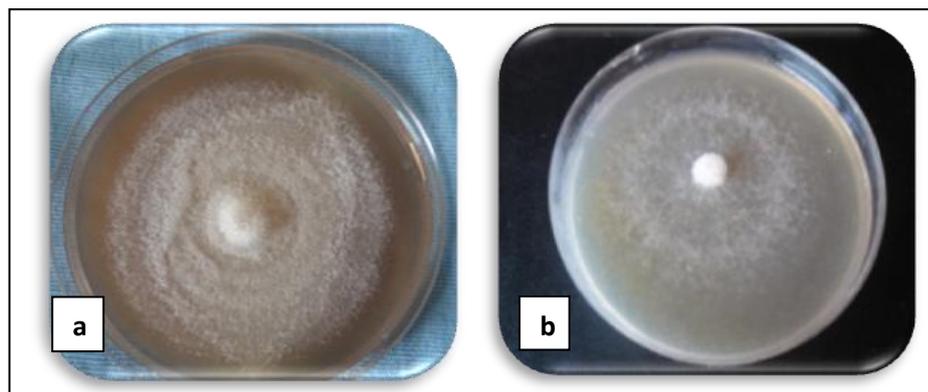


Photo 8: Culture de Foa sur milieux cellulose-agar et sur milieu PDA.

a. Foa sur milieu PDA ; b. Foa sur gélose à base de cellulose.

4.3. Effet des extraits sur la sporulation :

L'évaluation de l'efficacité des extraits testés repose sur le calcul du pourcentage d'inhibition de la sporulation.

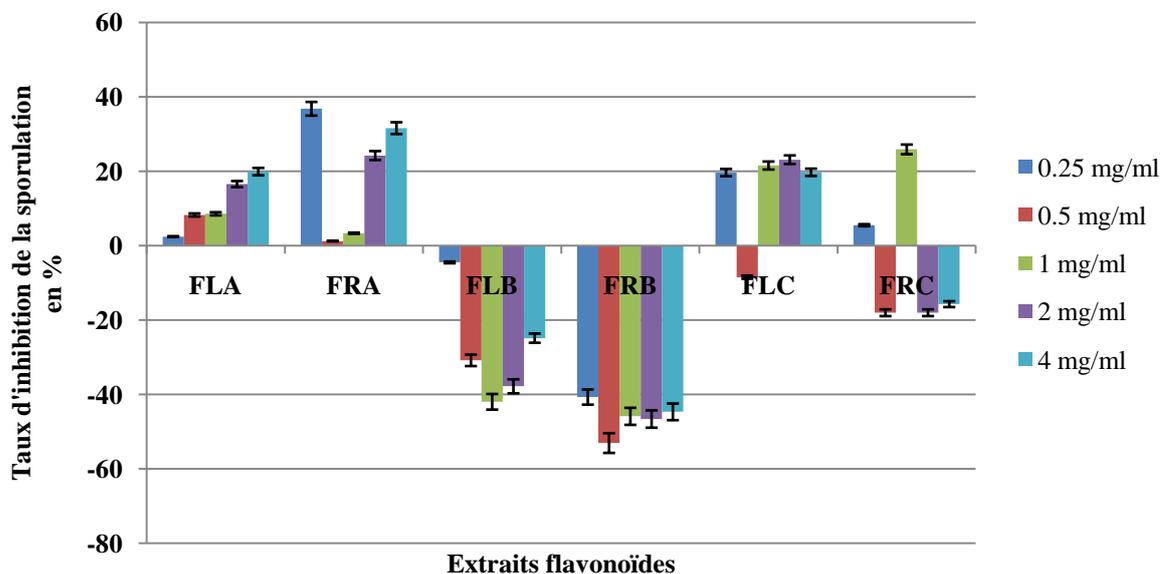


Figure 35: Effet des flavonoïdes sur la sporulation.

La figure 35 montre que les flavonoïdes ont peu d'effet inhibiteur sur le Foa au cours de la sporulation. En effet, les flavonoïdes d'*A. radiata* et de *C. cinerea* n'ont présenté qu'une activité modérée sur la sporulation dont le meilleur taux d'inhibition n'a pas atteint 40%, voire une stimulation à certaines concentrations. D'autre part, contrairement à la croissance mycélienne, les flavonoïdes de *B. graveolens* ont stimulé le phénomène de la sporulation du Foa en comparaison avec le témoin sans additif.

La figure 36 met en évidence une variabilité de sensibilité du Foa au cours de la sporulation en vers les polysaccharides pariétaux.

Mis à part les extraits PM d'*A. radiata* qui ont exercé une activité inhibitrice qu'à de fortes doses, l'effet inhibiteur des autres extraits est plus marqué sur la sporulation dont le taux d'inhibition a dépassé 40% pour la plus part des concentrations, certaines ont même atteint 60%.

Les hémicelluloses foliaires de *C. cinerea* sont montrés plus efficaces sur la sporulation par rapport à celles d'*A. radiata*, mais tous ces extraits sont moins efficaces que ceux de *B. graveolens* qui ont présenté des valeurs élevées par rapport aux autres (dépassant 50%). L'augmentation de la dose ne s'accompagne pas forcément d'une meilleure efficacité. Par contre, La sporulation du Foa a été inhibée par les extraits hémicellulosiques des fleurs de *C. cinerea* presque qu'à la faible dose.

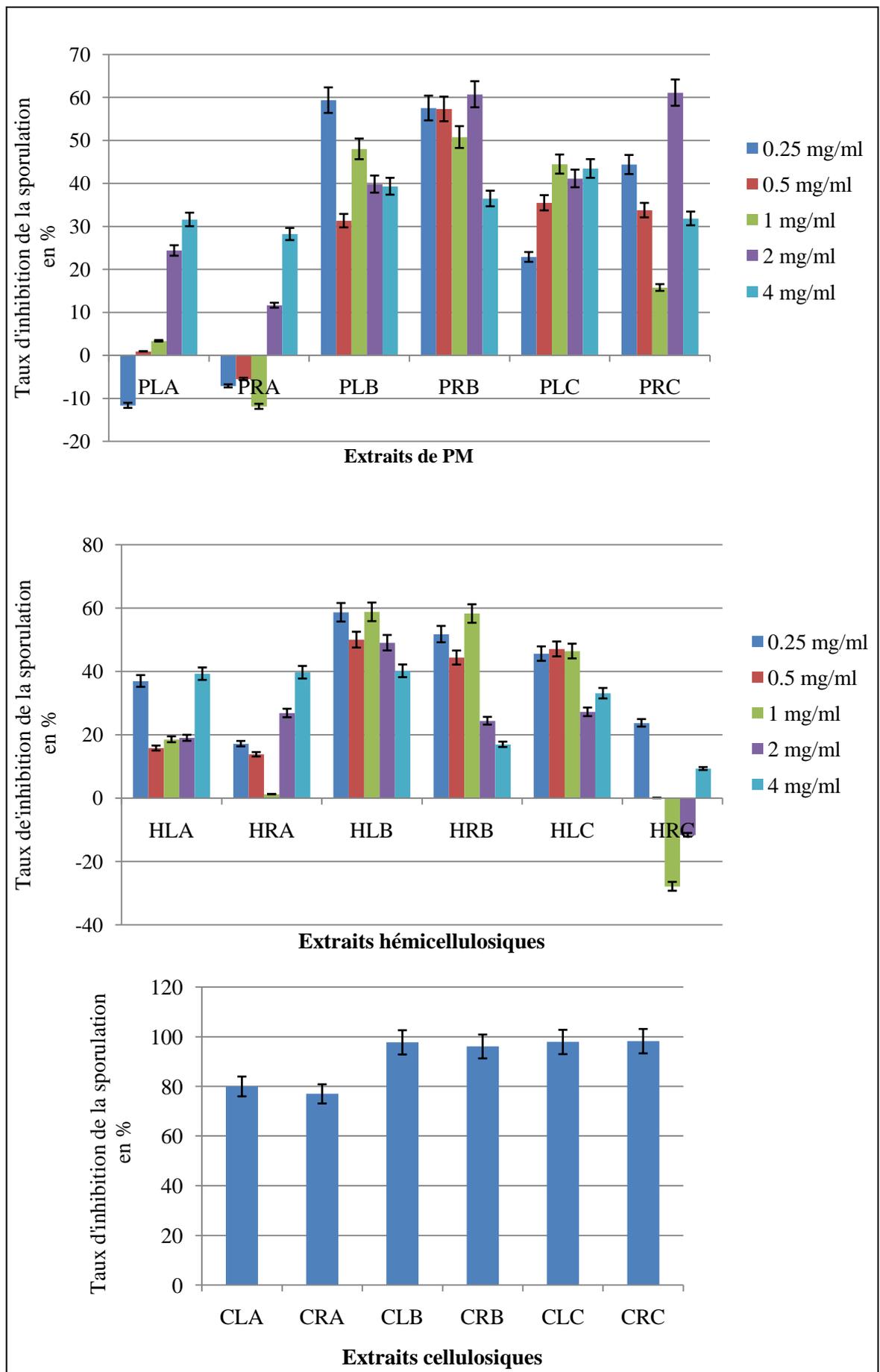


Figure 36: Effet des extraits polysaccharidiques pariétaux sur la sporulation.

De même, le Foa a montré globalement un fort niveau de sensibilité sur tous les milieux solides à base de cellulose. L'inhibition de la sporulation a dépassé 95% sur les milieux à base de cellulose extraite de *B. graveolens* et de *C. cinerea*.

Les résultats statistiques de l'effet des extraits sur les différents stades de vie du Foa (Tableau 8, 9 et 10 en annexe 3) ont montré qu'il n'y a pas une différence significative entre les feuilles et les fleurs sauf pour *A. radiata* sur la sporulation, ainsi que la variation de la concentration de l'extrait est statistiquement sans effet et ça pour toutes les plantes étudiées.

4.4. Production de la biomasse dans des milieux liquides à base de cellulose :

Après avoir pesé la biomasse fongique formée en différents milieux à base de cellulose, les valeurs ont été comparées avec celles obtenues en milieu PDB (milieu usuel de culture pour la plupart des champignons) par le calcul d'un rapport biomasse formée en milieu à base de cellulose sur la biomasse formée en PDB (tableau 11) :

Il ressort de ces résultats que le milieu PDB a abouti à une production de biomasse (de l'ordre de 110 mg) voisine à celle obtenue en milieu à base de cellulose microcristalline, mais, la biomasse formée en milieux à base de cellulose des 3 plantes médicinales est moins importante. Par ailleurs, celles formées en présence des celluloses des palmiers dattiers sont importantes par rapport au PDB surtout en présence de l'extrait de *P. dactylifera* (VDN) où elle est 4 fois plus.

Tableau 11 : Aptitude de productivité des souches en biomasses dans des milieux liquides à base de cellulose.

	Source de la cellulose						PDB
	<i>A. radiata</i>	<i>B. graveolens</i>	<i>C. cinerea</i>	<i>P. dactylifera</i> (VDN)	<i>P. dactylifera</i> (VT)	Cellulose microcristalline	
Biomasse sèche (mg)	101	55	73	433	149	119	110
R	0,918	0,5	0,663	3,93	1,35	1,08	

R : rapport de la biomasse formée en milieu à base de cellulose sur la biomasse formée en PDB

4.5. Effet des extraits sur la densité de population du Foa dans le sol en laboratoire :

La densité de la population de Foa dans le sol a été estimée en LOG 10 (unité formant une colonie/g de sol).

Du 3^{ème} jusqu'au 14^{ème} jour après traitement, Le sol amendé par les flavonoïdes foliaires des trois plantes étudiées a présenté une population moins dense de Foa que celle enregistrée dans le témoin quelque soit le taux du traitement sauf dans le cas de l'utilisation des FLB à 1% (tableau 12). Il est à noter que le meilleur taux de réduction de la population est de l'ordre de 32.54%. En plus, mis à part les FLA qui n'ont entraîné qu'une faible réduction de la densité fusarienne dans le sol, tous les autres flavonoïdes ont permis une augmentation de la population après 21 jours par rapport au sol non traité.

Tableau 12: Densités de la population du Foa dans le sol en fonction du temps après un traitement du sol par les flavonoïdes.

Organe végétal	Taux du traitement	Jours après traitement				
		1	3	7	14	21
Feuilles	1%					
	FLA	5,94	4	4,97	5,46	4,3
	FLB	7,81	6	6,2	4	6,37
	FLC	4	5,59	5,36	4	6,33
	5%					
	FLA	4	4	4,84	4	4,47
	FLB	6,74	4,74	5,08	4	5,93
	FLC	4	4	5,04	4	6,39
	10%					
	FLA	4	4	4,77	4,3	5,44
	FLB	5,64	4,65	4,7	4	5,97
	FLC	4	4,3	4,95	4	6,25
Fleurs	1%					
	FRA	6,19	4,81	5,38	5,64	4,3
	FRB	6,77	5,7	5,89	5,44	4
	FRC	4	4	6,32	4	4
	5%					
	FRA	6,06	5,27	5,04	5	4,47
	FRB	6,8	5,9	5,78	5,9	4
	FRC	4	4	5,57	4	4
	10%					
	FRA	4	5,26	4	4,69	5,44
	FRB	6,51	5,89	5,91	6,04	4
	FRC	4	4	5,25	4	4
Témoin		5,74	5,93	6,16	5,58	5,57

LOG10 (UFC/g sol)

Les FRA ont exercé une réduction mieux que celle engendrée par les FRB après le 3^{ème} jour du traitement, mais tous ces extraits ont été moins efficaces par rapport au FRC où on a enregistré un pourcentage de réduction allant jusqu'à 32.54%. De même, sauf dans le cas des FRC à 1%, 7 jours après le traitement, la population du pathogène dans les sols amendés par les flavonoides des fleurs reste toujours inférieure à celle dans le sol sans additifs, et les FRA ont présenté le meilleur effet répressif avec un taux de réduction qui a atteint 35.06%. Néanmoins, on doit préciser que le taux de réduction n'est pas proportionnel à l'accroissement de la concentration de l'extrait dans le sol. Ces extraits restent toujours efficaces mêmes 21 jours après l'amendement.

Trois jours après le traitement du sol, l'effet des extraits pectiques des feuilles envers la population fusarienne a été entre faible et nul (tableau 13). Par contre, après 7 jours, mis à part les PLC, toutes les pectines foliaires ont exercé une réduction de la densité du Foa dans le sol.

Tableau 13: Densités de la population du Foa dans le sol en fonction du temps après un traitement du sol par les extraits PM.

Organe végétal	Taux du traitement	Jours après traitement				
		1	3	7	14	21
Feuilles	1%					
	PLA	5,55	5,7	4	5,69	5,34
	PLB	5,87	6,05	6,08	5	6,03
	PLC	5,47	6,44	5,56	5,07	4,69
	5%					
	PLA	5,75	5,68	5,7	5,09	5,36
	PLB	6,39	5,94	6,02	4,7	6,28
	PLC	7,3	5,94	5,43	5,38	5,04
	10%					
	PLA	5,79	5,86	4	4,6	6,31
	PLB	6,29	6,11	5,91	5,34	6,34
	PLC	6,7	4,9	6,84	5,73	5,59
Fleurs	1%					
	PRA	6,25	5,9	6,04	6	4,6
	PRB	5,7	5,55	5	5,79	4,84
	PRC	5,3	6,46	5,03	4,84	4
	5%					
	PRA	6,19	5,93	6,14	5,09	5,2
	PRB	5,73	5,75	5,6	5,9	5,4
	PRC	4	6,41	5,96	5,56	5,81
	10%					
	PRA	6,14	4	5,47	4,6	5,38
	PRB	6,89	6,22	5,77	6	6,3
	PRC	6	5,9	6,28	6,94	6,27
Témoin		5,74	5,93	6,16	5,58	5,57

LOG10 (UFC/g sol)

Ces résultats restent presque semblables à ceux obtenus après 14 jours. Mais, 21 jours après le traitement, la densité du champignon a été réduite seulement en présence des PLA et des PLC à 1% et à 5%.

En amendant le sol par 1% des extraits pectiques des fleurs, la réduction dans la densité du Foa dans le sol est faible à nulle durant les 2 semaines qui suivent le traitement. En revanche, une réduction entre 13.10% et 28.18% a été enregistrée 21 jours après l'ajout de ces extraits. Par contre, l'augmentation dans le taux du traitement par les PM florales n'a abouti à aucune régression notable sauf pour les PRA à 10%.

Les densités de la population fusarienne dans les sols traités par 1% et 5% des hémicelluloses foliaires sont presque voisines à celle dans le témoin durant les 3 semaines après l'amendement du sol (tableau 14). Une légère réduction a été observée avec l'accroissement de la concentration à 10%.

Tableau 14: Densités de la population de Foa dans le sol en fonction du temps après un traitement du sol par les extraits hémicellulosiques.

Organe végétal	Taux du traitement	Jours après traitement				
		1	3	7	14	21
Feuilles	1%					
	HLA	5,89	5,9	6,56	6,06	5,43
	HLB	6,34	6,16	6,3	5,74	6,24
	HLC	6,24	5,9	6,35	6,4	5,69
	5%					
	HLA	5,87	6,15	6,66	6,59	6,12
	HLB	6,34	6,13	7,08	5,74	6,13
	HLC	5,73	5,59	6,18	5,87	4,77
	10%					
	HLA	6,25	5,17	6,19	5,2	5,14
	HLB	6,33	6	6,1	4	6,21
	HLC	5,79	5,62	4	6,03	5,25
	Fleurs	1%				
HRA		6,11	5,73	6,13	6,14	5,44
HRB		6,55	5,57	5,39	5,11	5,38
HRC		5,97	6,04	6,45	5,92	5,74
5%						
HRA		6,06	5,65	5,29	5,32	5,07
HRB		6,07	5,84	4	4	4
HRC		4,47	5,7	6,27	5,93	5,68
10%						
HRA		6,11	5,43	5,67	5,85	4,9
HRB		5,57	5,77	5,98	5,64	5,98
HRC		6,31	6,02	6,2	6,36	5,56
Témoin			5,74	5,93	6,16	5,58

LOG10 (UFC/g sol)

Les extraits des hémicelluloses des fleurs ajoutés avec 1% au sol n'ont pas d'effet régressif remarquable vis-à-vis le pathogène. Par contre, quand ils ont été ajoutés avec 5% ont permis une réduction notable et surtout les HRB où la densité de la population fusarienne a été stable à 4 LOG10 (UFC/g sol) entre le 7^{ème} et le 21^{ème} jour après le traitement. Dans le cas où on a augmenté la concentration de ces extraits jusqu'à 10%, leurs effets ont été affaiblis sauf pour les HRA après 21 jours.

Trois jours après le traitement du sol par les celluloses foliaires à 1%, seulement les extraits CLA et CLB qui ont réduit la densité fusarienne dans le sol par rapport au témoin (tableau 15). De même, à 5% après la même période, uniquement les CLA et les CLC qui ont présenté un effet régressif du pathogène. Par contre, quant à 10%, cette même activité a été enregistrée sous l'effet de toutes les celluloses foliaires. De plus, après 7 jours, tous les extraits cellulosiques foliaires ont exercé une réduction de la densité du Foa dans le sol, sauf dans le cas des CLA à 1%, notant que le taux de réduction a atteint 35.06%. Une semaine après, la population de ce champignon dans le sol sans ajouts reste toujours supérieure à celle dans les sols traités à l'exception des CLA à 1% et à 10%. Les résultats restent presque les mêmes 21 jours après le traitement.

Trois jours après le traitement du sol, l'effet des extraits cellulosiques des fleurs envers la population fusarienne a été entre faible et nul. Au contraire, une semaine après l'amendement du sol, tous ces extraits ont pu présenter une activité régressive du Foa surtout quand ils ont été ajoutés avec 10%. Une à deux semaines après, mis à part les CRB qui ont gardé cet effet à toutes les concentrations utilisées (où la densité du *Fusarium* reste stable), les CRC ont été actives qu'à des fortes doses et les CRC n'ont exercé aucune inhibition.

Tableau 15: Densités de la population du Foa dans le sol en fonction du temps après un traitement du sol par les extraits cellulodiques.

Organe végétal	Taux de traitement	Jours après traitement				
		1	3	7	14	21
Feuilles	1%					
	CLA	6,31	5,56	6,33	5,67	5,53
	CLB	7,79	4	5,29	4,93	5,09
	CLC	6,03	6,11	5,78	5,49	5,79
	5%					
	CLA	5,32	5,42	5,66	4,84	4,3
	CLB	5,74	6	5,5	5,16	5,52
	CLC	6,16	4,6	4	4,47	4
	10%					
	CLA	4,69	4,3	4	5,76	5,61
	CLB	6,05	5,36	5,32	4,47	5,52
	CLC	4,3	4	4	5,4	4
Fleurs	1%					
	CRA	6,31	5,69	5,04	5,86	5,71
	CRB	6,5	6,04	4	4	4
	CRC	6,3	5,96	5,726	5,72	5,98
	5%					
	CRA	5,32	5,32	5,72	5,97	5,76
	CRB	5,74	5,38	5,38	5,2	5,39
	CRC	6,16	5,92	5,87	5,51	5,59
	10%					
	CRA	4,69	5,47	5	6,11	5,71
	CRB	6,17	5,77	4	4	4
	CRC	6,05	5,87	5	4,3	4,84
Témoin		5,74	5,93	6,16	5,58	5,57

LOG10 (UFC/g sol)

Tableau 16 : Résultats comparatifs indiquant la densité de la population du Foa dans le sol en fonction du temps après un traitement du sol par les différents extraits.

Flvd	Organe végétal	Taux du traitement	Jours après traitement					PM	Organe végétal	Taux du traitement	Jours après traitement						
			1	3	7	14	21				1	3	7	14	21		
Feuilles	Feuilles	1%						Feuilles	Feuilles	1%						LOG10 (UFC/g sol)	LOG10 (UFC/g sol)
		FLA	5,94	4	4,97	5,46	4,3			PLA	5,55	5,7	4	5,69	5,34		
		FLB	7,81	6	6,2	4	6,37			PLB	5,87	6,05	6,08	5	6,03		
		FLC	4	5,59	5,36	4	6,33			PLC	5,47	6,44	5,56	5,07	4,69		
		5%								5%							
		FLA	4	4	4,84	4	4,47			PLA	5,75	5,68	5,7	5,09	5,36		
		FLB	6,74	4,74	5,08	4	5,93			PLB	6,39	5,94	6,02	4,7	6,28		
		FLC	4	4	5,04	4	6,39			PLC	7,3	5,94	5,43	5,38	5,04		
		10%								10%							
		FLA	4	4	4,77	4,3	5,44			PLA	5,79	5,86	4	4,6	6,31		
		FLB	5,64	4,65	4,7	4	5,97			PLB	6,29	6,11	5,91	5,34	6,34		
		FLC	4	4,3	4,95	4	6,25			PLC	6,7	4,9	6,84	5,73	5,59		
Fleurs	Fleurs	1%						Fleurs	Fleurs	1%						LOG10 (UFC/g sol)	LOG10 (UFC/g sol)
		FRA	6,19	4,81	5,38	5,64	4,3			PRA	6,25	5,9	6,04	6	4,6		
		FRB	6,77	5,7	5,89	5,44	4			PRB	5,7	5,55	5	5,79	4,84		
		FRC	4	4	6,32	4	4			PRC	5,3	6,46	5,03	4,84	4		
		5%								5%							
		FRA	6,06	5,27	5,04	5	4,47			PRA	6,19	5,93	6,14	5,09	5,2		
		FRB	6,8	5,9	5,78	5,9	4			PRB	5,73	5,75	5,6	5,9	5,4		
		FRC	4	4	5,57	4	4			PRC	4	6,41	5,96	5,56	5,81		
		10%								10%							
		FRA	4	5,26	4	4,69	5,44			PRA	6,14	4	5,47	4,6	5,38		
		FRB	6,51	5,89	5,91	6,04	4			PRB	6,89	6,22	5,77	6	6,3		
		FRC	4	4	5,25	4	4			PRC	6	5,9	6,28	6,94	6,27		
Hémicellulose							Cellulose										
Feuilles	Feuilles	1%						Feuilles	Feuilles	1%						LOG10 (UFC/g sol)	LOG10 (UFC/g sol)
		HLA	5,89	5,9	6,56	6,06	5,43			CLA	6,31	5,56	6,33	5,67	5,53		
		HLB	6,34	6,16	6,3	5,74	6,24			CLB	7,79	4	5,29	4,93	5,09		
		HLC	6,24	5,9	6,35	6,4	5,69			CLC	6,03	6,11	5,78	5,49	5,79		
		5%								5%							
		HLA	5,87	6,15	6,66	6,59	6,12			CLA	5,32	5,42	5,66	4,84	4,3		
		HLB	6,34	6,13	7,08	5,74	6,13			CLB	5,74	6	5,5	5,16	5,52		
		HLC	5,73	5,59	6,18	5,87	4,77			CLC	6,16	4,6	4	4,47	4		
		10%								10%							
		HLA	6,25	5,17	6,19	5,2	5,14			CLA	4,69	4,3	4	5,76	5,61		
		HLB	6,33	6	6,1	4	6,21			CLB	6,05	5,36	5,32	4,47	5,52		
		HLC	5,79	5,62	4	6,03	5,25			CLC	4,3	4	4	5,4	4		
Fleurs	Fleurs	1%						Fleurs	Fleurs	1%						LOG10 (UFC/g sol)	LOG10 (UFC/g sol)
		HRA	6,11	5,73	6,13	6,14	5,44			CRA	6,31	5,69	5,04	5,86	5,71		
		HRB	6,55	5,57	5,39	5,11	5,38			CRB	6,5	6,04	4	4	4		
		HRC	5,97	6,04	6,45	5,92	5,74			CRC	6,3	5,96	5,72	5,72	5,98		
		5%								5%							
		HRA	6,06	5,65	5,29	5,32	5,07			CRA	5,32	5,32	5,72	5,97	5,76		
		HRB	6,07	5,84	4	4	4			CRB	5,74	5,38	5,38	5,2	5,39		
		HRC	4,47	5,7	6,27	5,93	5,68			CRC	6,16	5,92	5,87	5,51	5,59		
		10%								10%							
		HRA	6,11	5,43	5,67	5,85	4,9			CRA	4,69	5,47	5	6,11	5,71		
		HRB	5,57	5,77	5,98	5,64	5,98			CRB	6,17	5,77	4	4	4		
		HRC	6,31	6,02	6,2	6,36	5,56			CRC	6,05	5,87	5	4,3	4,84		
	Densité supérieure au témoin.							Témoin									
	Densité stable du 7 ^{ème} jusqu'au 21 ^{ème} jour.							5,74 5,93 6,16 5,58 5,57									

Les résultats obtenus ont indiqué que la variation de la concentration de l'extrait dans le sol, ainsi que, la prolongation de la durée d'incubation du Foa dans le sol après l'ajout des extraits est statistiquement non significative pour les différentes plantes étudiées (tableau 17 en annexe 3).

4.6. Effet des flavonoïdes sur la virulence relative de Foa:

Le tableau 18 configure les résultats de l'effet des différentes charges des flavonoïdes sur les lésions des tissus causées par Foa après incubation de 7 jours à $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Le poids des tissus nécrosés dans les tranches témoins (tranches inoculées par Foa mais sans flavonoïdes (Photo 9) est de l'ordre de 0.518g (correspondant à un taux de virulence de l'ordre de 100%) a été comparé à ceux dans les tranches chargées par des flavonoïdes.

L'analyse des résultats indique que l'effet des trois espèces étudiées est presque similaire et que dix tests parmi douze (soit 80%) ont présenté un effet dépressif de la VR, mais seulement deux tests qui ont stimulé cet effet (dont la valeur maximale (VR= 114.6%) a été présentée par l'extrait de *A. radiata* à la charge de 0,25 mg suivie par celui de *B. graveolens* (VR= 105.4%) à la même charge. A l'inverse, le meilleur effet dépressif (valeur minimale de VR (72.3%)) a été enregistré sous l'action de l'extrait de *C. cinerea* à la charge de 1 mg. Il est à noter que l'effet inhibiteur est presque proportionnel à la charge de l'extrait appliquée.

Tableau 18: Effet des flavonoïdes sur la virulence relative de Foa.

Espèces	Quantité des flavonoïdes ajoutés aux tranches de pomme de terre (mg)							
	0,25		0,5		0,75		1	
	PTN(g)	VR(%)	PTN(g)	VR(%)	PTN(g)	VR(%)	PTN(g)	VR(%)
<i>A. radiata</i>	0.59	114.6	0.47	91.5	0.39	76.44	0.40	78.76
<i>B. graveolens</i>	0.54	105.4	0.49	94.5	0.44	86.29	0.39	77
<i>C. cinerea</i>	0.45	86.8	0.41	79.15	0.377	72.7	0.37	72.3

Témoin : PTN = 0.518g, VR = 100%.

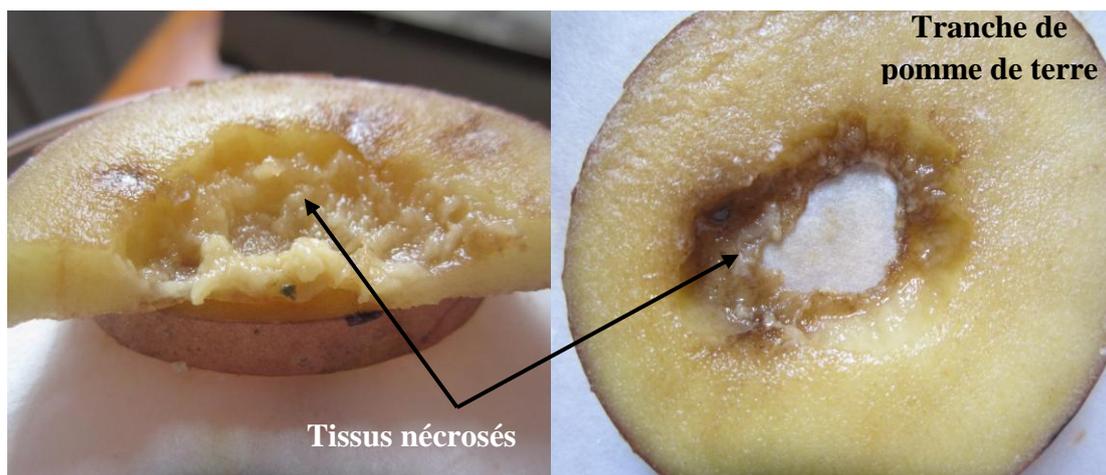


Photo 9 : Effet nécrotique du Foa.

4.7. Effet des flavonoïdes sur la mycotoxinogénèse et la production de biomasse:

Le chromatogramme du filtrat du témoin indique la présence d'un seul spot fluorescent (avec $R_f = 0.55$) caractéristique qui représente des toxines probables selon **Multon (1982)**. Ce spot persiste même dans les chromatogrammes des filtrats des cultures additionnées par les flavonoïdes de *C. cinerea* et *A. radiata* (figure 37). Par contre, il a disparue dans le chromatogramme correspondant au filtrat de la culture fongique qui a été réalisée en présence des flavonoïdes de *B. graveolens*. Ces résultats ont permis de dire que les extraits de cette dernière espèce présente un pouvoir antimycotoxinogène chez le Foa. De même, le chromatogramme a révélé aussi la présence d'autres spots dans les filtrats où le Foa a été cultivé en présence des extraits de plantes. Ces spots peuvent être des taches de flavonoïdes.

D'autre part, l'effet des flavonoïdes sur l'aptitude de la productivité du Foa en biomasse en milieu liquide a été évalué par le calcul du taux d'inhibition. Selon ces résultats on observe que tous les flavonoïdes ont montré un pouvoir régressif vis à vis la formation de la biomasse avec des pourcentages d'inhibition de l'ordre 43%, 56% et 69% pour l'extrait de *B. graveolens*, *A. radiata* et *C. cinerea* respectivement. En comparant les résultats de ces deux derniers tests, on observe qu'il n'y a pas une corrélation entre l'inhibition de la production de la biomasse et l'empêchement de la sécrétion des toxines.

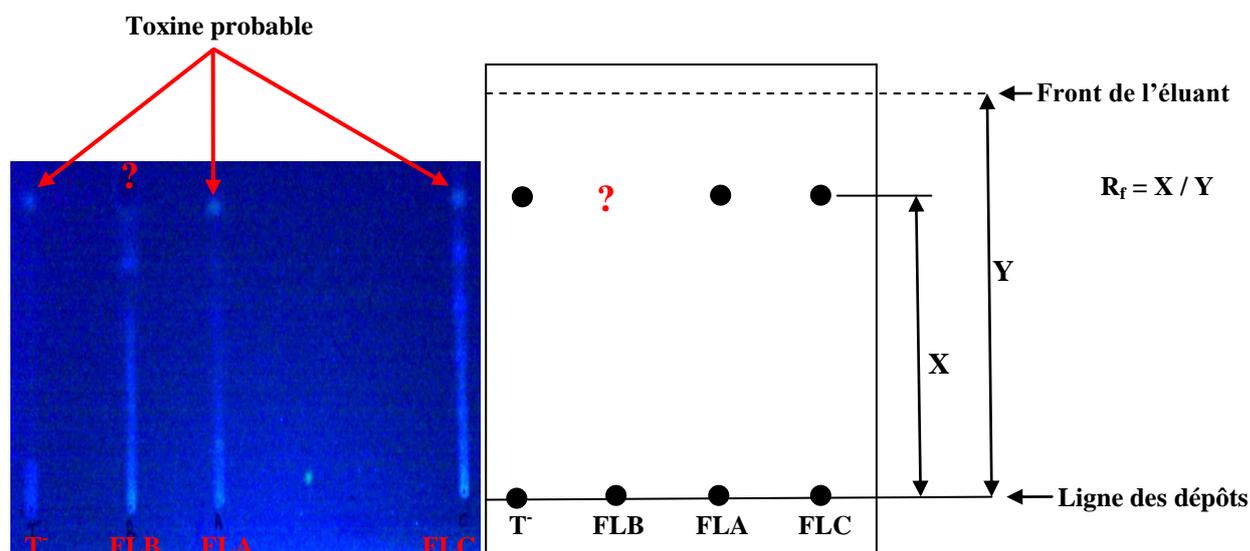


Figure 37 : Chromatogramme des filtrats de cultures de FOA en présence des extraits des flavonoïdes.

4.8. Effet des flavonoïdes sur l'activité cellulosique du Foa :

La mesure de l'activité cellulosique est complexe, mais parfois des méthodes simples et reproductibles peuvent prédire l'action enzymatique sous certaines conditions (Eveleigh et al., 2009). La technique utilisée dans cette étude est semi-quantitative donnant des informations sur la présence d'une inhibition et son degré par la mesure du diamètre. Le diamètre de la zone d'hydrolyse dans les boîtes témoins était de l'ordre de 12 mm, mais il a été réduit jusqu'à 7.5 mm (correspondant à un taux d'inhibition de 37.5%) sous l'effet des flavonoïdes de *B. graveolens* et d'*A. radiata* ce qui signifie que ces métabolites ont la capacité d'empêcher l'activité cellulosique de Foa. (Figure 38).

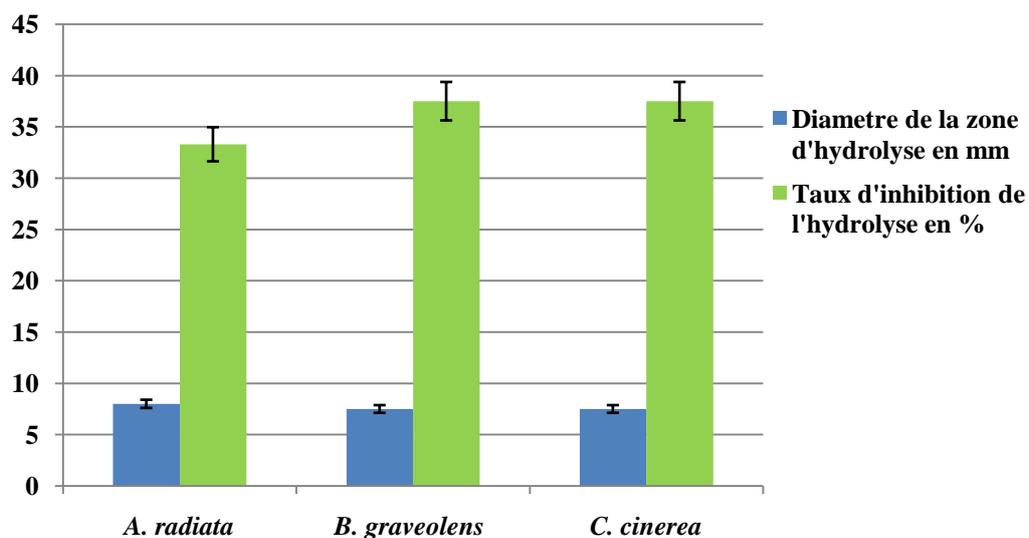


Figure 38 : Effet des flavonoïdes sur l'activité cellulosique.

Discussion

Discussion :

Cette étude vise à mettre en évidence les propriétés antifongiques des extraits flavonoïdes et polysaccharidiques pariétaux des trois plantes médicinales (fréquemment utilisées en médecine traditionnelle par les paysans de la région de Saoura, sud-ouest Algérien, à savoir *A. radiata*, *B. graveolens* et *C. cinerea*) sur tous les stades du cycle de vie de *Foa*, ainsi que sur quelques paramètres de sa pathogénicité (lésions tissulaires, mycotoxigenèse et activité cellulasique) et le suivi de l'effet de ces extraits sur la densité de la population de ce champignon dans le sol afin de sélectionner des produits qui pourraient éventuellement être utilisés dans des programmes de lutte contre ce mycopathogène.

1. Tests de confirmation de l'identité de la souche fongique :

L'approche classique d'identification des champignons filamenteux s'établit sur la base des caractères phénotypiques (aspect macroscopique et microscopique, physiologie de croissance à différentes températures ou sur milieux spécifiques). L'étude phénotypique a également été réalisée sur gélose PDA. Le pathogène sujet d'étude présente un morphotype cotonneux, avec un thalle blanc aérien très abondant, épais et dense avec une couleur roses sur l'envers de la boîte et à croissance lente. Au microscope, le mycélium est fin blanc. Les chlamydospores sont intercalaires, formées dans le mycélium, sub-globuleuses et hyalines. Le mycélium produit des spores distinguant nettement le genre *Fusarium* : des microconidies souvent unicellulaires et quelques fois bicellulaires et des macroconidies variables, ovales à ellipsoïdes, droites à légèrement courbées, cloisonnées et pointues aux deux extrémités.

De plus, les méthodes moléculaires ont pris une place prépondérante dans l'identification des espèces fongiques en général et des champignons filamenteux en particulier. La démonstration de l'intérêt des séquences des gènes codant les ARN ribosomiques (18S, 28S,...) pour les études phylogénétiques a permis d'affiner la distinction des groupes taxonomiques et des espèces chez les champignons. Ces méthodes permettent des identifications plus précises, plus fiables et plus exactes, car, selon **Stackebrandt et Goebel (1994)** les gènes codant pour les ARN ribosomiques sont des gènes très conservés chez les microorganismes. Ils servent donc de marqueurs phylogénétiques pour déterminer la relation entre des espèces.

L'analyse de la fraction 18S de l'ADNr a confirmée l'appartenance de notre isolat au genre *Fusarium* et plus précisément aux *Fusarium oxysporum*. La séquence 18S de l'ADNr obtenue a montré une similarité de 98% avec *Fusarium oxysporum* f. sp. *rapae* et *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* soit une identité nucléotidique de 549/559 et de 556/565 respectivement. Bien que le programme BLAST d'alignement soit extrêmement riche en séquences de référence, les différentes séquences d'ARNr ne sont pas connues simultanément pour toutes les espèces fongiques d'où aucune séquence spécifique pour la forme spéciales « *albédinis* » n'a été trouvée dans ce moteur d'alignement. D'autre part, selon **Kistler et al. (1987)** la taille de l'unité ribosomique de *Foa* est du même ordre que celle d'autres formes spéciales de *F. oxysporum*.

2. Analyses physicochimiques :

Le séchage de nos espèces végétales indique qu'elles renferment une teneur en eau entre 70 et 80%. Selon **Nultsch (1998)** et **Bergoin (2005)**, les plantes fraîches renferment 60 à 90% d'eau, et elle est du même ordre pour toutes les espèces (**Ozenda, 1982**). Mais le contenu réel en eau dépend du tissu et du type cellulaire (**Hopkins, 2003**), dont chaque partie de la plante est caractérisée par une valeur du potentiel hydrique (**Lafon et al., 1996**). Elle est d'une certaine façon également dépendant des conditions physiologiques et environnementales (**Hopkins, 2003**).

L'analyse phytochimique réalisé sur les trois plantes médicinales a prouvé par ailleurs, qu'elles contiennent différents groupes de composés chimiques qui sont à l'origine de leurs activités biologiques. Ce test a révélé la présence des saponosides, tanins, acides gras, flavonoïdes, anthracénosides, huiles volatiles, terpènes et stéroïde, alcaloïdes, stérols et triterpènes dans les trois espèces étudiées. À notre avis, l'ensemble des résultats du screening phytochimique expliquerait d'une part, et ce de façon rationnelle, l'engouement des tradi-thérapeutes en général et ceux de la Saoura en particulier, à utiliser les plantes médicinales, notamment ces trois espèces aux fins de soins contre plusieurs troubles. De même, ces résultats justifient le choix qui se porte sur ces plantes comme étant des réservoirs potentiels d'agents antifongiques contre *Foa*.

L'extraction des flavonoïdes a permis de constater que les rendements ne sont pas semblables et qu'il y a une légère différence qui est probablement due à la différence entre les espèces étudiées. Le rendement varie donc entre 1.13% et 4.24%. Les résultats obtenus indiquent aussi que les fleurs ont donné toujours un rendement moins important par rapport aux feuilles. Il est à préciser que les différentes manipulations de l'extraction bien qu'elles

ont été effectuées dans les mêmes conditions de laboratoires, mais à différents moments. Dans ce contexte, en accord avec **Zang et Hamauru (2003)**, la teneur en composés phytochimiques dans les plantes, peut être affectée par le génotype, les conditions du développement et de croissance, la maturité et par les méthodes d'extraction. Aucune étude n'a été citée dans la littérature sur les flavonoïdes de ces espèces, mais une extraction par le même protocole portée sur les flavonoïdes des fruits de *Capsicum frutescens* (Solanaceae) a abouti à un rendement de 0.17% du poids sec (**Bouchelta et al., 2005**).

D'après les résultats de l'extraction, on constate que les rendements en hémicelluloses sont supérieurs à ceux des PM, mais les deux sont inférieurs à celui obtenu pour la cellulose. Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus par **Benahmed Bouhafsoun (2008)** sur les feuilles de *Chamaerops humilis* (Arecaceae). Nos résultats indiquent aussi que le rendement de chaque extrait varie d'une espèce à une autre et d'un organe à un autre pour la même espèce. Dans le travail de **Benahmed Bouhafsoun (2008)** le rendement en PM était de l'ordre de 0.1%, très inférieur à celui obtenu par nous même (qui est entre 2.18% et 10.5%) et à celui obtenu à partir des feuilles de *Urginea pancration* (Hyacinthaceae) (8.8%) (**Bouzi et al., 2010**). Par contre, le rendement en hémicellulose extraite à partir des feuilles de *Chamaerops humilis* était de l'ordre de 17.5% (**Benahmed Bouhafsoun, 2008**), supérieur à celles extraites à partir de nos espèces (entre 6.05% et 13.85%) et à celle obtenue à partir des feuilles de *Urginea pancration* (14.20%) (**Bouzi et al., 2010**). Selon **Benahmed Bouhafsoun (2008)**, le rendement en hémicellulose est influencé par le type de la solution alcaline utilisée dans l'extraction. Il est à noter que la solution KOH a permis l'obtention d'un rendement supérieur (24%) à celui obtenu par NaOH (17.5%). De même, Nos extraits cellulosiques obtenus avec les proportions de 13,86% à 27,23% sont moins importants que celui extrait à partir de la partie foliaire de *Chamaerops humilis* (44%) (**Benahmed Bouhafsoun, 2008**).

3. Effet des extraits sur les différents stades de vie de Foa :

Cette étude a permis de mettre en évidence l'existence d'une activité antifongique des extraits mis en étude sur les différents stades de vie de Foa à savoir, la sporulation, la croissance mycélienne et la sporulation.

3.1. Effet des flavonoïdes :

Les différents extraits flavonoïdes testés ont présenté une action inhibitrice aussi bien sur la croissance mycélienne que sur la sporulation et la germination de ce champignon, avec des degrés variables en fonction du matériel végétal et de la concentration, ainsi que

l'efficacité n'est pas toujours proportionnelle à la concentration. Cette corrélation négative a été signalée aussi dans les travaux de **Gaceb-Terrak (2010)**, dont il ressort qu'un extrait d'acide phénolique à la concentration 0,48 mg/ml a entraîné une cinétique de croissance de Foa similaire à celle qui a été obtenue à 0,12 mg/ml et il a été moins actif à 0,24 et 0,36 mg/ml. **Gaceb-Terrak (2010)** a justifié ce phénomène par l'activation du pouvoir de détoxification de ces molécules que la concentration 0,48 mg/ml pourrait représenter. Un travail similaire portant sur l'action d'un acide salicylique sur la même souche et un autre portant sur l'action de l'huile de *Melaleuca quinquenervia* sur la sporulation de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* ont conduit à un résultat similaire (**Touam et al., 2006 ; Doumbouya et al., 2012**).

Dans ce contexte, de nombreux flavonoïdes possèdent des activités antifongiques, le plus grand nombre appartient aux flavanones et aux flavanes (**Grayer et Harborne, 1994**). Selon **Jimenez-Gonzalez et al. (2008)**, quelque soit la classe de flavonoïdes considérée, il apparaît que le caractère lipophile des composés augmente l'activité, permettant aux molécules de pénétrer plus facilement à travers la membrane fongique (**Jimenez-Gonzalez et al., 2008 ; Grayer et Harborne, 1994**). De plus, les flavonoïdes sont des inhibiteurs de la phospholipase A2, la cyclooxygénase et de la lipoxygénase (**Middleton et Kandaswami 1992; Kandaswami et Middleton, 1994**). Sur le plan phytopathologique, selon **Grayer et Harborne (1994)** et **Harborne (1999)**, les flavonoïdes ne sont pas seulement présents dans les plantes comme agents constitutifs mais sont également accumulés dans les tissus végétaux en réponse à une attaque microbienne. De ce fait, les flavonoïdes interviennent par plusieurs propriétés comme l'inhibition de cellulases microbiennes, de xylanases, pectinases, chélation de métaux nécessaires aux enzymes, formation d'une structure dure et cristalline agissant comme une barrière physique aux pathogènes. Les flavonoïdes pourraient entraîner des changements dans la différenciation tissulaire et ainsi promouvoir la formation de thylle et de cal, empêchant ainsi l'agression par des agents invasifs (**Treutter, 2005**).

3.2. Effet des polysaccharides :

Les extraits PM et hémicellulosiques ont été plus antifongiques sur la sporulation que sur la croissance mycélienne et la germination du Foa. Par contre, les cellulases ont présenté un effet inhibiteur aussi bien sur la sporulation et la germination que sur la croissance mycélienne de ce champignon. A titre de comparaison, aucune étude sur l'activité antifongique des extraits polysaccharidiques envers Foa n'a été effectuée.

Les Polysaccharides naturels issus de certaines plantes médicinales, algues et microorganismes ont suscité un grand intérêt en tant qu'agents antimicrobiens (**Mizuno et al., 1995; Tzianabos, 2000; Smith et al., 2002**). Dans les dernières décennies, sur la base des méthodes biotechnologique, une série de nouveaux agents antimicrobiens à base de polysaccharides a été développée. Ils sont aujourd'hui utilisés dans diverses applications, par exemple dans l'industrie alimentaire pour remplacer des conservateurs traditionnels, et en bactériologie comme inhibiteurs de la croissance bactérienne (**Chang et al., 2000**).

De plus et plus précisément, l'activité antifongique des extraits polysaccharidiques a également été confirmée expérimentalement dans plusieurs études (**Ballance et al., 2007 ; Meera et al., 2011 ; Chen Hao et al., 2012**). Les propriétés antimicrobiennes de polysaccharides naturels sont basées sur leur structure chimique où la présence d'un groupe carbonyle hautement réactif a été détecté. Selon **Painter (1991)**, Le groupe carbonyle est capable de lier des amines primaires pour produire une combinaison stable de polysaccharides avec des protéines (glycolconjugates). Collage d'exoenzymes de microorganismes par saprogenic polysaccharides réactifs est probablement la raison de leur activité antimicrobienne.

D'autre part, bien que le développement du Foa sur les milieux à base de cellulose soit de loin plus faible que celui sur PDA ; il pourrait nous indiquer que ces extraits jouent un rôle d'inducteur de cellulase chez Foa, malgré que les plantes médicinales mises en études ne représentent pas l'hôte spécifique de ce champignon et que ces extraits peuvent être utilisés comme unique source de carbone et d'énergie pour la croissance du Foa comme l'a suggéré **Amraoui et al., (2004)**. Selon **Roussos et Raimbault (1982)** cette souche est déjà connue dans la littérature comme productrice de cellulase. Cette activité enzymatique fait intervenir trois enzymes (Endo- β -glucanase, Exo- β -glucanase et la Cellobiase) qui agissent en synergie pour dégrader la cellulose (**Boulenouar, 2011**).

Les résultats de cette présente partie ont permis de mettre en exergue ce qui suit : Le meilleur effet inhibiteur des trois espèces étudiées a été enregistré par leur extrait cellulosique et ça était observé sur la sporulation, ce qui signifie que ces extraits sont montrés également très efficaces sur la sporulation que sur la croissance mycélienne et la germination. De même, la meilleure activité inhibitrice engendrée par les flavonoides était celle remarquée sur la germination sous l'effet des FRC à 0.5 mg/ml avec un taux de 74.64%, mais celle engendrée par les PHM était de l'ordre de 80.82% exercée par les PLC à 2mg/ml sur le même stade toujours. Les hémicellulose ont aussi fortement inhibé le Foa

durant le stade de sa germination (88.01% à 1mg/ml par les HLC) et le fort niveau de l'inhibition de ce stade a été exercé par ce dernier extrait. Par contre, la croissance mycélienne est le plus inhibée par les flavonoïdes.

4. Production de la biomasse dans des milieux liquides à base de cellulose :

Les résultats obtenus indiquent que le milieu PDB (milieu de culture plus largement utilisé pour cultiver la plupart des champignons) a permis au *Foa* de produire une biomasse de l'ordre de 110 mg du poids sec. La comparaison de cette valeur avec celles obtenues sur les différents milieux à base de cellulose, a permis de classer ces derniers en trois catégories : celui qui a donné une valeur voisine à celle sur PDB, le cas de la cellulose microcristalline ; ceux qui ont permis au *Foa* de produire une biomasse moins importante, le cas des plantes médicinales et en fin le groupe des palmiers dattiers qui a abouti à la formation d'une biomasse plus importante et surtout la variété « Deglet nour ». La formation de la biomasse en présence de cellulose comme seule source de carbone et d'énergie justifie qu'il y a une production de cellulase et une activité cellulolytique, ce qui a été signalé dans plusieurs travaux (**Amraoui et al., 2004 ; Lekchiri et al., 2006**). D'après ces résultats on peut dire que cette activité enzymatique s'est montrée plus faible en présence de cellulose de plantes médicinales ; ceci peut s'expliquer par le fait que ces substrats pourrait être non spécifique aux types de cellulases sécrétées par le *Foa In Vitro* comme l'a suggéré **Amraoui et al. (2004)**. Au contraire, l'importante biomasse obtenue en présence d'autres types de cellulose indique l'existence d'une activité cellulasique supérieure, ça peut justifier l'agressivité de ce champignon envers le palmier dattier et plus précisément la variété « Deglet nour ». Ceci nous laisse suggérer qu'il existerait une relation entre la pathogénécité de ce champignon et l'origine de la cellulose. De même, l'activité cellulasique qui a été mise en évidence chez *Foa* peut contribuer à la compréhension des mécanismes biochimiques de la pathogénie de ce champignon. Ce dernier en contact avec les constituants pariétaux des tissus du palmier dattier induit en premier les cellulases qui vont libérer des sucres réducteurs en particulier du glucose nécessaire à la croissance du champignon. Dans ce même sens, selon des travaux antérieurs, Plusieurs micro-organismes phytopathogènes sécrètent des toxines et des enzymes hydrolytiques actives contre les structures tissulaires de la plante hôte. Il s'agit principalement des cellulases et des pectinases. Ces hydrolases étaient capables de dégrader *In Vitro* les composés cellulosiques et pectiques (**Baracat et al., 1989 ; Ortega, 1990 ; Enokibara et al., 1992**). **Deese et Stahmann (1962)** avaient suggéré que les

cellulases et pectinases de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* soient responsables de la dégradation de la pectine et de la cellulose ; composés essentiels de la paroi de la cellule végétale en fragments solubles. Des études histologiques et de digestions enzymatiques réalisées par **Belarbi et al., (1984)** ont révélé des altérations tissulaires chez le palmier dattier infecté pouvant impliquer des hydrolases principalement les cellulases, les pectinases et même les protéases puisque ces dégradations concernent les polysaccharides, les pectines et les protéines des tissus du palmier dattier.

De plus, on constate qu'il y a une corrélation entre ces résultats et ceux obtenus sur milieux solides à base de cellulose. De ce fait, on peut dire que les celluloses extraites à partir de ces trois espèces de plantes médicinales empêchent le bon développement du Foa.

5. Effet des extraits sur la densité de population du Foa dans le sol en laboratoire :

Les résultats du suivi de la densité de population du Foa dans le sol indiquent que les différents extraits utilisés sont montrés actifs dans 213 tests parmi 360 (soit 59.16%). De plus, parmi 90 tests réalisés pour chaque extrait, les flavonoïdes ont exercé une réduction de la population fusarienne dans 69 tests (soit 76.66%), suivi par les extraits cellulosiques dans 58 tests (64.44%), ensuite les PM et les hémicelluloses dans 50 et 36 tests respectivement (tableau 16). De plus seulement les CRB à 1% et à 10% et les HRB à 5% qui ont maintenu la population fusarienne stable à une densité faible de l'ordre de 4 LOG10 (UFC/g sol) dès le 7^{ème} jusqu'au 21^{ème} jour après le traitement. Dans ce contexte plusieurs études ont prouvé l'efficacité des plantes médicinales et leurs dérivés sur les populations fusariennes dans le sol sous les conditions de laboratoires et/ou leur agressivité contre des différentes cultures. Comparativement à d'autres travaux, nos extraits ont exercé une bonne réduction de la population de Foa par rapport à celle obtenue en présence de la poudre de *Anacyclus valentinus* ; *Eucalyptus* sp ; *Rosmarinus officinalis* L, *Inula viscosa* ; *Artemisia herba alba* ; *Laurus nobilis* ; *Mentha piperita* ; *Salvia officinalis* ; *Tetraclinis articulata* ; *Thymus vulgaris* (**Simoussa et al., 2010**). Par contre la poudre et les huiles essentielles de ces mêmes plantes semblent être actifs contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* (**Belabid et al., 2010**). D'autre part, les extraits foliaires de *Piper betle* L, la poudre et les huiles essentielles de *Xylopiya Aethiopica*, la poudre de graines de *Azadirachta indica*, l'huile de *Melaleuca quinquenervia* et d'*Ocimum gratissimum* ont prouvé une efficacité contre *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, champignon parasite des cultures de tomate et dans le contrôle de la fusariose causée par ce pathogène (**Soro et al., 2010 ; Hadian et al., 2011 ; Singha et al., 2011; Doumbouya et al., 2012**). De même, les

extraits de *Chromolaena odorata* ont été actifs contre le jaunissement mortel des feuilles des bananiers causé par *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubens* (Kra et al., 2009). De plus, selon Bowers et Locke (2000), l'huile de clou de girofle, l'huile de neem, l'extrait de piment avec l'huile essentielle de moutarde ont permis de réduire la densité de la population de *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* dans le sol et d'assurer la protection des plants de chrysanthème contre ce pathogène.

6. Effet des flavonoïdes sur la virulence relative du Foa:

Plusieurs études ont montré la virulence relative de quelques espèces de *Fusarium* et de certaines formes spéciales de *Fusarium oxysporum* entre elles la forme *albedinis* sur les tissus de tubercule de pomme de terre. Comparativement à Boulenuar (2011), dont il a constaté que le poids des tissus nécrosés causés par Foa était de l'ordre de 0.066 g, nos résultats ont indiqué un poids relativement important (0.518g), mais toutes ces valeurs sont inférieures à celle obtenue par Herrmann et al. (1996), où le poids de la lésion a atteint 2.6 g, causée par *Fusarium submicinum* (souche considérée comme référence pour l'effet nécrotique d'après ces auteurs). Dans ce sens, Amraoui et al. (2005), ont suggéré que l'effet nécrotique du Foa sur les tissus de tubercule de pomme de terre est du principalement à la production d'enniatine, que selon Herrmann et al. (1996) représente une mycotoxine non spécifique à l'hôte et l'une des responsables de la phytotoxicité du Foa. La virulence du Foa peut être due aussi à la production de l'acide fusarique, l'acide 3-phenyl- lactique, acide succinique, et leurs dérivés, marasmins, et toxines peptidiques (El Hadrami et al., 2005).

De même, les espèces de *Fusarium oxysporum* sont aussi connues par leurs capacités de produire d'autres mycotoxines comme la moniliformine, l'oxysporine (Tabuc, 2007) et le zéaralénone (Pitt, 2000). D'autre part, que peu d'études apportées sur l'utilisation des plantes médicinales et leurs dérivés contre les lésions tissulaires (sur les tissus de tubercule de pomme de terre) ont été réalisées ; mais aucune sur les flavonoïdes n'a été signalée. En effet, quatre extraits (Méthanolique, d'acétate d'éthyle, dichlorométhanique et hexanique) de neuf plantes médicinales et/ou toxiques (*Limoniastrum feei*, *Launaea arborescens*, *Fredolia aretioides*, *Asteriscus graveolens*, *Acacia raddiana*, *Citrullus colocynthis*, *Calotropis procera*, *Nerium oleander* et *Pergularia tomentosa*) ont été utilisés avec quatre doses (200, 400, 800 et 1600 µg) pour évaluer leurs effets sur la virulence relative (Boulenuar, 2011). Cette étude a montré que la mesure pondérale de la lésion tissulaire la plus importante (de l'ordre de 324.1 mg) était celle observée en présence de l'extrait

d'acétate d'éthyle des racines de *Fredolia aretioides* à la charge de 400 µg et la plus faible (de l'ordre de 19.7 mg) était celle détectée en présence de l'extrait d'acétate d'éthyle de la partie aérienne de *Launaea arborescens* toujours à la même charge. D'après l'analyse de ces résultats, l'effet dépressif de nos extraits contre la virulence relative de *Foa* est probablement lié à l'altération de la synthèse et/ou de l'action des mycotoxines mises en jeux sur les cellules de pomme de terre.

7. Effet des flavonoïdes sur la mycotoxinogénèse et la production de biomasse:

Les résultats de la mycotoxinogénèse (après CCM) du filtrat de la culture du *Foa* sans extraits ajoutés indiquent l'apparition d'un seul spot fluorescent (avec $R_f = 0.55$). Selon **Multon (1982)**, ce type de spot représente des mycotoxines. D'après nos résultats, il y a au moins une toxine secrétée, parce que la CCM effectuée est monodirectionnelle. La présence de cette toxine peut justifier la lésion tissulaire observée dans le test précédent. Plusieurs auteurs ont montré le pouvoir mycotoxinogène de ce champignon. Selon **Moukhliiss (1987)**, l'extrait brut du filtrat du *Foa* contient une quarantaine de produits différents. Par exemple, les dérivés des acides fusariques. Ce parasite produit également plusieurs phytotoxines peptidiques en plus de l'acide fusarique et ses dérivés (**Sedra, 1995b; El Fakhouri et al., 1996**). D'autres substances toxiques ont été mises en évidence, telles que l'enniatine (**Amraoui et al., 2005**), l'acide 3-phenyl-lactique, acide succinique, et leurs dérivés, marasmins, et toxines peptidiques (**El Hadrami et al., 2005**).

Dans notre étude, l'effet des extraits flavonoïdes sur la mycotoxinogénèse témoignent que seuls les extraits de *B. graveolens* ont empêché la production des toxines. Ces résultats viennent à soutenir notre suggestion précédemment énoncée sur la capacité de cet extrait d'altérer la synthèse et/ou l'action des mycotoxines du *Foa* sur les cellules de pomme de terre et que les extraits flavonoïdes de *A. radiata* et de *C. cinerea* ont donc une activité uniquement sur l'action des mycotoxines. La différence observée entre les extraits des trois plantes peut être justifiée par leurs contenus en groupes des flavonoïdes.

D'autre part, plusieurs recherches ont signalé le pouvoir anti-mycotoxinogène des plantes médicinales et leurs dérivés. **Deabes et al., (2011)**, ont constaté que l'huile essentielle de *Coriandrum sativum* et *Ocimum basilicum* ont inhibé la production de l'aflatoxine B1 chez *Aspergillus flavus*. De même **El-Desouky et al., (2013)**, ont observé aussi que l'extrait éthanolique des graines de *Trigonella foenum-graecum* ont réduit la production de l'aflatoxine B1 chez *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* à 91.22% et 92.35% respectivement.

La production de mycotoxines est directement liée à la croissance fongique. Par conséquent, les facteurs capables d'influencer la croissance fongique vont aussi jouer un rôle sur la toxino-génèse. De manière générale, les conditions environnementales nécessaires à la production de mycotoxines sont plus étroites que celles permettant la croissance fongique et sont, le plus souvent, proches des conditions optimales de développement de l'espèce considérée (Tabuc, 2007).

En parallèle, la biomasse obtenue a été séchée et pesée pour évaluer l'effet des extraits des flavonoïdes sur l'aptitude de la productivité du *Foa* en biomasse en milieu liquide. Les résultats obtenus témoignent que tous nos extraits ont aboutis à la formation d'une biomasse inférieure à celle formé dans le milieu sans ajout où le taux de réduction de la croissance a atteint 69%. Il est à noter donc que ses résultats se concordent avec ceux obtenus sur milieux solides. Plusieurs études ont prouvé l'inhibition du développement fongique par les flavonoïdes naturels (Afolayan et Meyer., 1997; Valsaraj et al., 1997 ; Wachter et al., 1999; Galeotti et al., 2008). C'est grâce à leur structure caractérisée par la présence de groupe phénolique et d'autres fonctions chimiques, que les flavonoïdes sont considérés comme de très bons agents antimicrobiens (Harborne et Williams, 2000). De même, le mécanisme d'action de polyphénols est sans doute très complexe, parmi les hypothèses énoncées: L'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes ; la séquestration du substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer et l'inhibition du métabolisme microbien (Mila et Scalbert., 1994).

8. Effet des flavonoïdes sur l'activité cellulasique du *Foa* :

Les boîtes de Pétri contenant l'agar à base de cellulose et présentant des puits remplis par les filtrats des cultures du *Foa* (culture en milieu liquide à base de cellulose) indiquent l'apparition des zones d'hydrolyse autour de ces puits, ce qui est le témoin de l'activité de cellulases secrétées par ce champignon. De plus, ces résultats, se corrèlent avec ceux obtenus dans précédemment. Cette activité a été confirmée par plusieurs auteurs (Amraoui et al., 2004 ; Lekchiri et al., 2006). L'ajout des extraits flavonoïdes à l'agar à base de cellulose a exercé une diminution de cette activité enzymatique détecté dans les zones d'hydrolyse, ce qui signifie que ces extraits jouent un rôle d'inhibiteur de cellulase. Cette inhibition a été prouvé aussi par l'extrait d'acétate d'éthyle des fruits de *Citrullus colocynthis* et de celui d'acétate d'éthyle des tiges de *Asteriscus graveolens* ainsi que par l'extrait méthanolique de *Pergularia tomentosa* et de l'extrait hexanique de la partie aérienne de *Fredolia aretioides* (Boulenouar, 2011). De plus, les flavonoïdes sont connus

dans la littérature par leurs capacités d'inhiber différents types d'enzymes (**Middleton et Kandaswami 1992; Kandaswami et Middleton, 1994 ; Mila et Scalbert., 1994 ; Treutter, 2005**). Cette activité inhibitrice justifie le rôle défensif joué par ces métabolites chez les plantes hôtes vis à vis de différents phytopathogènes (**Grayer et Harborne, 1994 ; Harborne 1999**).

Conclusion générale

Conclusion générale :

Dans le cadre de la recherche des nouvelles méthodes de lutte contre le bayoud, ce travail s'intéresse à l'évaluation de l'activité antifongique des polysaccharides pariétaux et des flavonoïdes extraits à partir des feuilles et des fleurs de trois plantes (*Anvillea radiata*, *Bubonium graveolens* et *Cotula cinerea*) douées de propriétés médicinales importantes. Parallèlement à cette étude, un criblage phytochimique a été effectué pour ces trois espèces dont il a montré la présence des saponosides, tanins, acides gras, flavonoïdes, anthracénosides, huiles volatiles, terpènes et stéroïde, alcaloïdes, stérols et triterpènes dans les trois plantes, de plus, la présence des Anthraquinones et les polyuronides a été constaté uniquement dans *A. radiata*. Les anthocyanosides ont été détecté seulement chez *C. cinerea*.

Les résultats de l'extraction ont indiqué que les rendements en cellulose sont relativement élevés par rapport aux autres extraits avec un taux allant de 13,86% (obtenu à partir des fleurs de *C. cinerea*) jusqu'au 27,23% (obtenu à partir des fleurs de *B. graveolens*). De même ces résultats ont montré que le rendement en hémicelluloses diffère d'une espèce à une autre, dont le plus important était de l'ordre de 13,85%, (obtenu par les feuilles de d'*A. radiata*). Pour les PM, les taux des rendements sont compris entre 2,18% (obtenu à partir des feuilles d'*A. radiata*) et 10,5% (obtenu à partir des fleurs de *C. cinerea*). Il s'avère aussi que les rendements en flavonoïdes sont relativement moins importants pour toutes les espèces étudiées (entre 1.13% et 4.24%).

Par la suite, les extraits obtenus ont été évalués pour leurs activités antifongiques sur les différents stades de vie du *Foa*. Les résultats obtenus ont témoigné que le taux de germination des spores a été réduit en présence des extraits des flavonoïdes foliaires et floraux d'*A. radiata* et de *C. cinerea* par rapport au témoin quelque soit la concentration des flavonoïdes dans le milieu de culture, contrairement à ceux obtenus à partir de *B. graveolens* qui ont entraîné la réduction de la germination qu'à des concentrations plus élevées. De même, ces résultats ont montré que *Foa* a prouvé globalement un fort niveau de résistance vis-à-vis les extraits hémicellulosiques et pectiniques d'*A. radiata* et de *B. graveolens* au cours de la germination dont le taux de la germination a atteint 100%, par contre, seuls les extraits de *C. cinerea* ont présenté une toxicité vis-à-vis de la germination des spores. De plus, la germination des spores a été inhibée sur tous les milieux de culture à base de cellulose.

Tous les extraits flavonoïdiques étudiés ont présenté un effet inhibiteur sur le développement radial du pathogène. Le champignon a été inhibé presque de manière similaire par les extraits flavonoïdiques de toutes les espèces dont le meilleur taux d'inhibition était de l'ordre de 52,54% sous l'effet des flavonoïdes foliaires de *C. cinerea* à 4 mg/ml. Par contre, le Foa a montré également une résistance en présence des PHM des deux organes de *C. cinerea* et les PHM des fleurs de *B. graveolens*, comme il est faiblement sensible sous l'effet des PHM foliaires de *B. graveolens*. Mais seulement les extraits pectiniques d'*A. radiata* qui ont pu inhiber la croissance mycélienne du pathogène. Par ailleurs, Les hémicelluloses foliaires d'*A. radiata* et de *B. graveolens* et ceux des deux organes de *C. cinerea* ont exercé une certaine fongitoxicité à des degrés faibles et voisins, mais une réduction de la croissance mycélienne était encore nettement plus importante quant à la présence des extraits hémicellulosiques des fleurs d'*A. radiata* et surtout de *B. graveolens* dont les pourcentages d'inhibition ont dépassé 50% avec un maximum de 67,27% à la faible dose. De même, les milieux cellulose-agar ont développé des mycéliums très faiblement denses comparativement à ceux sur PDAA.

Sur la sporulation, les extraits flavonoïdiques n'ont pas beaucoup d'effet inhibiteur, voire une stimulation à certaines concentrations. En revanche, l'effet inhibiteur des PHM est plus marqué sur la sporulation dont le taux d'inhibition a dépassé 40% pour la plus part des concentrations, certaines ont même atteint 60%. De plus, les hémicelluloses sont montrés plus fongitoxique sur la sporulation surtout pour ceux de *B. graveolens* qui ont présenté des valeurs élevées où le pourcentage de l'inhibition a dépassé 50%. Ainsi que, le Foa a montré globalement un fort niveau de sensibilité sur tous les milieux solides à base de cellulose. L'inhibition de la sporulation a dépassé 95% sur les milieux à base de cellulose extraite de *B. graveolens* et de *C. cinerea*.

En suite, Les extraits cellulosiques ont été utilisés pour reconstituer un milieu liquide sur lequel le développement de la biomasse du champignon a été étudié. Dans ce contexte les résultats obtenus ont indiqué que la biomasse formée en milieux à base de cellulose des 3 plantes médicinales est moins importante par rapport au PDB.

Dans une autre partie, ces mêmes extraits ont été additionnés à différentes concentrations à des sols inoculés par Foa pour vérifier leurs effets sur la population de ce dernier. Les résultats de ce test ont indiqué que les différents extraits utilisés sont montrés actifs dans 213 tests parmi 360 (soit 59.16%). De plus, parmi 90 tests réalisés pour chaque extrait, les flavonoides ont exercé une réduction de la population fusarienne dans 69 tests (soit 76.66%), suivi par les extraits cellulosiques dans 58 tests (64.44%), ensuite les PHM et les

hémicelluloses dans 50 et 36 tests respectivement. De même, seulement les CRB à 1% et à 10% et les HRB à 5% qui ont maintenu la population fusarienne stable à une densité faible de l'ordre de 4 LOG10 (UFC/g sol) dès le 7^{ème} jusqu'au 21^{ème} jour après le traitement.

A la lumière de ces résultats, il s'avère que les flavonoïdes sont les plus fongitoxique sur la croissance mycélienne par rapport aux autres extraits. Pour cette raison, ils ont été évalués pour leurs effets sur quelques paramètres de la pathogénicité du Foa (virulence relative, mycotoxigenèse et activité cellulasique).

Les résultats de l'effet des flavonoïdes sur la virulence relative de Foa nous ont permis de constater que dans 80% des tests, les extraits flavonoïdiques ont pu réduire les lésions tissulaires (présentées sur les tranches de pommes de terre) causées par ce pathogène. Notant que l'effet des trois espèces étudiées était presque similaire.

Cependant, seuls les flavonoïdes de *B. graveolens* qui ont permis d'empêcher la synthèse des toxines chez le Foa.

D'autre part, L'activité cellulasique a été mesurée par la méthode de diffusion sur gélose à base de cellulose, c'est une méthode semi-quantitative. Cette activité a été inhibée sous l'effet des extraits flavonoïdiques de toutes les plantes étudiées.

Au terme de cette recherche, il apparait donc que les plantes médicinales évaluées présentent un réservoir de substances bioactives important et surtout les flavonoïdes foliaires, et leur utilisation pourra offrir une potentielle alternative pour lutter contre l'agent du bayoud.

Au vu des résultats obtenus et tenant compte de la problématique du sujet, ce travail n'est pas un aboutissement et il nous semble conséquent de l'approfondir par :

- Une caractérisation structurale fines des extraits sujets d'étude afin de bien cibler les molécules bioactives, pour leur évaluation *in vivo*.
- Elargir la gamme des métabolites et surtout ceux qui présentent leurs rôles dans l'interaction phytopathogène / plante hôte.
- Elargir la gamme des plantes médicinales.

En fin, le Bayoud reste la plus grave pathologie du palmier dattier et nécessite bien une mobilisation et une coordination parfaite des recherches. Il est à noter que, ces dernières années, le monde a accordé une place prépondérante à la qualité de l'environnement, à la pérennité des ressources naturelles et surtout à la réduction de l'utilisation des substances chimiques. Ceci conduit la communauté scientifique à se tourner vers la possibilité d'utiliser de façon rationnelle les produits naturels surtout d'origine végétale en tant

qu'outil de protection des cultures, mais, il reste clair que les méthodes utilisées pour le contrôle du Bayoud ne permettent pas de résoudre définitivement le problème de cette maladie. Il est donc impératif de penser à des stratégies de lutte à plusieurs niveaux en vue d'établir une meilleure combinaison des traitements susceptibles de conférer une protection maximale du palmier dattier contre la maladie du Bayoud.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- **Abdoun F et Beddiaf M. 2002.** *Cupressus dupreiziana* A, Camus, répartition, dépérissement et régénération au Tassili n'Ajjer, Sahara central. Comptes Rendus Biologies. 325 (5): 617-627.
- **Aboughe AS. 2010.** Extraction des polysaccharides hémicellulosiques de la paroi des feuilles de *Laportea aestuans* (*Fleurya aestuans*) et activité immunostimulante. ScienceSud. 3 : 1-5
- **Abu-Baker NK, Abd-Aziz S, Hassan MA and Ghazali FM. 2010.** Isolation and Sélection of Appropriate Cellulolytic Mixed Microbial Cultures for Cellulases Production from Oil Palm Empty Fruit Bunch. Biotechnology. 9 (1): 73-78.
- **Afolayan AJ et Meyer JJ. 1997.** The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*. J. Ethnopharmacol. 57:1777-1781.
- **Agrios N. 1970.** Plant pathology. Ed. Academic Press. New York.
- **Águeda B, Parladé J, De Miguel AM and Martínez-Peña F. 2006.** "Characterization and identification of field ectomycorrhizae of *Boletus edulis* and *Cistus ladanifer*". Mycologia. 98 (1). P: 23–30.
- **Ajouz S. 2009.** Estimation du potentiel de résistance de *Botrytis cinerea* à des biofongicides, thèse de doctorat. Université D'avignon Et Des Pays De Vaucluse.
- **Alabouvette C. 1999.** *Fusarium* wilts suppressive soils: an example of disease-suppressive soil. Australasian Plant Pathology. 28: 57-64.
- **Amadioha AC. 2003.** Evaluation of some plant extracts against *Colletotrichum lindemnhianum* in cowpea. Acta. Phytopathol. Entomol. Hung. 38: 259-265.
- **Amir H, Benaceur M, Laoufi Z, Amir A et Boijnaiv N. 1985.** -Le palmier dattier et la fusariose. XIII. Contribution à l'étude de l'écologie microbienne du sol de 2 palmeraies sahariennes atteintes de Bayoud. Rev Rio1 Sol. 22(3). 313-330.
- **Amraoui H, Sedra MH et Hamdaoui A. 2004.** Etude des sécrétions protéiques et enzymatiques du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, agent causal du bayoud, fusariose vasculaire du palmier dattier, AL Awamia. 109-110. Vol. 1-2.
- **Amraoui H, Lazrek HB, Hamdaoui A et Sedra MH. 2005.** Mise en évidence d'enzymes à activité antifongique chez le palmier dattier: dosage des activités

- chitinases et β 1-3 glucanases, comme réaction au *Fusarium oxysporum* f.sp *albedinis*, agent causal du Bayoud. Al Awamia. 116: 18-34.
- **Aspinall GO. and Kessler G. 1957.** The structure of callose from the grape vine, Chemistry and Industry, London. pp: 1296.
 - **Badid N, Moussaoui A et Belbraouet S. 2001.** Production de Protéines d'Organismes Unicellulaires Cultivés sur Corn Steep Liquor et Evaluation Nutritionnelle de la Biomasse. Rev. Energ. Ren. : Production et Valorisation – Biomasse. 11-28.
 - **Bahorun. 1997.** Substances naturelles actives : La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle, Food and Agricultural Research council Mauritius. pp : 83 - 94.
 - **Bahorun T, Grinier B, Trotin F, Brunet G, Pin T, Luncky M, Vasseur J, Cazin M, Cazin C and Pinkas M. 1996.** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. Arzneimittel-Forschung. 46 (11): 1086-1089
 - **Ballance S, Børsheim KY, Inngjerdingen K, Paulsen BS and Christensen BE .2007.** Partial characterisation and reexamination of polysaccharides released by mild acid hydrolysis from the chlorite-treated leaves of *Sphagnum papillosum*. Carbohydr. Polym. 67(1): 104-115.
 - **Baracat MS, Bertran RE and Ride J.P.** Chitin oligosaccharides elicit lignification In: wounded wheat leaves. Physiol Mol Plant Pathol. 1989. 34: 3-12.
 - **Barbat A. 2009.** Extraction, caractérisation chimique et valorisation biologique de glucuronoxylanes de bois de chataignier. développement de nouveaux procédés de delignification. Thèse de Doctorat de l'Université de Limoges.
 - **Barrow SC. 1998.** A monograph of *Phoenix* L. (Palmae: Coryphoideae). Kew Bull. 53(3): 513-575.
 - **Battesti V. 2005.** Jardins au désert, Évolution des pratiques et savoirs oasiens. Jérid tunisien. Éditions IRD, 1re éd., À travers champs, Paris, 440 p.
 - **Belabid L, Simoussa L, and Bayaa B. 2010.** Effect of some plant extracts on the population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*, the causal organism of lentil wilt. Advances in Environmental Biology. 4(1): 95-100.

- **Belarbi H, Dexheimer R et Mangenot J. 1984.** Le pneumatode chez *Phoenix dactylifera*. II ultrâstructure de la paroi de la cellule aérifère chez des pneumatodes jeunes provenant de cultures axéniques. *Can.J.Bot.* 62 : 972-981
- **Bellakhdar J. 1997.** La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle, Paris: Edition Ibis Press. pp : 272–274.
- **Benahmed Bouhafsoun A. 2008.** Etude de *Chamerops humilis L.* subsp. *aragentea*, anatomie, histochimie des palmes et des composés pariétaux. Thèse de doctorat. USTOMB, Oran.
- **Benhamou N. 1996.** Elicitor-induced plant defense pathways. *Trends Plant Sci*, 1: 233-240.
- **Benhouhou S,** In: A guide to Medicinal Plants in North Africa. 2005. Union Internationale pour la conservation de la nature et de ses ressources.
- **Ben Khalifa A. 1989.** Ressources génétiques du palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*) et la lutte contre la fusariose. Organisation de la variabilité des cultivars du palmier des palmeraies du Sud-ouest algérien. Thèse de magister, ENS Kouba, Alger.
- **Benkirane R, El Oirdi M, Bouslim F, Ouazzani T A, Zidane L, Douira A, Gmira N, Karmoussi M, El Hassani N and El Haloui N E. 1995.** La nutrition azotée, une méthode d'identification des isolats marocains de *Pyricularia oryzae*. *Rés Amélior Prod Agr Milieu Aride.* 7:117-29.
- **Ben Mabrouk A. 2011.** Elaboration de nanocomposites à base de whiskers cellulose et de polymère acrylique par polymérisation in situ. Thèse du doctorat De L'université de Sfax.
- **Bergoin M. 2005.** Application du concept de raffinage végétal au safran du Quercy (*Crocus sativus*) pour la valorisation intégrée des potentiels aromatiques et colorants, Thèse de Doctorat en Science des Agro-ressources, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- **Bidlack J, Malone M and Benson R. 1992.** Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants, *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science.* 72:51-56.
- **Bolwell GP, Butt VS, Davies DR and Zimmerlin A. 1995.** The origin of the oxidative burst in plants. *Free Radical Research.* 23: 517–532.

- **Bonan R, Chansel D, Chauvin C et Esnault PD. 2009.** Les figures d'Averroès. CRDP de l'académie d'Aix-Marseille, France. 55p.
- **Bouchelta A, Boughdad A, Abelali B. 2005.** Effets biocides des alcaloïdes, des saponines et des flavonoïdes extraits de *Capsicum frutescens L.* (Solanaceae) sur *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera : Aleyrodidae). Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 9 (4) : 259–269.
- **Boudart G, Dechamp-Guillaum G, Lafitte C, Ricart G, Barthe JP, Mazau D, Esquerré-Tugayé MT. 1995.** Elicitors and suppressors of hydroxyproline-rich glycoprotein accumulation are solubilized from plant cell walls by endopolygalacturonase. Eur. J. Biochem. 232: 449-457.
- **Boudet AM. 2000.** L'usine chimique. 9^{ème} conférence de l'université de tous les savoirs. France. P : 1-16.
- **Bouguedoura N. 1980.** Morphologie et ontogenèse des productions axillaires du palmier dattier, *Phoenix dactylifera L.* C.R. Acad.Sc. Paris, Série D, t. 291 :857-860.
- **Bouguedoura N. 1982.** Development and distribution of axillary buds in *Phoenix dactylifera L.* Proceeding of the first symposium on the date palm. El Hassa Saudi Arabia.
- **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 de Doctorat d'Etat. Université d'Alger, Algeria
- **Boulenouar N. 2011.** Substances naturelles à visée antifongique: cas particulier des polyphénols. Thèse du doctorat, université d'Es-senia, Oran, Algérie.
- **Bounaga N. 1991.** Le palmier dattier rappels biologiques et problèmes physiologiques. Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides. Groupe d'étude de l'arbre. Paris, France. pp : 323-336.
- **Bounaga N et Djerbi M. 1990.** Pathologie du palmier dattier. Options Méditerranéennes, Sér. A / n° 11, Les systèmes agricoles oasiens.
- **Bouzidi M, Latrèche A, Attaoui I, Mehdadi Z, Benyahia M, Bouguenaya N et Meliani H. 2010.** Caractérisation et valorisation des polysaccharides pariétaux d'*Urginea pancration* (Steinh) Phil. De Djebel Tessala (Nord-Ouest Algérien).

- **Bowers J H and Locke J C. 2000.** Effect of botanical extracts on the population density of *Fusarium oxysporum* in soil and control of *Fusarium* wilt in the greenhouse. *Plant Dis.* 84:300- 305.
- **Brongniart A., Peleaze T.T et Dumas A.B. 1839.** *Compte rendu.* 8 : 51-53.
- **Brown I, Trethowan J, Kerry M, Mansfield JW and Bolwell GP. 1998.** Localization of components of the oxidative cross-linking of glycoproteins and of callose synthesis in papillae formed during the interaction between nonpathogenic strains of *Xanthomonas campestris* and French bean mesophyll cells. *Plant J.* 15: 333-343.
- **Brudieux V. 2007.** Extraction, modification enzymatique et caractérisation chimique de nouvelles structures pectiques. Application de la relation structure / activité à la dermocosmétique. Thèse du Doctorat de l'Université de Limoges
- **Bruneton J. 1993.** Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 2^{ème} Ed Tec&Doc. Paris.
- **Bruneton J. 1999.** Pharmacognosie phytochimie, plantes médicinales, (3^e éd). Tec & Doc (Ed). Paris. pp : 1120.
- **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.
- **Carpita, NC and Gibeaut DM. 1993.** Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth, *Plant Journal.* 3(1): 1-30.
- **Carpita N and Mc Cann M. 2000.** The cell wall, *American society of plant physiologists.* 2: 52-76.
- **Cassolato JEF, Nosedá MD, Pujol CA, Pellizari FM, Damonte EB and Duarte MER. 2008.** Chemical structure and antiviral activity of the sulfated heterorhamnan isolated from the green seaweed *Gayralia oxysperma*. *Carbohydr. Res.* 343: 3085-3095.
- **Chaa L. 2008.** Caractérisation et valorisation des hémicelluloses pariétales d'un tissu foliaire d'*Aristida pungens* (Poacée). Thèse de doctorat. Université d'Artois.
- **Chabasse D, Bouchara J.P., De gentille L, Brun S et al. 2002.** Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation biologique médicale. Bioforma. N°25.

- **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.
- **Chanda SK, Hirst EL, Jones JKN and Percival EGV. 1950.** The construction of xylan from esparto grass (*Stipa tenacissima* L.). J. Chem. Soc. 1289-1297.
- **Chang PS, Mukerjea R, Fulton DB and Robyt JF. 2000.** Action of *Azotobacter vinelandii* poly-beta-D-mannuronic acid C-5-epimerase on synthetic D-glucuronans. Carbohydrate Research. 329 (4):913-922.
- **Chebil L. 2006.** Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia* : études cinétique, structurale et conformationnelle. Thèse doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine.
- **Chen Hao H, Zheng Zhou Z, Chen Peng P, Wu Xiang Gen Xg, and Zhao Ge G. 2012.** Inhibitory Effect of Extracellular Polysaccharide EPS-II from *Pseudoalteromonas* on *Candida* adhesion to Cornea in vitro. Biomedical and Environmental Sciences. 25 (2): 210–215.
- **Cheriti A. 2000.** Rapport CRSTA: Plantes Médicinales de la Région de Béchar, Sud-Ouest d'Algérie (Ethnopharmacological Studies). Bechar, Algeria, 3-11.
- **Cheriti A, Belboukhari N and Hacini S. 2005.** Savoir Traditionnel et Valorisation des Plantes Médicinales du Sud-Ouest Algérien. Ann. Univ. Béchar, 1: 4.
- **Cushnie TTP and Lamb AJ. 2005.** Antimicrobial activity of flavonoids. Int. J. Antimicrob. Agents. 26 (5): 343-356.
- **Deabes M, El-Soud N and El-Kassem L. 2011.** *In Vitro* Inhibition of Growth and Aflatoxin B1 Production of *Aspergillus Flavus* Strain (ATCC 16872) by Various Medicinal Plant Essential Oils. Macedonian Journal of Medical Sciences. 4 (4): 345–350.
- **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.
- **Deese DC and Stahmann MA. 1962.** Pectic enzymes and cellulase formation by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubens* on stem tissues from resistant and susceptible banana plants. Phytopathology. 52: 247-255.

- **Delaveau P. 1974.** Plantes agressives et poisons végétaux. Copyright Horizons de France.
- **Delaveau P. 1987.** Histoire, description et usage des différents épices, aromates et condiments ; Editions Albin Michel, 371 pages.
- **Dendougui H, Jay M, Benayache F and Benayache S. 2006.** Flavonoids from *Anvillea radiata* Coss. & Dur. (Asteraceae). Biochemical systematics and ecology. 34 : 718-720
- **De Paula, Sousa RV, Figueiredo-Ribeiro R and Buckeridge MS. 2005.** Hypoglycemic activity of polysaccharide fractions containing β -glucans from extracts of *Rhynchelytrum repens* (Willd.) C.E. Hubb., Poaceae. B. J. Med and Biol. Res. 38: 885-893.
- **Diallo D, Berit SP, Torun HAL, Terje EM. 2001.** Polysaccharides from the roots of *Entada africana* Guill. et Perr., Mimosaceae, with complement fixing activity. J Ethnopharm 74: 159-71.
- **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, Université Ibn Zohr, Agadir, Maroc.
- **Di Pietro A, Madrid M P, Caracuel Z, Delgado-Jarana J and Roncero MIG. 2003.** *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. Molecular Plant Pathology. 4:315-325.
- **Djelaila S. 2007.** Contribution à étude phytochimique du *Bubonium graveolens* (Asteraceae), mémoire magister, Université de Béchar.
- **Djellouli M, Moussaoui A, Benmehdi H, Ziane L, Belabbes A, Badraoui M, Slimani N and Hamidi N. 2013.** Ethnopharmacological study and phytochemical screening of three plants (Asteraceae family) from the region of south west Algeria. Asian Journal of Natural & Applied Sciences. 2: 159-165.
- **Djerbi M. 1982.** Bayoud disease in North Africa: history, distribution, diagnosis and control. Date Palm Journal I. (2):153-198.
- **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. 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.
- **Djerbi M. 1991.** Biotechnologie du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) : Voies de propagation des clones résistants au bayoud et de haute qualité dattière. Options Méditerranéennes, Séries Séminaires. 14 : 31-38.
- **Djerbi M., 1994.** Précis de phoéniculture. FAO, 192 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. Anns. Inst. Natl. Rech. Agron. Tunisie, 58, Note de recherche n. 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. Anns. Insf. Natl. Rech. Agron. Tunisie, 5S, Note de recherche. 3 : 1-11.
- **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.
- **Doumbouya M, Abo K, Lepengue A, Camara B, Kanko K, Aidara D et Kone D. 2012.** Activités comparées in vitro de deux fongicides de synthèse et de deux huiles essentielles, sur des champignons telluriques des cultures maraîchères en Côte d'Ivoire, Journal of Applied Biosciences. 50: 3520–3532.
- **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.
- **Ebringerová A, Kardodová A. Hromádková Z., Maloviková A., Hribalová V. 2002.** Immunodulatory activity of acidic xylans in relation to their structural and molecular properties. *International Journal of Biological Macromolecules*. 30 : 1-6.
- **Ebringerová A, Hromádková Z, Heinze T. 2005.** Hemicellulose. *Advances in Polymer Sciences*. 186:1-67.

- **Eddy N.O. 2010.** Adsorption and inhibitive properties of ethanol extract of *Garcinia kola* and *Cola nitida* for the corrosion of mild steel in H₂SO₄ Pigm. Resin Technol. 39: 348–354.
- **El-Desouky T.A, May, Amer M and Khayria Naguib. 2013.** Effect of fenugreek seeds extracts on growth of aflatoxigenic fungus and aflatoxin B1 production. Journal of Applied Sciences Research. 9(7): 4418-4425.
- **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.** Rapport de synthèse de l'atelier "Culture in vitro du Palmier dattier". In : Ferry M. (ed.), Greiner D. (ed.). Le palmier dattier dans l'agriculture d'oasis des pays méditerranéens. Zaragoza : CIHEAM, 1993. p. 167-168. (Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 28). Journées Internationales d'Elche sur le Palmier Dattier dans L'Agriculture d'Oasis des Pays Méditerranéens, 25-27 Apr 1995, Elche (Spain).
- **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. *albedinis*, the agent causing Bayoud disease. J Phytopathol. 145:329-333.
- **El Hadrami A, El Idrissi-Tourane A, El Hassni M, Daayf F and El Hadram I. 2005.** Toxin-based in-vitro selection and its potential application to date palm for resistance to the bayoud *Fusarium* wilt. Comptes Rendus Biologies, 328 (8): 732-744.
- **El Hadrami I. and El Hadrami A. 2009.** Breeding date palm. pp. 191-216. In: Jain S.M. and P.M. Priyadarshan (Eds.) Breeding Plantation Tree Crops, Springer, New York.
- **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.

- **El Rhaffari L, Zaid A. 2002.** Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet). Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée. Dans J. Fleurentin (éd.), Des sources du savoir aux médicaments du futur, IRD Editions, 293 - 318.
- **Enokibara S, Mori N and Kitamoto Y. 1992.** Purification and some properties of a carboxyl methyl cellulase from *Favolus arcularius*. Journal of Fermentation and Bioengineering. 73: 230-232.
- **Esquerré-Tugayé MT, Lafitte C, Mazau D, Toppan A and Touze A. 1979.** Cell surfaces in plant-microorganism interactions. II. Evidence for the accumulation of hydroxyproline-rich glycoproteins in the cell wall of diseased plants as a defense mechanism. Plant Physiol. 64: 320–326.
- **Fachmann O et Kraut M. 1995.** Composition des aliments d'après le répertoire général des aliments. Regal. Ed. Log Access. APRIFEL. :243
- **FAO. 2004.** FAO stat data base, www.FAO.org.
- **FAO. 2007.** Les Principaux Pays Producteurs de Dattes. FAOSTAT Agriculture.
- **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.
- **Formica J-V and Regelson W. 1995.** Review of the Biology of quercétin and related Bioflavonoids. Fd Chem.Toxic. 33: 1061-1080
- **Gaceb-Terrak Rabéa. 2010.** Contribution à la connaissance des interactions palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L) – agent causal du bayoud (*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*) par analyses phytochimiques des lipides et des phenylpropanoïdes. Thèse de Doctorat d'état, Facultés des Sciences Biologiques, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, Alger.
- **Galeotti F, Barille E, Curir P, Dolci M and Lanzotti V. 2008.** Flavonoids from carnation (*Dianthus caryophyllus*) and their antifungal activity. Phytochemistry letters. 1: 44-48.
- **Garibaldi A, Guglielmo L and Gullino ML. 1990.** Rhizosphere competence of antagonistic *Fusaria* isolated from suppressive soils. Symbiosis. 9:401–404.
- **Gaussen H, Leroy HF. 1982.** Précis de botanique (végétaux supérieurs) 2^{ème} Edition, 426 p.

- **Geiser DM, Klich MA, Frisvad JC, Peterson SW, Varga J and Samson RA. 2007.** The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*. 59: 1–10.
- **Ghestem A, Segun E, Paris M et Orecchioni A-M. 2001.** Le préparateur en pharmacie: Botanique-Pharmacognosie Phytothérapie - Homéopathie. Lavoisier Tec et Doc, Paris, 273p
- **Ghourri M, Zidane L, El Yacoubi H, Rochdi A, Fadli M, Douira A. 2012.** Etude floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la ville d'El Ouatia (Maroc Saharien). *Kastamonu Üni., Orman Fakültesi Dergisi*. 12 (2): 218-235.
- **Grayer RJ and Harborne JBA. 1994.** Survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. *Phytochemistry* 37: 19-42.
- **Guignard JL. 2001.** Botanique –Systématique moléculaire. Ed. Masson ,12^e édition, Paris, 279 p.
- **Guzmán B et Vargas P. 2009.** Historical biogeography and character evolution of Cistaceae (Malvales) based on analysis of plastid *rbcL* and *trnL-trnF* sequences. *Organisms Diversity & Evolution* 9:83-99.
- **Hadi M. 2004.** La quercitine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres ; étude et application thérapeutiques. Thèse Doctoral Pharmaco chimie. Université Louis Pasteur, Paris. 155p.
- **Hadian S, Rahnama K, Jamali S and Eskandari A. 2011.** Comparing Neem extract with chemical control on *Fusarium oxysporum* and *Meloidogyne incognita* complex of tomato. *Advances in Environmental Biology*. 5(8): 2052-2057.
- **Hadj Salem J. 2009.** Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *Nitraria retusa* et synthèse de dérivés acylés de ces molécules par voie enzymatique. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine.
- **Hannachi S, Khitri D, Ben Khalifa A et Brac De La Periere A. 1998.** Inventaire variétal de la palmeraie algérienne. Rouiba, Algérie, Ed. Anep, 225 p.
- **Haraguchi H, Tanimoto K, Tamura Y, Mizutani K and Kinoshita T. 1998.** Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*. 48 : 125-129
- **Harborne JB. 1999.** The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. *Biochem Syst Ecol.*; 27: 335- 368.

- **Harbone JB and Swain T. 1969.** Perspectives in phytochemistry, Academic Press, London.
- **Harborne JB and Baxter H. 1999.** Handbook of Natural Flavonoids. 2 vols. Wiley, Chichester.
- **Harborne JB and Williams CA. 2000.** Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 55: 481-504.
- **Harche M, Tollier MT, Monties B Et Catesson AM. 1991.** Caractérisation comparée des constituants (polyosides, lignine et acides phénoliques) des parois cellulaires de trois graminées ; *Stipa tenacissima*, *Lygeum spartum* et *Aristida pungens*. *Cellulose Chemistry and Technology*. 25 : 11-17.
- **Harikrishna D, Appa Rao AVN and Prabhakar MC. 2004.** Pharmacological investigation of a flavonoid glycoside. *Indian. J. Pharmacol.* 36: 244-250.
- **Haris C. 1989.** Introduction to modern microbiology. blackwell scientific publication. pp. 179.
- **Hassikou R, Hassikou K, Ouazzaoui Touhami A et Douira A. 2002.** Effet in vitro et in vivo de quelques fongicides sur *Curvularia lunata*. *Actes Inst. Agron. Vet. (Maroc)*. 22 (4) : 205-213.
- **Heil M. 2002.** Ecological costs of induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology*. 5: 345-350.
- **Henni, JE. 1998.** Morphologie, pouvoir pathogène et diversité génétique chez *Fusarium oxysporum* f.sp.*lycopersici*. Thèse de Doctorat d'état. Université d'Oran. 171 p.
- **Hensel A, Schmidgall J, Kreis W. 1998.** The plant cell wall - A potential source for pharmacologically active polysaccharides. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 73 : 37-43.
- **Herrmann M, Zocher R. et Haese A. 1996.** Enniatin Production by *Fusarium* Strains and its Effect on Potato Tuber Tissue. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:393-398.
- **Hibar K, Daami-Remadi M et El Mahjoub M. 2007.** Effets de certains fongicides de synthèse et biologiques sur la croissance mycélienne et l'agressivité de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Tropicultura*. 25(3) : 146-152.

- **Hilliard JJ, Krause HM, Bernstein JI, Fernandez JA, Nguyen V, Ohemeng KA, Barrett JF. 1995.** A comparison of active site binding of 4-quinolones and novel flavone gyrase inhibitors to DNA gyrase. *Adv. Exp. Med. Biol.* 390: 59-69.
- **Hopkins W.G. 2003.** *Physiologie végétale.* De Boeck. 532 p.
- **Iserin P. 2001.** Larousse Encyclopédie des plantes médicinales, Ed. Larousse.
- **Ishurd O and Kennedy JF. 2005.** The anti-cancer activity of polysaccharide prepared from Libyan dates (*Phoenix dactylifera* L.) *Carbohydr. Polym.* 59: 531-535.
- **JAiti F, Dihazi A, El Hadrami A, El Hassni M and El Hadrami I. 2004.** Effect of exogenous application of jasmonic acid on date palm defense reaction against *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*. *Phytopath. Medit.* 43: 325-331.
- **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.
- **Jimenez-Gonzalez L, Alvarez-Corral M., Munoz-Dorado M and Rodriguez-Garcia I. 2008.** Pterocarpan: interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. *Phytochemistry Reviews.* 7: 125-154.
- **Kaabeche M. 2003.** Étude Sur La Rehabilitation De La Flore Locale Au Niveau De La Reserve D'El Mergueb (Wilaya De M'sila, Algerie). PROJET ALG/00/G35/A/1G/99. 45p.
- **Kandaswami C and Middleton E. 1994.** Free radical scavenging and anti-oxidant activity of plant flavonoids. *Advanced Experimental Medicine and Biology.* 41: 351- 356.
- **Kardosová A, Ebringerová A, Alfödi J, Nosál'ová G, Matàkova T, Hribalová V. 2004.** Structural features and biological activity of an acidic polysaccharide complex from *Mahonia aquifolium* (Pursh) Nutt. *Carbohydrate Polymers.* 57 : 165-176.
- **Kasana RC, Salwan R, Dhar H, Dutt S and Gulati A. 2008.** A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. *Current Microbiology.* 57: 503-507.
- **Kawasaki T, Koita H, Nakatsubo T, Hasegawa K, Wakabayashi K, Takahashi H, Umemura K, Umezawa T and Shimamoto K. 2006.** Cinnamoyl-CoA

- reductase, a key enzyme in lignin biosynthesis, is an effector of small GTPase Rac in defense signaling in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103:230-235.
- **Kebir Z. 2009.** Extraction, analyse des polysaccharides pariétaux des racines de *R. raetam* et *R. monasperma* et recherche de leurs activités biologiques. Mémoire de magistère. USTOMB. Oran. Algérie.
 - **Killian C et Maire R. 1930.** Le Bayoud, maladie du dattier. *Bull. Soc. Hist. Nat. Agr.* 21: 89-101.
 - **Kistler CK, Bosland P, Benny U, Leong S and Williams P. 1987.** Relatedness of strains of *Fusarium oxysporum* from crucifers measured by examination of mitochondrial and ribosomal DNA. *Phytopathology*. 77 : 1289-1293.
 - **Kra KD, Diallo HA et Kouadio YJ. 2009.** Activités antifongiques de l'extrait de *Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson sur deux isolats de *Fusarium oxysporum* (E.F. Sm.) responsables du jaunissement mortel des feuilles des bananiers. *Journal of Applied Biosciences*. 24: 1488 – 1496.
 - **Kumpawat N, Chaturvedi A and Upadhyay RK. 2010.** Comparative study of corrosion inhibition efficiency of stems and leaves extract of *Ocimum sanctum* (holy basil) for mild steel in HCl solution. *Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces*. 46 (2): 267 – 270.
 - **Laberche JC. 1999.** Biologie végétale. Paris : Dunod.
 - **Lafon JP, Tharaud Prayer C et Levy G. 1996.** Biologie des plantes cultivées, Organisation physiologie de la nutrition. Tome 1, 2^{ème} édition, Tec et Doc Lavoisier, Paris. 233 p.
 - **Lazouni HA, Benmansour A, Taleb-bebdiab SA et Chabane Sari D. 2007.** Composition des constituants des huiles essentielles et valeur nutritives du foeniculum vulgare miller. *Science et Technologie*. 25 (6) : 7-12
 - **Lee Y, Howard LR and Villalon B. 1995.** Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars *J. Food Sci.* 60(3): 473-476.
 - **Lekchiri S, Moueqqit M et Lekchiri A. 2006.** Mise en évidence d'une activité cellulase chez *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* induite par une nouvelle forme d'hydrocellulose purifiée. Congrès International de Biochimie. Agadir, 09-12 Mai. 175.
 - **Lepoivre P, Busogoro JP, Etame JJ, El Hadrami A, Carlier J, Harelimana G, Mourichon X, Panis B, Riveros AS, Salle G, Strosse H and Swennen R.**

2003. Banana-*Mycosphaerella fijiensis* interactions. In: Jacome *et al.*: *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2nd International workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases, San José, Costa Rica, 20-23 may 2002. 151-159.
- **Leuchtenberger A, Liese F and Ruttloff H. 1989.** Synthesis of Variable Enzymes Spectrum by Immobilised Mycelium of *Aspergillus Niger*, Ed. Zentrabl Microbiol. 139-149 p.
 - **Lhuillier A. 2007.** Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook.f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissa trichophylla* Baker (Monimiaceae) et *Embelia concinna* Baker (Myrsinaceae). Thèse de doctorat. Toulouse.
 - **Louvet J. 1977.** Observations sur la localisation des chlamydospores de *Fusarium oxysporum* dans les tissus des plantes parasitées. Travaux Dédiés à G. Viennot-Bourgin, INRA, Paris, France. 193-197.
 - **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
 - **Louvet J et Toutain G. 1973.** Recherches sur les fusarioses. VIII. Nouvelles observations sur la fusariose du palmier dattier et précisions concernant la lutte. Annales de Phytopathologie. 5 : 35-52.
 - **Maiza K, BRAC De La Perriere et Hammiche V. 1993.** Pharmacopée traditionnelle: Sahara septentrional. Actes du 2e colloque européen d'ethnopharmacologie, Heidelberg. 169-181.
 - **Maouni A, Lamarti A, Douira A, et Badoc A. 2001.** Effet de dérivés calciques sur le développement de moisissures lors de la conservation des poires. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. 140 : 79-88.
 - **Marfak A. 2003.** Radiolyse Gamma des Flavonoïdes. Etude de Leur Réactivité avec Les Radicaux issus des Alcools : Formation de depsides. Thèse de doctorat. Université de Limoges. p : 187
 - **Markouk M. 2008.** Valorisation des plantes médicinales marocaines : Contribution à l'étude de quelques aspects pharmacologiques de *Cotula cinerea*, thèse de doctorat, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences - Semlalia, Marrakech.

- **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.
- **Meera CR, Syama C, Rakhi J, Wilsy W, Anjana JC and Ruveena TN. 2011.** Antimicrobial and Anti-Oxidant Activities of Polysaccharides Isolated from an Edible Mushroom, *Pleurotus florida* Adv Bio Tech. 10(08):12-13
- **Métraux JP, Nawrath C and Genoud T. 2002.** Systemic acquired resistance. Euphytica. 124: 237-243.
- **Michielse CB and Rep M. 2009.** Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. Molecular Plant Pathology. 10: 311-324.
- **Middleton E and Kandaswami C. 1992.** Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. Biochem Pharmacol. 43: 1167- 1179.
- **Middleton E, Kandaswami C and Thioharidies TC. 2000.** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. Pharmacological reviews. 52: 673-751.
- **Mila I and Scalbert A. 1994.** Tannin antimicrobial properties through iron deprivation a new hypothesis. International Symposium on Natural Phenols in Plant Resistance. 381(2): 749-755.
- **Ministère de l'agriculture, direction des statistiques agricoles et des enquêtes économiques. 2006.** Agriculture par les chiffres.
- **Mittler R and Lam E. 1996.** Sacrifice in the face of foes: pathogen-induced programmed cell death in plants. Trends Microbiol. 4:10-15.
- **Mizuno T, Sakai T and Chihara G. 1995.** Health foods and medicinal usage of mushrooms. Food Reviews International. 11(1): 69-81.
- **Mohammedi Z. 2006.** Etude de pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen, Thèse de Magistère En Biologie, Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen. Algérie. 105p.
- **Moine C. 2005.** Extraction, caractérisation structurale et valorisation d'une famille d'hémicelluloses du bois - Obtention de matériaux plastiques par modification des xylanes. Thèse de Doctorat de l'Université de Limoges.

- **Mokhlisse 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.
- **Multon JL. 1982.** Conservation et Stockage Des Grains et Graines et Produits Dérivés- Céréales, oléagineux, protéagineux, aliments pour animaux. Technique & Documentation Lavoisier, Paris. 576 p.
- **Munier P. 1973.** Le palmier dattier. Paris, France, Maisonneuve et Larose.
- **Munier P. 1981.** Origine de la culture de palmier dattier et sa propagation en Afrique. *Fruits*. 36: 437–450.
- **Nabarlantz D, Montané D, Kardosová A, Bekesová S, Hribalová V., Ebringerová A. 2007.** Almond shell xylo-oligosaccharides exhibiting immunostimulatory activity. *Carbohydrate Research*. 342 : 1122-1128.
- **Narayana KR, Reddy MS, Chaluvadi MR and Krishina DR. 2001.** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*. 33: 2-16.
- **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.
- **Nultsch W. 1998.** Botanique générale. De Boeck Université. p : 602.
- **OEPP/Eppo. 1990.** Exigences spécifiques de quarantaine. Document technique de l'OEPP n° 1008.
- **EOPP. 1994.** Fiche informative sur les organismes de quarantaine : *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*.
- **OEPP/CABI. 1997.** *Ips duplicatus*. In: *Distribution Maps of Quarantine Pests for Europe*. CAB International, Wallingford, Royaume Uni. 706 pp.
- **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.
- **Ollaguier M et Renard JL. 1976.** Influence du potassium sur la résistance du palmier à huile à la fusariose. *Oléagineux*. 31(5) : 203-209.
- **Ortega J. 1990.** Production of extracellular cellulolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *The Texas journal of science*. 42: 405-409.

- **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 Montpellier II.
- **Ozenda P. 1967.** Flore du Sahara, Pat, 270.
- **Ozenda P. 1977.** Flore du Sahara, édition : 2, Paris.
- **Ozenda Paul. 1982.** Les végétaux dans la biosphère. DOIN Editeurs, Paris. p 431.
- **Ozenda Paul. 1983.** Flore du Sahara, Edition CNRS, Paris.
- **Ozenda Paul. 2004.** Flore et végétation du Sahara, CNRS 3^{eme} édition. p : 417-434.
- **Painter TJ. 1991.** Lindow man, tollund man and other peat-bog bodies: the preservative and antimicrobial action of Sphagnan, a reactive glycuronoglycan with tanning and sequestering properties. Carbohydr. Polymer. 15(2): 123-142.
- **Paulian P. 1967.** Guide pour l'étude de quelques plantes Tropicale, Ed. Gauthier-Villards, Paris.
- **Pereau-Leroy P. 1958.** Le Palmier dattier au Maroc. Min .Agric. Maroc, Service. Rech. Agron. et Inst Français Rech. Fruit Outre Mer, (I.F.A.C). p : 142.
- **Picman AK, Schneder EF and Picman J. 1995.** Effect of flavonoids on mycelial growth of *Verticillium*. Albo Atrum Biochem Sys and Eco. 23: 683-693.
- **Pitt JI. 2000.** Toxigenic fungi and mycotoxins, Br. Med. Bull. 56 (1): 184 - 192.
- **Popa VI. 1996.** Hemicelluloses. In: Polysaccharides in Medicinal Applications. 107-124p.
- **Quezel P et Santa S. 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionale, Tome 2^{ieme} Edition CNRS, Paris. 10 -11p.
- **Ramírez-Suero M. 2009.** Etude de l'interaction de *Medicago truncatula* avec *Fusarium oxysporum* et du rôle de l'acide salicylique dans les interactions de la plante avec différents agents pathogènes et symbiotiques. thèse de doctorat, université de Toulouse.
- **Redgwell RJ, Selvendran RR. 1986.** Structural features of cell- wall polysaccharides of onion (*Allium cepa*). Carbohydr. Res. 157: 183-199.
- **Robert A et Benkhalifa A. 1991.** Progression de la fusariose du palmier dattier en Algérie. Sécheresse. 2(2) : 119-128.

- **Robert D, Roland JC.**, Les parois. In Biologie végétale: caractéristiques et stratégie évolutive des plantes, Doin, Ed. 1998; Vol. Tome 2: L'organisation cellulaire. pp : 35-113.
- **Roland JC.** Visualisation des polysaccharides au niveau ultrastructural. In : Les Polymères Végétaux. Polymères Pariétaux et Alimentaires non azotés. Ed. Gauthier-Villars, Paris. 1980. pp: 30-45.
- **Roussos S et Raimbault M. 1982.** Hydrolyse de la cellulose par les moisissures – Screening des souches cellulolytique -. Ann. Microbiol. Inst. Pasteur. 133 (B) : 455-464.
- **Saaidi M. 1979.** Contribution à la lutte contre le Bayoud, Fusariose vasculaire du palmier dattier. Thèse d'Université, Université de Dijon, France. 140p.
- **Saaidi M, Toutain G, Bannerot H et Louvet J. 1981.** La sélection du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) pour la résistance au Bayoud. Fruits. 36: 241-249.
- **Saadi I, Namsi A, Ben Mahamoud O, Takrouni ML, Zouba A, Bové JM and Duran-Vila N. 2006.** First report of the “Maladie des feuilles cassantes (MFC)” of date palms in Algeria. Plant Pathology. 55: 572.
- **Saija A., Scalese M., Lanza M., Marzullo D., Bonina F and Castelli F. 1995.** Flavonoids as antioxidant agents importance of their interaction with biomembranes. Free radical biology and medicine. 19: 481-486.
- **Sarkanen KV and Ludwig CH. 1971.** Lignins: occurrence, formation, structure and reaction, Ed. Wiley & Sons Inc, Interscience, N.Y.
- **Sato M, Tsuchiya H, Takase I, Kureshiro H, Tanigaki S and Iinuma M. 1995.** Antibacterial activity of flavanone isolated from *Sophora exigua* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its combination with antibiotics. Phytother Res. 9: 509-512.
- **Selles C. 2012.** Valorisation d'une plante médicinale à activité antidiabétique de la région de Tlemcen : *Anacyclus pyrethrum* L. Application de l'extrait aqueux à l'inhibition de corrosion d'un acier doux dans H₂SO₄ 0.5M ; thèse de doctorat, université de Tlemcen. 175 p.
- **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.

- **Sebastien F. 2006.** Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes : Approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. thèse de doctorat, Université de Nice-Sophia Antipolis.
- **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-Taфраoute 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 développement 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. 2013.** The Bayoud (Vascular Wilt) of Date Palm in North Africa: Situation, Research Achievements and Applications. ISHS. Acta Hort. 994 : 59-76

- Sedra MH et Djerbi M. 1985. Mise au point d'une méthode rapide et précise d'identification "in vitro" du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* agent causal du bayoud. Anns. Inst. Natl. Rech. Agron. Tunisie, 58, Note de recherche n° 02 : 1-12.
- **Sedra MH, Rouxel F. 1989.** Résistance des sols aux maladies. Mise en évidence de la résistance d'un sol de la palmeraie de Marrakech aux fusarioses vasculaires. Al Awamia. 66: 35-54.
- **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, Lashermes P, Trouslot P, Combes MC, Hamon S. 1998a.** Identification and genetic diversity analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) varieties from Morocco using RAPD markers. Euphytica. 103: 75-82.
- **Sedra MH, Lazrek HB, Lotfi F. et Rochat H. 1998b.** *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* toxin isolation and use for screening of date palm plants for resistance to the bayoud disease. Acta Hort. 513:81-90.
- **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.
- **Seifert K. 2001.** *Fusarium* and anamorph generic concepts. pp. 15 - 28 in: *Fusarium*. Summerell BA et al., eds. APS Press. St. Paul, Minnesota.
- **Seyoum A, Asres K and El-Fiky FK. 2006.** Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. Journal of phytochemistry. 67: 2058-2070.
- **Si Moussa L, Belabid L, Tadjeddine A, Bellahcene M and Bayaa B. 2010.** Effect of Some Botanical Extracts on the Population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, the causal agent of bayoud disease in Algeria. Arab. J. Pl. Prot. 28:71-79.
- **Singha IM, Kakoty Y, Unni BG, Kalita MC, Das J, Naglot A, Wann SB and Singh L. 2011.** Control of *Fusarium* wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* using leaf extract of Piper betle L.: a preliminary study, World J Microbiol Biotechnol. 27 (11) : 2583-2589.
- **Sjöström E and Westermark U.** Chemical composition of wood and pulps: basic constituents and their distribution, In: Sjöström E., Alén R. (eds), Analytical

- Methods in Wood Chemistry, Pulping, and Papermaking. Springer series in wood sciences, 1999, 1-19.
- **Smith JE, Rowan NJ and Sullivan R. 2002.** Immunomodulatory activities of mushroom glucans and polysaccharide-protein complexes in animals and humans. In: Medicinal Mushrooms: Their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. University of Strathclyde and Cancer Research U.K.: Glasgow, U.K., pp: 106-141.
 - **Soro S, Ouattara D, Zirihi GN, Kanko C, N'guessan EK, Kone D, Kouadio JY et Ake S. 2010.** Effet Inhibiteur in Vitro et in Vivo de l'extrait de Poudre et de l'huile Essentielle de *Xylopiya Aethiopica* (Dunal) A. Rich. (Annonaceae) sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radici-lycopersici* (Forl), Champignon Parasite des Cultures de Tomate, European Journal of Scientific Research. 279-288.
 - **Soylu S. 2006.** Accumulation of cell-wall bound phenolic compounds and phytoalexin in *Arabidopsis thaliana* leaves following inoculation with pathovars of *Pseudomonas syringae*. Plant Science. 170: 942–952.
 - **Stackebrandt E and Goebel BM. 1994.** Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16SrRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int J Syst Bacteriol. 44 : 846-849.
 - **Tabuc C. 2007.** Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse et de l'Université de Bucarest.
 - **Takrouni L, Rhouma A, Khoualdia O. et Allouchi B. 1988.** Observation préliminaire sur deux graves maladies d'origine inconnu du palmier dattier en Tunisie. Annales de l'Institut National de Recherche Agronomique de Tunisie (INRAT). 61 (2) : 16.
 - **Thibault JF. 1980.** Les substances pectiques. In: Monties B (eds). Les Polymères Végétaux : polymères pariétaux et alimentaires non azotés, Paris, Gauthier-Villars, 233-251p.
 - **Thrane U. 2001.** Developments in the taxonomy of *Fusarium* species based on secondary metabolites. pp. 29-49. In: *Fusarium*. Summerell BA et al., eds. APS Press. St. Paul.
 - **Tirichine M. 1997.** Mémoire sur la culture du palmier dattier et la production des dattes en Algérie. Synthèse des programmes de recherche et de

- développement. C.R. du symposium scientifique sur les recherches du palmier dattier en cours dans les pays membres du réseau de recherche et de développement du palmier dattier, Tozeur, Tunisie, A.C.S.A.D. p : 33.
- **Touam D, Gaceb-Terrak R et Rahmania F. 2006.** In : Contribution à la connaissance des interactions palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L) – agent causal du bayoud (*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*) par analyses phytochimiques des lipides et des phenylpropanoïdes, Thèse Doctorat d'état, Facultés des Sciences Biologiques, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, Alger. pp : 185.
 - **Toutain G. 1973.** Le palmier dattier et sa fusariose vasculaire (Bayoud). Coopération : D.R.A.Maroc et INRA.France. 179p.
 - **Toutain G. 1979.** Dossier technique. Enquete en palmeraie dattiere. GRET. Paris. 60p.
 - **Toutain G et Louvet J. 1974.** Lutte contre le Bayoudh. IV. Orientations de la lutte au Maroc. Al-Awamia 53 : 114-162.
 - **Treutter D. 2005.** Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth. (Fabaceae). Thèse de doctorat, Université d'Angers.
 - **Treutter D. 2005.** Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. Plant Biology. 7: 581-591.
 - **Triki MA, Zouba A et Khoualdia O. 2003.** Maladies des feuilles cassante or brittle leaf disease of date palms in Tunisia: biotic or abiotic disease? Journal of plant pathology. 85 (2): 71-79.
 - **Tsuchiya H and Iinuma M. 2000.** Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. Phytomedicine. 7:161–5.
 - **Tucker GA and Mitchell J. 1993.** Cell walls, structure, utilisation and manipulation, Plant Biotechnology. 55-103.
 - **Tzianabos A. 2000.** Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. Clinical Microbiology Reviews. 13(4): 523-533.
 - **Valette P et DE Choudens C. 1989.** Le bois, la pâte, le papier, Ed. CTP Grenoble.

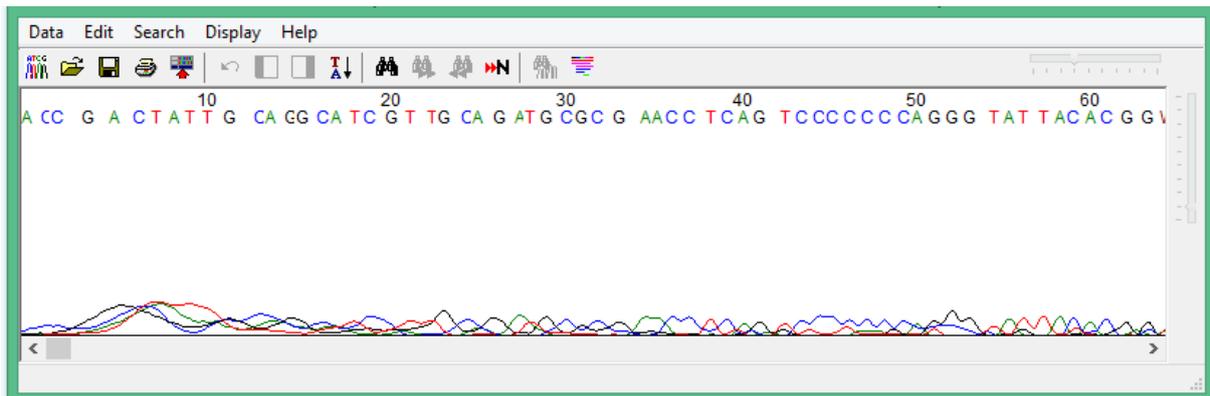
- **Valsaraj R, Pushpangadan P, Smitt UW, Adersen A, Christensen SB, Sittie A, Nyman U, Nielsen C and Olsen CE. 1997.** New anti-HIV-1, antimalarial, and antifungal compounds from *Terminalia bellerica*. *J. Nat. Prod.* 60: 739-742.
- **Verhoeven ME, Bovy A, Collins G, Muir S, Robinson S, De Vos CHR and Colliver S. 2002.** Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoids biosynthesis pathway. *Journal of experimental botany.* **53** (377): 209 -210.
- **Wachter GA, Hoffmann JJ, Furbacher T, Blake ME and Timmermann BN. 1999.** Antibacterial and antifungal flavanones from *Eysenhardtia texana*. *Phytochemistry* 52: 1469-1471.
- **Walters D., Heil M. 2007.** Costs and trade-offs associated with induced resistance. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 71: 3-17.
- **Walton JD. 1994.** Deconstructing the cell wall. *Plant Physiol.* 104: 1113-1118.
- **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.
- **Whistler RL, Feather MS. 1965.** *Methods Carbohydr. Chem.* 5: 144-145.
- **Wichtl M et Anton R. 1999.** *Plantes thérapeutiques – Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique.* Tec et Doc, Lavoisier, Paris. 692p.
- **Willats WG, McCartney L, Mackie W and Knox JP. 2001.** Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Mol Biol.* 47(1-2):9-27.
- **Yemoa AL, Gbenou JD et Johnson RC. 2008.** Identification et étude phytochimiques de plantes utilisées dans le traitement traditionnel de l'ulcère de Buruli au Bénin. *Ethnopharmacologia.* 42 :48-55.
- **Zaid A. 2002.** Date palm cultivation, FAO publication No. 156, Rome.
- **Zaid A, Arias E J and Taher F. 2002.** Date Palm Global Network. Project Document.
- **Zang D and Hamauru Y. 2003.** Phenolic compounds, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant properties of grebe, red and yellow bell peppers. *Food, Agric., Environ.* 12 : 22–27.
- **Zheng WF, Tan RX, Yang L and Liu ZL. 1996.** Two flavones from *Artemisia giraldii* and their antimicrobial activity. *Planta. Med.* 62:160-162.

Annexes

Annexe 1 : Identification moléculaire

Tableau 04 : Caractéristiques techniques de l'identification moléculaire

TECHNIQUES	PROCÉDURES
Purificación de l'ADN	The Maxwell 16 Mouse Tail DNA Purification Kit (Promega)
PCR standard	Kit de PCR utilisé: AmpONETaq DNA Polymerase (GeneAll).
	Kit d'extraction de produit de PCR : ExoSAP protocol.
Séquençage	kit de réaction de Séquençage: Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) précipitations: Etanol + EDTA + Acetato sódico 3M Polímero en Applied Genetic Analyzer 3500: POP-7



```

ACCGACTATTGCAGGCATCGTTGCAGATGCGCGAACCTCAGTCCCCCCCAGGGTATTAC
ACGGWGGGCTATAACACTCACGAAGAGAGCCACATTCGCGCCGCTTTATCCCCGGG
GAAAAGTGTGCTGGCCTGGACTGGAAAAGTGCCTGGGGAGAACCCAGATGATTAA
CCAAGCCCAAGTCTGGTCATAAAGCCTTCCCTTCAACAATTCACGTACTTTTAACTC
TCTTTTCAAAGTGCTTTTCATCTTTTCGATCACTCTACTTGTGCGCTATCGGTCTCTGGCCG
GWATTTAGCTTTAGAAGACATATACTCCCATTTAGAGCAGCATTCCCAAAGTACTCGA
CTCGTTGAAGGAAGTTTACAGAGATTTGGCATCCAACCAGACGGGGCTCTCWCCCTCTA
TGCGTCCCGTTCMGGGAACTCGGAAGGCACTGCATCAAAGTATCCTCTACAAATT
ACAAGTCCGGGCCGAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGTTGCCGCTTCACTCGCCGTT
ACTAGGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCCTCCGCTTATTGATATGCATGGTGCATATTA
MTAGACGGAGGAAAATCTTCTTTTWTAAATGASCAKGS

```

Figure 27 : Séquence génomique de la région de l'ARN 18S de la souche fongique.

a

Fusarium oxysporum f. sp. rapae genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence, strain: MAFF 240321
 Sequence ID: [qij343161760\[d0j\]AB586994.1](#) Length: 1073 Number of Matches: 1

Range 1: 513 to 1071 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
983 bits(532)	0.0	549/559(98%)	1/559(0%)	Plus/Minus
Query 21	TTGCAGATGCGGAACTCAGT	cccccccAGGGTATTACAGG	GGGCTATAACACTC-A	79
Sbjct 1071	TTGCAGATGCGGAACTCAGT	cccccccAGGGTATTACAGG	GGGCTATAACACTCCC	1012
Query 80	CGAAGAGAGCCACATTCCCGCGC	STTTATCCCCGGGAAA	AACTGATGCTGGCCTGGAC	139
Sbjct 1011	CGAAGAGAGCCACATTCCCGCGC	STTTATCCCCGGGAAA	AACTGATGCTGGCCTGGAC	952
Query 140	TGGAAAAGTGCACTGGGAGAACCC	CAGATGATTAACCAAGCC	CAAGTCTGGTCATAAAC	199
Sbjct 951	TGGAAAAGTGCACTGGGAGAACCC	CAGATGATTAACCAAGCC	CAAGTCTGGTCATAAAC	892
Query 200	GCTTCCCTTTCAACAATTTACGTA	CTTTTTAACTCTCTTTCAA	AGTGCTTTTCATCTT	259
Sbjct 891	GCTTCCCTTTCAACAATTTACGTA	CTTTTTAACTCTCTTTCAA	AGTGCTTTTCATCTT	832
Query 260	TCGATCACTCTACTTGTGCGCTAT	CGGCTCTGGCCGGWATTTAG	CTTTAGAAAGACATAT	319
Sbjct 831	TCGATCACTCTACTTGTGCGCTAT	CGGCTCTGGCCGGWATTTAG	CTTTAGAAAGACATAT	772
Query 320	ACCTCCCAATTTAGAGCAGCAT	TCCCAAATACTCGACTCGTT	GAAAGAACTTTACAGAGA	379
Sbjct 771	ACCTCCCAATTTAGAGCAGCAT	TCCCAAATACTCGACTCGTT	GAAAGAACTTTACAGAGA	712
Query 380	TTTGGCATCCAACAGACGGGCTCT	CWCCCTCTATGGCGTCCCG	TCCMGGAACTCGG	439
Sbjct 711	TTTGGCATCCAACAGACGGGCTCT	CWCCCTCTATGGCGTCCCG	TCCMGGAACTCGG	652
Query 440	AAGGCACTGCATCAAAGTATCCT	CTACAAATTACAATACTCGG	CCCGAGAGCCAGATTTC	499
Sbjct 651	AAGGCACTGCATCAAAGTATCCT	CTACAAATTACAATACTCGG	CCCGAGAGCCAGATTTC	592
Query 500	AAATTTGAGCTGTGCCCGCTTCACT	CGCCGTTACTAGGGCAATCC	CTGTTGGTTTCTTTT	559
Sbjct 591	AAATTTGAGCTGTGCCCGCTTCACT	CGCCGTTACTAGGGCAATCC	CTGTTGGTTTCTTTT	532
Query 560	CCTCCGCTTATTGATATGC		578	
Sbjct 531	CCTCCGCTTATTGATATGC		513	

b

Fusarium oxysporum f. sp. melonis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: [qij37778811\[qb\]AY188919.1](#) Length: 1134 Number of Matches: 1

Range 1: 525 to 1089 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1048 bits(538)	0.0	556/565(98%)	1/565(0%)	Plus/Plus
Query 54	GCATATCAATAAGCGGAGAAAGAA	ACCAACAGGGATTGCCCTAGT	AACGGCGAGTGAA	113
Sbjct 525	GCATATCAATAAGCGGAGAAAGAA	ACCAACAGGGATTGCCCTAGT	AACGGCGAGTGAA	584
Query 114	CGGCAACAGCTCAAATTTGAAAT	CTGGCTCTCGGGCCCGAGTT	GTAATTTGTAGAGGAT	173
Sbjct 585	CGGCAACAGCTCAAATTTGAAAT	CTGGCTCTCGGGCCCGAGTT	GTAATTTGTAGAGGAT	644
Query 174	ACTTTTGATGCAGTGCCTTCCGAG	TCCCKGGAACGGGACCCATAG	AGGGWAGAGCCC	233
Sbjct 645	ACTTTTGATGCAGTGCCTTCCGAG	TCCCKGGAACGGGACCCATAG	AGGGWAGAGCCC	704
Query 234	CGTCTGTTGGATGCCAAATCTCT	GTAAGTTCCTCAACGAGT	CGAGTATTGGGAAT	293
Sbjct 705	CGTCTGTTGGATGCCAAATCTCT	GTAAGTTCCTCAACGAGT	CGAGTATTGGGAAT	764
Query 294	CGTCTCTAAATGGGAGTATATG	TCTCTAAAGCTAAATWCCG	CCAGAGACCATAGC	353
Sbjct 765	CGTCTCTAAATGGGAGTATATG	TCTCTAAAGCTAAATWCCG	CCAGAGACCATAGC	824
Query 354	GCACAGTAGAGTGATCGAAGAT	GAAAAGCACTTTGAAAAGAG	AGTTAAAAAGTACGTG	413
Sbjct 825	GCACAGTAGAGTGATCGAAGAT	GAAAAGCACTTTGAAAAGAG	AGTTAAAAAGTACGTG	884
Query 414	AAATTGTTGAAAGGAAGCGTTT	TATGACCAGACTTGGGCTT	GGTTAATCATCTGGGGTTC	473
Sbjct 885	AAATTGTTGAAAGGAAGCGTTT	TATGACCAGACTTGGGCTT	GGTTAATCATCTGGGGTTC	944
Query 474	TCCCAGTGCACITTTCCAGTCC	AGGCCAGCATCAGTTTTCCC	CGGGGATAAAGCGGC	533
Sbjct 945	TCCCAGTGCACITTTCCAGTCC	AGGCCAGCATCAGTTTTCCC	CGGGGATAAAGCGGC	1004
Query 534	GGAAATGTGGCTCTCTTCGT	-GAGTGTATAGCCWCCGT	GTAATACCTTggggggACT	592
Sbjct 1005	GGAAATGTGGCTCTCTTCGT	-GAGTGTATAGCCWCCGT	GTAATACCTTggggggACT	1064
Query 593	GAGTTCGCGCATCTGCAAGATGC		617	
Sbjct 1065	GAGTTCGCGCATCTGCAAGATGC		1089	

Related Information

Figure 28 : Résultats de l’alignement de la séquence obtenue utilisant le programme BLAST. **a** : avec *Fusarium oxysporum* f. sp. *rapae* ; **b** : avec *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*

Annexe 2 : Composition des milieux de culture, solutions et réactifs

1. Milieu PDA (Potatoes Dextrose Agar)

Pomme de terre.....	200g
Saccharose	10g
Agar	15g
Eau distillée.....	1000ml

2. Milieu PDB (Potatoes Dextrose Broth)

Filtrat de Pomme de terre.....	200g
Saccharose.....	10g
Eau distillée.....	1000ml

3. Milieu cellulose-Agar

NaNO ₃	2g
K ₂ HPO ₄	1g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	1g
Kcl.....	0,5g
ZnSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,005g
CuSO ₄ , 5H ₂ O.....	0,001g
MnCl ₂	0,001g
Cellulose.....	2,5g
Agar.....	16g
Eau distillée.....	1000 ml

4. Milieu cellulose liquide

NaNO ₃	2g
K ₂ HPO ₄	1g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	1g
Kcl.....	0,5g
ZnSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,005g
CuSO ₄ , 5H ₂ O.....	0,001g
MnCl ₂	0,001g
Cellulose.....	2,5g

Eau distillée.....	1000 ml
--------------------	---------

5. Milieu YES (Yeast Extract Sucrose)

Sucrose.....	40 g
Extrait de levure.....	20 g
Eau distillée.....	1000 ml

6. Eau physiologique :

NaCl	9 gr
Eau distillée.....	1000 ml

7. Réactif de Mayer :

Dissoudre 1.358 g de HgCl₂ dans 60 mL d'eau. Dissoudre 5g de KI dans 10 ml d'eau. Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume total a 100 ml d'eau.

8. Réactif de Wagner :

Dissoudre 2g de KI et 1.27g d'I₂ dans 75 ml d'eau. Ajuster le volume total a 100 ml d'eau

9. Liqueur de Fehling :

La liqueur est un mélange de deux solutions :

Fehling a : dissoudre 2g de CuSO₄.5H₂O dans 50 ml d'eau distillée.

Fehling b : dissoudre 6.5g de NaOH ,17.3 g de tartrate de sodium et potassium dans 35 ml d'eau distillée puis compléter le volume a 50 ml.

10. Réactif d'amidon :

Dissoudre 1.2g d'iode dans 50 ml d'eau distillée contenant 2.5g d'iodure de potassium. Chauffer pendant 5 min. Diluer jusqu'à 500ml. Chauffer 5ml de la solution à tester avec 10 ml d'une solution de NaCl saturée dans un bain marie jusqu'à ébullition.

Annexe 3 : Etude statistique

Test de Fisher :

La comparaison d'une moyenne de (c) séries de mesures d'une quantité x, inscrites dans les (i) colonnes et (j) lignes d'un tableau, est basé sur le rapport (F) dont :

Le numérateur est la variance « entre colonne » :

$$\frac{\sum(T_i^2 / n_i) - T_G^2 / N}{n_i - 1}$$

Le numérateur est la variance « entre lignes » :

$$\frac{\sum(T_j^2 / n_i) - T_G^2 / N}{n_j - 1}$$

Le dénominateur est la variance résiduelle :

$$\frac{\sum x^2 - \sum(T_i^2 / n_i)}{N - 1}$$

Avec :

n_i = nombre de mesures de la colonne i;

n_j = nombre de mesures de la ligne j ;

N = nombre total des mesures ;

T_G = total général des mesures.

- Les moyennes diffèrent significativement si (F) est supérieure à la valeur lue dans la table de (F) pour $(F_{N-1}^{n_j-1})$ pour les colonnes et le risque 0.5 %.
- Les moyennes diffèrent significativement si (F) est supérieure à la valeur lue dans la table de (F) pour $(F_{N-1}^{n_i-1})$ pour les lignes et le risque 0.5%.
- La statistique associée au test de comparaison de deux variances correspond au rapport des deux variances estimées.

Tableau 8: Résultats statistiques de l'effet des extraits sur la germination des spores.

Espèce végétale	Extrait		F expérimentale	F théorique
<i>A. radiata</i>	Flavonoïdes	O	3,77048	6,61
		C	0,245903	5,05
	Hémicellulose	O	3,7517	6,61
		C	0,249661	5,05
	PM	O	3,7518	6,61
		C	0,24964	5,05
<i>B. graveolens</i>	Flavonoïdes	O	3,75785	6,61
		C	0,248429	5,05
	Hémicellulose	O	3,75302	6,61
		C	0,249395	5,05
	PM	O	3,75472	6,61
		C	0,249056	5,05
<i>C. cinerea</i>	Flavonoïdes	O	3,98112	6,61
		C	0,203776	5,05
	Hémicellulose	O	3,83036	6,61
		C	0,233928	5,05
	PM	O	3,86662	6,61
		C	0,226676	5,05

O : Effet de la variation de l'**organe** végétal.

C : Effet de la variation de la **concentration** de l'extrait.

Tableau 9: Résultats statistiques de l'effet des extraits sur la croissance mycélienne.

Espèce végétale	Extrait		F expérimentale	F théorique
<i>A. radiata</i>	Flavonoïdes	O	4,872	7,71
		C	0,218	6,39
	Hémicellulose	O	3,213	7,71
		C	0,197	6,39
	PM	O	2,929	7,71
		C	0,268	6,39
<i>B. graveolens</i>	Flavonoïdes	O	2,914	7,71
		C	0,272	6,39
	Hémicellulose	O	3,995	7,71
		C	0,001	6,39
	PM	O	3,461	7,71
		C	0,135	6,39
<i>C. cinerea</i>	Flavonoïdes	O	3,005	7,71
		C	0,249	6,39
	Hémicellulose	O	3,557	7,71
		C	0,111	6,39
	PM	O	3,130	7,71
		C	0,218	6,39

O : Effet de la variation de l'**organe** végétal.

C : Effet de la variation de la **concentration** de l'extrait.

Tableau 10: Résultats statistiques de l'effet des extraits sur la sporulation.

Espèce végétale	Extrait		F expérimentale	F théorique
<i>A. radiata</i>	Flavonoïdes	O	3,114	7,71
		C	0,222	6,39
	Hémicellulose	O	2,995	7,71
		C	0,251	6,39
	PM	O	15,390	7,71
		C	2,847	6,39
<i>B. graveolens</i>	Flavonoïdes	O	2,957	7,71
		C	0,261	6,39
	Hémicellulose	O	2,915	7,71
		C	0,271	6,39
	PM	O	2,880	7,71
		C	0,280	6,39
<i>C. cinerea</i>	Flavonoïdes	O	4,720	7,71
		C	0,180	6,39
	Hémicellulose	O	3,592	7,71
		C	0,102	6,39
	PM	O	2,878	7,71
		C	0,281	6,39

O : Effet de la variation de l'**organe** végétal.

C : Effet de la variation de la **concentration** de l'extrait.

Tableau 17: Résultats statistiques de l'effet des extraits sur la densité fusarienne dans le sol.

Espèce végétale	Extrait		F expérimentale	F théorique
<i>A. radiata</i>	Flavonoïdes _{fr}	D	1,309	3,26
		T	2,255	3,49
	Flavonoïdes _{fl}	D	1,276	3,26
		T	2,299	3,49
	Hémicellulose _{fr}	D	1,324	3,26
		T	2,234	3,49
	Hémicellulose _{fl}	D	1,320	3,26
		T	2,240	3,49
	PM _{fr}	D	1,312	3,26
		T	2,250	3,49
	PM _{fl}	D	1,318	3,26
		T	2,243	3,49
	cellulose _{fr}	D	1,329	3,26
		T	2,228	3,49
cellulose _{fl}	D	1,309	3,26	
	T	2,255	3,49	
<i>B. graveolens</i>	Flavonoïdes _{fr}	D	1,288	3,26
		T	2,283	3,49
	Flavonoïdes _{fl}	D	1,264	3,26
		T	2,314	3,49
	Hémicellulose _{fr}	D	1,301	3,26
		T	2,265	3,49
	Hémicellulose _{fl}	D	1,315	3,26
		T	2,246	3,49
	PM _{fr}	D	1,320	3,26
		T	2,240	3,49
	PM _{fl}	D	1,322	3,26
		T	2,238	3,49
	cellulose _{fr}	D	1,276	3,26
		T	2,298	3,49
cellulose _{fl}	D	1,311	3,26	
	T	2,252	3,49	
<i>C. cinerea</i>	Flavonoïdes _{fr}	D	1,227	3,26
		T	2,364	3,49
	Flavonoïdes _{fl}	D	1,255	3,26
		T	2,327	3,49
	Hémicellulose _{fr}	D	1,325	3,26
		T	2,234	3,49
	Hémicellulose _{fl}	D	1,320	3,26
		T	2,240	3,49
	PM _{fr}	D	1,300	3,26

		T	2,267	3,49
	PM _{fl}	D	1,316	3,26
		T	2,245	3,49
	cellulose _{fr}	D	1,317	3,26
		T	2,244	3,49
	cellulose _{fl}	D	1,267	3,26
		T	2,311	3,49

D : Effet de la **duré** d'incubation sur la densité du Foa dans le sol après le traitement.

T : Effet du **taux** du traitement sur la densité du Foa dans le sol.

Tableau 19: Table de Fisher.

Pour $\alpha = 0,05$:

$v_1 \rightarrow$ $v_2 \downarrow$	1	2	3	4	5	6	8	12	24	∞
1	161,4	199,5	215,7	224,6	230,2	234,0	238,9	243,9	249,0	254,3
2	18,51	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,37	19,41	19,45	19,50
3	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,84	8,74	8,64	8,53
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,04	5,91	5,77	5,63
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,82	4,68	4,53	4,36
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,15	4,00	3,84	3,67
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,73	3,57	3,41	3,23
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,44	3,28	3,12	2,93
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,23	3,07	2,90	2,71
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,07	2,91	2,74	2,54
11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	2,95	2,79	2,61	2,40
12	4,75	3,88	3,49	3,26	3,11	3,00	2,85	2,69	2,50	2,30
13	4,67	3,80	3,41	3,18	3,02	2,92	2,77	2,60	2,42	2,21
14	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,70	2,53	2,35	2,13
15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,64	2,48	2,29	2,07
16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,59	2,42	2,24	2,01
17	4,45	3,59	3,20	2,96	2,81	2,70	2,55	2,38	2,19	1,96
18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,51	2,34	2,15	1,92
19	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	2,63	2,48	2,31	2,11	1,88
20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,45	2,28	2,08	1,84
21	4,32	3,47	3,07	2,84	2,68	2,57	2,42	2,25	2,05	1,81
22	4,30	3,44	3,05	2,82	2,66	2,55	2,40	2,23	2,03	1,78
23	4,28	3,42	3,03	2,80	2,64	2,53	2,38	2,20	2,00	1,76
24	4,26	3,40	3,01	2,78	2,62	2,51	2,36	2,18	1,98	1,73
25	4,24	3,38	2,99	2,76	2,60	2,49	2,34	2,16	1,96	1,71
26	4,22	3,37	2,98	2,74	2,59	2,47	2,32	2,15	1,95	1,69
27	4,21	3,35	2,96	2,73	2,57	2,46	2,30	2,13	1,93	1,67
28	4,20	3,34	2,95	2,71	2,56	2,44	2,29	2,12	1,91	1,65
29	4,18	3,33	2,93	2,70	2,54	2,43	2,28	2,10	1,90	1,64
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,27	2,09	1,89	1,62
40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,18	2,00	1,79	1,51
60	4,00	3,15	2,76	2,52	2,37	2,25	2,10	1,92	1,70	1,39
120	3,92	3,07	2,68	2,45	2,29	2,17	2,01	1,83	1,61	1,25
∞	3,84	2,99	2,60	2,37	2,21	2,09	1,94	1,75	1,52	1,00

ARTICLES PUBLIES

Bubonium graveolens* extracts for controlling *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis

Received for publication, September 29, 2014

Accepted, November 23, 2014

**MEBARKI LAKHDAR^{1*}, KAID HARCHE MERIEM¹, BENLARBI LARBI²,
KASMI HAMZA³, MATROUINE MOHAMED³**

¹ *Laboratoire des Productions Valorisations Végétales et Microbiennes (LP2VM),
Faculty of Natural Sciences; University of Sciences and Technology of Oran, Mohamed
Boudiaf (USTOMB), P.O. Box. 1505, El M'naouer, Oran, 31000, Algeria.*

² *Laboratory of valorization of vegetal Resource and Food Security in Semi Arid Areas,
South West of Algeria, University of Bechar, BP 417, Bechar, Algeria.*

³ *Biology Department, University of Bechar, BP 417, Bechar, Algeria.*

***Corresponding author:** Email: mebarki76@yahoo.fr, Phone: +213 663890531

Abstract

*Bayoud disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa) is the most serious disease of date palm. Plant extracts may be alternative strategies to the currently used fungicides to control plant diseases. The present study was undertaken to evaluate the antifungal activities of cell-wall polysaccharide extracts (cellulose, hemicellulose and highly methylated pectins (HMP)) and flavonoids extracts derived from the floral parts and leaves of *Bubonium graveolens* on mycelial growth, sporulation and on soil population density of Foa. The antifungal tests were investigated by using agar dilution method. Results obtained showed that the mycelial growth of Foa was inhibited by all extracts tested except leaf and floral cellulose, leaf hemicellulose and leaf HMP. The strongest inhibitory activity was observed with leaf flavonoids (47.51%) at 4 mg/ml. On sporulation, clearly inhibitory effects by leaf hemicellulose and HMP of both organs were recorded, but the strongest inhibitory activity was found on cellulose-based media with inhibition rates between 96.1% and 97.76%. In contrast, stimulatory effects were observed with flavonoids extracts. Only soil treated with 10% of floral cellulose which has reduced significantly the population densities of Foa during 7th to 21th day after treatment (Log 10 CFU/g = 4) compared with untreated infested soil.*

Keywords: antifusarium activity, *Bubonium graveolens*, flavonoids extracts, Bayoud disease, polysaccharide extracts, soil.

1. Introduction

Fusarium species causes a huge range of diseases on an extraordinary range of host plants. The fungus can be soilborne, airborne or carried in plant residue and can be recovered from any part of the plant from the deepest root to the highest flower (SUMMERAL & al. [1]). The Bayoud disease (vascular fusariosis of date palm), caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, 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 [2]).

According to BELABID & al. [3] for controlling *Fusarium* wilt, cultural practices and the use of other methods are the most common strategies. However, they are either not available or effective. The use of natural products for the control of fungal diseases in plants is considered as an interesting alternative to synthetic fungicides due to their less negative impacts on the environment, and natural compounds are less phytotoxic, easily biodegradable

and more systematic (SAXENA & al. [4]). In this context, previous studies revealed that medicinal plants have antimicrobial and antioxidant properties (M. ASAN-OZUSAGLAM & K. KARAKOCA, [5]; M.L. BADEA & E DELIAN, [6]), and many plant extracts have been tested against *Fusarium oxysporum* species for the inhibitory effect and the control efficacy under greenhouse conditions (SAHAYARAJ & al. [7]; AMADI & al. [8]). In effect, *Bubonium graveolens* (Asteraceae family) is a medicinal plant that has important biological roles (BOULENOUAR & al. [9]).

The aim of this investigation is to evaluate the antifungal activities of the cell-wall polysaccharide extracts (cellulose, hemicellulose and HMP) and flavonoid extracts from flowers and leaves of *Bubonium graveolens*, on mycelial growth, sporulation and soil population of *Foa* in order to select the products that can be used in controlling bayoud disease.

2. Materials and methods

Plant material

Aerial parts (leaves and flowers) of *Bubonium graveolens* collected from Bechar area (Southwest of Algeria) during the flowering period of the year 2010 were chosen as experimental materials. The plant was authenticated at biology department, university of Bechar, Algeria and it was deposited in the herbarium of this department. The harvested parts were shade dried for 15 days, ground and stored separately until their use.

Fungal strain

The fungal strain used in this study was isolated according to the protocol of DJERBI [10] from rachis of infected date palm in infested palm grove in the region of Bechar, Algeria. The fungus was identified by macroscopic and microscopic characteristics according to DIHAZI [11]. This fungal strain was certified as highly aggressive and causing severe wilt disease on date palm.

Preparation of plant extracts

Preparation of flavonoids extract

Flavonoids were extracted according to the protocol of LEE & al. [12]. 50 g of plant powder (leaves and flowers of *Bubonium graveolens*) were heated separately at 90 °C under reflux in 500 ml of a mixture of distilled water/ethanol (1:1, v/v) for 4 h and the extract was filtered through a filter paper. The aqueous-ethanolic phase was evaporated until eliminating ethanol and was extracted with 100 ml of n-butanol, then was acidified to pH 3 with 10% HCl, and then the n-butanol phase was dried. The dry residue was extracted three times with 200 ml of a mixture of distilled water/ethyl acetate (1:1, v/v) for one hour, and the organic phase was basified to pH 9 with NaOH. After 15 minutes of rest, the organic phase (represents flavonoids extract) was dried before being weighed and recovered in 1% ethanol for biological tests.

Preparation of cell-wall polysaccharides extracts

Cell-wall polysaccharides extraction requires a preliminary operation which consists of preparation of the parietal residue (HARCHE & al. [13]). For this, each of the powdered plant materials (30 g) was put in an erlenmeyer flask containing a mixture of methanol and chloroform (1:1, v/v) and was stirred for 14 h under a fume hood in order to remove the lipid soluble, tannins and other cytoplasmic constituents. The operation was repeated twice. After

filtration, the residue was placed in 95% ethanol for 2 h with stirring to remove traces of chloroform and then was incubated in boiling 95% ethanol for 2 h to get better elimination of chloroform traces. The residue was then dried in an oven at 60°C for 48 h (REDGWELL & SELVENDRAN [14]).

Extraction of cellulose and hemicelluloses

Cellulose and hemicelluloses were obtained by putting 5 g of parietal residue in an erlenmeyer flask containing 100 ml of 4% NaOH and were stirred for 14 h. After filtration, the residue was rinsed with distilled water and then with acetone, then the residue was dried in an oven at 60 °C for 14 h before being weighed. The resulting part represents the cellulosic fraction (CHANDA & al. [15]).

The two filtrates obtained were neutralized by pure acetic acid and then precipitated in ethanol (1:3, v/v) for 14 h. After centrifugation (30 min, 3600 rpm/min) at room temperature, the pellet was washed with distilled water and then with acetone. Next, it was dried in an oven at 60°C for 14 h and finally weighed. This part represents the hemicellulosic fraction (CHANDA & al. [15]).

Extraction of HMP

HMP extracts were prepared by putting 5 g of parietal residue in an erlenmeyer flask containing 100 ml of distilled water, and stirred for 14 h at room temperature, and were put to boiling under reflux twice for two hours. After filtration, the filtrate was concentrated in a rotary evaporator. Then it was precipitated in cold acetone (1:2, v/v) for 14 h. After centrifugation (30 min, 3600 rpm/min) at room temperature, the pellet was rinsed with distilled water, and with alcohol, and then the residue was dried in an oven at 50°C, and was weighed. This part represents the HMP (THIBAUT [16]).

Antifungal tests

Before being added to the potato dextrose agar acidified (PDAA) medium, hemicelluloses, HMP and flavonoids were diluted in NaCl solution (5 mM), sterile distilled water and in 1% ethanol respectively. A range of concentrations (0.25; 0.5; 1; 2 and 4 mg/ml of culture medium) of the extract were used. However, cellulose extracts were intended to reconstruct cellulose-based media (With the following composition: NaNO₃ 2 g; K₂HPO₄ 1 g; MgSO₄·7H₂O 1 g; KCl 0.5 g; ZnSO₄·7H₂O 0.005 g; CuSO₄·5H₂O 0.001 g; MnCl₂ 0.001 g; Cellulose 2.5 ; Agar 16 g; Distilled water 1000 ml; pH 5. (LEKCHIRI & al. [17]), on which development of *Foa* was studied.

Assay for radial growth inhibition

Petri dishes containing PDAA media with extracts (hemicelluloses, HMP and flavonoids in separated experiments) at different concentrations were inoculated with a mycelial disc (6 mm diameter) obtained from a pure culture of *Foa*. The Petri dishes containing cellulose-based medium were inoculated in the same way. The Petri dishes were incubated at 25 °C for 7 days. The diameter of the *Foa* colony was obtained by calculating the average of two perpendicular diameters (HASSIKOU & al. [18]).

For reading the results of the mycelial growth on cellulose-based media, a note is assigned based on the diameter of the colony and the bulk density of mycelium according to the rating scale of VALES & al. [19] modified by BENKIRANE & al. [20] (Table 1).

Table 1 - The rating scale of VALES & al. [19] modified by BENKIRANE & al. [20].

Colony diameter (mm)	Density			
	very weakly dense	weakly dense	dense	very dense
0 to 30	0	0	1	2
30 to 60	0	1	2	3
60 to 90	1	2	3	3

Assay for sporulation inhibition

All colonies used to evaluate mycelial growth and incubated for 10 days at 25 °C were used to study the effect of the extracts on sporulation. Four washers measuring 5 mm in diameter were taken along the diameter of the same colony and were collected in a tube containing 1 ml of sterile distilled water. After crush washers and agitation to the vortex for 30 s, the spores were counted using a Malassez cell with three counts by suspension (MAOUNI & al. [21]).

Control tests were performed under the same conditions in absence of extracts. The percentage of inhibition was calculated using the formula of AMADIOHA [22], as shown below: Inhibition (%) = $(C - T) \cdot 100/C$.

Where C and T represent *Foa* radial growth (or sporulation) in control and treated plates, respectively.

Fusarium soil population assay

Foa was incorporated into soil (previously sifted and sterilized) at an inoculum density of 10^6 spores/g of soil. Aliquots (10 g) of the infested soil were introduced aseptically into sterilized tubes and treated by 1, 5 and 10% (w/w) of cellulose, hemicellulose, HMP and flavonoids in separated experiments. Population density of *Foa* was determined using dilution plate techniques at 0 (before soil treatment), 1, 3, 7, 14, and 21 days after soil treatment (BOWERS & LOCKE [23]). 0.5 g of soil (sample unit) from each tube (replication) was placed in 5 ml of distilled water. 0.1 ml from the appropriate dilution (depending on the treatment) was pipetted onto the surface of Petri plates containing PDAA media. Plates were then incubated at 25 °C for 24 to 48 h. Colony forming units (CFU) were counted in Petri dishes and then reported per gram of soil. CFU were then transformed to log₁₀ (CFU/g of soil) (SIMOUSSA & al. [24]). Control tests (infested soil with no medicinal plant treatment) were performed under the same conditions.

Statistical analysis

The statistical evaluation of results for the study on the products effects on the mycelial growth, sporulation inhibition percentage and on the soil population reduction percentage was performed to determine statistically significant differences ($p < 0.05$) by using Fischer test. For all experiments three replicates were realized per treatment and concentration.

3. Results and discussion

Bayoud is a vascular wilt caused by *Foa*, and it is the most serious fungal disease threatening date palm plantations in North Africa. However, several higher medicinal plants and their constituents have been successful in plant disease control and have proved to be harmless and nonphytotoxic, unlike chemical fungicides. In effect, the main objective of this study is to evaluate the effectiveness of the cell-wall polysaccharide and flavonoids extracts of *Bubonium graveolens* on the in vitro development of *Foa* and assess their ability to reduce the population of this pathogen in the soil.

The phytochemical contents of the *Bubonium graveolens* leaves and flowers are shown in Table 2. The results revealed the presence of 2.59% and 1.13% (w/w) flavonoids in leaves and flowers respectively, 18.61% and 27.23% for cellulose compounds. Hemicellulose content was found more in leaves (8.1%) and flowers contained 6.76% of hemicellulose but the content of HMP was low in the leaves (2.79%) compared to the flowers (4.01%).

Table 2 - Phytochemical contents of *Bubonium graveolens*.

	Flavonoid	Cellulose	Hemicellulose	HMP
Leaves	2.59%	18.61%	8.1%	2.79%
Flowers	1.13%	27.23%	6.76%	4.01%

4. Effect of extracts on mycelial growth

The results of antifungal assays of the *Bubonium graveolens* extracts on mycelial growth are presented in Figure 1. Flavonoid extracts from both organs of *Bubonium graveolens*, floral hemicellulose and HMP showed antifungal activities. But the dose increase was not statistically significant. Comparing the antifungal activity of these extracts, leaf flavonoids exhibited the most interesting results among the other tested extracts, with an inhibition percentage of 47.51% at 4 mg/ml.

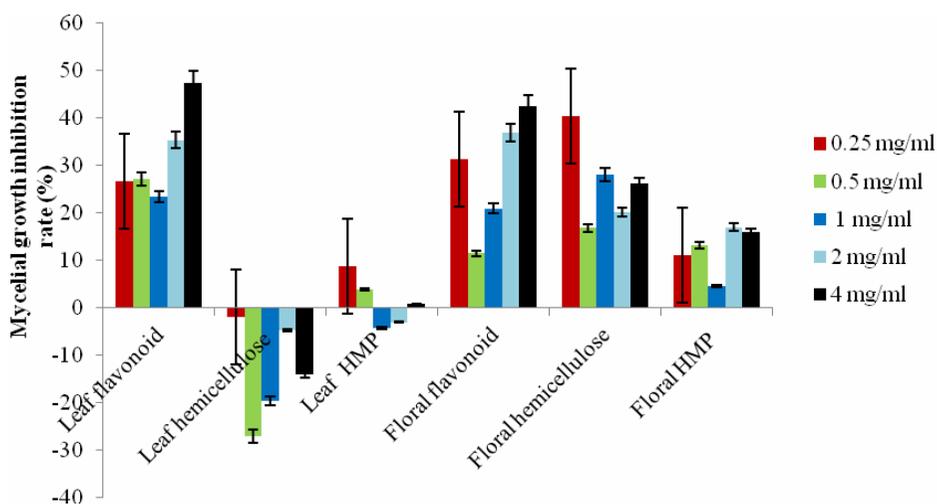


Figure 1- Effect of *Bubonium graveolens* extracts on mycelial growth of *Foa*. Results are represented as means \pm standard error.

The difference between both organs was statistically significant only for hemicellulose where it is of interest to note that, the mycelial growth of *Foa* was stimulated by the leaf hemicellulose extracts at the tested concentrations. The non-significance of the concentration increase was reported also in the work of GACEB-TERRAK [25], which showed that a phenolic acid extract of 0.48 mg/ml resulted in a growth kinetics of *Foa* similar to that obtained to 0.12 mg/ml and it was less active than to 0.24 and 0.36 mg/ml. GACEB-

TERRAK [25] justified this phenomenon by the activation of the power of detoxification of these molecules that the 0.48 mg/ml concentration could represent. According to OKIGBO & NMEKA [26], diseases of plants and tuber crops can be successfully controlled by using plant extracts. In this context, in addition to their free-radical scavenging activity, several flavonoids have been known to possess antibacterial, antifungal and antiviral activities as well as being inhibitors of phospholipase A2, cyclooxygenase and lipoxygenase (MIDDLETON & KANDASWAMI [27]; KANDASWAMI & MIDDLETON [28]). According to GRAYER & HARBORNE [29] and HARBORNE [30] flavonoids are not only present in plants as constitutive agents but are also accumulated in plant tissues in response to microbial attack.

The radial growth on cellulose-based agar was followed in terms of time in parallel with the PDAA media (Fig. 2). These results showed that the mycelial hyphae elongation of *Foa* on cellulose-based agar occurred in a similar way as on PDAA without additions. The diameters of the colonies were between 5.5 and 6.48 cm. The significant difference was that a very weakly dense mycelium was developed on the cellulose-based media (1 point according to rating scale) compared to the PDAA with no additions, on which a very dense mycelium was developed (3 points according to rating scale). These results are quite similar to those reported previously by LEKCHIRI & al. [17]. Based on these results, it is appropriate to say that these cellulosic extracts induce cellulase gene expression in *Foa*. In agreement with the research of RAMANATHAN & al. [31] *Fusarium oxysporum* is a potential fungal strain for production of cellulase enzyme that cleave β -1,4 glycosidic bonds between constituent sugars to produce glucose which is necessary for the growth of *Foa*.

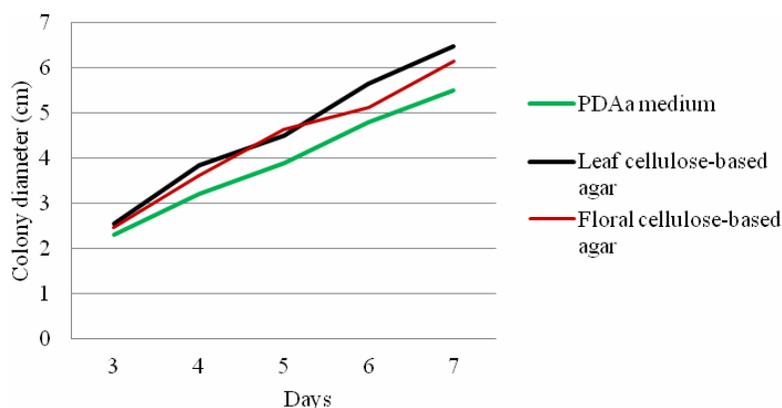


Figure 2 - Growth curves of *Foa* on cellulose-based agar and on PDAA medium.

5. Effect of extracts on sporulation

Figure 3 summarizes the average inhibition rates of sporulation. According to the results, no significant difference between both organs was observed except for hemicellulose. So, leaf hemicellulose and HMP of both organs were found active against sporulation. But the dose increase was not statistically significant. The most interesting inhibition was exhibited by floral HMP with an inhibition percentage of 60.71% at 2 mg/ml, whereas a clearly stimulatory effect of flavonoids extracts was observed on sporulation at all dosages. In this investigation, however, cellulose-based media were able to inhibit the sporulation of *Foa*. The Romanian Biotechnological Letters, Vol. 20, No. 1, 2015

inhibition percentage of the sporulation was calculated in relation to the PDAa medium with no additions and has reached 97.76% and 96.1% on the cellulose-based agar of leaves and flowers respectively. The present results of the antifungal activity were supported by the previous study which showed that the essential oils and individual monoterpenoids of lavender (*Lavandula stoechas* L.), oregano (*Origanum vulgare* L. subsp. *Hirtum*), sage (*Salvia fruticosa* Mill.) and spearmint (*Mentha spicata* L.), exhibited a sporulation inhibition of *F. oxysporum* (KADOGLIDOU & al. [32]). The dose increase was not significant even for the oil of *Melaleuca quinquenervia* on the sporulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (DOUMBOUYA & al., [33]). According to TZIANABOS [34], natural polysaccharides derived from some plants, algae and lower organisms have attracted great interest as antimicrobial agents. In addition, PAINTER [35] suggested that the antimicrobial properties of natural polysaccharides are based on their chemical structure where the presence of a highly reactive carbonyl group was detected. The carbonyl group is able to bond primary amines to produce a stable combination of polysaccharides with proteins (glycolconjugates). Bonding of exoenzymes of saprogenic microorganisms by reactive polysaccharides is likely the reason for their antimicrobial activity.

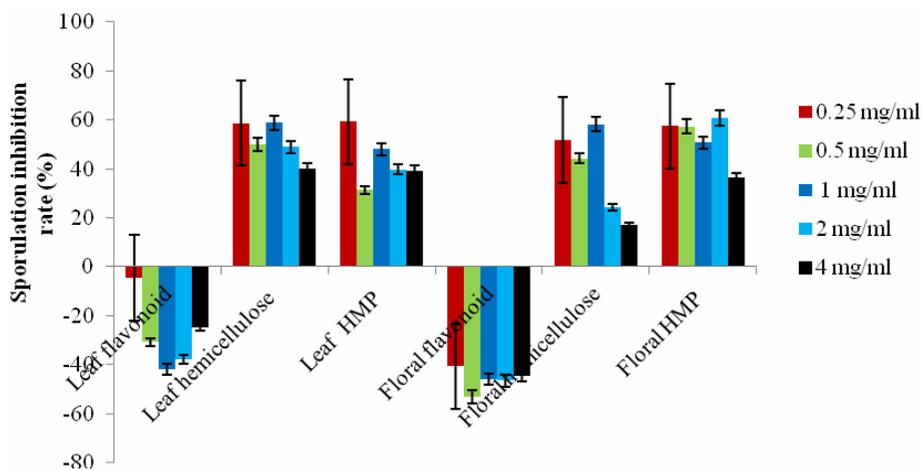


Figure 3 - Effect of *Bubonium graveolens* extracts on sporulation of *Foa*. Results are represented as means \pm standard error.

6. Effect of extracts on soil population of *Foa*

The results of soil population densities (Table 3) showed that the treatment with botanical extracts has no significant effect on the population densities of *Foa* except for floral cellulose. Soil treatment with 10% of floral cellulose has reduced significantly the soil population of *Foa*, between the 7th and 21th day after treatment (Log 10 CFU/g = 4) compared with untreated, infested soil. Similar results were obtained by SIMOUSSA & al. [24], who have reported that soil treated with 1%, 5% and 10% of some Asteraceae medicinal plants powder (*Anacyclus valentinus*; *Artemisia herba alba* and *Inula viscosa*) reduced population of *Foa* 14 and 21 day after treatment compared with infested soil with no medicinal plant treatment. In addition, according to BELABID & al [3], soil treated with 5% and 10% of the

powders of *I. viscosa* and *M. pepirita* have significantly reduced the soil population densities of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*, causing agent of vascular wilt in lentil.

Table 3 - Soil population densities of *Foa* over time as affected by soil treatment with cell-wall polysaccharide extracts and flavonoid extracts of *Bubonium graveolens*.

Plant organ	Rate treatment	Days after treatment				
		1	3	7	14	21
Leaves	1%					
	cellulose	7.79	4	5.29	4.93	5.09
	hemicellulose	6.34	6.16	6.3	5.74	6.24
	HMP	5.87	6.05	6.08	5	6.03
	Flavonoid	7.81	6	6.2	4	6.37
	5%					
	Cellulose	5.74	6	5.5	5.16	5.52
	hemicellulose	6.34	6.13	7.08	5.74	6.13
	HMP	6.39	5.94	6.02	4.7	6.28
	Flavonoid	6.74	4.74	5.08	4	5.93
	10%					
	Cellulose	6.05	5.36	5.32	4.47	5.52
	hemicellulose	6.33	6	6.1	4	6.21
	HMP	6.29	6.11	5.91	5.34	6.34
	Flavonoid	5.64	4.65	4.7	4	5.97
	Flowers	1%				
cellulose		6.5	6.04	4	4	4
hemicellulose		6.55	5.57	5.39	5.11	5.38
HMP		5.7	5.55	5	5.79	4.84
Flavonoid		6.77	5.7	5.89	5.44	4
5%						
cellulose		5.74	5.38	5.38	5.2	5.39
hemicellulose		6.07	5.84	4	4	4
HMP		5.73	5.75	5.6	5.9	5.4
Flavonoid		6.8	5.9	5.78	5.9	4
10%						
cellulose		6.17	5.77	4	4	4
hemicellulose		5.57	5.77	5.98	5.64	5.98
HMP		6.89	6.22	5.77	6	6.3
Flavonoid		6.51	5.89	5.91	6.04	4
Untreated			6.7	5.66	5.59	5.62

LOG10 (CFU/g soil)

7. Conclusion

Following this study, it appears that on mycelial growth, leaf flavonoids exhibited the most interesting inhibition compared with the other extracts, and the cellulosic extracts can induce cellulase gene expression in *Foa*. On sporulation, clearly inhibitory effects by leaf hemicellulose and HMP of both organs were observed, but the highest inhibitory effect was found on cellulose-based media. In addition, stimulatory effects were observed with leaf and floral flavonoids extracts. This study found that, among the extracts used, the floral cellulose has exercised the best reduction of the population of *Foa* in soil, which should suggest its use against this phytopathogen, due to its nature, which is not poluante.

References

1. B.A. Sumneral, B. Salleh, J.F. Leslie, A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant. Dis.*, **87**, 117, 128 (2003).
2. C. EL MODAFAR, Mechanisms of date palm resistance to bayoud disease: Current state of knowledge and research prospects. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.*, **74**, 287, 294 (2010).
3. L. BELABID, L. SIMOUSSA, B. BAYAA, Effect of some plant extracts on the population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*, the causal organism of lentil wilt. *Adv. Environ. Biol.*, **4**, 95, 100 (2010).
4. A.R. SAXENA, R.K. SAHNI, H.L. YADAV, S.K. UPADHYAY, M. SAXENA, Antifungal activity of some higher plants against *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*. *J. Liv. World.*, **12**, 32, 39 (2005).
5. M. ASAN-OZUSAGLAM, K. KARAKOCA, Evaluation of biological activity and antioxidant capacity of Turkish licorice root extracts, *Rom. Biotech. Lett.*, **19**(1), 8994, 9005 (2014).
6. M L BADEA, E DELIAN, In vitro antifungal activity of the essential oils from *Artemisia* spp. L. on *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rom. Biotech. Lett.*, **19**(3), 9345, 9352 (2014).
7. K. SAHAYARAJ, S.K.R. NAMASIVAYAM, J.A.F BORGIO, Influence of three plants extracts on *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* mycelium growth. *J. Plant. Prot. Res.*, **46**(4): 335- 338 (2006).
8. J.E. AMADI, SALAMI SO, C.S. EZE, Antifungal properties and photochemical screening of extracts of African basil (*Ocimum gratissimum* L.). *Agric. Biol. J. N. Am.*, **1**(2), 163,166 (2010).
9. N. BOULENOUAR, A. MAROUF, A. CHERITI, N. BELBOUKHARI, Medicinal plants extracts as source of antifungal agents against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *J. Agr. Sci. Tech.*, **14**, 659, 669 (2012).
10. M. DJERBI, Méthodes de diagnostic du bayoud. Bulletin OEPP/EPPO., **20**, 607, 613 (1990).
11. A. DIHAZI, 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. [PhD Thesis]. Ibn Zohr University, Agadir, Morocco (2012).
12. Y. LEE, L.R. HOWARD, B. VILLALON, Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars. *J. Food. Sci.*, **60** (3), 473, 476 (1995).
13. M. HARCHE, M.T. TOLLIER, B. MONTIES, A.M. CATESSON, Caractérisation comparée des constituants (polyosides, lignine et acides phénoliques) des parois cellulaires de trois graminées ; *Stipa tenacissima*, *Lygeum spartum* et *Aristida pungens*. *Cellulose. Chem. Technol.*, **25**, 11, 17 (1991).
14. R.J. REDGWELL, R.R. SELVENDRAN, Structural features of cell- wall polysaccharides of onion (*Allium cepa*). *Carbohydr. Res.*, **157**, 183, 199 (1986).
15. S.K. CHANDA, E.L. HIRST, J.K.N. JONES, E.G.V. PERCIVALE, The construction of xylan from esparto grass (*Stipa tenacissima* L.). *J. Chem. Soc.*, **50**, 1289, 1297 (1950).
16. J.F. THIBAUT, Les substances pectiques. In: Monties B, editor. Les Polymères Végétaux : polymères pariétaux et alimentaires non azotés. Paris: Gauthier-Villars, 1980, pp. 233- 251.
17. S. LEKCHIRI, M. MOUEQQIT, A. LEKCHIRI, Mise en évidence d'une activité cellulase chez *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* induite par une nouvelle forme d'hydrocellulose purifiée. In: International Congress of Biochemistry: *Proceedings: Contributed papers; 2006 May; Agadir, Morocco. Agadir.*, 175, 178 (2006).
18. R. HASSIKOU, K. HASSIKOU, T.A. OUAZZAOUI, A. DOUIRA, Effect in vitro and in vivo of some fungicides on *Curvularia lunata*. *Actes. Inst. Agron. Vet.*, **22**, 205, 213 (2002).
19. M. VALES, G. TOKPA, P. OLLITRAULT, Comparison of three techniques for *Pyricularia oryzae* Cav. strains identification. *Agron. Trop.*, **41**(3-4), 242, 249 (1986).
20. R. BENKIRANE, M. EL OIRDI, F. BOUSLIM, T.A. OUAZZANI, L. ZIDANE, A. DOUIRA, N. GMIRA, M. KARMOUSSI, N. EL HASSANI, N.E. EL HALOUI, La nutrition azotée, une méthode d'identification des isolats marocains de *Pyricularia oryzae*. *Rés. Amélior. Prod. Agr. Milieu. Aride.*, **7**, 117, 129 (1995).
21. A. MAOUNI, A. LAMARTI, A. DOUIRA, A. BADOC, Effect of calcium derivates on the colonization of stored pear by fungic species. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.*, **140**, 79, 88 (2001).
22. A.C. AMADIOHA, Evaluation of some plant extracts against *Colletotrichum lindemthianum* in cowpea. *Acta. Phytopathol. Entomol. Hung.*, **38**, 259, 265 (2003).
23. J.H. BOWERS, J.C. LOCKE, Effect of botanical extracts on the population density of *Fusarium oxysporum* in soil and control of *Fusarium* wilt in the greenhouse. *Plant. Dis.*, **84**, 300, 305 (2000).

24. L. SIMOUSSA, L. BELABID, A. TADJEDDINE, M. BELLAHCENE, B. BAYAA, Effect of some botanical extracts on the population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, the causal agent of bayoud disease in Algeria. *Arab. J. Pl. Prot.*, **28**, 71, 79 (2010).
25. R. GACEB-TERRAK, Contribution à la connaissance des interactions palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L) – agent causal du bayoud (*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*) par analyses phytochimiques des lipides et des phenylpropanoïdes [PhD Thesis]. Algiers, Algeria: Houari Boumediene University of Sciences and Technology (2010).
26. R.N. OKIGBO, I.A. NMEKA, Control of yam tuber with leaf extracts of *Xylopiya aethiopica* and *Zingiber officinale*. *Afr. J. Biotechnol.*, **4**(8), 804, 807 (2005).
27. E. MIDDLETON, C. KANDASWAMI, Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochem. Pharmacol.*, **43**, 1167, 1179 (1992).
28. C. KANDASWAMI, E. MIDDLETON, Free radical scavenging and anti-oxidant activity of plant flavonoids. *Advanced. Experimental. Medicine and Biology.*, **41**, 351, 356 (1994).
29. R.J. GRAYER, J.B. HARBORNE, A survey of antifungal compounds from higher plants 1982-1993. *Phytochemistry*, **37**, 19, 42 (1994).
30. J.B. HARBORNE, The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. *Biochem. Syst Ecol.*, **27**, 335, 368 (1999).
31. G. RAMANATHAN, S. BANUPRIYA, D. ABIRAMI, Production and optimization of cellulase from *Fusarium oxysporum* by submerged fermentation. *J. Sci. Ind. Res.*, **69**, 454, 459 (2010).
32. K. KADOGLIDOU, A. LAGOPODI, K. KARAMANOLI, D. VOKOU, G.A. BARDAS, G. MENEXES, H.A. Constantinidou. Inhibitory and stimulatory effects of essential oils and individual monoterpenoids on growth and sporulation of four soil-borne fungal isolates of *Aspergillus terreus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium expansum*, and *Verticillium dahlia*. *Eur. J. Plant. Pathol.*, **130**, 297, 309 (2011).
33. M. DOUMBOUYA, K. ABO, A. LEPENGUE, B. CAMARA, K. KANKO, D. AIDARA, D. Kone, Comparing in vitro activities of two synthetic fungicides and two essential oils on soil fungi of vegetable crops in Côte d'Ivoire. *J. Appl. Biosci.*, **50**, 3520, 3532 (2012).
34. A. TZIANABOS, Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clin. Microbiol. Rev.*, **13**(4), 523, 533 (2000).
35. T.J. PAINTER, Lindow man, tollund man and other peat-bog bodies: the preservative and antimicrobial action of Sphagnum, a reactive glycuronoglycan with tanning and sequestering properties. *Carbohydr. Polymer.*, **15**(2), 123, 142 (1991).

Phytochemical Analysis and Antifungal Activity of *Anvillea Radiata*

¹Mebarki Lakhdar, ¹Kaid Harche Meriem, ²Benlarbi Larbi, ³Rahmani Amina and ³Sarhani Aicha

¹Laboratory of Production, Vegetal and Microbial Valorization, Department of Biotechnology, Sciences Faculty, University of Sciences and Technology Mohamed Boudiaf, P.O. Box. 1505, El M'naouer, Oran, 31000, Algeria

²Laboratory of valorization of vegetal Resource and Food Security in Semi Arid Areas, South West of Algeria, BP 417, University of Bechar, Algeria

³Sciences and technology Faculty, BP 417, University of Bechar, Algeria

Submitted: Aug 28, 2013; **Accepted:** Oct 27, 2013; **Published:** Nov 12, 2013

Abstract: Recently, natural products have been evaluated as sources of antimicrobial agents with efficacies against a variety of microorganisms. This study described the phytochemical screening and the antifungal activity of *Anvillea radiata*. Phytochemical analysis revealed the presence of some chemical groups such as Volatile oils, Fatty acids, Tannins, Flavonoids, Anthracénosides, Emodols, Saponins, Free quinones, Anthraquinones, Alkaloids, Sterols and triterpenes. The antifungal activity of flavonoid extracts and cell-wall polysaccharide extracts derived from the flower and leaves of *A. radiata* were tested against plant pathogenic fungi *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Foa) (causing vascular wilt of date palm) by agar well diffusion method. The results indicate that flavonoid extracts had the strongest inhibitory effects on spore germination and on soil population density of Foa. Highly methylated pectins (HMP) from flowers produce the greatest inhibitory effect on mycelial growth. The sporulation was strongly inhibited using cellulose-based agar of leaves. Thus, it can be concluded that the use of *A. radiata* extracts could be considered as an antifungal available to develop novel types of natural fungicides and to control several plant pathogenic fungi.

Key words: Antifungal activity • *Anvillea radiata* • Flavonoids extracts • *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* • Phytochemical screening • Polysaccharide extracts

INTRODUCTION

Since ancient times, people have been exploring the nature particularly plants in search of new drugs [1, 2]. Medicinal plants represent a rich source of antimicrobial agents and they are widely used in the human therapy, veterinary, agriculture, scientific research and countless other areas [3, 4]. Drugs from plants can be derived from barks, leaves, flowers, roots, fruits, seeds [5]. In addition, knowledge of the chemical constituents of plants is desirable because such information will be value for synthesis of complex chemical substances [6]. Although hundreds of plant species have been tested for antimicrobial properties, the vast majority of have not been adequately evaluated [7]. In this context, *Anvillea*

radiata is a plant in Asteraceae family that grows in northern Africa and particularly in the two Maghreb countries, Morocco and Algeria. It is widely used in traditional medicine for the treatment of dysentery, gastric-intestinal disorders [8], chest cold and has been reported to have hypoglycemic activity [9]. Although so far there has been no study on antimicrobial effects and phytochemical constituents of this species.

Hence, the main goal of this report was studying on the qualitative phytochemical analysis of *Anvillea radiata*, of South-western region of Algeria and on the antifungal effects of its polysaccharide extracts and flavonoid extracts against Foa, the causal agent of vascular wilt of date palm called "Bayoud disease".

Corresponding Author: Mebarki Lakhdar, Laboratory of Production, Vegetal and Microbial Valorization, Department of Biotechnology, Sciences Faculty, University of Sciences and Technology Mohamed Boudiaf, P.O. Box. 1505, El M'naouer, Oran, 31000, Algeria.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material: At flowering stage, Fresh parts (leaves and flowers) of *Anvillea radiata* were collected from the area of Bechar (Southwest of Algeria). The harvested parts were shade dried. After drying, the plant materials were ground well using mechanical blender into fine powder and transferred into airtight containers for future use.

Plant Pathogenic Fungi: One isolate of *Foa*, was used in this study. The fungus was isolated from rachis of infected date palm in infested palm grove in the region of Bechar, Algeria. This fungal species was maintained on potato dextrose agar acidified (PDAA) and stored at 5°C for further study.

Phytochemical Analysis: Phytochemical tests were performed on different extracts prepared from the dried plant materials and ground, using four solvents of different polarities: water, ethanol, diethyl ether and petroleum ether. Phytochemical analysis for major phytoconstituents of the plant extracts was undertaken using standard qualitative methods as described by various authors [10, 11].

Preparation of Plant Extracts:

Preparation of Flavonoids Extract: A large number of flavonoid extraction methods have been developed in the past few years [12]. In this study flavonoid extracts were prepared as described by Lee *et al.* [13]. 50 g of plant powder (leaves and flowers of *Anvillea radiata*) were heated separately at 90°C under reflux in a mixture of distilled water/ethanol (250 ml/250 ml) for 4 h and the extract was filtered through a filter paper. The aqueous-ethanolic phase was evaporated until eliminating ethanol and was extracted with 100 ml of n-butanol, then was acidified to pH = 3 with 10% HCl and then the n-butanol phase was dried. The dry residue was extracted three times with a mixture of distilled water/ethyl acetate (100 ml/100 ml) for one hour and the organic phase was basified to pH = 9 with NaOH. After 15 minutes of rest, the organic phase (represents flavonoids extract) was dried before being weighed and recovered in 1% ethanol for biological tests.

Preparation of the Cell-Wall Polysaccharides Extracts: According to Harche *et al.* [14] the extraction of cell-wall polysaccharides requires a preliminary operation consists

in the preparation of the parietal residue. For this, each of the powdered plant materials (30 g) was put in an erlenmeyer flask containing a mixture of methanol and chloroform (1:1, v/v) and was stirred for 14 h under a fume hood in order to remove the lipid soluble, tannins and other cytoplasmic constituents. The operation was repeated twice. After filtration, the residue was placed in 95% ethanol for 2 h with stirring to remove traces of chloroform and then was incubated in boiling 95% ethanol for 2 h to get better elimination of chloroform traces. The residue was then dried in an oven at 60°C for 48 h [15].

Extraction of Cellulose and Hemicelluloses: Cellulose and hemicelluloses were obtained by putting 5 g of parietal residue in an erlenmeyer flask containing 100 ml of 4% NaOH and were stirred for 14 h. After filtration, the residue was rinsed with distilled water and then with acetone, then the residue was dried in an oven at 60°C for 14 h before being weighed. The resulting part represents the cellulosic fraction [16].

The two filtrates obtained were neutralized by pure acetic acid and then precipitated in ethanol (1:3, v/v) for 14 h. After centrifugation at 3600 g at room temperature for 30 min, the pellet was washed with distilled water and then with acetone. Next, it was dried in an oven at 60°C for 14 h and finally weighed. This part represents the hemicellulosic fraction [16].

Extraction of HMP: HMP extracts were prepared by putting 5 g of parietal residue in an erlenmeyer flask containing 100 ml of distilled water and stirred for 14 h at room temperature and were put to boiling under reflux twice for two hours. After filtration, the filtrate was concentrated in a rotary evaporator. Then it was precipitated in cold acetone (1:2, v/v) for 14 h. After centrifugation at 3600 g at room temperature for 30 min, the pellet was rinsed with distilled water and with alcohol and then the residue was dried in an oven at 50°C and was weighed. This part represents the HMP [17].

Antifungal Activity Assay: Before being added to the PDAA medium, hemicelluloses, HMP and flavonoids were diluted in NaCl solution (5 mM), sterile distilled water and in 1% ethanol respectively. A range of concentrations (0.25; 0.5; 1; 2 and 4 mg/ml of culture medium) of the extract were used. However, cellulose extracts were intended to reconstruct cellulose-based media (With the following composition : NaNO₃ 2 g; K₂HPO₄ 1

g; MgSO₄·7H₂O 1 g; KCl 0.5 g; ZnSO₄·7H₂O 0.005 g; CuSO₄·5H₂O 0.001 g; MnCl₂ 0.001 g; Cellulose 2.5 ; Agar 16 g; Distilled water 1000 ml; pH = 5. [18], on which development of *Foa* was studied.

Spore Germination Assay: Spore germination assay was performed as described by Maouni *et al.* [19]: 0.1 ml of a spore suspension (10⁵ spores/ml) of *Foa*, prepared in sterile distilled water (counting using a Malassez cell) was spread on the Petri dishes containing PDAA media incorporated by hemicellulose and HMP extracts (separately) at different concentrations and on the cellulose-based media. The Petri dishes were incubated at 25°C for 24 h. The counting of spores germinated or ungerminated was determined under microscope on a total of 200 spores. A spore is considered germinated if the germ tube length is greater than its diameter.

Mycelial Growth Assay: Petri dishes containing PDAA media with extracts (hemicelluloses, HMP and flavonoids in separated experiments) at different concentrations were inoculated with a mycelial disc (6 mm diameter) obtained from a pure culture of *Foa*. The Petri dishes containing cellulose-based medium were inoculated in the same way. The Petri dishes were incubated at 25°C for 7 days. The diameter of the *Foa* colony was obtained by calculating the average of two perpendicular diameters [20].

Sporulation Assay: All colonies used to evaluate mycelial growth and incubated for 10 days at 25°C were used to study the effect of the extracts on sporulation. Sporulation assay was performed as described by Maouni *et al.* [19].

Control tests were performed under the same conditions in absence of extracts. The percentage of inhibition was calculated using the formula of Amadioha [21], as shown below: Inhibition (%) = $(C - T) \cdot 100 / C$.

Where C and T represent *Foa* germination (radial growth or sporulation) in control and treated plates, respectively.

Fusarium Soil Population Assay: *Foa* was incorporated into soil (previously sifted and sterilized) at an inoculum density of 10⁶ spores/g of soil. Aliquots (10 g) of the infested soil were introduced aseptically into sterilized tubes and treated by 1, 5 and 10% (w/w) of cellulose, hemicellulose, HMP and flavonoids in separated experiments. Population density of *Foa* was determined using dilution plate techniques at 0 (before soil treatment),

1, 3, 7, 14 and 21 days after soil treatment [22]. 0.5 g of soil (sample unit) from each tube (replication) was placed in 5 ml of distilled water. 0.1 ml from the appropriate dilution (depending on the treatment) was pipetted onto the surface of Petri plates containing PDAA media. Plates were then incubated at 25°C for 24 to 48 h. Colony forming units (CFU) were counted in Petri dishes and then reported per gram of soil. CFU were then transformed to log 10 (CFU/g of soil) [23]. Control tests (infested soil with no medicinal plant treatment) were performed under the same conditions.

RESULTS

Phytochemical analysis: The phytochemical screening of *Anvillea radiata* showed the presence of medically active compounds in this plant (Table 1).

From the table, it could be seen that, Volatile oils, Fatty acids, Tannins, Flavonoids, Anthracénosides, Emodols, Saponins, Free quinones were present in both organs studied. Anthraquinones, Sterols and triterpenes were absent in the leaves. Alkaloids were absent only from the flowers. But Starch and Reducing compounds were absent in the leaves and also in the flowers.

Antifungal Activity: On spore germination, the evaluation of the effectiveness of the extracts tested was based on the calculated percentages of spore germination (200 spores counted represent a percentage of 100%). The percentage of spore germination in control treatments was equal to 83.44% (Table 2).

Comparing with the control test, spore germination was stimulated by the polysaccharide extracts at all the tested concentrations (with spore germination percentages ranging from 99.66% to 100%). By contrast, flavonoid extracts inhibited spore germination at all dosages. The strongest inhibitory activity was observed with floral flavonoid (48.66%) at high concentration. Cellulose-based media were also capable of inhibiting the spore germination (The inhibition rate has reached 16% and 46% on cellulose-based medium of leaves and flowers respectively).

For mycelial growth fungal strain colony radius in control treatments was equal to 45.9 mm (Table 3).

From the concentration of 0.5 mg/ml all the incorporated extracts (hemicellulose, HMP and flavonoid) showed inhibitory effect with varying degrees of inhibition rate. An increase in antifungal activity was observed with increase in concentration. Comparing with

Table 1: Phytochemical constituent of *Anvillea radiata*

	Starch	Reducing compounds	Volatile oils	Fatty acids	Alkaloids	Tannins	Flavonoids	Anthracénosides	Anthocyanosides	Emodols	Saponins	Sterols and Quinones		
												triterpenes	free Anthra quinones	
Leaves	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
Flowers	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+

Table 2: Effect of *Anvillea radiata* extracts on spore germination of *Foa*

Plant organ	Extracts	Concentration (mg/ml)					Control	Percentage of spore germination (%)
		0.25	0.5	1	2	4		
Leaves	Flavonoid	70	69.66	59.66	61.66	45.83	83.44	
	hemicellulose	99.83	99.83	99.33	98.16	96.16	83.44	
	HMP	100	99.16	100	100	99.66	83.44	
Flowers	Flavonoid	64.16	61.5	49.33	55.83	42.83	83.44	
	hemicellulose	97.33	100	98.33	100	99.83	83.44	
	HMP	98.6	99.83	100	99.66	97.5	83.44	

Table 3: Effect of *Anvillea radiata* extracts on mycelial growth of *Foa*

Plant organ	Extracts	Concentration (mg/ml)					Control	Colony diameter (cm)
		0.25	0.5	1	2	4		
Leaves	Flavonoid	4.95	4.58	4.51	4.35	3.88	4.59	
	hemicellulose	4.45	4.37	4.05	4.07	3.6	4.59	
	HMP	4.63	4.56	4.4	4.03	3.77	4.59	
Flowers	Flavonoid	4.63	4.56	4.4	4.03	3.77	4.59	
	hemicellulose	3.75	4.52	3.9	3.82	3.47	4.59	
	HMP	3.8	3.6	3.81	3.65	3.18	4.59	

Table 4: Effect of *Anvillea radiata* extracts on sporulation of *Foa*

Plant organ	Extracts	Concentration (mg/ml)					Sporulation inhibition rate (%)
		0.25	0.5	1	2	4	
Leaves	Flavonoid	02.43	08.26	08.57	16.55	19.91	
	hemicellulose	36.94	15.77	18.53	18.99	39.24	
	HMP	-11.67	00.90	03.35	24.37	31.59	
Flowers	Flavonoid	36.80	01.21	03.35	24.22	31.59	
	hemicellulose	17.15	13.80	01.21	26.82	39.70	
	HMP	-07.14	-05.53	-11.90	11.63	28.20	

Table 5: Soil population densities of *Foa* 21 days after soil treatment with *Anvillea radiata* extracts

Plant organ	Extracts	Rate treatment				Untreated	LOG10 (CFU/g soil)
		1%	5%	10%			
Leaves	Flavonoid	4,3	4,47	5,44	5,57		
	hemicellulose	5,43	6,12	5,14	5,57		
	HMP	5,34	5,36	6,31	5,57		
	Cellulose	5,53	4,3	5,61	5,57		
Flowers	Flavonoid	4,3	4,47	5,44	5,57		
	hemicellulose	5,44	5,07	4,9	5,57		
	HMP	5,71	5,2	5,38	5,57		
	Cellulose	5,71	5,76	5,71	5,57		

the other extracts, HMP from flowers exhibited the most interesting inhibition on mycelial growth (30.71% at the highest concentration). On cellulose-based agar the mycelial hyphae elongation of *Foa* was occurred in a similar way as on PDAA without additions. But the significant difference is that the cellulose-based media have developed a very weakly dense mycelium compared to the PDAA with no additions.

Inhibitory but also stimulatory effect of conidial production by the tested compounds was found (Table 4).

In particular, flavonoid and hemicellulose from both organs inhibited sporulation of *Foa* at all dosages (the dose increase is not necessarily accompanied by better efficiency) while sporulation of the pathogen was only inhibited at the intermediate and high dosages of HMP from both organs. The highest sporulation inhibition was obtained with hemicellulose of flowers (39.70% at 4 mg/ml). In addition, cellulose-based media also greatly inhibited production of conidia of *Foa* (The inhibition percentage has reached 80% and 77% on the cellulose-based agar of leaves and flowers respectively).

Twenty-one days after soil treatment with 1%, flavonoid from both organs reduced population densities of *Foa* by 22.80%, compared with the nontreated control soil (Table 5).

However, the treatment with the other extracts has no significant effect. No significant change in the case of the treatment with 5% of *Anvillea radiata* extracts. The population of *Foa* in the soil treated with 10% of medicinal plants powders was not significantly less than in the untreated soil after 21 days.

DISCUSSION

Phytochemical screening conducted on the *Anvillea radiata* extracts revealed the presence of constituents which are known to exhibit medicinal as well as physiological activities [24]. Analysis of the plant extracts revealed the presence of phytochemicals such as tannins, flavonoids, saponins, Volatile oils, Sterols, Anthracénosides, Emodols, triterpenes and alkaloids. The presence of these bioactive compounds indicates the medicinal value of this plant. Natural phytochemicals derived from fruits, vegetables and herbs have been reported to possess a wide range of biological effects, including antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory actions [25].

Various extract of medicinal plants have shown inhibitory effects against phytopathogenic fungi in vitro [26]. In this study, the biological tests showed that

favonoids exhibited appreciable inhibitory effect against *Foa* in all tests. Previous studies indicate that flavonoids of several plant extracts showed antifungal activities [27-29]. The other roles attributed to them were to promote physiological survival of the plant by protecting them from fungal pathogens (Galeotti *et al.*, 2008) [30]. According to Huang and Chung [31], phenolic compounds caused swelling of hyphal tips, plasma seeping around hyphae, leaking of plasma, cell wall distortion, abnormal branching or fusion of hyphae and consequently wrinkling of hyphae surface.

Our results showed that polysaccharide extracts have presented an inhibitory effect both on the mycelial growth and sporulation neatly superior to that on the spore germination. The antifungal activity of polysaccharide extracts was also confirmed experimentally by Ballance *et al.* [32]. The antimicrobial properties of natural polysaccharides are based on their chemical structure where the presence of a highly reactive carbonyl group was detected. The carbonyl group is able to bond primary amines to produce a stable combination of polysaccharides with proteins (glycolconjugates). Bonding of exoenzymes of saprogenic microorganisms by reactive polysaccharides is likely the reason for their antimicrobial activity [33].

CONCLUSION

The results revealed the presence of medicinally important constituents in the plant studied. In this study, the antifungal activity of cell-wall polysaccharide extracts and flavonoid extracts of *Anvillea radiata* against *Foa* was determined. Flavonoid extracts showed the strongest inhibitory effects on spore germination and on soil population density of *Foa*. HMP from flowers had the greatest inhibitory effect on mycelial growth. The sporulation was strongly inhibited using cellulose-based agar of leaves. The traditional medicine practice is recommended strongly for this plant as well as it is suggested that further investigation should be carried out to isolate, purify and characterize the active constituents responsible for the activity of this plant.

REFERENCES

1. Verpoorte, R., 1998. Chemodiversity and the biological role of secondary metabolites, some thoughts for selecting plant material for drug development. Proc. Phytochem. Soc. Europe, Kluwer Publishers, 43: 11-24.

2. Dabai, Y.U., A.H. Kawo and R.M. Aliyu, 2012. Phytochemical screening and antibacterial activity of the leaf and root extracts of *Senna italica*. Afr. J. Pharm. Pharmacol, 6(12): 914-918.
3. Vasu, K., J.V. Goud, A. Suryam, Singara and M.A. Chary, 2009. Biomolecular and phytochemical analyses of three aquatic angiosperms. Afr. J. Microbiol. Res., 3(8): 418-421.
4. Hussain, I., J.A. Khader, S. Noor, R. Ullah, M. Talha, Badrullah and M. Ahmed, 2012. Study on the medicinal plant *Calandula officinalis*. Afr. J. Pharm. Pharmacol, 6(13): 973-978.
5. Criagg, G.M. and J.N. David, 2001. Natural product drug discovery in the next millennium. J. Pharm. Biol., 39: 8-17.
6. Parekh, J. and S. Chanda, 2007. Antibacterial and phytochemical studies on twelve species of Indian medicinal plants. Afr. J. Biomed. Res., 10: 175-181.
7. Balandrin, M.F., J.A. Klocke, E.S. Wurtele and W.H. Bollinger, 1985. Natural plant chemicals: Sources of Industrial and Medicinal materials. Science, 228: 1154-1160.
8. Bellakhdar, J., 1997. La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle. Edition Ibis Press, pp: 272-274.
9. Maizak, K., R.A. Brac De La Perriere, V. Hammiche, 1993. Pharmacopée traditionnelle saharienne: Sahara septentrional. In the Proceedings of The 2nd European Symposium of Ethnopharmacology and the 11th International Conference on Ethnomedicine, Heidelberg, France, pp: 169-181.
10. Bruneton, J., 1999. Pharmacognosie-Phytochimie, Plantes médicinales, Technique et documentation. 3rd Edn., Lavoisier, Paris, pp: 721-741.
11. Paris, R. and H. Moyses, 1969. Précis de matière médicinale. Tome 3, Masson et Cie, Paris, pp: 205-208.
12. Gao, M. and C.Z. Liu, 2005. Comparison of techniques for the extraction of flavonoids from cultured cells of *Saussurea medusa* Maxim. World. J. Microbiol. Biotechnol, 21: 1461-1463.
13. Lee, Y., L.R. Howard and B. Villalon, 1995. Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annum*) cultivars. J. Food. Sci., 60(3): 473-476.
14. Harche, M., M.T. Tollier, B. Monties and A.M. CATESSON, 1991. Caractérisation comparée des constituants (polyosides, lignine et acides phénoliques) des parois cellulaires de trois graminées ; *Stipa tenacissima*, *Lygeum spartum* et *Aristida pungens*. Cellulose. Chem. Technol, 25: 11-17.
15. Redgwell, R.J. and R.R. Selvendran, 1986. Structural features of cell- wall polysaccharides of onion (*Allium cepa*). Carbohydr. Res., 157: 183-199.
16. Chanda, S.K., E.L. Hirst, J.K.N. Jones and E.G.V. Percivale, 1950. The construction of xylan from esparto grass (*Stipa tenacissima* L.). J. Chem. Soc., 50: 1289-1297.
17. Thibault, J.F., 1980. Les substances pectiques. In Les Polymères Végétaux : polymères pariétaux et alimentaires non azotés, Eds., Gauthier-Villars, Paris, pp: 233-251.
18. Lekchiri, S., M. Moueqqit and A. Lekchiri, 2006. Mise en évidence d'une activité cellulase chez *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* induite par une nouvelle forme d'hydrocellulose purifiée. In the Proceedings of the International Congress of Biochemistry, Agadir, Morocco, pp: 175-178.
19. Maouni, A., A. Lamarti, A. Douira and A. Badoc, 2001. Effet de dérivés calciques sur le développement de moisissures lors de la conservation des poires. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 140: 79-88.
20. Hassikou, R., K. Hassikou, T.A. Ouazzaoui and A. Douira, 2002. Effet in vitro et in vivo de quelques fongicides sur *Curvularia lunata*. Actes. Inst. Agron. Vet., 22: 205-213.
21. Amadioha, A.C., 2003. Evaluation of some plant extracts against *Colletotrichum lindemthianum* in cowpea. Acta. Phytopathol. Entomol. Hung., 38: 259-265.
22. Bowers, J.H. and J.C. Locke, 2000. Effect of botanical extracts on the population density of *Fusarium oxysporum* in soil and control of *Fusarium* wilt in the greenhouse. Plant. Dis., 84: 300-305.
23. Si Moussa, L., L. Belabid, A. Tadjeddine, M. Bellahcene and B. Bayaa, 2010. Effect of Some Botanical Extracts on the Population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*, the causal agent of bayoud disease in Algeria. Arab. J. Pl. Prot., 28: 71-79.
24. Parekh, J. and S. Chanda, 2008. Phytochemicals screening of some plants from western region of India. Plant. Arch, 8: 657-662.
25. Jasna, M., C. Brunet, G.S. Cetkovic, S.M. Djilas, V.T. Tumbas, T.S.S. Savatovic, A.I. Mandic, S.L. Markov and D.D. Cvetkovic, 2009. Radical scavenging and antimicrobial activity of horsetail (*Equisetum arvense* L.), extracts. Int. J. Food. Sci. Technol, 44: 269-278.
26. Shalini and R. Srivastava, 2009. Antifungal activity screening and HPLC analysis of crude extracts from *Tectona grandis*, *Shilajit*, *Valeriana wallachi*. Electronic. J. Environ. Agric. Food. Chem., 8: 218-229.

27. Cushnie, T.T.P. and A.J. Lamb, 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 26(5): 343-356.
28. Pavithra, P.S., N. Sreevidya and R.S. Verma, 2009. Antibacterial and antioxidant activity of methanolic extract of *Evolvulus nummularius*. *Indian. J. Pharmacol*, 41(5): 233-236.
29. Akroum, S., D. Bendjeddou, D. Satta and K. Lalaoui, 2009. Antibacterial activity and acute toxicity effects of flavonoids extracted from *Mentha longifolia*. *Am. Eurasian. J. Sci. Res.*, 4(2): 93-96.
30. Galeotti, F., E. Barile, P. Curir, M. Dolci and V. Lanzotti, 2008. Flavonoids from carnation (*Dianthus caryophyllus*) and their antifungal activity. *Phytochem. Lett.*, 1: 44-48.
31. Huang, J.W. and W.C. Chung, 2003. Management of vegetable crops diseases with plant extracts. *Adv. plant. Dis. Manag.*, 37: 153-163.
32. Balance, S., K.Y. Børsheim, K. Inngjerdigen, B.S. Paulsen and B.E. Christensen, 2007. Partial characterisation and reexamination of polysaccharides released by mild acid hydrolysis from the chlorite-treated leaves of *Sphagnum papillosum*. *Carbohydr. Polym*, 67(1): 104-115.
33. Painter, T.J., 1991. Lindow man, tollund man and other peat-bog bodies: the preservative and antimicrobial action of Sphagnum, a reactive glycuronoglycan with tanning and sequestering properties, *Carbohydr. Polymer*, 15(2): 123-142.
34. Abou-Deif, M.H., M.A. Rashed, M.A.A. Sallam, E.A.H. Mostafa and W.A. Ramadan, 2013. Characterization of Twenty Wheat Varieties by ISSR Markers, *Middle-East Journal of Scientific Research*, 15(2): 168-175.
35. Kabiru Jinjiri Ringim, 2013. Understanding of Account Holder in Conventional Bank Toward Islamic Banking Products, *Middle-East Journal of Scientific Research*, 15(2): 176-183.
36. Muhammad Azam, Sallahuddin Hassan and Khairuzzaman, 2013. Corruption, Workers Remittances, Fdi and Economic Growth in Five South and South East Asian Countries. A Panel Data Approach *Middle-East Journal of Scientific Research*, 15 (2): 184-190.