

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
المدرسة الوطنية العليا للفلاحة الحراش - الجزائر -
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (E.N.S.A.)
El-Harrach -Alger-

Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences
Agronomiques
Spécialité : Protection des végétaux

Thème

Etude du Spiroplasma des Agrumes :
Caractérisation Immuno-Enzymatique et Moléculaire
du Stubborn (*Spiroplasma citri*), Impact du Stubborn
sur la Qualité des Fruits et des Huiles Essentielles

Présentée par :

M^{me} BENZAOUZ KINZA Ep. KESBIA

Soutenue le 05/06/2021 devant le jury :

Président :	M ^r Benchabane A.	Professeur ENSA, El-Harrach, Alger
Directrice de thèse :	M ^{me} Belkahla H.	Professeur USDB1, Univ. Blida
Examineur :	M ^r Lehad A.	MCA ENSA, El-Harrach, Alger
Examineur :	M ^r Benchabane M.	Professeur USDB1, Univ. Blida
Examineur :	M ^r Ouelhadj A.	Professeur, Mouloud Mammeri, Univ. Tizi- Ouzou

Remerciements

Tout d'abord, je remercie Dieu qui m'a guidé sur le droit chemin tout au long de ce travail et m'a donné la volonté, le courage et surtout la patience pour arriver à le finaliser.

Je veux remercier particulièrement Ma directrice de thèse, **Madame Belkahla Hadjira** Professeur à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Blida1 d'avoir accepté de m'encadrer et de m'avoir donné la chance de bénéficier de ses connaissances scientifiques et ses conseils, je lui adresse également mes remerciements distingués de m'avoir consacré son temps précieux, pour ses critiques constructives, son enthousiasme et ses qualités personnelles et professionnelles. Qu'elle trouve ici l'expression de mon profond respect.

À, **Monsieur Mohamed El-Hattab**, Professeur à l'Université de Blida1, Faculté des sciences, Je vous remercie de m'avoir accueilli dans votre laboratoire et d'avoir laissé à ma disposition tout votre matériel d'extraction des huiles essentielles et d'analyses.

Je remercie infiniment **Madame Colette Saillard**, Professeur à l'Université de Bordeaux, France, de m'avoir permis d'intégrer le Laboratoire «Biologie du Fruit et Pathologie (BFP), INRA, Villenave d'Ornon, Bordeaux» que dieu lui accorde ses miséricordes et **Madame Marie-Pierre Dubrana**, de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Laboratoire des Mollicutes, Bordeaux-Aquitaine, France qui m'a suivi de près lors de mon séjour au laboratoire pour réaliser l'analyse moléculaire, ainsi que la culture, pour sa formidable gentillesse, sa disponibilité, ses conseils et son aide dans l'interprétation des résultats.

Mes sincères remerciements à **Monsieur le docteur Derrar Fawzi**, directeur général et responsable du Laboratoire grippe et virus respiratoires de l'Institut Pasteur d'Alger, d'avoir mis à notre disposition le matériel de son laboratoire de recherche, ainsi que son équipe de travail (Elaalia et Kahina) de leur soutien tout au long des périodes d'extraction que j'ai réalisé.

Je remercie également **Monsieur Mahmoud Rachid**, professeur à l'école militaire polytechnique de Bordj El Bahri, de m'avoir aidé dans la caractérisation des huiles essentielles par GC-MS.

Je remercie les membres de jury:

Monsieur Benchabane Ahmed Professeur à l'Ecole Nationale Supérieur Agronomique (ENSA) d'Alger, d'avoir aimablement accepté d'être le Président de cette thèse. Veuillez recevoir mes sincères remerciements.

Monsieur Lehad Arezki Maitre de Conférences A à l'Ecole Nationale Supérieur Agronomique (ENSA) d'Alger, d'avoir accepté de juger ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.

Mes sincères remerciements et mon profond respect à **Monsieur Benchabane Messaoud**, Professeur à l'université Sâad Dahled de Blida, d'avoir accepté de faire partie de ce jury et d'examiner le travail.

Ma profonde gratitude à **Monsieur Ouelhadj Akli**, Professeur à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, d'avoir jugé ce travail en tant qu'examineur.

Je présente aussi mes remerciements les plus distingués à tous les techniciens des laboratoires et mes collègues de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques.

Enfin, je suis très reconnaissante pour mes parents, qui m'ont soutenu toute au long de mes études et je remercie également mon mari Lounes de sa patience et son soutien, Ma fille Djoumana, mes frères et mes sœurs pour leur soutien incontestable, et tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin pour la réalisation de ce travail.

Study of *Citrus Spiroplasma*: Immuno-Enzymatic and Molecular Characterization of *Citrus* Stubborn (*Spiroplasma citri*) -Effect of Stubborn on the Quality of the Fruit and Essential Oils

Abstract

Spiroplasma citri, the causal agent of *Citrus* stubborn disease, is a phloem restricted pathogenic Mollicute and is transmitted by leafhoppers vectors. The stubborn has been a long-standing disease in the Northern part of Algeria. This study focuses on the identification of the *Spiroplasma citri*, by several diagnostic methods (serological, cultural and molecular), as well as the determination of the possible effects of the disease on the physico-chemical, chemical and biological qualities of the essential oils extracted from symptomatic trees fruits. Thereby, different varieties of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) showing typical symptoms of stubborn disease have been detected and collected from different orchards located in certain *Citrus* producing regions in Algeria such as Boumerdes, Blida and Tizi-Ouzou. The serological method (double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) showed positive results on varieties from the private orchard of Baghlia and the experimental agricultural station of Blida, indicating the presence of *Spiroplasma citri*. The method of culture in an artificial liquid medium SP4m revealed the presence of this pathogen on the Double fine variety of the private orchard of Baghlia. The molecular method (conventional PCR) using the SC1/SC1⁻ primer pairs, has shown the existence of DNA fragments identical to the positive control sample. Out of the 62 samples tested, 06 samples were positive for stubborn, from which three Washington navel samples, two Thomson samples, and one Tardive sample. Comparing the physico-chemical qualities of the essential oils extracted from both stubborn infected fruits and healthy fruits has indicated that they did not have the same properties. While the results of the chemical characterization by GC-MS of the two essential oils, showed the same main chemical compounds (octanal, β -phellandrene, d-limonene, 1 r- α pinene), but new toxic chemical compounds at low concentrations (<1%) appeared in the essential oil extracted from infected fruits (2-cyclohexene-1-ol, 2-methyl-5-(1-methylethenyl) -cis, decanal, trans-p-mentha-2, 8-dienol, 2-cyclohexene-1-ol, and 1-methyl-4- [1-methy- 4- (1-methylethyl)] - cis). Regarding biological qualities, the two essential oils have shown very interesting antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. However, they do not exert any antifungal activity against *Botrytis cinerea*. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the bacteria, that was sensitive to the essential oil extracted from infected and uninfected *Citrus sinensis* fruit samples, was 4 μ L and 32 μ L/mL respectively.

Key-words : *Spiroplasma citri*; *Citrus* stubborn disease ; PCR ; GC-MS; volatile oil.

دراسة سيروبلزما الحمضيات: تشخيص الفحص المصلي و الجزيني لمرض العناد (*Spiroplasma citri*)
تأثير مرض العناد على نوعية الفاكهة و الزيوت العطرية

ملخص

سيروبلزما سيتيري ، العامل المسبب لمرض العناد لدى الحمضيات ، هو من نوع الموليكوت . يعتبر عامل ممرض للنبات يقتصر على اللحاء وينتقل عن طريق الحشرات النطاطة. مرض العناد موجود منذ فترة طويلة في معظم شمال الجزائر. تركز هذه الدراسة على التعرف على سيروبلزما سيتيري (*Spiroplasma citri*) ، بعدة طرق تشخيصية (مصلية ، الزرع وجزئية) ، وكذلك تحديد الآثار المحتملة للمرض على الصفات الفيزيوكيميائية، الكيميائية والبيولوجية للزيوت الأساسية المستخلصة من ثمار الأشجار المصحوبة بالأعراض. لهذا، تم اكتشاف أنواع مختلفة من البرتقال الطلو (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) ، والتي تظهر أعراضًا نموذجية لمرض الستوبورن ، و تم جمعها من بساتين مختلفة تقع في بعض مناطق زراعة الحمضيات في الجزائر كبومرداس، البليدة وتيزي وزو. تقنية الفحص المناعي (DAS-ELISA) ذات الجسم المضاد المزدوج المرتبط بالإنزيم (DAS-ELISA) أظهرت نتائج إيجابية على بعض العينات للبستان الخاص ببغلية و المحطة التجريبية للفلاحة بالبليدة، مما يؤكد وجود *S. citri*. تقنية الزراعة في وسط سائل صناعي SP4m أظهرت وجود هذا العامل الممرض على صنف Double fine للبستان الخاص ببغلية. تقنية PCR التقليدية، باستخدام الزوج SC1 / SC1⁻، أظهرت وجود قطع DNA مطابقة للعينات المستخدمة كعنصر إيجابي. من بين 62 عينة تم اختبارها بواسطة تفاعل البوليميراز المتسلسل ، اكتشفنا 06 حالات إيجابية من العناد ، بما في ذلك ثلاث عينات من Wachington navel ، وعينتان من Thomson ، وعينة من Tardive. مقارنة الخصائص الفيزيوكيميائية، للزيوت العطرية المستخرجة من ثمار الأشجار المصحوبة بأعراض العناد وغير المصحوبة بالأعراض أظهرت أنه ليس لديهم نفس الخصائص. بينما نتائج التشخيص الكيميائي بواسطة تقنية GC-MS للزيوت العطرية أظهرت نفس المركبات الكيميائية الرئيسية (octanal ، β-phellandrene ، d-limonène ، 1r-α pinène). لكن مركبات كيميائية جديدة سامة، بتركيزات منخفضة >1٪. اكتشفت في الزيوت العطرية المستخرجة من ثمار الأشجار المصابة بالمرض :

(2-Cyclohexène-1-ol,2-méthyl-5-(1-méthyléthényl)-cis ; décanal ; 2-cyclohexène-1-ol;
(trans-p-mentha-2,8- dienol). فيما يتعلق بالصفات البيولوجية ، أظهر الزيتان العطريان نشاطًا مضادًا للبكتيريا مثيّرًا للاهتمام ضد: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 و *Escherichia coli* ATCC 25922 و *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. إلا أنه لم يمارسوا أي نشاط مضاد للفطريات مثل *Botrytis cinerea*. كان الحد الأدنى للتركيز المثبط (MIC) للبكتيريا التي كانت حساسة للزيت العطري المستخرج من عينات فواكه *C. sinensis* المصابة و غير المصابة 4 ميكرو لتر و 32 ميكرو لتر / مل على التوالي.

الكلمات الدالة: *Spiroplasma citri*, مرض العناد على الحمضيات, GC-MS,PCR, زيوت عطرية.

Etude du Spiroplasma des Agrumes : Caractérisation Immuno-Enzymatique et Moléculaire du Stubborn (*Spiroplasma citri*) des Agrumes-Impact du Stubborn sur la Qualité du Fruit et des Huiles Essentielles

Résumé

Spiroplasma citri, l'agent causal de la maladie du stubborn des agrumes, est un Mollicute pathogène des plantes, limité aux tubes criblés du phloème, et transmis par des cicadelles vectrices. Le stubborn existe depuis longtemps dans la majeure partie du Nord de l'Algérie. Cette étude porte sur l'identification de *Spiroplasma citri*, par plusieurs méthodes de diagnostic (sérologique, culture et moléculaire), ainsi que la détermination des éventuels effets de la maladie sur les qualités physico-chimiques, chimiques et biologiques des huiles essentielles extraites de fruits d'arbres symptomatiques. De ce fait, différentes variétés d'oranges douces (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), présentant des symptômes typiques de la maladie du stubborn, ont été dépistés et prélevés dans différents vergers situés dans certaines régions productrices d'agrumes en Algérie tels que Boumerdes, Blida et Tizi-Ouzou. La méthode sérologique (double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) a exhibé des résultats positifs sur des variétés du verger privé de Baghlia et de la station expérimentale d'agronomie de Blida, indiquant la présence de *Spiroplasma citri*. La méthode de culture dans un milieu liquide artificiel SP4m a révélé la présence de cet agent pathogène sur la variété Double fine du verger privé de Baghlia. La méthode moléculaire (PCR classique) utilisant la paire d'amorces SC1/SC1⁻ a montré l'existence de fragments d'ADN identiques à celui de l'échantillon utilisé comme témoin positif. Sur 62 échantillons testés, nous avons détecté 06 cas positifs du stubborn, dont trois échantillons de Washington navel, deux échantillons de Thomson, et un échantillon de Tardive. La comparaison des qualités physico-chimiques des huiles essentielles extraites à la fois de fruits infectés par la maladie du stubborn et de fruits sains a indiqué qu'ils n'avaient pas les mêmes propriétés. Alors que les résultats de la caractérisation chimique par la GC-MS des deux huiles essentielles, ont montré les mêmes composés chimiques principales (octanal, β -phellandrène, d-limonène, 1 r- α pinène), mais de nouveaux composés chimiques toxiques à de faibles concentrations (<1%) sont apparues dans l'huile essentielle extraite des fruits infectés (2-cyclohexène-1-ol, 2-méthyl-5- (1-méthyléthényl) -cis, décanal, trans-p-mentha-2, 8-diéno, 2-cyclohexène-1-ol et, 1-méthyl-4- [1-méthyl- 4- (1-méthyléthyl)] - cis). Concernant les qualités biologiques, les deux huiles essentielles ont montré une activité antibactérienne très intéressante contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Cependant, ils n'exercent aucune activité antifongique contre *Botrytis cinerea*. La concentration minimale inhibitrice (CMI) de la bactérie qui était sensible à l'huile essentielle extraite des échantillons de fruits de *Citrus sinensis* infectés et non infectés, était de 4 μ L et 32 μ L/mL, respectivement.

Mots-clés : *Spiroplasma citri*; stubborn des agrumes; PCR ; GC-MS ; huile essentielle.

Liste des abréviations

Liste des abréviations

AAP :	Acholeplasmataceae, Anaeroplasmataceae, Phytoplasma
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ARNr 16S :	ARN ribosomique 16S
AX :	Amoxicilline
BFP :	Biologie de Fruit et Pathologie
BHIB :	Bouillon Brain Heart Infusion
CEVd :	<i>Citrus Exocortis Viroïd</i> (viroïde de l'exocortis des agrumes)
CGD :	Concave gum disease (virus de la Concavité gommose)
GC-MS :	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
CiTLV :	<i>Citrus Tatter Leaf Virus</i>
CPsV :	<i>Citrus Psorosis Virus</i> (virus de la psorose des agrumes)
CIVV :	<i>Citrus Infectious Variegation Virus</i> (virus de la Panachure infectieuse des agrumes)
CMB :	Concentration Minimale Bactéricide
CMI :	Concentration Minimale Inhibitrice
CSD :	<i>Citrus Stubborn Disease</i>
CTAB :	Bromure de cétyltriméthyl- ammonium
CTV :	<i>Citrus Tristeza Virus</i> (virus de la tristeza des agrumes)
CVC :	<i>Citrus Variegated Chlorosis</i>
CYMV :	<i>Citrus Yellow Mosaique Virus</i>
DAS-ELISA :	Double Anti Body Sandwich- Enzyme Linked Immunosorbent Assay
DMSO :	Diméthyl Sulfoxyde
dNTP :	Désoxy Nucléotide Triphosphate
ELISA :	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Dosage immuno-enzymatique)
FOX :	Céfoxitine
GHz	Gigahertz
HLB:	Greening ou Huanglongbing
INRAA :	Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie
IC-PCR :	Immunocapture-Réaction en chaîne de polymérase
IgG :	Immuno-globulines G
IgGs :	Immunoglobuline

Liste des abréviations

LPS :	Lipopolysaccharidique
MHz	Mégahertz
MLO :	Mycoplasma Like Organisms
PBS-PVP-T :	Phosphate buffered saline contenant le polyvinylpyrrolidone
PCR :	Réaction en chaîne de polymérase
PNPP :	Paranitra-phenyl phosphate
PPAM :	Plantes à Parfums Aromatiques et Médicinales
PsA :	Psorose A
PsB :	Psorose B
SDV:	<i>Satsuma Dwarf Virus</i>
SEM :	Spiroplasmataceae, Entomoplasmataceae, Mycoplasmataceae
SP4m :	Milieu spécifique aux spiroplasmes N° 4 modifié
TBE :	Tris/Borate/EDTA
UFC/mL :	Unité Formant Colonies /millilitre
UGA :	Codon stop (uracile_Guanine_Arginine)

Liste des Figures

Liste des Figures

Figure 1 :	Principaux pays producteurs d'agrumes dans le monde.....	04
Figure 2 :	Classification des agrumes et origine génétique des <i>Citrus</i> cultivés	05
Figure 3 :	Coupe transversale d'une orange	09
Figure 4 :	Planches illustratives de <i>Citrus sinensis</i> (oranger doux)	10
Figure 5 :	Production mondiale d'agrumes en 2018 par région en milliers de tonnes.....	14
Figure 6 :	Évolution de la production d'agrumes en Algérie entre 2016 et 2017, par type d'agrumes (en milliers de quintaux).....	16
Figure 7 :	Symptômes d'une infection par <i>Citrus Tristeza Virus (CTV)</i>	21
Figure 8 :	Symptômes d'une infection par <i>Citrus Tristeza Virus (CTV)</i>	21
Figure 9 :	Symptômes de psorose sur arbre infecté	23
Figure 10 :	Symptômes associés à la panachure infectieuse sur agrumes	25
Figure 11 :	Symptôme de cristicortis sur mandarinier greffé sur bigaradier	27
Figure 12 :	Symptômes d'impetratura sur fruits	28
Figure 13 :	Symptômes caractéristiques de la concavité gommeuse	29
Figure 14 :	Symptômes d'exfoliation d'écorce induits par <i>Citrus Exocortis Viroïd (CEVd)</i> sur <i>P. trifoliata</i>	30
Figure 15 :	Symptômes de Cachexie induit par <i>CCaVd</i> : Production intense de gommose sur le tronc de mandarinier Parson's special.....	30
Figure 16 :	Symptômes du greening	32
Figure 17 :	Arbre phylogénétique des Mollicutes.....	37
Figure 18 :	Symptômes du stubborn (INRA, Bordeaux).....	41
Figure 19 :	Symptômes du stubborn	41
Figure 20 :	Symptômes du stubborn (Algérie).....	42
Figure 21 :	Particule de <i>Spiroplasma citri</i> observée au microscope électronique...	43
Figure 22 :	Culture de <i>S. citri</i>	44

Liste des Figures

Figure 23 :	Photographies des insectes vecteurs de <i>S. citri</i>	46
Figure 24 :	Cycle circulant-multipliant-persistant de <i>S. citri</i> dans son insecte vecteur <i>C. haematoceps</i>	47
Figure 25 :	<i>Salsola kali</i> , principale plante hôte des cicadelles vectrices de <i>S. citri</i> (Syrie)	50
Figure 26 :	Symptômes du stubborn sur la pervenche (<i>Catharanthus roseus</i>).....	50
Figure 27 :	Huiles essentielles, oléorésines et résinoïdes exportées	59
Figure 28 :	Aromatogramme sur boîte de Pétri à diffusion linéaire à partir d'un disque imprégné d'huile essentielle.....	88
Figure 29:	Symptômes du stubborn sur Double fine (Verger privé de Baghlia).....	91
Figure 30 :	Symptômes du stubborn sur Double fine (Verger privé de Baghlia)...	91
Figure 31 :	Symptômes du stubborn sur Double fine (Verger privé de Baghlia).....	91
Figure 32 :	Symptômes du stubborn sur Thomson (Verger privée de Baghlia).....	92
Figure 33 :	Symptômes de chloroses foliaires sur la variété Jaffa.....	92
Figure 34:	Symptômes du stubborn sur Valencia Laté (Verger privé de Baghlia)..	92
Figure 35 :	Coupe sur fruit d'oranger (<i>Citrus sinensis</i>).....	93
Figure 36 :	Coupe sur fruit d'oranger (<i>Citrus sinensis</i>) Var. Washington navel avec columelle courbée et graines avortés.....	93
Figure 37 :	Dissymétrie de la nervure principale sur Washington navel (Verger privé d'Oued Aissi).....	94
Figure 38 :	Feuilles petits en forme de cœur sur Washington navel (Verger privé d'Oued Aissi).....	94
Figure 39 :	Prolifération des bourgeons axillaires (Balai de sorcière) sur Washington navel (Verger privé d'Oued Aissi).....	94
Figure 40 :	Chloroses foliaires sur Thomson (St. Exp. d'Agr. de l'Univ. Blida).....	95
Figure 41 :	Taux d'infection de la maladie dans la région de Baghlia.....	97
Figure 42 :	Taux d'infection de la maladie dans la St. Exp. d'Agr. de Blida.....	97
Figure 43 :	Taux d'infection de la maladie par station.....	98

Liste des Figures

Figure 44 :	<i>Salsola kali</i> , observée sur champ à Baghlia.....	100
Figure 45 :	Résultats de la culture de <i>S. citri</i>	101
Figure 46:	Profil électrophorétique obtenu sur gel d'agarose 1,2% d'un test PCR pour la détection de <i>S. citri</i> utilisant des amorces spécifiques.....	103
Figure 47 :	Profil électrophorétique obtenu sur gel d'agarose 1,2% d'un test PCR pour la détection de <i>S. citri</i> utilisant des amorces spécifiques.	104
Figure 48 :	Profil électrophorétique obtenu sur gel d'agarose 1,2% d'un test PCR pour la détection de <i>S. citri</i> utilisant des amorces spécifiques.	104

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau I :	Taxonomie et caractéristiques des genres de la classe des Mollicutes..	35
Tableau II :	Les types d'huiles essentielles produits dans la famille des Rutaceae ..	53
Tableau III :	Exemples de plantes utilisées en médecine traditionnelles en Algérie	57
Tableau IV :	Valeurs des exportations des huiles essentielles et autres	58
Tableau V :	Préparation du mix 2X.....	72
Tableau VI :	Paire d'amorce utilisée pour la PCR.....	74
Tableau VII :	Valeurs des dilutions utilisées pour déterminer les CMI d'HE.....	89
Tableau VIII :	Caractères morphologiques et biochimiques des bactéries testées.....	107
Tableau IX:	Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de <i>Citrus sinensis</i>	108
Tableau X:	Composés chimiques en pourcentage des deux huiles essentielles extraites de fruits d'oranges saines et infectés avec le stubborn.	109
Tableau XI:	Diamètres d'inhibition (mm) observés sous l'effet des deux huiles essentielles d'oranges extraites (n=3).....	110

Table des matières

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale..... 01

Première partie: Données bibliographiques

Chapitre I : Généralités sur les agrumes..... 04

I.1. Origine des agrumes, leur évolution et la naissance des espèces cultivées..... 04

I.2. Diffusion des agrumes à travers le monde..... 06

I.3. Description botanique des agrumes..... 06

I.4. Classification botanique..... 07

I.5. Description morphologique..... 07

I.5.1. Feuilles et fruits..... 08

I.5.2. Système racinaire..... 09

I.5.3. Système aérien..... 09

I.5.3.1. Feuille..... 09

I.5.3.2. Fleurs 10

I.5.3.3. Tronc et branches..... 10

I.6. Développement phénologique..... 11

I.7. Cycle végétatif annuel..... 11

I.8. Exigences pédoclimatiques 11

Chapitre II : Les agrumes dans le monde et en région méditerranéenne..... 13

II.1. Importance économique de la filière agrumicole..... 13

II.1.1. Importance mondiale..... 13

II.1.2. Zones géographiques majeures de production d'agrumes..... 14

Table des matières

II.2. Situation de l'agrumiculture en Algérie.....	15
II.3. Transformation des agrumes.....	17
II.3.1. Coproduits de la transformation des agrumes.....	18
Chapitre III : Principales maladies transmissibles par greffage des agrumes.....	19
III.1. Maladies virales.....	19
III.1.1. <i>Citrus Tristeza Virus</i>	19
III.1.2. Psorose écaillée « <i>Citrus Psorosis Virus: CPsV</i> ».....	21
III.1.3. Panachure infectieuse « <i>Citrus Infectious Variegation Virus: CIVV</i> ».....	24
III.1.4. <i>Citrus Tatter Leaf Virus (CiTLV)</i>	26
III.1.5. <i>Satsuma Dwarf Virus (SDV)</i>	26
III.1.6. Maladies à oak leaf pattern «Feuille de chêne».....	27
III.1.6.1. Cristacortis.....	27
III.1.6.2. Impietratura.....	28
III.1.6.3. Maladie de concavité gommose (Concave gum disease) « CGD ».....	29
III.2. Viroïdes des agrumes.....	29
III.2.1. <i>Citrus Exocortis Viroid (CEVd)</i>	30
III.2.2. Cachexie.....	30
III.3. Procaryotes limités au phloème.....	31
III.3.1. Greening ou Huanglongbing (HLB).....	31
III.3.2. Stubborn disease.....	32
Chapitre IV : Etude de <i>Spiroplasma citri</i>.....	33
IV.1. Mollicutes.....	33
IV.1.1. Taxonomie.....	33
IV.1.2. Origine Eubactérienne des Mollicutes	36
IV.1.3. Phylogénie.....	36
IV.1.4. Mollicutes phytopathogènes.....	38
IV.2. Spiroplasmes phytopathogènes.....	38
IV.2.1. <i>Spiroplasma phoeniceum</i> et <i>Spiroplasma kunkelii</i>	38
IV.2.2. <i>Spiroplasma citri</i>	39
IV.2.2.1. Maladie du stubborn des agrumes et découverte de <i>Spiroplasma citri</i>	39
IV.2.2.2. Répartition géographique du stubborn.....	39
IV.2.2.3. Incidence économique.....	40

Table des matières

IV.2.2.4. Symptômes de la maladie du stubborn.....	40
IV.2.2.5. Caractéristiques de <i>Spiroplasma citri</i>	42
IV.2.2.6. Classification de <i>Spiroplasma citri</i>	44
IV.2.2.7. Caractéristiques sérologiques.....	44
IV.2.2.8. Biologie moléculaire de <i>Spiroplasma citri</i>	45
IV.2.2.9. Déterminants génétiques de la transmission de <i>Spiroplasma citri</i>	45
IV.2.2.10. Transmission de <i>Spiroplasma citri</i>	46
IV.2.2.11. Cycle de <i>Spiroplasma citri</i> dans l'insecte.....	46
IV.2.2.12. Rôle du métabolisme des sucres dans la phytopathogénie.....	47
IV.2.2.13. Interaction <i>Spiroplasma citri</i> –Insecte vecteur.....	48
IV.2.2.14. Barrière intestinale/glandes salivaires.....	48
IV.2.2.15. Interaction protéine spiraline- Protéine des glandes salivaires.....	49
IV.2.3. Plantes hôtes de <i>Spiroplasma citri</i>	49
IV.2.4. Plantes hôtes des cicadelles vecteurs <i>Circulifer tenellus</i> et <i>Neoliturus haematoceps</i>	49
IV.2.5. Distribution géographique de deux principaux vecteurs de <i>Spiroplasma citri</i>	50
Chapitre V : Etude des huiles essentielles	51
V.1. Définitions.....	52
V.2. Huiles essentielles et essences.....	52
V.2.1. Composition des huiles essentielles et des essences d'agrumes.....	53
V.2.2. Localisation et rôles des huiles essentielles chez les végétaux	54
V.2.3. Domaines d'utilisation des huiles essentielles.....	55
V.2.4. Toxicité des huiles essentielles.....	55
V.3. Filière des huiles essentielles en Algérie.....	56
V.3.1. Commercialisation des huiles essentielles en Algérie.....	57

Deuxième Partie : Matériel et Méthodes

Chapitre I: Détection sérologique de <i>Spiroplasma citri</i>	60
I.1. Matériel.....	60
I.1.1. Matériel végétal.....	60
I.1.1.1. Prospections sur terrains.....	60

Table des matières

I.1.1.2. Présentation de la région d'étude.....	61
I.1.2. Matériel de laboratoire.....	62
I.1.2.1. Solutions tampon.....	62
I.2. Méthodes.....	63
I.2.1. Etude symptomatologique.....	63
I.2.2. Méthode d'échantillonnage.....	64
I.2.3. Conservation de la source d'inoculum.....	64
I.2.4. Sérodétection de <i>Spiroplasma citri</i>	64
I.2.4.1. Principe du test ELISA.....	65
I.2.4.2. Calcul du taux d'infection.....	67
Chapitre II : Culture de <i>Spiroplasma citri</i> en milieu SP4 modifié (SP4m).....	68
II.1. Matériel.....	68
II.1.1. Echantillonnage.....	68
II.2. Méthodes.....	68
II.2.1. Préparation du milieu SP4m	68
II.2.2. Mise en culture des spiroplasmes à partir des nervures de feuilles d'agrumes	69
Chapitre III : Caractérisation moléculaire de <i>Spiroplasma citri</i>.....	70
III.1. Matériel.....	70
III.1.1. Stations prospectées.....	70
III.1.2. Matériel de laboratoire.....	70
III.1.3. Echantillonnage.....	71
III.2. Méthodes.....	71
III.2.1. Préparation du Tampon d'Extraction au CTAB.....	71
III.2.2. Préparation de la solution stock dNTP 5mM.....	72
III.2.3. Préparation des gels – 1,5% agarose – Appareil Mupid.....	72
III.2.4. Extraction d'ADN pour la PCR	73
III.2.5. Amplification des séquences.....	73

Table des matières

Chapitre IV : Impact du stubborn sur la qualité des fruits et des huiles essentielles.....	75
IV.1. Matériel.....	75
IV.1.1. Matériel végétal.....	75
IV.1.2. Matériel biologique.....	76
IV.1.2.1. Microorganismes testés.....	76
IV.1.3. Matériel de laboratoire.....	78
IV.2. Méthodes.....	78
IV.2.1. Préparation des échantillons.....	78
IV.2.2. Extraction des huiles essentielles par hydro distillation.....	78
IV.2.2.1. Principe.....	78
IV.2.2.2. Protocole expérimental d'extraction.....	79
IV.2.3. Détermination des indices physico-chimiques	79
IV.2.3.1. Détermination des indices physique.....	79
IV.2.3.1.1. Détermination du rendement en huile essentielle.....	79
IV.2.3.1.2. Mesure de la densité.....	80
IV.2.3.1.3. Mesure de l'indice de réfraction.....	81
IV.2.3.2. Détermination des indices chimiques.....	81
IV.2.3.2.1. Indice d'acide.....	82
IV.2.3.2.2. Indice de saponification.....	82
IV.2.3.2.3. Indice d'ester.....	84
IV.2.4. Analyse chromatographique des huiles essentielles	84
IV.2.5. Activité antimicrobienne.....	84
IV.2.5.1. Tests de vérification des souches bactériennes.....	85
IV.2.5.1.1. Tests microbiologiques	85
IV.2.5.1.2. Tests biochimiques.....	86
IV.2.5.2. Préparation de l'inoculum.....	87
IV.2.5.2.1. Préparation de pré-culture	87
IV.2.5.2.2. Préparation de la suspension bactérienne.....	87
IV.2.5.3. Activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	87
IV.2.5.3.1. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).....	88
IV.2.5.3.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB).....	89

Table des matières

Troisième Partie : Résultats et Discussion

Chapitre I : Résultats de la détection sérologique de <i>Spiroplasma citri</i>	90
I.1. Diagnostic symptomatologique du stubborn.....	90
I.1.1. Prospections sur terrains.....	90
I.1.1.1. Symptômes du stubborn sur les différentes stations prospectées durant cette étude	90
I.2. Résultats de la sérodétection.....	96
Chapitre II: Résultats de la détection de <i>Spiroplasma citri</i> par culture	101
Chapitre III : Résultats de la détection moléculaire de <i>Spiroplasma citri</i>	103
III.1. Résultats de la PCR.....	103
Chapitre IV: Résultats de l'impact du stubborn sur la qualité des fruits et des huiles essentielles	107
IV.1. Détermination des caractères morphologiques et biochimiques des bactéries testées.....	107
IV.2. Détermination des indices physico-chimiques.....	107
IV.3. Composition chimique des huiles essentielles.....	108
IV.4. Résultats de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	110
Conclusion et perspectives	114
Références bibliographiques	117
Annexes	

Introduction générale

Introduction générale

Les *Citrus* représentent la culture fruitière la plus importante dans le monde de point de vue économique (Tadeo *et al.*, 2008).

Plusieurs études épidémiologiques ont démontré que la consommation des agrumes serait reliée à la prévention de certaines maladies cancéreuses du tube digestif et des maladies cardiovasculaires due à l'effet de plusieurs composants tels que la vitamine C, les caroténoïdes, les flavonoïdes et les limonoïdes (Dhuique-Mayer, 2007). Ainsi, les écorces d'orange constituent un gisement riche en ingrédients nutritionnels (eau, protéines, sucres et minéraux) et en ingrédients fonctionnels (huiles essentielles, fibres, caroténoïdes, vitamine C, composés phénoliques). Toutefois, la voie de la valorisation industrielle la plus répandue demeure l'extraction des essences et des huiles essentielles qui peuvent être utilisées comme une alternative aux fongicides synthétiques (Ververis *et al.*, 2007; Virot *et al.*, 2008; Chutia *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2010).

Les agrumes sont cultivés dans plus de 140 pays à travers le monde (Peña *et al.*, 2007). Ils sont cultivés dans la plupart des régions tropicales et subtropicales (Agustí *et al.*, 2014). Ils ont atteint une superficie de 8,5 millions d'hectares (FAO, 2018). Ces superficies ont connu une progression continue dans les 140 pays producteurs à travers le monde, 70% de ces derniers sont localisés dans l'hémisphère nord dont 20 % dans la région méditerranéenne. L'Algérie détient une collection variétale composée de 256 variétés d'agrumes, ce qui représente un patrimoine génétique inestimable (Larbi *et al.*, 2009). Le verger agrumicole algérien se localise essentiellement dans les plaines irrigables en raison de l'exigence en eau et en qualité de sol. Il s'étend sur une superficie de 70.503 ha (MADRP, 2019).

Cependant, ce patrimoine arboricole a connu une réduction de son potentiel productif suite à la détérioration de son état physiologique et phytosanitaire dû essentiellement au vieillissement des arbres, au manque de sélection variétale et clonale et à l'emploi de matériel végétal non sélectionné atteint de maladies de dégénérescence transmissibles par greffage tels que la Tristeza (*CTV*), l'exocortis (*CEVd*), les psoroses (*CPsV*), la gommose parasitaire (*Phytophthora citrophthora* et *Phytophthora parasitica*) et enfin le stubborn (*Spiroplasma citri*) (Bové, 1995).

Introduction générale

Spiroplasma citri est une bactérie phytopathogène appartenant à la classe des Mollicutes, un groupe de microorganismes phylogénétiquement liés à des bactéries Gram-positives à faible teneur en G-C (Weisburg *et al.*, 1989), limitées aux tubes criblés du phloème et sont transmises par des cicadelles vecteurs (Renaudin, 2006). Elle est l'agent responsable du stubborn des agrumes (Saglio *et al.*, 1973), répertoriée comme organisme de quarantaine en Europe et dans d'autres parties du monde (Loiseau *et al.*, 2019). Cette maladie est à l'origine de perturbations dans le développement de la plante entraînant le jaunissement et la chlorose des feuilles, la prolifération des bourgeons axillaires en balais de sorcière, la réduction de la taille de l'arbre et la diminution de la taille du fruit causant des pertes de rendement (Laflèche and Bové, 1970).

A cet égard, différents techniques de diagnostic ont été appliquées dans l'objectif de déterminer l'état sanitaire vis-à-vis de la maladie du stubborn (*Spiroplasma citri*) de certains vergers agrumicoles situés dans la partie Nord du pays, ainsi que la détermination de l'effet de cette maladie ou ce pathogène sur la qualité des fruits et des huiles essentielles.

La première partie de ce manuscrit a été consacrée à une analyse bibliographique en cinq chapitres regroupant les différents thèmes de cette étude. Le premier chapitre est consacré pour les généralités sur les agrumes, Le deuxième chapitre met l'accent sur l'importance de l'agrumiculture en tant qu'une des principales activités agro-économiques du pays. Un aperçu sur les voies de valorisation des sous-produits d'agrumes est présenté aussi dans ce chapitre. Le troisième chapitre présente les principales maladies les plus préjudiciables affectants cette culture. Le quatrième chapitre a été réservé pour l'étude de l'agent pathogène responsable de la maladie du stubborn (*Spiroplasma citri*), et le dernier chapitre présente les huiles essentielles et leur importance en Algérie.

La deuxième partie de ce manuscrit porte sur la méthodologie expérimentale adoptée dans ce travail. elle est composé de 04 chapitres : dans le premier chapitre les essais ont porté sur la détection de *S. citri* par la technique ELISA, le deuxième chapitre a porté sur la détection par culture sur milieu liquide, le troisième chapitre porte sur la détection par PCR, et dans le quatrième chapitre nous nous somme intéressé à la mise en évidence de l'effet de ce pathogène sur la qualité des fruits et des huiles essentielles extraite par hydrodistillation par

Introduction générale

leur caractérisation physicochimique, biologique et biochimique par la technique de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

L'ensemble de ses résultats et leurs interprétations ont fait l'objet de la troisième partie de la thèse qui comporte quatre chapitres. Le premier chapitre a été consacré aux résultats de la DAS-ELISA suivie par le chapitre décrivant les résultats de la culture, puis le chapitre résultats de la PCR, et enfin le quatrième chapitre portant sur les résultats de la caractérisation physico-chimique et biologique des huiles essentielles extraite de fruits malades et de fruits sains. Cette partie a fait l'objet d'une publication scientifique internationale dans le journal « International Journal of Fruit Science ».

Finalement, l'ensemble de ce travail est clôturé par une conclusion générale avec des perspectives de recherche envisageables.

Première partie
Données Bibliographiques

Chapitre I. Généralités sur les agrumes

I.1. Origine des agrumes, leur évolution et la naissance des espèces cultivées

Le mot agrumes provient du latin *acrumen* (aigre) qui désigne des arbres à fruits acides (Khan *et al.*, 2010 ; Ladaniya, 2008). Les agrumes sont en principe cultivés autour de l'équateur, du 40° Nord au 40° Sud (Figure 1). On les rencontre dans les climats de type méditerranéen (Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996).

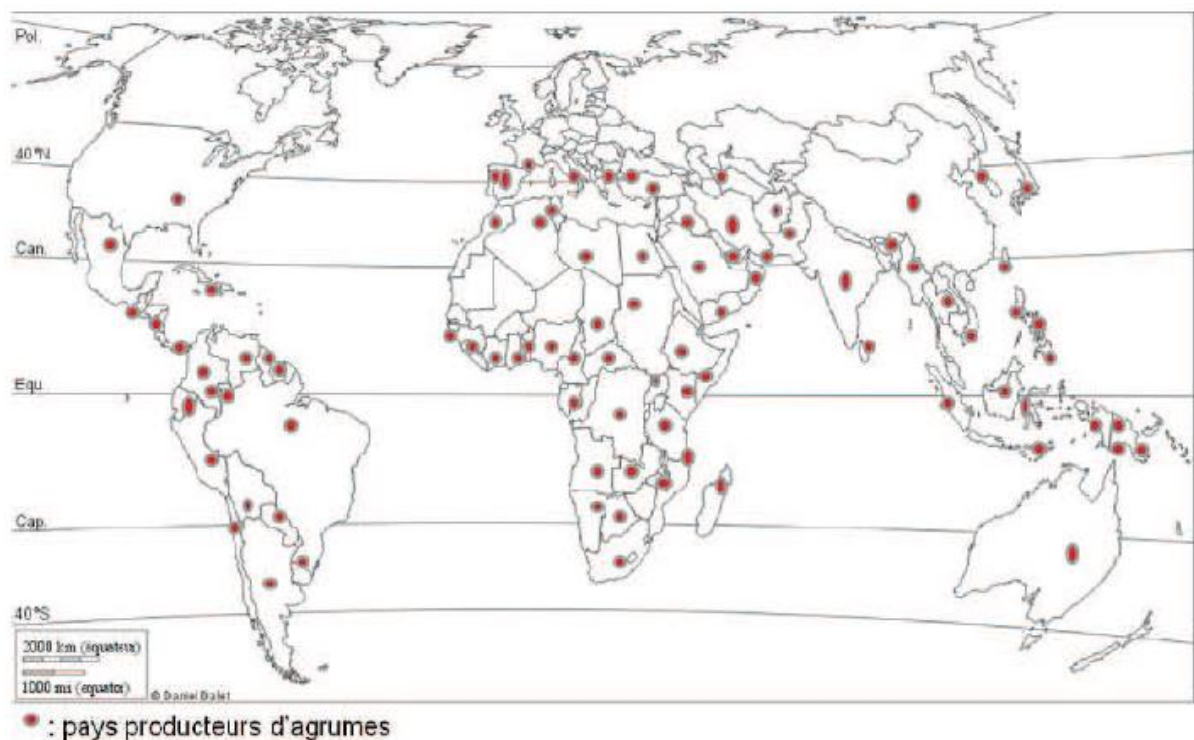


Figure 1 : Principaux pays producteurs d'agrumes dans le monde (Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996).

Parmi les six genres botaniques de la famille des Rutacées représentant les agrumes, les plus connus sont originaires du Sud-Est Asiatique: *Citrus*, *Fortunella* et *Poncirus*. Les agrumes des genres *Poncirus* et *Fortunella* sont originaires des zones septentrionales de l'Est de la Chine, tandis que ceux du genre *Citrus* ont une origine méridionale entre l'Inde et l'Indonésie.

La diversité du genre *Citrus* se concentre sur quatre entités taxonomiques à l'origine de la grande majorité des espèces cultivées : *Citrus maxima* (les pamplemoussiers), *C. reticulata* (les mandariniers), *C. medica* (les cédratiers) et les papedas, regroupant plusieurs espèces. Les trois premières, qualifiées d'espèces ancestrales, ont évolué séparément dans trois zones géographiques distinctes (respectivement l'archipel Malaisien, le Sud de la Chine et le Nord-Est de l'Inde). C'est lors de cette phase d'évolution séparée que les trois espèces ont acquis des caractéristiques spécifiques comme la taille et la couleur du fruit, la reproduction asexuée, la résistance à des contraintes environnementales et même la taille du génome (18 chromosomes). Plus tardivement dans l'évolution, des croisements sexués se sont produits dans les zones mixtes de peuplement et des formes hybrides interspécifiques, sont apparues : l'oranger (*C. sinensis*) et le bigaradier (*C. aurantium*), produits de croisements entre pamplemoussiers et mandariniers, le citronnier (*C. limon*), hybride de cédratier et de bigaradier et le limettier (*C. aurantifolia*) produit d'un croisement entre un papeda (*C. micrantha*) et un cédratier (Figure 2) (Luro, 2015).

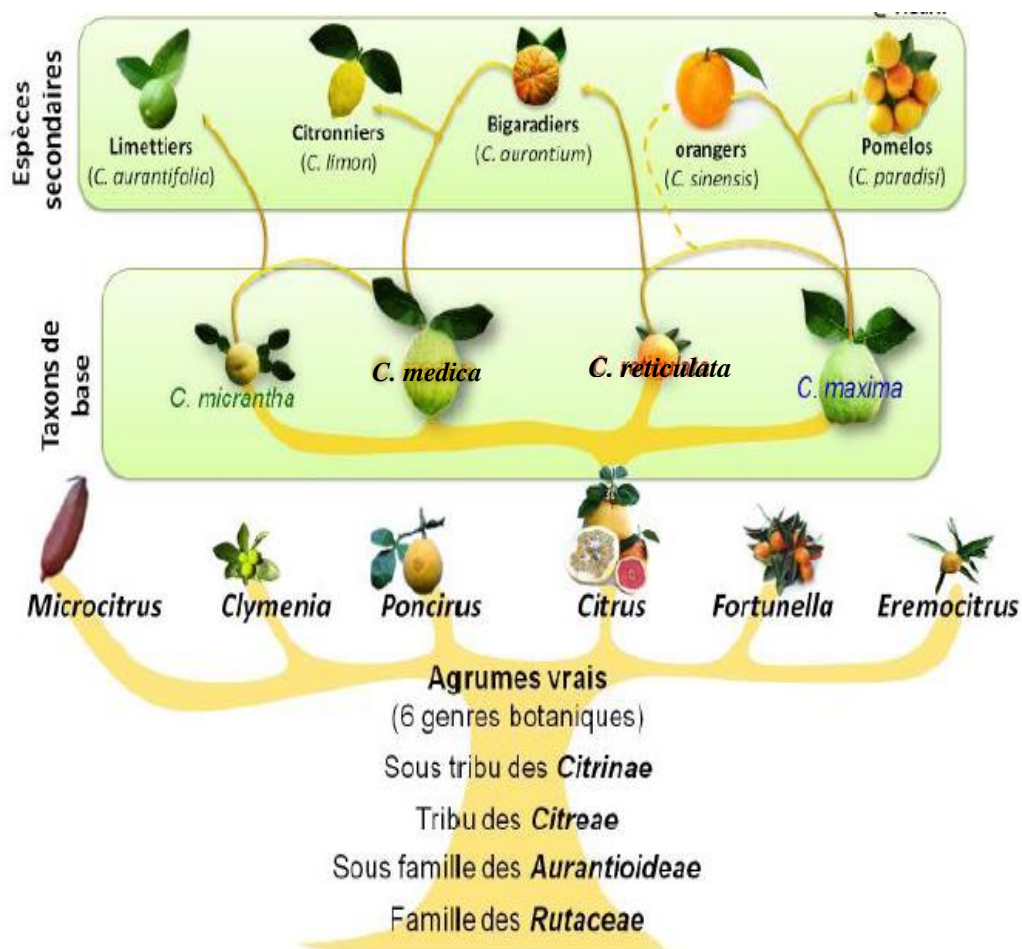


Figure 2 : Classification des agrumes et origine génétique des *Citrus* cultivés (Ollitrault *et al.*, 1999)

I.2. Diffusion des agrumes à travers le monde

La domestication et la culture des agrumes se sont développées en Asie dans l'aire d'origine de ces arbres. La première grande migration des agrumes a eu lieu au premier millénaire avant notre ère, en direction de l'Ouest, vers la Mésopotamie. De là, ils atteignirent les rivages de la Méditerranée, l'Égypte et la Grèce entre le VIII^{ième} et le IV^{ième} siècle av. JC. Théophraste, botaniste contemporain d'Alexandre le Grand, fit une description détaillée de l'agrumes que l'on nomme aujourd'hui cédratier (appelé dans l'ancien temps par les grecs « Pomme de Médie »). Les restes archéologiques sont très rares et quelques fresques murales découvertes à Pompéi représentent des agrumes portant des fruits ressemblant aux citrons et cédrats. Le cédratier a probablement été présent dans tout le pourtour méditerranéen avant le début de notre ère. On attribue l'introduction en Méditerranée du bigaradier, du pamplemoussier et du citronnier aux Maures, aux Génois et aux Portugais (X-XII^{ième} siècles). L'essor du commerce maritime au XV^{ième} siècle permit la diffusion des agrumes à travers le monde. Christophe Colomb les introduisit dans les Caraïbes (1493). Au XVI^{ième} siècle, les agrumes sont présents dans de nombreuses régions du continent américain. L'oranger (orange douce) ne fut connu en zone méditerranéenne qu'au XV^{ième} siècle et le mandarinier seulement au XVIII^{ième} siècle, tous deux en provenance de Chine. En Méditerranée, la culture en zones rapprochées de ces différentes espèces d'agrumes, fut propice à l'émergence de nouvelles formes hybrides, comme la bergamote, le clémentinier et le cédrat Corse. De nombreuses variations naturelles sont aussi apparues dont les variétés d'oranges sanguines. Le pomelo (*C. paradisi*) naquit lui vers la fin du XVIII^{ième} siècle, dans les Caraïbes d'une rencontre fortuite entre un pamplemoussier et un oranger (Luro, 2015).

I.3. Description botanique des agrumes

Les agrumes sont des angiospermes dicotylédones appartenant à l'ordre des Sapindales et à la famille des Rutacées (sous-famille des Aurantioideæ, tribu des Citreae, sous-tribu des Citrinæ). Cette famille comprend environ 140 genres et 1300 espèces de plantes (Singh and Rajam, 2009).

I.4. Classification botanique

En botanique, les agrumes appartiennent à la famille des Rutacées (Escartin, 2011), et sont répartis en cinq genres: *Fortunella* (Kumquat qui est mangé tel quel avec sa peau), *Poncirus* (orange trifoliée), *Microcitrus*, *Eremocitrus*, et le genre *Citrus* (majorité des agrumes) (Bousbia, 2011).

La plupart des taxonomistes, considèrent que le genre *Citrus* fait partie de l'ordre des Geraniales et de la famille des Rutaceae (Nicolosi, 2007). Cette dernière comprend 140 genres et 1300 espèces à travers le monde (Singh and Rajam, 2009). Elle est subdivisée en six sous familles et dont celle des Aurantioideae, regroupe les vrais agrumes. Au sein des Aurantioideae, tribu des Citreae et sous-tribu des Citrinae, ils sont classés les genres, *Citrus*, *Poncirus*, *Eremocitrus*, *Microcitrus*, et *Fortunella* (Agustí *et al.*, 2014). Tous les porte-greffes et variétés d'agrumes, sont inclus dans le genre *Citrus*, à l'exception des kumquats (*Fortunella* spp.) et de l'oranger trifolié (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) (Peña *et al.*, 2007).

Bien que certains systématiciens ont regroupé tous les agrumes dans le genre *Citrus*, des études récentes suggèrent trois groupes majeurs; le groupe de *C. medica* (*C. medica*, *C. aurantifolia* et *C. limon*), le groupe de *C. reticulata* (*C. reticulata*, *C. sinensis*, *C. paradisi*, *C. aurantium* et *C. jambhiri*) et le groupe de *C. maxima* (*C. maxima*). Il existe un quatrième groupe qui n'a pas d'importance commerciale (*C. halimii*) (Agustí *et al.*, 2014). De plus, les hybrides d'agrumes majeurs, comprennent le Citrumelo (orange trifoliée x pomelo), Tangor (orange douce x tangerine), Tangelo (mandarine et pomelo) et le citrange (orange trifoliée x orange douce) (Singh and Rajam, 2009). Les citranges Troyer et Carrizo, sont utilisés comme porte-greffe, et ils confèrent aux orangers une bonne productivité (Loussert, 1989).

I.5. Description morphologique

Les agrumes sont des arbres ou arbustes allant de trois à quinze mètres de haut (Harley *et al.*, 2006 ; Chegrani-Conan, 2009), à tronc droit, à rameaux nombreux, formant une cime assez dense plus ou moins arrondie (Lieutaghi, 2004). Elles sont composées de deux parties : une partie souterraine formée par le porte greffe et une partie aérienne constituée par la variété (Benttayer, 2003).

I.5.1. Feuilles et fruits

Les agrumes ont des feuilles persistantes, caractère d'adaptation à des hivers peu rigoureux (Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996). Tous les fruits des *Citrus* cultivés ont presque la même structure : l'écorce, partie non comestible du fruit est peu développée chez les oranges, les mandarines et les clémentines. Elle constitue en revanche la majeure partie du fruit des cédrats ou du pamplemousse. Les fruits des principales espèces et variétés cultivées du genre *Citrus* diffèrent par leur coloration, leur forme, leur calibre, la composition de leur jus et leur époque de maturité. Cependant, tous les fruits des *Citrus* cultivés présentent la même structure anatomique (Ramful *et al.*, 2010). D'un point de vue botanique, les agrumes sont des fruits charnus de type baie avec un péricarpe structuré en trois parties bien différenciées : l'épicarpe appelé flavédo, le mésocarpe appelé albédo et l'endocarpe (pulpe).

L'épicarpe (ou flavedo) est la surface périphérique qui recouvre le fruit et le protège des dommages. Il est coloré par des pigments caroténoïdes et représente 8 à 10% du fruit. Il contient de nombreuses glandes oléifères sécrétrices d'essences aromatiques qui sont réparties de façon irrégulière. Ces glandes sont des poches bordées par plusieurs assises de cellules sécrétrices dont la formation fait intervenir des cellules épidermiques et des nodules méristématiques superficiels.

Le mésocarpe (ou albedo) est la couche intérieure blanchâtre, de structure spongieuse, plus ou moins épaisse par rapport à la taille du fruit, elle peut constituer 12 à 30% du fruit. Elle est intimement associée à l'épicarpe avec lequel elle forme ce qu'il est convenu d'appeler les écorces d'agrumes.

L'endocarpe est la partie comestible d'agrumes. Il est constitué d'une fine membrane qui tapisse les nombreuses loges carpellaires. Du côté interne, cette membrane porte des poils succulents ou de vésicules enfermant le jus et qui sont regroupés en quartiers pouvant varier de 5 à 18 (Spiegel-Roy et Goldschmidt, 1996 ; Ramful *et al.*, 2010), dont l'ensemble forme la partie comestible ou pulpe renfermant les graines ou pépins (Huet, 1991; Albagnac, 2002 ; Bennici et Tani, 2004 ; Ramful *et al.*, 2010). Cette partie, riche en sucres solubles, renferme des quantités significatives de vitamine C, de pectine, de fibres, de différents acides organiques et de sel de potassium, qui donnent au fruit son acidité caractéristique (Hendrix et Redd, 1995 ; Guimaraes *et al.*, 2010).

La coupe transversale du fruit permet de distinguer les parties suivantes (Figure 3).

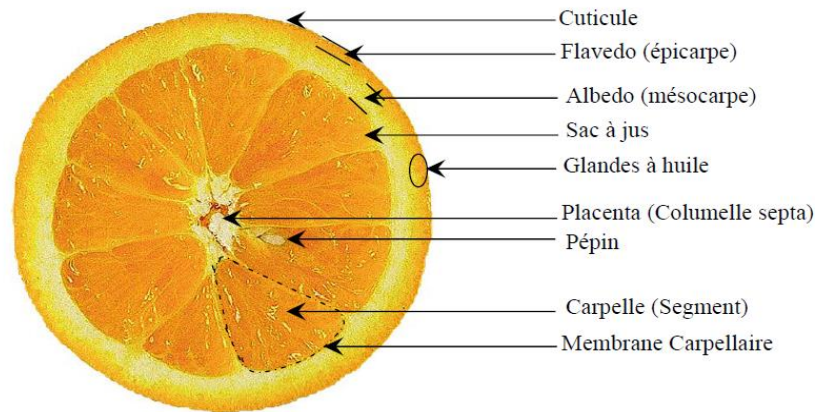


Figure 3 : Coupe transversale d'une orange (Guimaraes *et al.*, 2010).

I.5.2. Système racinaire

Chez les agrumes, le système racinaire occupe plus de 70% de la taille de l'arbre, les racines ont un pivot qui peut dépasser 2 m au-dessous de la surface. Ces racines fibreuses se prolongent généralement bien au-delà de la canopée (Walter et Sam, 2002). Le système racinaire formé par le porte greffe (ou sujet), c'est la partie qui assure à la fois l'ancrage de l'arbre au sol, son alimentation en eau et en sels minéraux (Barboni, 2006).

I.5.3. Système aérien

I.5.3.1. Feuille

Les feuilles sont simples, de 4 à 8 cm de longueur, unifoliées, denses, avec des pétioles ailés et articulés (Mackee, 1985). Les *Poncirus* ont des feuilles trifoliées et caduques. Les *Citrus* et *Fortunella* ont des feuilles entières et persistantes (Figure 4) (Bachés et Bachés, 2002).

I.5.3.2. Fleurs

Les fleurs sont généralement de couleur blanche, de 3 à 5 sépales verts et de 4 à 5 pétales imbriqués, souvent recourbés vers l'arrière, souvent très odorantes ((Bachés et Bachés, 2002), contenant des glandes à essence, de 20 à 40 étamines à filets soudés entre eux par groupes, d'un ovaire à 6-14 loges surmonté par un style (Figure 4) (Lieutaghi, 2004). Les fleurs ont entre 2 à 4 cm de diamètre, axillaires, parfumées, simples (ayant les étamines et les pistils fonctionnels) et parfois staminées (comportant des étamines tout en étant dépourvues de pistils) (Somon, 1987).



Figure 4 : Planches illustratives de *Citrus sinensis* (oranger doux).
(Branche, fleurs et fruits d'oranger doux) (Köhler, 1887) In Khefifi (2015).

I.5.3.3. Tronc et branches

Le tronc a un développement limité en hauteur à quelques dizaines de centimètres par la première taille de formation qui a pour effet de favoriser le développement des futures charpentières. Cette dernière constituent l'armature de l'arbre, elles sont limitées à 3,4 ou 5 par la taille de formation, prennent naissance sur le tronc. Elles se divisent en sous-charpentières qui à leur tour porteront les rameaux végétatifs et les rameaux fructifères. C'est au niveau du tronc que se situe la ligne de greffe résultant de l'association de la variété et du porte-greffe (Loussert, 1987).

I.6. Développement phénologique

Les agrumes se présentent sous la forme de petits arbres d'environ 4 à 12 m de hauteur avec un feuillage dense et persistant (CIRAD – GRET, 2009). Il s'agit de plantes pérennes qui possèdent une phase juvénile relativement longue, entre 5 à 8 ans, pour être capables d'émettre des fleurs et produire des fruits après leur semis (Iglesias *et al.*, 2007). La rythmicité phénologique des agrumes est fonction non seulement des inductions climatiques, mais elle est également propre à chaque type d'agrumes et à chaque variété. Les agrumes nécessitent un cumul de degrés-jour pour assurer leur développement phénologique (Goldschmidt, 1997).

I.7. Cycle végétatif annuel

Après une période de vie ralentie, la croissance se manifeste à partir de fin Février. Après environ deux mois d'activité, de jeunes ramifications se développent, facilement reconnaissables à la coloration vert clair de leurs feuilles (Praloran, 1971 ; Loussert, 1987). Cette poussée de sève du Printemps est la plus importante, elle comprend à la fois des pousses végétatives et reproductrices (Spiegel-Roy and Goldschmidt, 1996). Une seconde poussée végétative, plus faible que la précédente, s'observe en Juillet-Août. Ensuite en Automne, la croissance apparaît plus nettement que la précédente. Elle débute en Octobre et se termine en fin Novembre. Cette poussée assure le renouvellement des feuilles (Praloran, 1971).

I.8. Exigences pédoclimatiques

Les agrumes sont cultivés dans les régions tropicales et subtropicales (Pefia and Navarro, 1999). Leur culture nécessite en région méditerranéenne des zones abritées à hiver doux et sans risque de gelées mais également un complément d'eau d'irrigation durant la saison sèche (LebdiGrissa, 2010). Les sols limoneux-sableux, profonds et bien drainés, sont considérés comme les meilleurs pour la production d'agrumes (Agustí *et al.*, 2014).

Du point de vue climatique, les *Citrus* sont très sensibles aux variations thermiques et ils exigent des températures élevées au moment de la croissance et la maturation des fruits (Singh and Rajam, 2009). Ces mêmes auteurs ont noté également que des températures moyennes de 20°C la nuit et 35°C le jour, sont nécessaires pour une croissance optimale de

ces espèces. Par ailleurs, il est à mentionner que les agrumes sont généralement classés parmi les cultures moyennement sensibles au froid. Ils sont vulnérables aux dégâts de froid à des températures inférieures à -2°C (El-Otmani, 2005). Les besoins en eau des agrumes sont estimés à environ 1200 mm/an, répartis sur toute l'année (El Macane *et al.*, 2003). Toutefois, il est à noter qu'ils ne supportent pas les zones tropicales très humides (Hill, 2008).

Chapitre II : Les agrumes dans le monde et en région méditerranéenne

II.1. Importance économique de la filière agrumicole

Les agrumes représentent la première catégorie fruitière en terme de valeur en commerce international ; cette importance est justifiée par leur consommation comme des produits frais ou après leur transformation (jus, sirop,...etc), grande qualité nutritive, riche en vitamine C, B₆, et constituent une source de fibres, d'acide ascorbique et folique, du potassium et du calcium ; effet bénéfique sur la santé en contribuant dans la diminution des risques de maladies cardio-vasculaires et d'autres troubles (Kesterson et Braddock, 1976 ; Di giacomo *et al.*, 1992).

II.1.1. Importance mondiale

Les agrumes présentent un intérêt économique pour de nombreux pays à travers le monde. Le marché des agrumes est prédominé par celui des oranges. Ces dernières peuvent être commercialisées sous forme de fruits frais ou transformées en jus (Lacirignola and D'Onghia, 2009). En plus de l'intérêt alimentaire, les agrumes sont très utilisés en pharmacologie. A titre d'exemple, ils contiennent de nombreux métabolites présentant des propriétés intéressantes pour la santé (Tadeo *et al.*, 2008). En outre, le pomelo est souvent recommandés pour les personnes qui souffrent d'un excès de poids (Xiao *et al.*, 2014), et il a de nombreux bienfaits pour la santé (Xu *et al.*, 2007 ; Yin *et al.*, 2012).

Les écorces d'agrumes, qui sont considérés comme étant un résidu industriel, sont une matrice hautement valorisable vue leurs richesse en ingrédients fonctionnels (huiles essentielles, fibres, caroténoïdes, vitamine C, composés phénoliques) ayant des applications très variées dans les industries agroalimentaires, cosmétiques, nutraceutiques et dans les industries de production de biocarburants et de matériaux biodégradables (Ledesma-Escobar and Luque de Castro, 2014).

II.1.2. Zones géographiques majeures de production d'agrumes

Bien que l'aire de culture des agrumes soit très vaste, le Brésil, le Bassin méditerranéen, la Chine et les États-Unis contrôlent à eux seuls deux tiers de la production mondiale d'oranges, de petits agrumes, de citrons et lime et de pamplemousses et pomelos. La part la plus importante de la production se concentre dans les pays de l'hémisphère Nord, où la récolte s'échelonne d'Octobre à Mi-Juin (Jacquemond *et al.*, 2013).

Selon les statistiques de 2020, la production mondiale d'agrumes en 2018 par région (en milliers de tonnes) est illustrée dans la figure 5. Nous observons que 75,5 milles de tonnes d'agrumes ont été produits en Asie (Figure 5) (Statista₁, 2020).

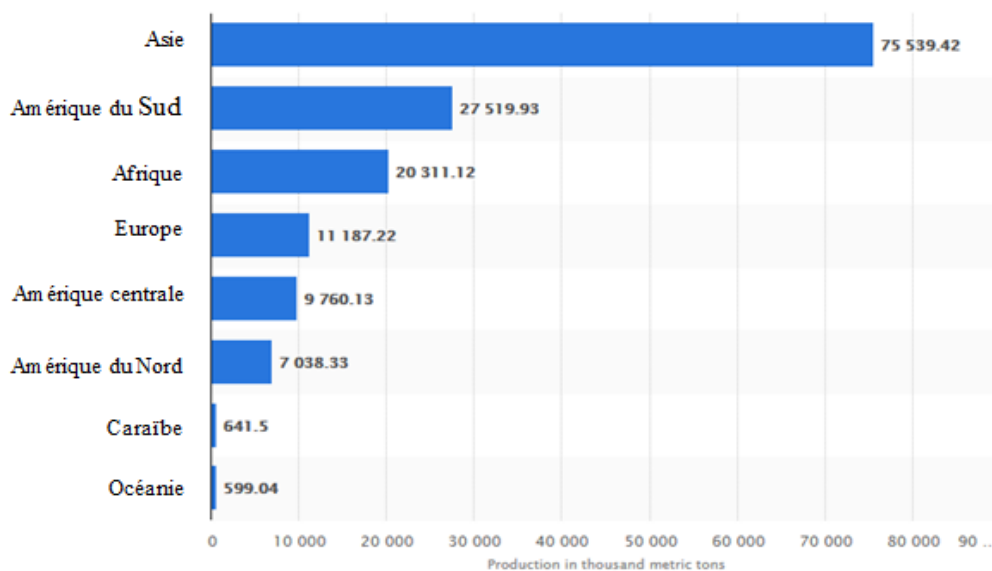


Figure 5 : Production mondiale d'agrumes en 2018 par région en milliers de tonnes (Statista₁, 2020)

Par contre en 2019, La production moyenne mondiale d'agrumes, toutes espèces confondues, s'élève à plus de 110 millions de tonnes par an, sur une superficie de 7,5 millions d'hectares environ. Les oranges représentent environ 60 % de la production totale d'agrumes. Les tangerines, mandarines, clémentines et satsumas comptent pour 23 % du volume mondial. Environ 13,7 millions de tonnes de citrons et de limes, ainsi que 4,4 millions de tonnes de pamplemousses et pomelos sont produites annuellement (Agroligne, 2020).

II.2. Situation de l'agrumiculture en Algérie

Durant les années soixante l'Algérie exportait, en moyenne 25% de sa production. La période 1970/1980 a connu la réorientation de la production destinée à l'exportation vers la satisfaction de la demande du marché intérieur. De la fin des années 80 jusqu'à 1999, l'agrumiculture a connu une régression suite à plusieurs contraintes (ITAFV, 2013). Avec l'avènement des différents programmes, dès 1999, l'agrumiculture au même titre que les autres filières a bénéficié d'une relance grâce à des mesures incitatives aussi bien financières, socio- économiques, technico-scientifique qu'organisationnelles.

A partir des années 2000, l'agrumiculture a connu une nouvelle politique avec le renouveau de l'économie agricole et rurale visant l'augmentation et l'amélioration qualitative de la production pour la satisfaction des besoins de la population et le marché extérieur. La culture des agrumes représente un segment stratégique pour notre pays. En 2004, la superficie occupée par le verger agrumicole algérien était de 59368 ha soit 0.7% de la SAU et se répartit essentiellement dans les wilayat les plus importantes qui sont : Blida, Chlef, Alger, Mascara, Relizane, Mostaganem, Skikda et El-Tarf. Tandis que selon les statistiques du Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural MADR (2011), l'agrumiculture couvre une superficie de 64323 ha, soit environ 8 % de la superficie totale occupée par les cultures pérennes. D'après l'ITAFV (2017), Le verger agrumicole national, s'étend sur une superficie de 67.190 ha. Les orangers occupent une superficie de 49.201 ha, soit 73,2%, avec la prédominance des variétés précoces (Washington et Thomson navel) et des variétés tardives (Valencia Late).

La production nationale a évolué au cours des dernières décennies passant de 45.000 tonnes en 1974 à 30.000 tonnes en 1996, pour connaître une timide relance à partir de 2003 avec une production de 56.000 tonnes et atteindre un pic de production de 855265,4 tonnes en 2009. En effet, traditionnellement exportateur d'agrumes, notre pays éprouve depuis quelques années des difficultés à satisfaire les besoins de consommation, qui ne cessent de croître sous les effets conjugués de la croissance démographique et des traditions de consommation en fruits frais (raisin, agrumes, etc.) et de l'augmentation du pouvoir d'achat.

Le niveau de rendement moyen national enregistré en 2010/2011 était de l'ordre de 172 qx/ha, bien qu'ayant bénéficié d'une évolution régulière (augmentation de 60 qx/ha

depuis l'indépendance), il demeurerait insuffisant au regard des résultats obtenus par certains agrumiculteurs de différentes régions du pays (de 300 à 400 qx/ha et même plus) en mettant en œuvre un itinéraire technique approprié (ITAFV, 2013).

Selon l'Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne (ITAFV), en 2015, la production totale des agrumes est estimée annuellement à 13.417.540 qx avec un rendement moyen de 224 qx/ha. La même source précise qu'en 2015, les importations en produits agrumicoles ont dépassé 51.400.000 tonnes, dont plus de 32.400.000 tonnes de fruits frais et plus de 15.600.000 tonnes de jus d'agrumes. Les importations en produits de conserve ont dépassé 3.200.000 tonnes, et celles des huiles essentielles dépassent 124.000 tonnes. Les exportations étaient de l'ordre de 1287,896 tonnes d'agrumes, réparties en 82,58 qx de fruits frais et 13205,41 qx de jus (ITAFV, 2017). Tandis que la production d'oranges pendant la campagne 2016 et 2017, s'élevait à plus d'un million de quintaux, tandis que la production de citrons était d'environ 778.000qx (Figure 6) (Statista₂, 2020).

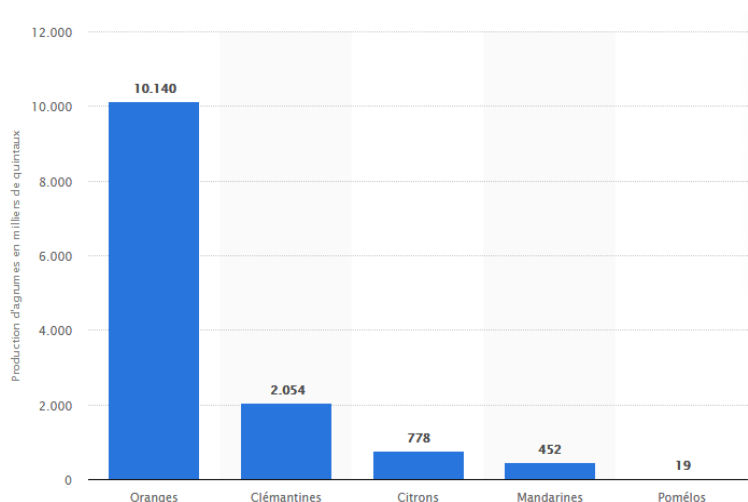


Figure 6 : Évolution de la production d'agrumes en Algérie entre 2016 et 2017, par type d'agrumes (en milliers de quintaux) (Statista₂, 2020).

La production globale d'agrumes (oranges, clémentines et citrons) pour la saison agricole de 2018 a été estimée à plus de 14 millions de quintaux, dont plus de 11 millions de quintaux d'oranges et 2,5 millions de quintaux de clémentines, et près de 800.000 quintaux de citrons. Sur un total de 32 wilayas productives d'agrumes, la wilaya de Blida vient en tête avec 4,1 millions de quintaux, suivie de Mostaganem avec 1,2 millions de quintaux, puis

Tipasa avec 1,1 million de quintaux, la wilaya de Chlef étant considérée parmi les cinq wilayas pionnières dans ce domaine. Le reste de la production agrumicole était réparti sur les 28 autres wilayas. La valeur de production des différentes variétés d'agrumes ayant atteint durant la campagne agricole 2017-2018 une hausse considérable, soit l'équivalent de 186 milliards de dinars. Cette valeur représente 5% de la production nationale agricole globale. Les quantités de fruits exportées actuellement par l'Algérie demeurent faibles par rapport à ses capacités de production. L'agrumiculture concerne 32 wilayas pour une superficie globale de 70.503 ha (MADRP, 2019). En 2019 La production d'agrumes a atteint 15 millions de quintaux (MADR, 2020)

Concernant l'analyse de la structure variétale des agrumes, il est relevé une prédominance des variétés précoces qui assurent une disponibilité de fruits au moment où l'étalage fruitier est réduit mais peu diversifié, une faiblesse des variétés de saison qui devraient assurer la soudure entre les variétés précoces et celles tardives, une faiblesse des superficies des variétés tardives qui devraient permettre un échelonnement de la disponibilité des agrumes jusqu'à la fin du mois Juin et une faiblesse des superficies réservées aux citronniers et pomelos (DSA, 2018).

II.3. Transformation des agrumes

Dotés d'arômes qui ne sont seulement qu'un de leurs produits, les agrumes sont un bon exemple de transformation des produits agricoles à grande échelle qui utilise une approche de raffinerie. Une gamme de culture d'agrumes est transformée pour produire des huiles essentielles à double usage aussi bien comme arômes que comme ingrédients de parfum. Il s'agit notamment de la bergamote, du pamplemousse, du citron, de la lime, de la mandarine, des oranges douce et amère (Bousbia, 2011). Les oranges sont pressées pour en extraire le jus, qui est concentré par évaporation jusqu'à environ 5 à 6 fois son poids avant d'être expédié. La peau d'orange restante est ensuite soumise à pression ou à être râpée pour en extraire « l'huile pressée à froid » ou « essence d'agrumes », source d'arômes et de nombreuses molécules utiles au parfum. Les terpènes oxygénés constituent essentiellement une minorité de l'huile, qui est essentiellement composée de limonène et d'autres hydrocarbures terpéniques (Cheetham, 2010).

II.3.1. Coproduits de la transformation des agrumes

Les fruits d'agrumes peuvent être utilisés principalement par les industries de transformation, grâce à leur matière sèche riche en sucres solubles (glucose, fructose, saccharose et faibles teneurs en pentoses), sucres insolubles (cellulose, hémicellulose et protopectine), acides organiques (citrique, malique, isocitrique et oxalique) et une teneur importante en flavonoïdes. Les constituants inorganiques du résidu représentés par leur forte teneur en calcium. Ces composés peuvent être extraits de la peau d'oranges et réutilisés dans le domaine industriel. Egalement l'extraction d'huiles essentielles de la peau d'orange génère des sous-produits intéressants tels que les huiles concentrées et déterpénées, les formulations d'alcool et de d-limonène (Kesterson et Braddock, 1976). Ce dernier peut être utilisé dans une grande variété d'applications en tant que composant de résines synthétiques, son utilisation comme solvant, comme substitut de solvants minéraux et en tant que base pour la synthèse de composés aromatiques (Di giacomo *et al.*, 1992).

Les co-produits d'agrumes peuvent être aussi utilisés en tant qu'aliment pour bétails (Bampidis and Robinson, 2006 ; Ledesma-Escobar and Luque de Castro, 2014). L'utilisation des écorces pour la production des biocarburants (éthanol) et des biogaz (Wilkins *et al.*, 2007; Pourbafrani *et al.*, 2010 ; Lohrasbi *et al.*, 2010), pour la production du plastique biodégradable (Byrne *et al.*, 2004) et comme inhibiteur de la corrosion des métaux et des alliages (Saleh *et al.*, 1982 ; Da Rocha *et al.*, 2010) est relativement récente.

Chapitre III : Principales maladies transmissibles par greffage des agrumes

La production méditerranéenne d'agrumes est très majoritairement dédiée au marché du frais. L'aspect sanitaire des fruits a donc un impact important sur le devenir de la production (Vernière *et al.*, 2003). Les agrumes sont sujets à de nombreuses maladies causées par des champignons, bactéries, nématodes, virus, agents de type viral et viroïdes (Whiteside *et al.*, 1988 ; Roïstacher, 1991 ; Bové, 1995). Les dépérissements provoqués par les viroses paraissent occuper le premier plan par leur gravité et leur impact économique comme dans le cas des variétés ou des associations porte-greffe-greffon sensibles.

Selon Roïstacher (1995), les agrumes sont les plus affectés par les agents transmissibles par greffage qui entraînent le plus souvent la mort de l'arbre. Dans le cas des variétés et des associations tolérantes, ces affections passent inaperçues (Praloran, 1971). Cependant, elles entraînent parfois un important ralentissement de la végétation et une diminution des rendements (Roïstacher, 1995). Actuellement, tous les vergers agrumicoles à travers le monde sont affectés, plus ou moins sévèrement par des virus et un grand nombre d'agents transmissibles par greffage, qui provoquent de très graves maladies dévastatrices dont les plus importantes sont la tristeza et le greening « Huanglongbing » (Bové, 2006).

III.1. Maladies virales

III.1.1. *Citrus Tristeza Virus*

Citrus Tristeza Virus (CTV) provoque une des maladies les plus préjudiciables à la culture des agrumes (Moreno *et al.*, 2008). En portugais, le mot « tristeza » signifie « tristesse » ou « mélancolie ». Il fait référence au dépérissement que subissent de nombreuses espèces d'agrumes greffées sur *Citrus aurantium* ou *Citrus limon*.

L'épidémie de la tristeza a été signalée en Argentine et au Brésil dans les années 1930 (Lee *et al.*, 1994). Le virus cause d'épidémies ravageuses qui ont pesé sur l'évolution de ce secteur (Moreno *et al.*, 2008), surtout qu'elle est d'une part transmise par pucerons et d'autre part, le porte greffe bigaradier classiquement le plus utilisé dans le monde, représente une association très sensible avec les orangers. Durant le siècle dernier, le CTV a détruit plus

de 100 millions d'arbres. Ce fut le cas de certains pays d'Amérique du Sud tels que l'Argentine, où des dépérissements spectaculaires ont été enregistrés sur 90 % des plantations d'agrumes greffés sur bigaradier. En région méditerranéenne, le virus s'est manifesté en Espagne pendant les années 1956 et 1962 où il a causé la mort de 15 millions d'arbres (Cambra *et al.*, 1988). Ce problème a incité à la substitution rapide du bigaradier par des porte-greffes tolérants au CTV tels que le Citrange carrizo et troyer en Espagne, la Lime Rangpur au Brésil. Dans les pays où le bigaradier est encore le porte-greffe principal, des observatoires de veille et d'avertissement ont été installés pour contrôler la maladie et les pucerons vecteurs dont le plus important est *Toxoptera citricida* identifié ces dernières années au Bassin méditerranéen (Espagne et Portugal). Ce puceron originaire de l'Asie, a été signalé dans plusieurs pays d'Afrique (Afrique du Sud, Kenya, Tanzania, Uganda, Zaire, Ethiopie,...); il a été introduit en Floride en 1995 et a été prouvé comme le vecteur le plus efficace de la tristeza comparativement à *A. spiraecola*, *A. gossypii*, et *T aurantii*. Le CTV, apparemment originaire d'Asie, a été disséminé dans tous les grands bassins agrumicoles mondiaux par des échanges internationaux de matériel végétal contaminé (Lovisololo, 1993).

Le CTV exprime un certain nombre de symptômes: dépérissement des portes greffes de bigaradier (Figure 7_{a,b}), jaunissement des jeunes pousses sur le citronnier et le pamplemousse (Figure 8_a), cannelures (Stem-pitting) dans le bois des rameaux (Figure 7_{c,d,e}), des branches et des troncs observés sur le pamplemousse et/ou oranger doux (Garnsey *et al.*, 2005). Les orangers doux, mandariniers et pamplemoussiers greffés sur des bigaradiers ou des citronniers dépérissent lentement: ils se rabougrissent, deviennent chlorosés et finissent souvent par mourir au bout de plusieurs mois ou années (Figure 7_f) ; Réduction de la qualité et la taille des fruits (Figure 8_b) (Lee, 2014).

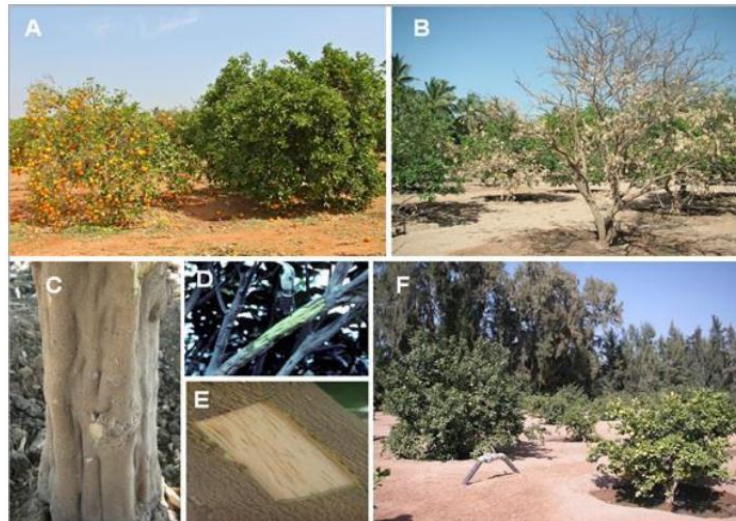


Figure 7 : Symptômes d’une infection par *CTV*: **(A)** syndrome de la tristezza ou dépérissement des orangers doux greffés sur des bigaradiers infectés par *CTV* (gauche) et arbres asymptotiques (droite); **(B)** dépérissement rapide d’un pamplemoussier greffé bigaradier; **(C)** bois strié sur le tronc d’un pamplemoussier greffé sur un citrange-troyer causé par une souche agressive de *CTV*; **(D)** cas sévère de bois strié sur les branches d’un pamplemoussier; **(E)** bois strié sur le tronc d’un oranger doux greffé sur un mandarinier cleopatra; et **(F)** rabougrissement marqué d’orangers doux infectés par *CTV* greffés sur un citrange-carrizo (droite), par rapport à un arbre sain (gauche) (ONUAA, 2016).

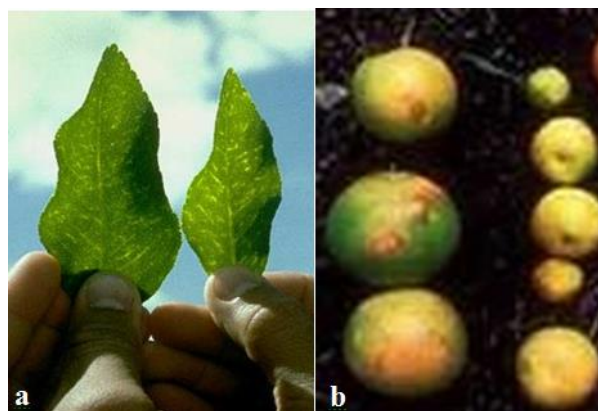


Figure 8 : Symptômes d’une infection par *CTV*: **(a)** Jaunissement des nervures « Vein clearing » sur feuilles de limettier ; **(b)** Réduction de la qualité et la taille des fruits (Roïstacher *et al.*, 2010).

III.1.2. Psorose écailleuse « *Citrus Psorosis Virus: CPsV* »

La psorose des agrumes a été observée pour la première fois en Floride et en Californie au début des années 1890 et nommée psorose basée sur le grec psora signifie ulcère ou gale. La maladie était communément appelée écorce squameuse. Il est originaire d’Orient et s’est répandu dans le monde entier par la distribution d’espèces et de variétés d’agrumes

(Roïstacher, 1991 ; Roïstacher *et al.*, 2000). La psorose est une maladie répandue et dommageable des agrumes dans de nombreuses régions du monde, y compris le Sud d'Amérique et Bassin méditerranéen (Roïstacher, 1993).

Deux types de psorose ont été décrites, la psorose A et B.

Sur les feuilles : Ce sont les jeunes feuilles ayant atteint la moitié ou les trois quarts de leur taille normale qui sont les premières attaquées. La région des nervures secondaires du limbe et les tissus adjacents montrent, par transparence, de petites plages claires de 1 à 3 mm de long sur 0 mm à 25 mm de large environ. Les symptômes foliaires peuvent se manifester sur une portion ou sur la totalité du limbe. D'autre part, ces taches claires deviennent souvent coalescentes. Leur contour s'estompe et la feuille psorosée porte un dessin en « feuille de chêne » (Jamoussi, 1955). Sur l'écorce, l'apparition des symptômes corticaux est tardive.

La psorose A (PsA), *Citrivir psorosis* var. *vulgare* Faw. C'est la forme la plus commune, Elle apparaît sous forme de petites pustules qui se transforment en écailles sèches de 2 à 3 mm d'épaisseur environ. Ces écailles recouvrent des surfaces vivantes de l'écorce de couleur chamois (Figure 9_a). La psorose A peut être ou non accompagnée d'exsudations gommeuses. Elle est d'abord localisée, mais elle finit par s'étendre et gagner en profondeur. Le bord attaqué reste vivant, au moins au début, puis change de couleur. Il devient gris brun à brun rougeâtre (Figure 9_b). L'arbre est alors profondément affecté, ses feuilles diminuent en taille et en nombre et jaunissent (Jamoussi, 1955).

La psorose B (PsB) : *Citrivir psorosis* var. *anulatum* Faw. La sécrétion de gomme précède l'écaillage. C'est une forme virulente, à évolution plus rapide. Les écailles sur le tronc et les branches sont plus ou moins confluentes, se traduisant parfois en plages qui s'étendent sur un côté seulement du tronc et des branches. La Psorose B envahit même les rameaux de faible diamètre qui seraient épargnés par la psorose A (Jamoussi, 1955). L'écorce est souvent écaillée chez les arbres âgés de 10 à 12 ans. La gomme peut s'accumuler sous les écailles de l'écorce et imprégner le xylème, produisant une coloration du bois et une occlusion des vaisseaux. Des taches chlorotiques dans les vieilles feuilles avec des pustules gommeuses brunâtres sur le dessous des feuilles, et parfois des taches annulaires sur les fruits (Figure 9_c) (Roïstacher, 1993 ; Martin *et al.*, 2004 ; Velázquez, 2012).

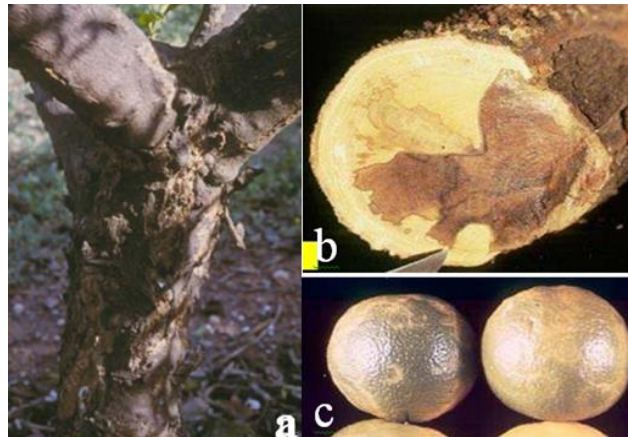


Figure 9 : Symptômes de psorose sur arbre infecté : (a) Ecaillage de l'écorce (Tennant *et al.*, 2009) ; (b) Coloration rougeâtre interne du bois ; (c) Taches annulaires sur fruits (Roïstacher *et al.*, 2010).

Cependant, en l'absence de la forme B sévère de la maladie, le symptôme de la desquamation de l'écorce peut être retardé, voire absent (Roïstacher, 1991 ; Roïstacher, 1993). Les espèces d'agrumes les plus gravement touchées sont l'orange douce, le pamplemousse et la mandarine. Certaines autres espèces tels que l'orange amère et le citron, présentent des symptômes foliaires typiques lorsqu'elles sont infectées, mais restent exemptes de lésions d'écorce sans effets néfastes évidents (Roïstacher, 1993 ; Milne, 2003).

Les psoroses sont connues du monde entier. Elles ont été signalées notamment : en Californie, Floride, Brésil, Paraguay, Afrique du Nord (Tunisie, Algérie, Maroc), Espagne, Italie. En Afrique du Nord, les premiers symptômes ont été observés vers 1930 au Maroc (Bouhelier, 1947). En 1947, 300.000 pieds étaient atteints en Afrique du Nord. Les arbres infectés déclinent lentement et finissent par devenir improductifs, causant des dommages à l'industrie des agrumes dans le Bassin méditerranéen et dans certaines régions d'Amérique du Sud. Dans les années 80, en Argentine et en Uruguay, il s'agissait d'une maladie grave causant des pertes annuelles d'environ 5% des arbres (Danos, 1990) et la maladie est toujours présente (Zanek *et al.*, 2006). Dans le cas des psoroses A et B, la maladie débute par des symptômes foliaires auxquels succèdent les symptômes corticaux sur le tronc, les branches et les rameaux.

Le virus est transmis par greffage, mais les symptômes apparaissent rarement avant que les arbres aient 10 ans; par conséquent, les producteurs propagent souvent des bourgeons

infectés par la psorose à partir d'arbres asymptomatiques, ce qui explique en partie l'incidence élevée de la maladie dans certaines régions (Martin *et al.*, 2002).

D'après Jamoussi (1955), les autres formes de psorose sont :

- La psorose alvéolaire (La gommose alvéolaire ou « Concave gum disease », due à *Citricolonia psorosis* var. *concauum*): Au Maroc elle affecte particulièrement et parfois gravement les orangers Washington navel et certaines variétés de mandariniers,
- La psorose en poches (la gommose en poches ou « Blind pocket » due à *Citricolonia psorosis* var. *alvatum*).
- La psorose infectieuse ou « Infections variegation ».
- La psorose frisolée ou « Crinkly leaf ».

La psorose peut demeurer asymptomatique dans la majorité des agrumes «l'oranger, le mandarinier, le pamplemoussier, le pomélo, le tangelo ou le citronnier», ce phénomène explique sa large propagation dans les échanges de matériel végétal de multiplication infecté (Roïstacher, 1991). Le *Citrus Psorosis Virus* est l'agent responsable de la psorose écaïlleuse sur différentes variétés de *Citrus* (Milne *et al.*, 2000). Cette maladie est transmissible par greffage mais sa transmission par le champignon *Olpidium* spp. a été rapportée ces dernières années (Miao *et al.*, 2005). Ce virus ne se transmet pas par le pollen (Navarro *et al.*, 1980) ni par les graines infectées (D'Onghia *et al.*, 2000).

III.1.3. Panachure infectieuse «*Citrus Infectious Variegation Virus: CIVV*»

Citrus Variegated Chlorosis (CVC) ou la panachure infectieuse. C'est une grave infection virale causée par *Citrus Infectious Variegation Virus (CIVV)*.

La chlorose panachée des agrumes est apparue pour la première fois au Brésil en 1987 (Lee *et al.*, 1991), par la suite, il est propagé aux pays voisins du Brésil (Aguilar *et al.*, 2005). Cette maladie a été signalée dans de nombreux vergers agrumicoles du Bassin méditerranéen (Roïstacher, 1991). La maladie a été nommée en raison de l'aspect chlorotique de l'arbre, ressemblant à une carence en zinc, une fois que l'arbre est infecté. Les arbres nouvellement touchés présentent une sectorisation des symptômes, tandis que les arbres

infectés de manière chronique apparaissent jaune. De petites lésions gommeuses brun clair se forment sur la face inférieure des feuilles, correspondant aux zones chlorotiques jaunes sur la face supérieure de la feuille. Sur les vieilles feuilles, les lésions sur le dessous peuvent devenir brun foncé et même devenir nécrotiques. Outre le gaufrage (Figure 10a), la panachure infectieuse se manifeste aussi par une déformation des feuilles qui prennent un aspect lancéolé qui s'accompagne parfois par des difformités des fruits ou des bosses qui les rendent impropres à la commercialisation (Figure 10b).

Les fruits sont nombreux, de très petite taille, avec une écorce dure sur les arbres affectés par le CVC. Les fruits affectés mûrissent plus tôt que les fruits sur un arbre sain et la teneur en sucre est plus élevée et ont tendance à se produire en grappes, plutôt qu'en un ou deux fruits comme d'habitude, en particulier sur les orangers doux. Les arbres affectés deviennent rabougris, les branches dépérissent et la canopée s'amincit, mais l'arbre meurt rarement. Il a été démontré que la maladie est causée par le pathovar *Xylella fastidiosa* (Hartung *et al.*, 1994).

Les orangers et mandariniers sont les espèces les plus souvent infectées par cette maladie mais les infections peuvent être plus sévères sur les citronniers et les cédratiers. La panachure infectieuse se transmet très bien par voie mécanique. Un faible taux de transmission par la graine est observé (Roïstacher, 1991). Le CVC est transmis par de nombreuses espèces vecteurs de Cicadellinae et des Cercopidae (Hopkins and Purcell, 2002).



Figure 10 : Symptômes associés à la panachure infectieuse sur agrumes : (a) Gaufrage prononcé du limbe d'un oranger navel ; (b) difformité d'un fruit de citronnier (Davino *et al.*, 1988).

III.1.4. *Citrus Tatter Leaf Virus (CiTLV)*

Synonymes : *Citrange Stunt Virus*, Apple stem grooving virus. *CiTLV* a été signalé pour la première fois en 1962 à Riverside, Californie sur *Citrus meyer* qui avait été importé de Chine en 1908 (Wallace and Drake, 1962 ; Miyakawa and Ito, 2000). Le *CiTLV* est largement répandu en Chine, au Japon et en Corée, et a été signalé en Afrique du Sud, en Australie et aux États-Unis via l'importation de citron Meyer de Chine (Lee, 2014).

Ce virus provoque un retard de croissance ou un nanisme, une nécrose au niveau de l'union des bourgeons et une incompatibilité de l'union des bourgeons induite par le virus sur les arbres greffés sur les porte-greffes de *P. trifoliata*, Citrange ou Citrumelo (Miyakawa and Matsui, 1977 ; Iwanami *et al.*, 1991 ; Miyakawa and Ito, 2000). Les symptômes foliaires chlorotiques sont produits sur les *Citrus excelsa*, Rusk et Citranges troyer (*Poncirus trifoliata* x *Citrus sinensis*), Citrumelos swingle (*P. trifoliata* x *C. paradisi*) et d'autres hybrides de *P. trifoliata*. Le virus est souvent asymptomatique chez la plupart des variétés d'agrumes. Les symptômes n'apparaissent qu'une fois l'arbre atteint l'âge de 3 à 7 ans (Roïstacher, 1991). Le *Poncirus trifoliata* est hautement résistant, mais ses hybrides peuvent présenter des symptômes après l'infection (Wallace et Drake, 1963).

La principale méthode de transmission du virus d'un plant à un autre est le greffage. La transmission mécanique au citron est possible par coups de couteau et abrasion des feuilles (Garnsey, 1974). Une transmission par graines a été observée chez *Chenopodium quinoa*, niébé et soja, mais pas chez *Fortunella japonica* (Nishio *et al.*, 1982). Aucun vecteur naturel n'est connu.

III.1.5. *Satsuma Dwarf Virus (SDV)*

La maladie est à distribution mondiale, originaire du Japon où elle cause de sérieux Problèmes (Cui *et al.*, 1991 ; Changyong *et al.*, 1993). Les arbres infectés par le *SDV* sont rabougris, portent des feuilles en forme de cuillère avec énaions, moins de feuilles et de petits fruits à peau épaisse (Tanaka, 1972). Il existe des variantes de *SDV*, une variante étant appelée virus de la mosaïque des agrumes (à ne pas confondre avec le virus *CYMV* qui est un *Badnavirus*) (Dakshinamurti and Reddy, 1975 ; Ahlawat *et al.*, 1985). Le *SDV* a été signalé au

Japon, Chine, Iran, Corée et Turquie, tandis que la variante de la mosaïque d'agrumes de *SDV* n'a été signalée qu'au Japon. Le *SDV* est transmis par greffage, et la transmission du sol a été signalés mais non confirmé (Koizumi *et al.*, 1988). Aucun vecteur n'a été signalé (Lee, 2014)

III.1.6. Maladies à oak leaf pattern «Feuilles de chêne»

La concavité gommeuse, cristacortis et impietratura sont trois infections à virus similaires, largement répandues dans le Bassin méditerranéen, et dont l'agent causal n'est pas encore identifié mais transmissible par greffage. Ces maladies se caractérisent par le développement d'un symptôme typique au printemps qui consiste en la formation de nouvelles feuilles avec une mosaïque caractéristique en feuille de chêne. Ces maladies sont détectées uniquement par l'indexage biologique en utilisant l'indicateur ligneux Dweet tangor (*C. reticulata* x *C. sinensis*) (Roïstacher, 1991).

III.1.6.1. Cristacortis

La maladie de Cristacortis est une maladie transmissible par greffage présumée être causée par un virus des agrumes non caractérisé (Roïstacher, 1991). Il a été signalé pour la première fois en Corse (Vogel and Bové, 1968) et a également été signalé en Italie, en Espagne, en Afrique du Nord, en Turquie, à Maurice et à Sau Paulo au Brésil (Lee, 2014), et dans plusieurs pays du Bassin méditerranéen. Elle affecte un grand nombre d'espèces d'agrumes particulièrement le tangelo, le bigaradier, l'oranger et le mandarinier (Praloron, 1971; Roïstacher, 1991). La maladie est caractérisée par des dépressions verticales ou des poches dans le bois (Figure 11), Des imprégnations gommeuses se produisant au bas de la dépression lorsque l'écorce est coupée (Praloron, 1971; Roïstacher, 1991 ; Lee, 2014).



Figure 11 : Symptômes de cristacortis sur mandarinier greffé sur bigaradier (Roïstacher, 1991).

Les symptômes semblent similaires au stem pitting causées par certaines souches de CTV, observés sur des porte-greffes d'oranger amer, et sur des mandarines tandis que les symptômes foliaires sont une mosaïque caractéristique en feuille de chêne, similaires à ceux produits par le CPsV. La propagation naturelle de ce virus n'a pas été signalée (Lee, 2014).

III.1.6.2. Impietratura

Elle se caractérise par la présence de taches (Figure 12_a) et des poches de gomme dans l'albédo des fruits (Figure 12_b). Certains présentent extérieurement des bosses en relief qui sont durs au toucher d'où le nom d'impietratura (consistance de pierre) (Praloron, 1971).

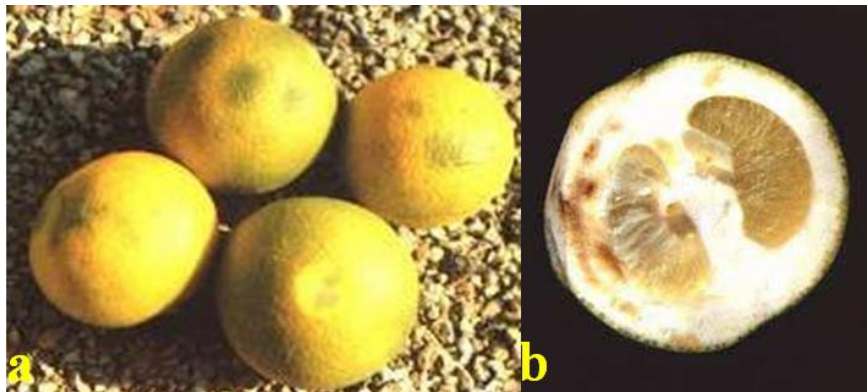


Figure 12 : Symptômes d'impietratura sur fruits : (a) Taches sur fruits ; (b) Poches de gomme dans l'albédo des fruits (Roïstacher, 2010).

La maladie d'impietratura est une maladie transmissible par greffage causée par un virus des agrumes non caractérisé (Roïstacher, 1991 ; Caruso *et al.*, 1993). Elle a été observé pour la première fois en Palestine (Reichert et Hellinger, 1930) et décrite par Ruggieri en 1955. La maladie a été rencontrée dans la plupart des pays du Bassin méditerranéen. Les feuilles des arbres touchés ressemblent à celles de chêne et présentent un éclaircissement des nervures au printemps. Les fruits symptomatiques présentent des poches de gomme dans l'albédo qui apparaissent comme de petits bosses à la surface. La plupart des variétés présentent des symptômes, tandis que les citrons semblent être plus tolérants. La maladie entraîne une chute des fruits et de nombreux fruits ne sont pas commercialisables, car ils sont petits, déformés et durs. Une diminution de la vigueur de l'arbre avec un feuillage légèrement fané a été également rapportée. La maladie est non transmissible par graine ou par vecteur (Roïstacher, 1991).

III.1.6.3. Maladie de concavité gommose (Concave gum disease) « CGD »

Est une maladie d'étiologie inconnue, bien qu'elle soit transmise par greffage. Le CGD a été signalé pour la première fois en 1936 (Fawcett, 1936). La concavité gommeuse est une maladie très répandue dans la région méditerranéenne. Elle affecte l'oranger, le mandarinier, le tangor et tangelo (Roïstacher, 1991).

La maladie est caractérisée par des concavités sur le tronc et les branches, avec des dépôts remplis de gomme dans le bois sous les concavités. L'écorce se fissure occasionnellement avec formation d'exsudat de gomme (Powell *et al.*, 1998). Les symptômes se manifestent par le développement de feuilles de chêne autour de la nervure médiane (Figure 13a) et une coloration interne du bois au niveau du tronc ainsi que de la gommose sur les branches (Figure 13b,c) (Roïstacher, 1991).



Figure 13 : Symptômes caractéristiques de la concavité gommose : (a) Symptôme de feuille de chêne ; (b) Des anneaux concentriques de gomme, sur un rameau (c) Des concavités profondes sur tronc (Roïstacher, 2010).

III.2. Viroïdes des agrumes

Les viroïdes d'agrumes sont un groupe de bas poids moléculaire (371-330 nt), circulaire. Ils s'agit de molécules d'ARN infectieuses qui provoquent divers symptômes chez les agrumes et d'autres espèces apparentées (Duran-Vila *et al.*, 1988 ; Brlansky and Timmer, 2014). Les viroïdes sont facilement transmis mécaniquement (Roïstacher, 1991). Aucun vecteur n'a été signalé (Lee, 2014).

III.2.1. *Citrus Exocortis Viroïd (CEVd)*

Le *CEVd* a été le premier viroïde des agrumes décrit (Roïstacher, 1991). Ce viroïde est associé à la décortication de l'écorce des arbres cultivés sur *P. trifoliata* ou sur ses hybrides (Citranges et Citrumelos) (Figure 14), et peut causer le nanisme des arbres greffés sur ces porte-greffes. Le *CEVd* est le plus gros viroïde des agrumes qui produit les symptômes les plus prononcés de l'épinastie foliaire, rabougrissement et nécroses de nervures médianes des feuilles (Lee, 2014).



Figure 14 : Symptômes d'exfoliation d'écorce induits par le *CEVd* sur *P. trifoliata* (Roïstacher, 1991).

III.2.2. Cachexie

Cachexie, anciennement appelée xyloporose (Childs, 1950), a été démontré pour la première fois comme viroïde-like en 1980 lorsque Roïstacher *et al.* (1980) ont démontré la capacité de transmettre mécaniquement la maladie et a constaté que la thérapie n'élimine pas le pathogène. La cachexie provoque le nanisme et la faible croissance du tangelo, de la mandarine et du *Citrus macrophylla* utilisés comme greffons ou porte-greffes. Sur les arbres sensibles, la cachexie provoque des dépressions sur le bois de l'arbre (Figure 15) (Serra *et al.*, 2007).



Figure 15 : Symptômes de Cachexie induit par *CCaVd* : Production intense de gommose sur le tronc de mandarinier Parson's special (Roïstacher, 1991).

III.3. Procaryotes limités au phloème

III.3.1. Greening ou Huanglongbing (HLB)

Le HLB, également connu sous le nom de maladie du verdissement des agrumes, est peut-être la maladie la plus importante dans les zones où le vecteur et la maladie sont présents (Bové, 2006). Les symptômes sont caractérisés par des marbrures asymétriques des feuilles (Figure 16_a), fréquemment, les nervures médianes des feuilles sont jaunies, et dégénérescence des tubes criblés du phloème et dépérissement du couvert végétal. Une fois que l'arbre est presque totalement infecté, l'arbre produira de pousses jaunes caractéristiques de HLB. Les fruits symptomatiques sont asymétriques, généralement contiennent des graines avortées et ont une saveur désagréable (Figure 16_b). La production est réduite, le fruit symptomatique est petit et tombe souvent prématurément, ainsi que sur 2 à 3 ans l'arbre meurt (Lee, 2014).

Trois formes de HLB ont été identifiées :

La forme Asiatique qui est associée avec *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las); la forme Africaine qui est associée à *Candidatus L. africanus* (Laf); la forme Américaine qui est associée à *Candidatus L. americanus* (Lam) (Jagoueix *et al.*, 1994 ; Teixeira *et al.*, 2005). La forme asiatique de HLB exprime les symptômes à des températures très élevées, alors que la forme africaine exprime des symptômes sévères sous des températures plus fraîches, tandis que la forme américaine, les symptômes sont exprimés sous des températures plus fraîches et les périodes prolongées des températures plus chaudes éliminent la maladie des plantes infectées (Lopes *et al.*, 2009). Il existe deux psylles vecteurs du HLB: *Diaphorina citri* (Figure 16_c) et *Trioza erytreae* (Figure 16_d) (Bové, 2006).

Les deux espèces vectrices peuvent transmettre soit la forme asiatique ou la forme africaine de HLB, et *D. citri* s'est avéré transmettre la forme américaine au Brésil (Bové, 2006 ; Lopes *et al.*, 2010). *T. erytreae* se trouve principalement en Afrique, tandis que *D. citri* se trouve en Afrique du Nord, en Asie et en Amérique. Selon Bové (2006), *D. citri* est le vecteur le plus efficace.

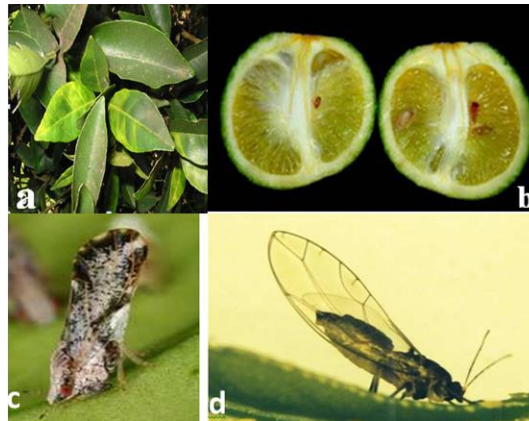


Figure 16 : Symptômes du greening : (a) Marbrures sur feuilles ; (b) Fruit de pamplemoussier atteint du greening; (c) *Diaphorina citri* ; (d) *Trioza erythrae* (Bové, 2006)

III.3.2. Stubborn disease

Le stubborn a été décrit pour la première fois en 1944 en Californie. Il est maintenant connu d'être causée par un Mollicute hélicoïdal *Spiroplasma citri* (Saglio *et al.*, 1973 ; Bové *et al.*, 2002) dont le génome a été séquencé (Ye *et al.*, 1992). Le stubborn provoque un retard de croissance, d'où le nom stubborn, car les plantes infectées ne poussent pas (Roïstacher, 1991). Les fruits sont souvent déséquilibrés, de petite taille avec des graines avortées. L'inversion de la couleur est souvent observée avec l'extrémité stylière verte et l'extrémité pédonculaire montrant la couleur orange. Les feuilles sont petites, en cuillère et dissymétriques, et peuvent aussi montrer des marbrures. La plupart des variétés et cultivars d'agrumes sont sensibles au stubborn (Lee, 2014). Le stubborn est transmis par plusieurs cicadelles vecteurs : *Circulifer tenellus* et *Scaphytopius nitridus* qui sont commun en Californie et Arizona, et *C. haematoceps* (syn. *Neoliturus haematoceps*) dans la région méditerranéenne (Calavan and Bové, 1989). Le stubborn n'a pas été signalé dans les régions tropicales ou subtropicales (Lee, 2014).

Chapitre IV : Etude de *Spiroplasma citri*

IV.1. Mollicutes

A la fin du XIX^{ème} siècle, Nocard et Roux cultivent pour la première fois *Mycoplasma mycoïdes* (*M. mycoïdes*), l'agent responsable de la péripneumonie contagieuse bovine. Ce microorganisme est d'une telle ténuité qu'il est difficile d'en déterminer la forme exacte et sa culture nécessite l'addition de sérum animal dans le milieu (Nocard et Roux, 1898). Dujardin-Beaumetz décrit par la suite sa capacité à passer à travers les filtres bactériens et à former des colonies de morphologie caractéristique en « œufs sur le plat » sur milieu solide (Dujardin-Beaumetz, 1900). C'est Nowak qui, suite à l'observation des formes mycéliennes qui apparaissent à certains stades de la culture du microorganisme, a proposé le nom de mycoplasme. En 1960, l'ultrastructure des mycoplasmes a été étudiée par microscopie électronique: ces organismes n'ont pas de paroi et sont uniquement délimités par une membrane cytoplasmique (Van Iterson et Ruys, 1960). En 1967, Edward et Freundt ont proposé de regrouper ces microorganismes au sein de la classe des Mollicutes.

IV.1.1. Taxonomie

Selon la classification taxonomique, la classe des Mollicutes (Edward et Freundt, 1967) est constituée de plusieurs centaines d'espèces réparties en 4 ordres (Tully *et al.*, 1993), 5 familles et 8 genres (Razin *et al.*, 1998).

L'ordre des Mycoplasmatales ne contient qu'une seule famille, les Mycoplasmataceae. Cette famille polyphylétique comprend 2 genres, *Mycoplasma* et *Ureaplasma*, qui regroupent l'essentiel des Mollicutes pathogènes de l'homme ou des animaux. La comparaison des classifications taxonomiques et phylogénétiques révèle la nature paraphylétique du genre *Mycoplasma*. Ainsi, les 6 mycoplasmes du complexe d'espèces *Mycoplasma mycoïdes* forme un groupe phylogénétique cohérent avec les spiroplasmes, alors qu'ils sont classés selon la taxonomie, dans des ordres distincts. D'un point de vue métabolique, les Mycoplasmatales ont besoin de cholestérol pour leur croissance et les bactéries du genre *Ureaplasma* sont les seuls Mollicutes connus capables d'hydrolyser l'urée (Tableau I).

L'ordre des Entomoplasmatales se compose de 2 familles : les Entomoplasmataceae représentées par 2 genres, *Entomoplasma* et *Mesoplasma* respectivement dépendant et indépendant du cholestérol pour leur croissance (Tully *et al.*, 1993 ; Tully *et al.*, 1994), dont les membres, isolés à partir d'invertébrés ou de la surface de plantes, sont des bactéries non hélicoïdales et les Spiroplasmataceae qui ne comprennent qu'un seul genre, *Spiroplasma*. Les spiroplasmes sont caractérisés par leur morphologie hélicoïdale et leur motilité, présentant des exigences plus ou moins strictes en stérol. Les habitats des spiroplasmes sont les invertébrés, la surface des plantes et les tubes criblés du phloème.

L'ordre des Acholeplasmatales est constitué d'une seule famille Acholeplasmataceae ne comprenant elle-même qu'un seul genre, *Acholeplasma*. Certains sont pathogènes pour l'animal. La plupart des Acholeplasmes ne nécessite pas de cholestérol pour leur croissance (Yamao *et al.*, 1985 ; Blanchard *et al.*, 1990 ; Citti *et al.*, 1992 ; Navas-Castillo *et al.*, 1992).

Enfin, l'ordre des Anaeroplasmatales qui comprend une seule famille Anaeroplasmataceae et 2 genres, *Anaeroplasma* et *Asteroplasma*. Les quatre espèces du genre *Anaeroplasma* nécessitent du cholestérol contrairement à la seule espèce d'*Asteroplasma*, *Asteroplasma anaerobium* (Tully *et al.*, 1993 ; Tully *et al.*, 1994). Des analyses phylogénétiques ont montré qu'*Asteroplasma anaerobium* ne fait pas partie de l'arbre monophylétique comprenant les autres Mollicutes et la position phylogénétique de cette espèce est encore incertaine.

De nombreux Mollicutes n'ont pas encore été cultivés en milieu acellulaire. De ce fait, leur statut taxonomique n'a pu être établi selon les standards minimaux de définition d'espèce. C'est en particulier le cas des phytoplasmes, anciennement désignés *Mycoplasma Like Organisms* (MLO), qui constituent la majorité des Mollicutes phytopathogènes. En 1995, Murray et Stackebrandt ont proposé le statut provisoire *Candidatus* pour les organismes non cultivés mais partiellement caractérisés au niveau génétique et phénotypique (Murray et Stackebrandt, 1995 ; Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes, 1995).

Tableau I : Taxonomie et caractéristiques des genres de la classe des Mollicutes (Tully *et al.*, 1993; Razin *et al.*, 1998)

Ordre	Famille	Genre	Nombre d'espèces	Taille des génomes	Moles % en bases G+C	Besoin en cholestérol	Caractéristiques phénotypiques	Habitat
I <i>Mycoplasmatales</i>	{ <i>Mycoplasmataceae</i>	{ <i>Mycoplasma</i>	107	580-1350	23-40	oui	Croissance optimale à 37°C	Homme, animaux
		{ <i>Ureaplasma</i>	7	760-1170	27-30	oui	Hydrolyse de l'urée	Homme, animaux
II <i>Entomoplasmatales</i>	{ <i>Entomoplasmataceae</i>	{ <i>Entomoplasma</i>	6	790-1140	27-29	oui	Croissance optimale à 30°C	Insectes, plantes
		{ <i>Mesoplasma</i>	12	870-1100	27-30	non	Croissance optimale à 30°C	Insectes, plantes
	{ <i>Spiroplasmataceae</i>	{ <i>Spiroplasma</i>	36	780-2220	24-31	oui	Croissance optimale à 30-37°C Morphologie hélicoïdale	Insectes, plantes
III <i>Acholeplasmatales</i>	{ <i>Acholeplasmataceae</i>	{ <i>Acholeplasma</i>	14	1500-1650	26-36	non	Croissance optimale à 30-37°C	Animaux, plantes
IV <i>Anaeroplasmatales</i>	{ <i>Anaeroplasmataceae</i>	{ <i>Anaeroplasma</i>	4	1500-1600	29-34	oui	Anaérobies strictes	Ruminants
		{ <i>Asteroplasma</i>	1	1500	40	non	Anaérobies strictes	Ruminants
Taxonomie non définie		' <i>Candidatus</i> <i>Phytoplasma</i> '	28 groupes	530-1350	21-29		Non disponibles en culture	Insectes, plantes

IV.1.2. Origine Eubactérienne des Mollicutes

Les Mollicutes sont une branche de l'arbre phylogénétique des bactéries à gram positifs, leurs principales caractéristiques révèlent une évolution régressive par réduction du génome (Bové et Garnier, 1997). La réduction du génome a résulté en particulier de la perte des gènes nécessaires à la synthèse d'une paroi, propriété unique et caractéristique de cette classe bactérienne, (Mollicute vient du latin molli/cutis, peau molle) et dans la perte de nombreuses capacités métaboliques (synthèse des acides aminés, des acides gras,...) (Garnier *et al.*, 2000).

IV.1.3. Phylogénie

L'origine et la phylogénie des Mollicutes constituèrent un sujet controversé pendant de nombreuses années. En raison de la faible taille de leur génome ainsi que de leur simplicité générale. Les Mollicutes ont initialement été considérés comme les descendants d'un organisme primitif ayant divergé précocement dans l'évolution des procaryotes. Cette hypothèse fut progressivement abandonnée à mesure que les études biophysiques et biochimiques menées sur ces organismes révélaient, qu'en dépit de la petite taille de leur génome, leur biologie diffère peu de celle des autres procaryotes. En 1980, les premières analyses phylogénétiques des Mollicutes, basées sur les séquences d'oligonucléotides d'ARNr 16S, ont conduit Woese et ses collaborateurs à conclure que les Mollicutes ne dérivent pas d'un ancêtre « prébactérien » primitif mais trouvent leur origine dans le sous-groupe *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* des bactéries Gram-positives à faible pourcentage en G+C (Woese *et al.*, 1980). Deux décennies plus tard, des analyses phylogénétiques approfondies, rendues possibles par la disponibilité de nouvelles données de séquences, ont permis à Maniloff de proposer le scénario évolutif suivant : les Mollicutes seraient issus d'un ancêtre commun ayant divergé de la branche phylogénétique *Streptococcus* il y a 605 millions d'années. Ce Mollicute ancestral, dont la taille du génome a été estimé à 2 000 kpb, présentait probablement de fortes similarités avec les Acholéplasmies (dépourvu de paroi, aérobie facultatif, métaboliquement proche des streptocoques). Il y a 470 millions d'années, cette branche phylogénétique nommée (Acholeplasmataceae, Anaeroplasmataceae, Phytoplasma) se serait scindée en deux pour donner naissance à la branche SEM (Spiroplasmataceae, Entomoplasmataceae, Mycoplasmataceae). Les branches AAP et SEM auraient par la suite évolué indépendamment. La conversion du codon stop UGA en codon tryptophane ainsi que

le besoin en stérols pour la croissance constitueraient des évènements précoces de l'évolution de la branche SEM. Soixante millions d'années plus tard la branche SEM se serait divisée en deux branches, la branche des Mycoplasmataceae d'une part et la branche des Spiroplasmataceae et des Entomoplasmataceae d'autre part. Ces deux dernières familles auraient finalement divergé il y a 170 millions d'années. D'après ce scénario, des réductions successives de génomes chez les Mollicutes auraient eu lieu de manière indépendante dans chaque branche. Bien que les génomes des Mollicutes continuent d'évoluer et poursuivent leur processus de réduction, une taille de 600-800 kpb semble constituer la limite inférieure du contenu génomique chez les mycoplasmes (Maniloff, 2002). A partir des premières analyses phylogénétiques basées sur des ARNr, il a été suggéré que les Mollicutes évoluent plus rapidement que les autres bactéries (Woese *et al.*, 1984). Cette vitesse d'évolution rendrait compte de leur positionnement sur les plus longues branches de l'arbre de la vie universel (Figure 17) (Ciccarelli *et al.*, 2006).

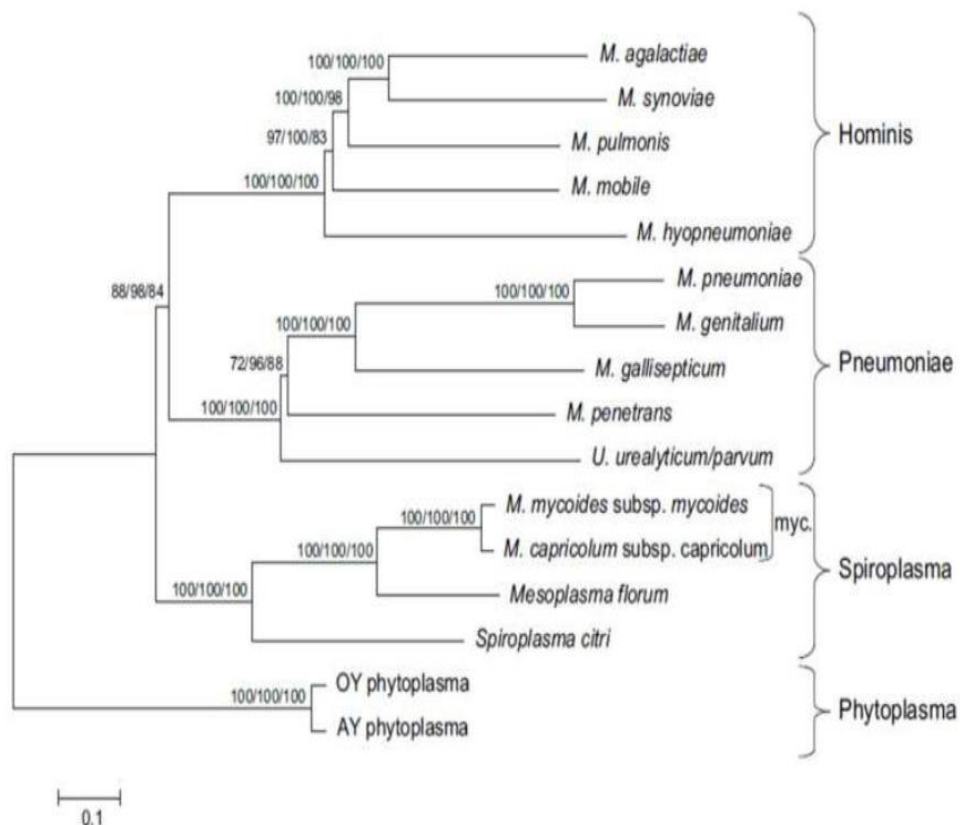


Figure 17 : Arbre phylogénétique des Mollicutes (d'après Sirand-Pugnet *et al.*, 2007) .

Les valeurs de *bootstrap* indiquées correspondent à 100 répliques (plus proche voisin/Parcimonie/Evolution minimale). La barre d'échelle indique le nombre de substitution par position.

IV.1.4. Mollicutes phytopathogènes

En 1967, Doi *et al.* ont observé pour la première fois des organismes ressemblant aux mycoplasmes dans les tubes criblés d'une plante malade (Doi *et al.*, 1967). Ces organismes pléomorphes furent désignés MLO. D'un point de vue taxonomique, les Mollicutes phytopathogènes appartiennent à deux genres : le genre "*Candidatus Phytoplasma*", phylogénétiquement proches des acholéplasmes, et le genre *Spiroplasma*. Le genre *Spiroplasma* regroupe plusieurs dizaines d'espèces isolées de plantes ou d'insectes, réparties en 34 groupes sérologiques et 14 sous-groupes (Williamson *et al.*, 1998). Seules trois espèces sont phytopathogènes : *Spiroplasma citri*, *Spiroplasma kunkelii* et *Spiroplasma phoeniceum*. Ce sont à l'heure actuelle les seuls Mollicutes phytopathogènes disponibles en culture pure. Les Mollicutes pathogènes de plantes se multiplient exclusivement dans les tubes criblés du phloème qui conduisent la sève élaborée, enrichie en produits de la photosynthèse (Breton, 2009).

IV.2. Spiroplasmes phytopathogènes

IV.2.1. *Spiroplasma phoeniceum* et *Spiroplasma kunkelii*

Spiroplasma phoeniceum a été isolé en 1986 de pervenches de Madagascar atteintes de jaunisse provenant de Syrie (Saillard *et al.*, 1987). Il provoque des symptômes très similaires à ceux observés sur des plantes infectées par *S. citri*. Il appartient au séro groupe I-8 de la dernière classification des spiroplasmes établie en 1998 (Williamson *et al.*, 1998). Son génome de 1860 kpb (Carle *et al.*, 1995) possède 26% de bases G+C (Saillard *et al.*, 1987). Son optimum de croissance dans un milieu riche en cholestérol est de 32°C. *S. kunkelii* (séro groupe I-3), observé pour la première fois en 1972, est l'agent responsable de la maladie du rabougrissement du maïs ou « corn stunt », une maladie qui s'étend depuis le Sud des Etats-Unis jusqu'en Argentine. *S. kunkelii*, cultivé pour la première fois en 1975 (Chen and Liao, 1975; Whitcomb and Williamson, 1975) a été caractérisé en 1986. Son génome, partiellement séquencé, est constitué d'un chromosome circulaire de 1610 kpb (Carle *et al.*, 1995) et possède 26% de bases G+C (Whitcomb *et al.*, 1986).

IV.2.2. *Spiroplasma citri*

IV.2.2.1. Maladie du stubborn des agrumes et découverte de *Spiroplasma citri*

La première description de cette maladie sur orangers remonte aux années 1915-1917, en Californie. Les arbres atteints montraient un « entêtement » à ne pas croître, d'où le nom de stubborn, signifiant « entêté », donné à cette pathologie. Dans les années 1930, une épidémie de « maladie des petites feuilles », similaire au stubborn Californien, se déclara en Palestine avant de s'étendre à l'ensemble du Maghreb. Au plus fort de l'épidémie, à la fin des années 1960, un million d'arbres étaient atteints en Californie et en Arizona (Calavan et Bové, 1989).

En 1970, deux équipes ont mis en évidence, par des techniques de microscopie électronique, la présence d'un MLO dans les tubes criblés d'oranger atteints de stubborn ainsi que la rémission de la plante malade après traitement par la tétracycline (Igwegbe et Calavan, 1970; Laflèche et Bové, 1970). Ce résultat démontrait la nature procaryotique de l'agent étiologique du stubborn des agrumes. Peu de temps après, la bactérie responsable du stubborn a été obtenue en culture pure, à partir d'orangers malades, dans un milieu riche, complété en sérum animal, inspiré des milieux de culture utilisés pour les mycoplasmes animaux (Saglio *et al.*, 1971). *S. citri* est également l'agent causal de la maladie des racines cassantes du radis noir, *Armoracia rusticana*, aux Etats-Unis. Les symptômes sont une déformation et une chlorose des feuilles, une nécrose marginale, un raccourcissement des entre-nœuds, une perte de la flexibilité racinaire, un arrêt de la croissance et un flétrissement de la plante qui meurt quelques semaines après l'infection (Fletcher *et al.*, 1981).

IV.2.2.2. Répartition géographique du stubborn

Le stubborn des agrumes est largement répandue dans le Sud des États-Unis d'Amérique, l'Afrique du Nord, les pays méditerranéens et l'Asie du Sud-Est, y compris l'Arizona, la Californie, l'Illinois et le Maryland aux États-Unis d'Amérique, France, Grèce, Italie, Espagne, Libye, Algérie, Chypre, Égypte, Iran, Irak, Jordanie, Liban, Palestine, Maroc, Oman, Arabie Saoudite, Syrie, Tunisie, Turquie, Pakistan, Yémen et Émirats Arabes Unis dans les régions méditerranéennes et du Moyen-Orient, Mexique et Malaisie (Bové, 1995 ; Nejat *et al.*, 2011). La maladie ne semble pas poser de problème dans les régions froides ou

les régions à climat chaud et humide (Whiteside *et al.*, 1988). Bien qu'il existe *Spiroplasma citri* dans les zones équatoriales et peut causer des symptômes sévères et maladies létales sur d'autres plantes hôtes (Nejat *et al.*, 2011).

IV.2.2.3. Incidence économique

La maladie du stubborn est la maladie la plus destructive dans la plupart des pays où les *Citrus* se développent sous conditions (chaudes, sèches) ou conditions (arides ou semi-arides). Il est considéré comme une maladie endémique dans les pays à climat doux du pourtour méditerranéen et ceux de l'Asie Occidentale (Turquie, Irak, et Iran) (Bové, 1995). Cette maladie induit des effets néfastes en compromettant la production et en diminuant la longévité de l'arbre occasionnant ainsi une réduction de la production allant de 50% à 100% (Khemiri, 2000). La maladie est importante en Arizona et Californie. En Arizona le stubborn est particulièrement décelé sur Washington navel (Olsen, 2000). En Californie, les principaux hôtes économiques sont : L'oranger, grappe fruits, et les tangelos des quels 5 à 10% d'arbres sont estimés d'être affectés. Dans la région méditerranéenne, le stubborn est très sévère dans quelques pays surtout en Syrie où le vecteur *N. haematoceps* est commun (Vignault *et al.*, 1980 ; Bové, 1986). L'Irak et la Turquie sont deux autres pays où la maladie est rapportée pour être répandu et importante. Dans les autres pays méditerranéens (Chypre, Egypte, Jordanie, Maroc) la maladie est présente mais rarement sur certains cultivars. Dans d'autres (Libye, Tunisie) le stubborn était rapporté d'être commun dans le passé mais les prospections et les études trouvent peu ou pas d'arbres avec des symptômes caractéristiques (Bové, 1986). En Algérie, des études ont permis de confirmer la présence du stubborn dans différentes stations agrumicoles (Benazzouz, 2007).

IV.2.2.4. Symptômes de la maladie du stubborn

Les symptômes causés par *S. citri* diffèrent d'une espèce à l'autre et semblent être associés à des perturbations dans la répartition du fructose et du glucose dans la plante (Gaurivaud *et al.*, 2000). En effet, le catabolisme du fructose entraîne d'une part une acidification au niveau du phloème et, d'autre part, une mauvaise répartition des sucres entre les organes sources (feuilles matures) et les organes puits (racines et jeunes feuilles) dans la plante (Lerchl *et al.*, 1995). Hormis le catabolisme du fructose, aucun facteur de virulence n'a été identifié chez *S. citri* (Eliautout, 2014).

Les agrumes atteints du stubborn présentent des symptômes caractéristiques. La réduction des entre-nœuds donne à l'arbre un aspect buissonnant (Figure 18), Les fruits sont déformés avec columelle courbée (Figure 19_a) et pépins avortés ou nécrosés (Figure 19_b), les feuilles sont de petite taille et en forme de cuillère (Figure 19_c) (Bové, 1995 ; Breton, 2009). En conditions très chaudes, les feuilles de certaines pousses peuvent avoir leurs extrémités déformées, pointues ou jaunes et en forme de cœur (critère de diagnose très caractéristique). Les pousses peuvent être anormalement groupées et le développement de bourgeons axillaires peut entraîner l'apparition de balais de sorcières (Figure 20_a) (Lafèche et Bové, 1970). Une inversion de la coloration est également observée au cours de la maturation des fruits : la couleur orange apparaît du côté pédonculaire et non pas styloïde (Figure 20_b). Ces différents symptômes ne sont généralement pas observés simultanément sur le même arbre (Bové, 1995 ; Breton, 2009).



Figure 18 : Symptômes du stubborn : A droite : Arbre rabougris, à gauche: Arbre sain (INRA, Bordeaux) (Bové, 1995)

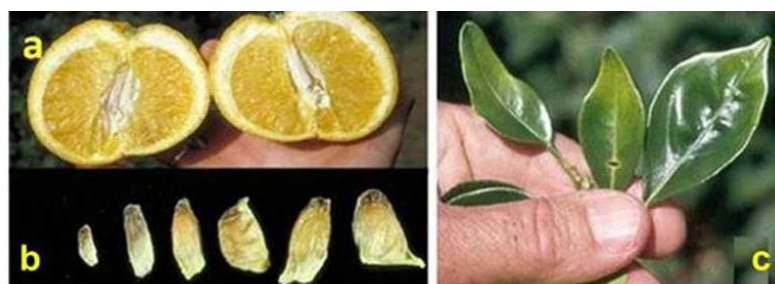


Figure 19 : Symptômes de stubborn : (a) Fruits déformé ; (b) Pépins avortés et nécrosés ; (c) Petites feuilles en forme de cuillère (Roïstacher, 2010).

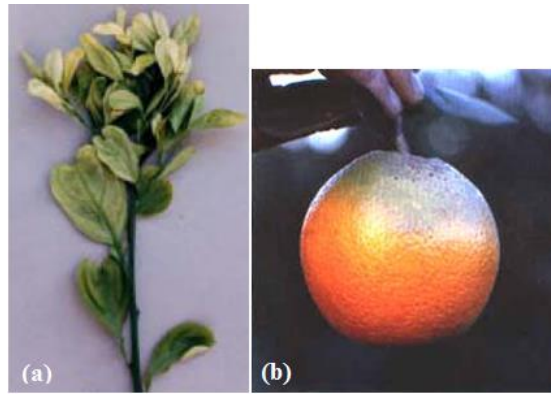


Figure 20 : Symptômes du stubborn : **(a)** Prolifération des bourgeons axillaires ; **(b)** Inversion de la coloration : couleur orangée à l'extrémité pédonculaire et verte à la partie styloïde (Algérie) (Bové, 1995).

Le nom « stubborn » (entête) provient de la persistance des symptômes originels d'un arbre lorsque l'on greffe en-tête des greffons sains. *S. citri* infecte les tubes criblés du phloème de leurs hôtes. Le pathogène persiste dans les arbres affectés jusqu'à leur mort (Smith *et al.*, 1992). La maladie peut apparaître à n'importe quel stade de vie de l'arbre, et la sévérité des symptômes varie d'année en année (Olsen *et al.*, 2000).

Les symptômes les plus évidents du stubborn sont des arbres infectés plus ou moins rabougris, présentent un aspect buissonnant, et ont un faible rendement de fruits anormalement petits, La production de fruits tend à être supprimée sur les arbres touchés, ils peuvent être dissymétriques (Bové, 1984 ; 1988) et présenter des inversions de couleur.

IV.2.2.5. Caractéristiques de *Spiroplasma citri*

Le genre *Spiroplasma* rassemble des microorganismes de 100 à 200 nm de diamètre sur 3 à 5 μm de longueur (Figure 21), caractérisés par un génome de 580 à 2200 kpb, à faible teneur en G-C (24 à 41%) (Williamson *et al.*, 1998).

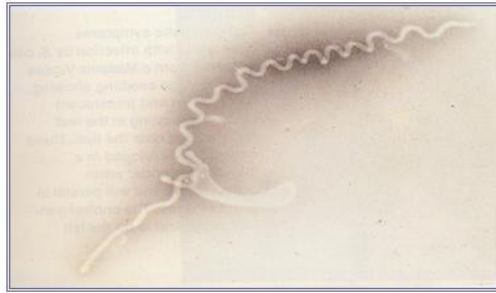


Figure 21 : Particule de *Spiroplasma citri* observée au microscope électronique (Roïstacher, 1991).

S. citri infecte les tubes criblés du phloème de ses plantes-hôtes. Le pathogène reste dans les arbres atteints pendant leur déclin. Le développement du spiroplasma est maximal sur agrumes dans des conditions chaudes (28-32°C) et peut ne pas donner de symptômes nettement visibles à de plus basses températures (Bové, 1986).

Les spiroplasmes se distinguent des autres Mollicutes par leur morphologie hélicoïdale et leur motilité. Bien que dépourvus de flagelle ou de filament axial, les spiroplasmes possèdent des mouvements de flexion et de rotation (Cole *et al.*, 1973 ; Trachtenberg *et al.*, 2003). Cette motilité se traduit, sur milieu solide, par la formation de colonies diffuses entourées de colonies satellites (en œuf sur plat) (Figure 22_a). Par ailleurs, des travaux ont mis en évidence l'existence d'un chimiotactisme pour les sucres et les acides aminés (Daniels *et al.*, 1980). La croissance de *S. citri* s'effectue par allongement d'une hélice élémentaire, constituée de deux tours d'hélices, donnant une hélice parentale à quatre tours. L'hélice parentale se divise ensuite, par constriction, en deux hélices élémentaires (Garnier *et al.*, 1984). Le temps de génération de *S. citri* cultivé dans le milieu SP4 est d'environ 6 heures.

La culture de *S. citri* nécessite un milieu riche, généralement additionné de sérum animal (Figure 22_b) (Chang *et al.*, 1994). Ainsi, il a été établi que sa culture nécessite l'ajout de cholestérol, d'acide gras, en particulier de phosphatidylcholine, de vitamines, de co-facteurs (acide folique, acide *p*-aminobenzoïque, niacine,...etc.), d'acides aminés sauf les acides aspartique et glutamique, de bases nucléiques et d'une source de carbone. Les sucres fermentés par *S. citri* sont le glucose, le fructose et le tréhalose; les autres sucres comme le mannose, raffinose ou le sorbitol ne sont pas utilisés (Freeman *et al.*, 1976 ; Whitcomb, 1983 ; André et Renaudin, résultats non publiés *in* Breton, 2009).

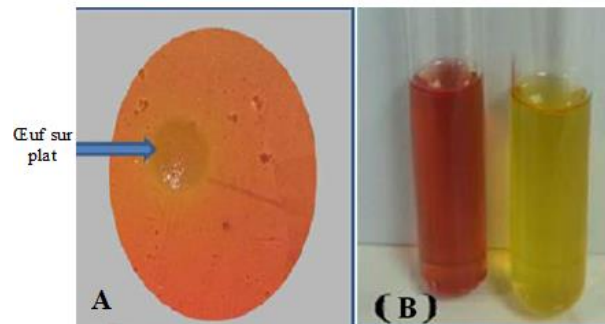


Figure 22 : Culture de *S. citri* : (A) colonies en forme d'œufs de *S. citri* sur milieu solide C-3G (X 200) ; (B) Changement de la couleur du milieu liquide de culture allant du rouge au jaune, indique la présence de croissance de *S. citri* (Abd El-Fatah *et al.*, 2016)

IV.2.2.6. Classification de *Spiroplasma citri*

L'agent du stubborn, *S. citri*, depuis 1973, a été le premier Mollicute issu de plante, à avoir été cultivé, caractérisé et nommé spiroplasma. *S. kunkelli* et *S. phoeniceum* sont les deux autres spiroplasmes phytopathogènes connus aujourd'hui. Le genre *Spiroplasma* est l'unique genre de la famille des Spiroplasmataceae du domaine des Bacteria, Phylum des Tenericutes, classe des Mollicutes ou des Eubacteria, et de l'ordre des Entomoplasmatales, (Tully *et al.*, 1987 ; Roistacher, 1988 ; Budbury, 1991 ; Young *et al.*, 1996; Williamson *et al.*, 1998 ; Gasparich, 2002 ; Joffin, 2004).

IV.2.2.7. Caractéristiques sérologiques

Parmi les Mollicutes des plantes seulement les spiroplasmes ont été mises en culture in-vitro avec succès, en permettant la production d'antisérum très spécifique pour leur découverte sérologique et identification (Bové, 1995).

Les spiroplasmes sont classés dans 38 groupes sur la base de critères essentiellement sérologiques (inhibition de croissance par sérum immun de lapin et test de déformation des spiroplasmes), génomiques (hybridation d'ADN génomique, ARN 16S) et métaboliques (hydrolyse de l'arginine) (Brown *et al.*, 2007). Parmi les 38 groupes identifiés, *S. citri* appartient au groupe I-1.

IV.2.2.8. Biologie moléculaire de *Spiroplasma citri*

Depuis 2010, 92% de la séquence du génome de *S. citri* GII3 sont connus (Carle *et al.*, 2010). Ce génome se compose d'un chromosome de 1820 kpb avec 26% de bases G+C et de sept plasmides (pSciA et pSci1 à 6) qui ne possèdent pas d'homologues connus (Saillard *et al.*, 2008). La taille de ces plasmides varie de 7,8 kpb pour le pSciA à 35,3 kpb pour le pSci6 et leurs nombres de copies par spiroplasmes ont été estimés entre 10 et 14. L'ADN plasmidique représenterait ainsi près de 1,6 Mpb soit 47% de l'ADN total de *S. citri* GII3. Les pSci1-6 possèdent un pourcentage en G+C (25,6 à 29%) proche de celui du chromosome (26%) alors que le pSciA à un pourcentage plus faible de 21,3% (Breton *et al.*, 2008).

IV.2.2.9. Déterminants génétiques de la transmission de *Spiroplasma citri*

La spiraline est la protéine immunodominante majoritaire de la membrane (Whitcomb *et al.*, 1983) et sa séquence est très conservée dans toutes les souches de spiroplasmes. Elle est ancrée par une *N*-acyl-glycéril-cystéine dans le feuillet lipidique externe de la membrane, la chaîne polypeptidique étant exposée à la surface du spiroplasma. En raison de cette localisation membranaire, la spiraline a été considérée comme une protéine potentiellement impliquée dans la transmission par insecte (Duret *et al.*, 2003). L'étude des interactions entre les protéines du spiroplasma et celles de l'insecte vecteur a montré que la spiraline se comportait comme une lectine capable de lier les résidus glycosylés présent à la surface des cellules en culture et des glandes salivaires de *C. haematocep* (Duret *et al.*, 2003 ; Killiny *et al.*, 2005 ; Duret *et al.*, 2014). La Sc76 est une lipoprotéine associée à un ABC transporteur. Cette protéine serait impliquée dans la colonisation des glandes salivaires de *C. haematoceps* (Boutareaud *et al.*, 2004). Enfin les protéines P32 et PGK sont également impliquées dans l'interaction entre *S. citri* et les cellules des glandes salivaires de l'insecte (Killiny *et al.*, 2006 ; Labroussa *et al.*, 2010, 2011). Ainsi, la spiraline n'est pas essentielle pour la pathogénie et la mobilité, mais elle est requise pour une transmission efficace du spiroplasma par l'insecte vecteur.

IV.2.2.10. Transmission de *Spiroplasma citri*

S. citri est transmis de plante à plante par des insectes vecteurs, piqueurs suceurs de sève élaborée, de l'ordre des Hemiptera, et la famille des Cicadellidae, (Bové *et al.*, 1989 ; Bové, 1997; Breton, 2009 ; Bové et Garnier, 2003), sous-famille des *Deltocephalinae* (Oldfield, 1988 ; Breton, 2009), par le mode persistant circulant multipliant (Calavan and Bové, 1989 ; Fletcher *et al.*, 1998 ; Duret *et al.*, 2003). Les principaux vecteurs de *S. citri* sont *C. tenellus* (Figure 23_a) (Klein *et al.*, 1988) est le vecteur majeur du spiroplasma dans le Sud-Ouest des Etats-Unis (Rana *et al.*, 1975 ; Liu *et al.*, 1983). Les vecteurs identifiés dans le pourtour méditerranéen sont *C. haematoceps* (Figure 23_b) (Fos *et al.*, 1986 ; Breton, 2009) et *C. tenellus* (Rasooly *et al.*, 1994 ; Breton, 2009). *Scaphytopius nitridus* et *S. acutus* DeLong en Californie (Etats-Unis) (Oldfield, 1988). *S. citri* se multiplie dans ses insectes vecteurs qui deviennent infectieux 10 à 20 jours après la nutrition d'acquisition (Liu *et al.*, 1983). Les insectes peuvent rester infectieux toute leur vie (Rana *et al.*, 1975; Bové *et al.*, 1979 ; Breton, 2009), et il n'y a pas de transmission verticale (Rana *et al.*, 1975; Bové *et al.*, 1979).

La transmission naturelle de *S. citri* s'effectue à travers le bois de greffage infecté dans un pourcentage hautement varié (Calavan and Bové, 1989).

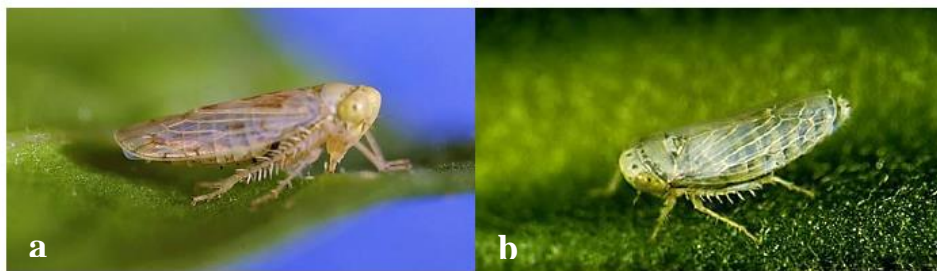


Figure 23 : Photographies des insectes vecteurs de *S. citri* : (a) *C. tenellus*; (b) *C. haematoceps* (Bové, 1995).

IV.2.2.11. Cycle de *Spiroplasma citri* dans l'insecte

Lors d'un repas sur une plante infectée (Figure 24), la cicadelle absorbe la sève élaborée contenant la bactérie à travers le stylet (1), les spiroplasmes se retrouvent dans l'intestin antérieur (2) et migrent vers l'intestin moyen (3) où ils sont internalisés. Ils interagissent alors étroitement avec la membrane du pôle apical des cellules épithéliales de

l'intestin moyen et entrent dans ces cellules par endocytose (Liu *et al.*, 1983 ; Kwon *et al.*, 1999). Au niveau des vésicules d'endocytose, les spiroplasmes perdent leur morphologie hélicoïdale où ils adoptent une forme ovoïde (Ozbek *et al.*, 2003). Les vésicules d'endocytose fusionnent avec le plasmalemme intestinal basal et les spiroplasmes sont donc libérés par exocytose. Ils se retrouvent alors dans l'hémolymphe (4), où ils se multiplient massivement. Un nouveau mécanisme d'endocytose / exocytose leur permet de franchir la barrière des glandes salivaires (5) puis, après une nouvelle multiplication, ils sont expulsés dans le canal salivaire (Kwon *et al.*, 1999 ; Eliautout, 2014).

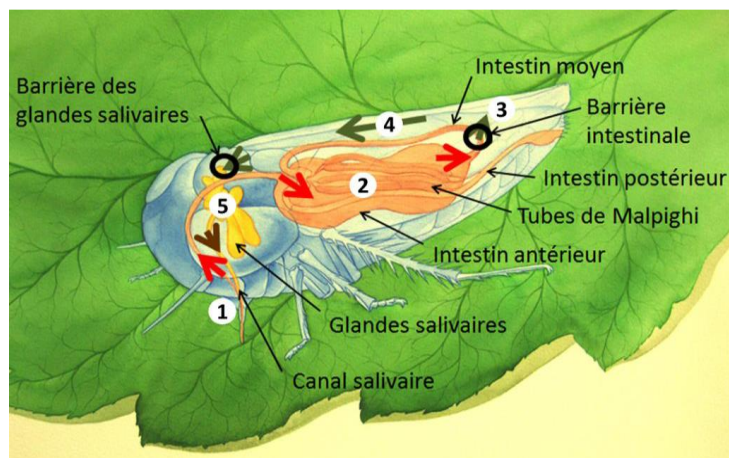


Figure 24 : Cycle circulant-multipliant-persistant de *S. citri* dans son insecte vecteur *C. haematoceps* (Eliautout, 2014).

IV.2.2.12. Rôle du métabolisme des sucres dans la phytopathogénie

Il a été montré que l'utilisation du fructose par *S. citri* est un facteur clé de la pathogénicité de ce Mollicute (Gaurivaud *et al.*, 2000 ; Andre *et al.*, 2003 ; Bové *et al.*, 2003). Le sucre principal présent dans le phloème est le saccharose, seules des traces de fructose ou glucose y sont présents. Le chargement du saccharose dans le phloème par la cellule compagne nécessite l'utilisation de fructose et d'UDP-glucose. Il est vraisemblable que lorsque *S. citri* est présent dans les tubes criblés du phloème, il entre en compétition avec les cellules compagnes pour l'utilisation du fructose, et dès lors empêche ces dernières de réaliser le chargement du phloème au saccharose. Ceci se traduit par une accumulation du saccharose dans les organes sources (feuilles âgées), d'où le développement de jaunisses, et une carence en saccharose dans les organes puits (fruits, jeunes racines, feuilles) dont le développement est réduit (Garnier *et al.*, 2001).

IV.2.2.13. Interaction *Spiroplasma citri* - Insecte vecteur

Le cycle biologique du spiroplasma dans l'insecte nécessite le passage de deux barrières : la barrière intestinale et celle des glandes salivaires. Les mécanismes d'endocytoses et d'exocytoses qui régissent ces passages suggèrent des interactions spécifiques entre le spiroplasma et l'insecte.

Dans les interactions spiroplasma/cellules d'insecte des interactions de type lectine/récepteurs glycosylés ont été retrouvées (Killiny *et al.*, 2005). La spiruline, protéine majeure de la membrane de *S. citri* interagit avec deux glycoprotéines de 50 et 60 kDa de l'insecte *C. haematoceps*.

La recherche des lectines chez *S. citri* a mis en évidence une seule lectine : la spiruline. Par comparaison des différentes cartes protéiques, une protéine de 32 kDa (P32) a été mise en évidence uniquement chez les souches transmissibles de *S. citri*. Le gène codant la P32 est présent sur un plasmide de haut poids moléculaire de 35,5 kpb qui lui-même est absent chez les souches non transmissibles. La protéine P32 est considérée comme un marqueur de transmissibilité chez *S. citri* (Killiny *et al.*, 2006).

IV.2.2.14. Barrière intestinale - glandes salivaires

Les étapes de reconnaissances de la bactérie avec son insecte hôte sont essentielles à l'établissement d'une infection dans cet insecte. Les spiroplasma interagiraient avec les cellules de l'intestin moyen du vecteur par l'intermédiaire d'une extrémité pointue appelée « tip end » (Ammar *et al.*, 2004). Cette extrémité semble être présente même en condition de culture *in vitro*. Les spiroplasma passeraient plutôt à travers les cellules épithéliales de l'intestin moyen sans endommager les cellules, puis lyseraient une partie de la lamina sous-jacente pour passer dans l'hémolymphe (Ozbek *et al.*, 2003).

L'infection de cellules du muscle sous-jacent à l'épithélium intestinal endommagerait les cellules musculaires par la multiplication des bactéries dans ces cellules, mais est sans effet destructeur général du tissu musculaire (Kwon *et al.*, 1999; Ozbek *et al.*, 2003), puis les spiroplasma vont traverser les glandes salivaires. *S. citri* a été retrouvé en microscopie électronique dans les cellules de tous les acinis et plus particulièrement dans les acinis I, II IV

et VIII (Kwon *et al.*, 1999). Lorsqu'elle est injectée dans l'insecte, la souche transmissible GII-3 de *S. citri* est capable de traverser la lame basale et le plasmalemma au niveau des glandes salivaires et de se retrouver dans des vésicules intracellulaires par des mécanismes d'endocytose (Killiny *et al.*, 2006).

IV.2.2.15. Interaction protéine spiraline- Protéine des glandes salivaires

Le gène du spiralin se trouve localisé sur la séquence nucléotidique du fragment d'ADN 6863 pb de *S. citri* (Le Dantec *et al.*, 1998) et il a été montré que 7 protéines dont la spiraline étaient capable d'interagir spécifiquement avec les protéines des glandes salivaires de l'insecte en permettant le passage à travers cette barrière (Garnier *et al.*, 2001).

IV.2.3. Plantes hôtes de *Spiroplasma citri*

Au moins 38 espèces végétales issues de 12 familles botaniques sont naturellement infectées par *S. citri*. Il s'agit essentiellement de Rutacées (agrumes), Brassicacées (brocoli, radis, giroflée), Rosacées et Astéracées (chrysanthème), Fabacées (trèfle, pois), et Apiaceae (carotte) (Breton, 2009 ; Mello *et al.*, 2009). Par ailleurs, une quarantaine d'autres espèces végétales ont également été infectées expérimentalement par *S. citri* (Breton, 2009).

IV.2.4. Plantes hôtes des cicadelles vectrices *Circulifer tenellus* et *Neoliturus haematoceps*

Comme beaucoup d'autres cicadelles, les vecteurs méditerranéens de la maladie du stubborn s'alimente sur une large gamme d'hôtes (cultures au champ, arbres fruitiers, plantes ornementales, et mauvaises herbes). *C. tenellus*, sa plante hôte préférentielle est la betterave (*Beta vulgaris var. saccharifera*) en Amérique du Nord (Smith *et al.*, 1992). *N. haematoceps* a été trouvés particulièrement sur la plante ornementale *Malthiola incana* (Fos *et al.*, 1986). En Syrie, cette espèce a été rencontrée sur les plantes ornementales réservoirs *M. sinuata* R. et les plantes sauvages de *Salsola kali* (*S. kali*) (Figure 25) (Bové, 1986; Fos *et al.*, 1986 ; Bové, 1995). Elle est largement distribuée à travers la méditerranée et le Proche Orient. Sa présence proche ou dans les pépinières ou jeunes vergers peut fournir le centre d'épidémies de la maladie du stubborn. De plus les chercheurs en Turquie ont montré que *Sesamum indicum* est non seulement un bon hôte pour *N. haematoceps* mais aussi pour *S. citri*. Elle joue un rôle

épidémiologique très important dans cette région (Bové, 1995). Selon Smith *et al.* (1992) *Catharanthus roseus* (Figure 26) et *S. kali*, sont des plantes réservoirs de *S. citri*.



Figure 25 : *Salsola kali*, principale plante hôte des cicadelles vectrices de *S. citri* (Syrie) (Bové, 1995)

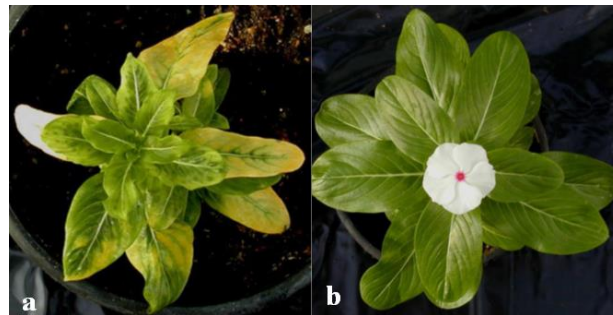


Figure 26 : Symptômes du stubborn sur la pervenche (*Catharanthus roseus*): (a) plant infecté par *S. citri* ; (b) plant sain. (INRA, Bordeaux) (Labroussa, 2010).

IV.2.5. Distribution géographique de deux principaux vecteurs de *Spiroplasma citri*

La large distribution de *S. kali*, de l'Atlantique au Himalaya favorise la présence de *N. tenellus* et *N. haematoceps*, vecteurs de *S. citri* dans les zones arides et semi-arides (Bové *et al.*, 1987). Ces deux cicadelles sont présentes au Maroc, Iran, Iraq, Arabie saoudite, Afghanistan, Turquie, Egypte, Corse, par contre en Syrie, France et en Chypre, seule *N. haematoceps* a été identifiée (Bové, 1995). Cette espèce est considérée comme un vecteur principal dans la région méditerranéenne (Saillard *et al.*, 1984 ; Fos *et al.*, 1986 ; Bové, 1995). En Californie les principaux vecteurs de *S. citri* sont *N. tenellus*, *S. acutus* (DeLongi) et *S. nitridus* (DeLongi) (Kaloostian, 1975 ; Kaloostian, 1976 ; Oldfield *et al.*, 1976). Par contre en Amérique du Nord *N. tenellus* est le vecteur principal de *S. citri* (Bové, 1995). En Iran bien que moins abondante que *N. haematoceps*, il pourrait jouer un rôle dans la transmission de *S. citri* (Bové *et al.*, 1987)

Chapitre V : Etude des huiles essentielles

Introduction

Au cours de la dernière décennie, la médecine préventive a considérablement progressé. Les recherches ont démontré que le rôle essentiel de l'alimentation est de fournir des substances nutritives nécessaires pour couvrir les besoins nutritionnels d'un individu qui contribue à la prévention des maladies chroniques (Lobo *et al.*, 2010 ; Bouyahya, 2016). Un grand nombre d'études scientifiques ont été menées pour découvrir les propriétés fonctionnelles des composés d'origine végétale, antioxydants ou autres, qui pourraient être efficaces pour la santé (Tumbas *et al.*, 2010).

Les huiles essentielles sont liquides à température ambiante mais aussi volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixes. Ce sont des substances de consistance huileuse mais sans corps gras, plus ou moins fluides, très odorantes et de densité généralement inférieure à celle de l'eau. Elles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels ainsi que dans l'alcool, entraînables à la vapeur d'eau mais très peu solubles dans l'eau (Jouault, 2012 ; Lakhdar, 2015). Ces composés aromatiques localisés dans différents organes producteurs des végétaux (fleurs, bourgeons, graines, feuilles, brindilles, écorces, herbes, bois, fruits et racines) et sont contenues dans des structures spécialisées à savoir : les poils, les canaux sécréteurs et les poches à essences (González-Molina *et al.*, 2010; Lakhdar, 2015).

Les huiles essentielles constituées principalement des métabolites secondaires lipophiles volatils tels que les hydrocarbures (terpènes et sesquiterpènes) et les composés oxygénés (alcools, aldéhydes, cétones, phénols, éthers, esters, lactones et éthers phénoliques). Ils sont des mélanges de structure complexe, pouvant contenir plus de 300 composés différents. Les composants principaux peuvent constituer jusqu'à 80% de l'huile, tandis que d'autres composants sont présentés seulement en trace (Bousbia, 2011; Sharopov *et al.*, 2015).

V.1. Définitions

Selon Durvelle (1893 ; 1930), les essences ou huiles essentielles (HEs), connues également sous le nom d'huiles volatiles, de parfums, etc., sont des substances odorantes huileuses, volatiles, peu solubles dans l'eau, plus ou moins solubles dans l'alcool et dans l'éther, incolores ou jaunâtres, inflammables qui s'altèrent facilement à l'air en se résinifiant. Elles sont liquides à température ordinaire ; quelques-unes sont solides ou en partie cristallisées ; elles n'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes, dont elles se distinguent par leur volatilité. Leur odeur plus ou moins forte, suave, piquante ou désagréable. Elles ont la propriété de ne pas laisser de taches durables sur le papier. Les huiles essentielles se trouvent, pour la plus grande partie, élaborées par l'organisme végétal (Charabot *et al.*, 1899) ; mais il en est (telles que les essences d'amande et de moutarde) qui ne prennent naissance qu'au moment où les parties végétales sont mises au contact de l'eau (Durvelle, 1930).

D'après Naves (1976), les HEs sont des mélanges de divers produits issus d'une espèce végétale, ces mélanges passant avec une certaine proportion d'eau lors d'une distillation effectuée dans un courant de vapeur d'eau. Cette définition peut être étendue aux HEs obtenues par expression à froid de l'écorce ou zeste des fruits de *Citrus*, à cause de l'intervention de l'eau dans les procédés mécaniques pour entraîner le produit libéré des alvéoles oléifères.

V.2. Huiles essentielles et essences

Les huiles essentielles de la famille des Rutacées, notamment les huiles d'agrumes sont largement utilisées comme arômes et parfums en fonction de la partie de la plante soumise à l'extraction et des espèces ainsi que, de la méthode employée pour leur extraction. Les agrumes utilisés dans la production des huiles sont présentés dans le Tableau II.

Les huiles conduisant à la plus grande production comprennent l'orange, le citron, le pamplemousse, la mandarine. La distillation des fleurs d'agrumes conduit à une huile appelée « huile essentielle de néroli » très sollicitée par les parfumeurs. L'hydrolat qui est un sous-produit de cette distillation s'appelle « eau de fleur d'oranger », très appréciée tant à l'échelle ménagère qu'industrielle. L'écorce des fruits d'agrumes contient une essence récupérée soit

par distillation ou par expression à froid. Enfin, à partir des feuilles et des brindilles d'agrumes nous obtenons une huile qui porte le nom d'huile de petit grain (Peyron, 2002).

Tableau II : Les types d'huiles essentielles produits dans la famille des Rutaceae (Bousbia, 2011).

Nom botanique	Expressé	Distillée	Partie de la plante utilisée
<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm.) <i>Swingle</i>	Essence de lime	Huile de lime distillée	Péricarpe, jus de fruits ou fruits écrasés
<i>Citrus aurantium</i> L., syn. <i>Citrus amara</i> Link, syn. <i>Citrus bigaradia</i> Loisel, syn. <i>Citrus vulgaris</i> Risso	Essence de bigaradier (orange amère)	Huile de néroli, orange amère, huile de petit grain	Fleurs, péricarpe, feuilles, et brindilles (rameaux) avec quelquefois des petits fruits verts
<i>Citrus bergamia</i> (Risso et Poit.) <i>Citrus aurantium</i> L. subsp. <i>bergamia</i> (Wight et Amott) Engler	Essence de bergamote	Huile petit grain de bergamote	péricarpe, feuilles, et brindilles avec quelquefois des petits fruits verts
<i>Citrus hystrix</i> DC., syn. <i>Citrus torosa</i> Blanco	Essence de lime kaffir, combava	Huile de feuilles kaffir	Péricarpe, feuilles
<i>Citrus latifolia</i> Tanaka	Essence de lime type persan		Péricarpe
<i>Citrus limon</i> (L.) Burn. F.	Essence de citron	Huile de petit grain de citron	Fleurs, péricarpe, feuilles, et brindilles avec quelquefois des petits fruits verts
<i>Citrus reticulata</i> Blanco syn. <i>Citrus nobilis</i> Andrews	Essence de mandarine	Huile de petit grain de mandarine	Fleurs, péricarpe, feuilles, et brindilles avec quelquefois des petits fruits verts
<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck, <i>Citrus djaloni</i> A. Chevalier	Essence d'orange douce		Péricarpe
<i>Citrus x paradisi</i> Macfad.	Essence de pamplemousse		Péricarpe

V.2.1. Composition des huiles essentielles et des essences d'agrumes

Les fruits d'agrumes ont des arômes distinctifs car ils libèrent de petites quantités de composés volatils dans l'atmosphère. La quantité des substances libérées augmente avec la maturité des fruits et l'élévation de la température de stockage. L'émission des substances volatiles augmente aussi considérablement si la peau est blessée ou coupée et les sacs à huiles

rompus. Ces huiles volatiles sont associées aux saveurs et arômes caractéristiques des agrumes. Chimiquement, il s'agit notamment d'hydrocarbures terpéniques (monoterpènes, sesquiterpènes), alcools, esters, aldéhydes, cétones et acides organiques volatils (Shaw *et al.*, 1981 ; Isman, 2005). Ces huiles sont généralement présentes dans l'écorce au flavédo mais se trouvent aussi dans les sacs d'huiles intégrés dans les vésicules de jus. Cependant, la quantité présente dans les vésicules à jus est plus faible que la quantité présente dans le flavédo; de même, leur composition diffère de l'un à l'autre. Les composés volatils soufrés (sulfure d'hydrogène, sulfure de diméthyle, méthanthiol et disulfure de diméthyle) ont également été identifiés (à des concentrations de l'ordre de ppm) en employant la méthode d'extraction analytique « *Head space* » sur des fruits d'agrumes frais (Shaw *et al.*, 1981).

V.2.2. Localisation et rôles des huiles essentielles chez les végétaux

Les huiles essentielles sont composées de molécules volatiles odorantes, majoritairement issues de la famille des terpénoïdes. Elles s'accumulent dans des glandes et tissus spécialisés des végétaux tels que les cellules épidermiques des pétales chez les Rosaceae et les Oleaceae, les glandes épidermiques des Lamiaceae, les poches sécrétrices des Rutaceae ou canaux sécréteurs des Apiaceae (Gilly, 1997).

La teneur des plantes en huiles essentielles est généralement faible, de l'ordre de 1 % (Guignard, 1995). Les huiles essentielles sont largement répandues chez les végétaux supérieurs. Elles peuvent être stockées dans tous les organes, les sommités fleuries, les feuilles, les rhizomes, les fruits, les écorces et les graines. Elles permettent aux plantes de s'adapter à leur environnement et à assurer leur défense (Houël, 2011).

La fonction biologique des terpénoïdes des HEs est écologique et constitue une réponse aux stress biotiques et abiotiques (Bruneton, 1997). Ces métabolites secondaires jouent un rôle fondamental de protection et de défense antimicrobienne des plantes (Tajkarimi *et al.*, 2010 ; Houël, 2011). Ils participent dans les interactions entre la plante et son environnement, aussi bien dans le domaine des interactions végétales (inhibiteurs de la germination), que dans celui des interactions végétal-animal, comme la protection contre les prédateurs, insectes, champignons et attraction des pollinisateurs (Picherski et Gershenzon, 2002; Unsicker *et al.*, 2009).

V.2.3. Domaines d'utilisation des huiles essentielles

Même si la thérapie tient toujours une large place dans l'utilisation des essences de plantes, la vulgarisation de l'usage des huiles essentielles a également élargi le domaine des champs d'application. Par leurs nombreuses et diverses propriétés, les HEs sont devenues une matière d'importance économique considérables avec un marché en constante croissance. En effet, elles sont commercialisées et présentent un grand intérêt dans divers secteurs industriels comme en pharmacie par leurs pouvoirs antiseptiques, analgésiques, antispasmodiques, apéritifs, antidiabétiques...etc., en alimentation par leurs activités anti oxydantes et leurs effets aromatisants, en parfumerie et en cosmétique par leurs propriétés odoriférantes (Ouis, 2015). Ils représentent une grande part de la demande en substances naturelles en particulier celle de rose, de jasmin, de violette, de verveine,...etc. (Bessah et Benyoussef, 2015 ; Ouis, 2015).

Dans le domaine des Plantes à Parfums Aromatiques et Médicinales (PPAM), les huiles essentielles d'agrumes, destinées à des secteurs d'activité aussi divers que l'agroalimentaire, la cosmétologie, l'industrie pharmaceutique ou encore l'aromathérapie, occupent une place importante dans la production mondiale. Les trois quarts de la production d'huiles essentielles d'agrumes proviennent de l'aire méditerranéenne et des USA, tandis que le Brésil et l'Argentine assurent le dernier quart. Il s'agit de produits à haute valeur ajoutée permettent de valoriser une matière abondante et périssable (Dugo et Di Giacomo, 2002).

V.2.4. Toxicité des huiles essentielles

Les HEs sont des substances puissantes et très actives. Elles représentent une source inépuisable de remèdes naturels (Ouis, 2015). Elles contiennent des milliers de composants, très efficaces mais aussi très dangereux. La toxicité provient de la présence de certaines molécules aromatiques pour lesquelles des risques ont été identifiés. Une famille biochimique particulière, celle des cétones, présente une neurotoxicité et un risque abortif. La famille des phénols sont toxiques pour la peau et le foie, ainsi que les HEs contenant les furocoumarines et pyrocoumarines. Enfin, l'absorption orale d'huiles essentielles riches en monoterpènes (toutes les espèces de pins et de sapins, de genévriers et même le santal blanc) sur de longues périodes peut enflammer et détériorer à terme, les néphrons conduisant à une néphrotoxicité

(Chaker, 2010 ; Pinchuk *et al.*, 2012). Les huiles essentielles doivent être prises à bon escient et à doses adaptées afin d'éviter de dommageables effets secondaires (Festy, 2011).

V.3. Filière des huiles essentielles en Algérie

L'Algérie de par sa situation géographique, possède une flore riche et variée. Cette richesse s'explique par l'étendue de sa surface constituée par des écosystèmes de types méditerranéen, steppique et saharien. Un nombre de 3139 espèces sont décrites par Quezel *et al.* (Quezel and Santa, 1962) dans la nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Zeraïa (1983), dénombre 168 espèces endémiques spécifiques de l'Algérie. Dans son rapport national sur l'état des ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture en 2006, l'Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie (INRAA), signale plus de 626 espèces, sous espèces et variétés médicinales (INRAA, 2006). Selon le même rapport sur les 1 600 espèces spontanées utiles et cultivées, l'Algérie n'en utilise que 1%. Concrètement, la première grande action concernant les plantes médicinales fut la création en 1941 du comité de contrôle de la production, de la répartition et de la vente des plantes médicinales et aromatiques en Algérie (IUCN, 2003). L'un des objectifs majeur de ce comité était de combler l'importante pénurie de drogues officielles et limiter ainsi les importations.

Depuis 2003, la politique agricole de l'Algérie encourage la culture et la valorisation des plantes médicinales et aromatiques, par la mise en œuvre de projets de développement rural. Elles sont traditionnellement utilisées par les populations locales pour l'aromatisation des aliments, les arts culinaires et les vertus médicinales. Cette utilisation traditionnelle résulte de connaissances pratiques ancestrales accumulées dans le temps, puis transmises de génération en génération. Selon l'inventaire de la Direction Générale des Forêts (DGF, 2006), on trouve une liste non exhaustive de 420 plantes qui sont utilisées en médecine traditionnelle sur l'ensemble du territoire national. Dans le Tableau III, sont donnés quelques exemples de plantes utilisées dans la médecine traditionnelle (Bessah et Benyoussef, 2015).

Tableau III: Exemples de plantes utilisées en médecine traditionnelles en Algérie (Bessah et Benyoussef, 2015).

Wilaya	Exemples d'espèces	Usage locale
Alger	<i>Melissa officinalis</i> L. (Mélilésse)	Troubles digestifs, crampes d'estomac d'origine nerveuse, vomissement et insomnie
	<i>Geranium robertianum</i> L. (R'guemaya)	Action collutoire, vulnéraire, tonique diurétique, antihémorragique et résolutive.
Tamanrasset	<i>Euphorbia granulata</i> forsk (Tellakh)	Morsures des serpents et scorpions
	<i>Artemisia judaica</i> L. (Taharadjelé)	Troubles digestifs et contre la grippe anti diarrhéique et vermifuge.
	<i>Fagonia bruguieri</i> DC. (Afassur)	Jaunisse et troubles du foie.
Batna	<i>Erica arborea</i> L. (Bouhadad)	Diurétiques et antiseptique.
	<i>Cynodactylon</i> L. (Afar)	Diurétique, dépurative du sang et cholagogue.
	<i>Tamarix gallica</i> L. (Tarfa)	Astringent, anti diarrhéique, diurétique, bon pour insuffisance hépatique.
Tindouf	<i>Zizyphus lotus</i> L. (Sedra)	Adoucissante, gorge et broncho pulmonaire, anti-inflammatoire, analgésique.
	<i>Calotropis procera</i> (Toudja)	Antibiotique (caries dentaires et dermatoses) et antalgique.
	<i>Accacia raddiana</i> Savi. (Talh, Abser)	Vermifuge, antifongique, anti-oedémateux
Médéa	<i>Pistacia lentiscus</i> L. (Dhrou)	Antiseptique, astringents, expectorant, détersif, diurétique, hémostatique, stimulant.
	<i>Arbutus unedo</i> L. (Lendj)	Anti-diarrhéique, ant-inflammatoire, antiseptique, urinaires, astringentes, dépurative
	<i>Erica arborea</i> L. (Khelnedj)	Astringent, diurétique, antiseptique, uro-génitale, dépuratif

V.3.1. Commercialisation des huiles essentielles en Algérie

En Algérie, la commercialisation des plantes aromatiques et médicinales se fait à l'état brut, ou à l'état conditionné en huiles essentielles, oléorésines et résinoïdes. L'Algérie est restée en marge de l'évolution mondiale de ce secteur. Les échanges commerciaux (exportations et importations) sont nettement dominés par les importations. L'analyse des

statistiques du commerce extérieur agricole et des douanes (Tableau IV) des huiles essentielles et autres, montre que les exportations dans cette catégorie de produits restent insignifiantes comme c'est le cas en 2001 et 2005. Pour l'année 2002, les activités de transformation et de valorisation des plantes aromatiques et médicinales ont permis une exportation de près de 1137 kg d'huiles essentielles et d'extraits divers d'une valeur de 31255 US\$. De 2003 à 2005, les exportations subissent une tendance à la baisse avec respectivement des volumes de 68.5 à 100 kg. Ces volumes correspondent à des valeurs de 1498 US\$ pour l'année 2003 et à 1000 US\$ pour l'année 2005. La reprise des exportations s'est précisée à partir de 2006 avec 2823 kg et d'une valeur de 7644 US\$. Le pic des exportations est enregistré en 2008 avec un volume de 22690 kg et une valeur commerciale de 998261 US\$.

Tableau IV: Valeurs des exportations des huiles essentielles et autres (Bessah et Benyoussef, 2015).

Année	Unité=1000 US\$ ¹	Unité=1000 US\$ ²
2001	0	5.507
2002	31.255	84.261
2003	1.498	569.645
2004	0.181	480.614
2005	1	0
2006	7.644	168.442
2007	41	497.95
2008	998.26	1827.229
2009	-	1178.948
2010	-	1039.51

Sources: ¹ Statistiques du commerce extérieur agricole

² Statistiques des douanes algériennes

Les produits exportés comme les huiles essentielles d'orange, de citron de lavande ou de lavandin et d'autres plantes, participent à hauteur de 26%, alors que les oléorésines et les résinoïdes représentent 74%. De l'analyse des mouvements commerciaux entre les différentes huiles essentielles exportées (Figure 27), on constate que l'orange assure à elle seule la moitié des exportations. Les pays destinataires de ces produits sont le Canada, la France et la Belgique (Bessah et Benyoussef, 2015).

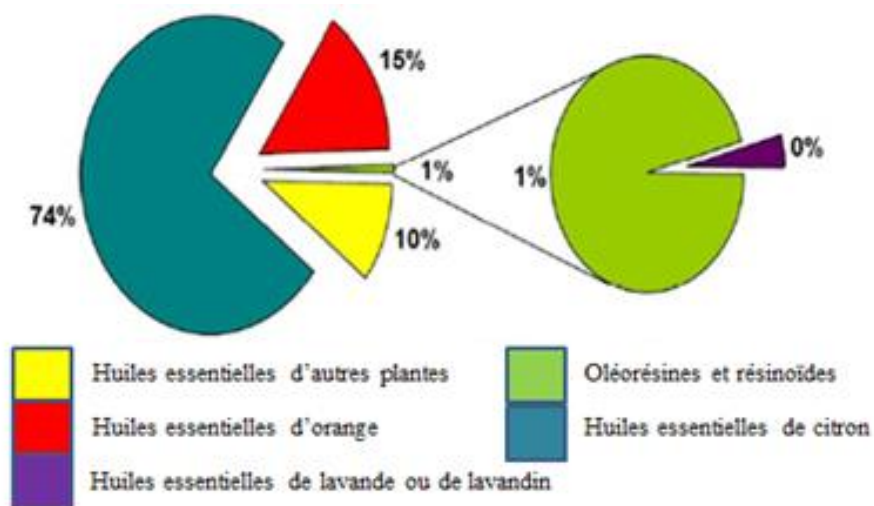


Figure 27 : Huiles essentielles, oléorésines et résinoïdes exportées (Bessah et Benyoussef, 2015).

Deuxième partie
Matériel et Méthodes

Chapitre I: Détection sérologique de *Spiroplasma citri*

Spiroplasma citri peut être détecté par greffage sur des indicateurs d'agrumes, culture sur milieu artificiel, sérologie, sondes d'ADN, test dot-immunobinding, immunocapture-réaction en chaîne de polymérase (IC-PCR), réaction en chaîne de polymérase (PCR) et réaction en chaîne de polymérase en temps réel (RT-PCR) (Nejat *et al.*, 2011).

La maladie du stubborn, préoccupante surtout pour les pays du pourtour méditerranéen, requiert la détection précoce de *S. citri* afin de procéder à l'arrachage des arbres contaminés et éviter ainsi la propagation de la maladie. La faible quantité d'organismes présents dans les arbres atteints du stubborn nécessite la mise au point de tests de détection très sensibles (Barthe, 1992).

En 1980, l'agent de la maladie du stubborn des agrumes a été isolé de matériel végétal des pays du pourtour méditerranéen et du Proche-Orient (Algérie, France (Corse), Irak, Iran, Maroc, Syrie et Tunisie) par Vignault *et al.* (1980). Selon Fletcher et Eastman (1984), l'ELISA s'est avéré être une méthode fiable pour estimer la concentration de cellules de *S. citri* dans les tissus de plantes malades. D'autres auteurs, Archer *et al.* (1982) ; Eden-Green (1982) ; Raju et Nyland (1981), ont également montré que l'ELISA peut être un outil utile pour la détection et la quantification des spiroplasmes au niveau des plantes hôtes.

I.1. Matériel

I.1.1. Matériel végétal

I.1.1.1. Prospections sur terrains

Les prospections ont été effectuées dans 03 wilayat d'Algérie, il s'agit de la wilaya de Blida (la station expérimentale du département d'agronomie), la wilaya de Tizi-Ouzou (verger privé d'Oued-Aissi) et la wilaya de Boumerdes (verger privé de la Daira de Baghlia).

I.1.1.2. Présentation de la région d'étude

✓ **Vergers privés de Baghlia** (wilaya de Boumerdes)

- **Situation géographique**

La daïra de Baghlia Située à une latitude de 36.8169 et une longitude de 3.8572 (coordonnées GPS: 36°48'56" Nord, 3°51'40" Est), Algérie. A climat méditerranéen avec été chaud (ANDI, 2015).

- **Données techniques**

Le verger est d'une superficie de 5 ha, âgé de 33 ans (la plantation effectuée en 1987), composé de plusieurs variétés : Thomson, Double fine, Washington navel, Washington sanguine, Hamline, Valencia Late, Clémentine et Java. La plantation est effectuée au hasard. Les traitements réalisés dans ce verger étaient contre la gommose et les cochenilles. Des apports d'engrais et d'ammoniac s'effectuent selon les besoins. L'irrigation est apportée par des rigoles et par aspersion durant l'été.

✓ **Station expérimentale de département des biotechnologies (ex: Agronomie de Blida)**

- **Situation géographique**

La Wilaya de Blida se situe dans la partie Nord du pays dans la zone géographique du Tell central. Elle est limitée au Nord par les wilayat d'Alger et Tipaza, à l'Ouest par la Wilaya de Ain-Defla, au Sud par la Wilaya de Médéa, et à l'Est par les Wilayas de Bouira et de Boumerdes (ANDI, 2015).

- **Données techniques**

Cette station est composée de deux vergers l'un est d'une superficie de 0.25 ha avec une diversité variétale: Citronnier, Thomson, et Washington navel. Les variétés ont été plantées alternativement selon des lignes dont l'écart était de 5x5 avec un nombre total de 208

plants. L'irrigation était basée uniquement sur les pluies (apports naturels). Le second verger est d'une superficie de 0.5 ha, composé de deux variétés : Thomson et Winkler, âgé de 4 ans (plantées en Mars 2007), l'irrigation est apportée par des rigoles.

✓ **Verger privé d'Oued-Aissi (Wilaya de Tizi-Ouzou)**

- **Situation géographique**

La wilaya de Tizi-Ouzou est limitée par la mer méditerranée au Nord ; la Wilaya de Bouira au Sud ; la Wilaya de Boumerdes à l'Ouest et la Wilaya de Bejaia à l'Est (ANDI, 2015).

- **Donnés techniques**

Le verger d'Oued-Aissi est d'une superficie de 7 ha, âgé de 22 ans, composé d'une seule variété (Washington navel).

I.1.2. Matériel de laboratoire

Les solutions et réactifs utilisés pour le test DAS-ELISA sont préparés comme suit :

I.1.2.1. Solutions tampon

Plusieurs solutions tampon ont été préparées pour réaliser le test ELISA (Clark and Adams, 1977).

- **Tampon de broyage 1x20 (référence 51804)**

Tampon de broyage standard, utilisé pour la majorité des réactifs des gammes maraîchage, grandes cultures, arboriculture et horticulture

NaCl	8 g
Na ₂ HPO ₄	2,9 g
KCl	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Tween 20	0,5 ml
NaN ₃	0,2 g
Polyvinylpyrrolidone:(PVP-PM:40.000)	10 g

qsp eau distillée 1 litre

PHx20=6,4

PHx1= 7,4

- **Tampon de lavage x20 (référence 51803)**

NaCl	8 g
Na ₂ HPO ₄	2,9 g
KCl	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Tween 20	0,5 ml
NaN ₃	0,2g
qsp eau distillée 1 litre	

PHx20=6,4

PHx1= 7,4

- **Solution tampon phosphate 0,1M pH 7,4**

Solution A : 0,05M

Phosphate dissodique (Na ₂ PO ₄)	3,750 g
Eau distillée	1000 ml

Solution B : 0,05M

Phosphate mono potassique (KH ₂ PO ₄)	1,425 g
Eau distillée	1000 ml

Solution finale

Solution A	143 ml
Solution B	57 ml
Eau distillée	800 ml

I.2. Méthodes

I.2.1. Etude symptomatologique

L'observation des symptômes a été faite parallèlement avec la période de prélèvement d'échantillons.

I.2.2. Méthode d'échantillonnage

Les prospections réalisées sur les différents vergers des différentes stations (2009/2010; 2012/2015) étaient basées sur l'observation visuelle des symptômes. Il s'agit de repérer les plants présentant des symptômes décelables à l'œil nu suspectés d'être induits par *S. citri* par comparaison à des photos bibliographiques (Bové, 1995 ; Saillard, 1978). La partie de l'arbre concernée par les prélèvements était des feuilles avec des chloroses, formes en cuillère, jaunissements des jeunes pousses et des fruits déformés.

I.2.3. Conservation de la source d'inoculum

Les feuilles prélevées sur terrain étaient placées dans des sacs en plastique, sur lesquels a été noté la variété, et la région correspondante et sont par la suite conservés à une température de 4°C afin d'éviter toute altération et /ou dessèchement.

I.2.4. Sérodétection de *Spiroplasma citri*

Le test ELISA (Clark et Adams, 1977), comme rapporté par Saillard *et al.* (1980) pour le *S. citri* et Bar Joseph *et al.* (1979) est effectué suivant les protocoles d'utilisation du fournisseur.

Dans le contexte de notre expérimentation la DAS-ELISA a été réalisée « en double antibody » où seuls les anticorps poly clonaux sont utilisés, le spiroplasma est donc littéralement pris en sandwich entre deux couches d'anticorps. Le sérum utilisé a été fourni par le laboratoire SEDIAG (France).

Les échantillons testés proviennent des prospections effectuées sur différentes régions. Le nombre total était de 470 échantillons dont 158 échantillons du Thomson et 83 de la variété Winkler de la St. Exp. d'Agr. de Blida. Les variétés proviennent de la région de Boumerdes sont : 51 échantillons du Thomson, 43 Double fine, 34 de la variété Valencia Late, 26 de Clémentine, 20 de Hamline, 15 de Jaffa, 11 de Washington navel, et 6 de la variété Washington sanguine. Tandis que les variétés prélevées de la région de Tizi-Ouzou étaient uniquement le Washington navel en nombre de 18 échantillons.

Le test immuno-enzymatique (DAS-ELISA), a été réalisé au niveau du laboratoire de recherche de la protection et valorisation des produits agrobiologiques (PVRAB) de l'université de Blida.

I.2.4.1. Principe du test ELISA

Le test ELISA est une réaction immuno-enzymatique relativement simple qui permet de mettre en évidence la présence d'un antigène à l'aide d'un anticorps marqué par une enzyme, la phosphatase alcaline, par une réaction colorée en présence du substrat de l'enzyme, le paranitro-phenyl phosphate (PNPP). L'intensité de la coloration est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 405 nm.

La Bactérie présente dans les extraits de plantes à tester réagit avec les immunoglobulines G (IgG) fixée sur la plaque de microtitration. Elle est ensuite mise en contact avec une préparation d'IgGs spécifiques couplés à l'enzyme phosphatase alcaline. La double réaction sérologique est mise en évidence par la réaction du substrat de l'enzyme, le PNPP, ce qui induit une réaction colorée dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de l'antigène fixé (Clark et Adams, 1977).

- **Mode opératoire**

Les échantillons de feuilles conservés ont été lavés à l'eau distillée, puis séchés sur du papier absorbant et broyés séparément à froid à l'aide d'un mortier-pilon et dilués au 1/10^{ème} dans une solution tampon phosphate buffered saline contenant le polyvinylpyrrolidone (PBS-PVP-T) à pH=7,4 (à raison de 10 mL pour 1g de feuilles). Les broyats étaient ensuite filtrés. Le jus obtenu est mis dans des tubes en plastique numérotés. Chaque tube représente un échantillon. Ce jus est analysé par le test ELISA.

Nous avons utilisés des échantillons frais sains "Thomson" provenant d'une collection du laboratoire de virologie, également les témoins contrôles positifs et négatifs proviennent du laboratoire Bio-Rad, France.

Selon Clark et Adams (1977), les étapes du test DAS-ELISA sont résumées comme suit :

Etape 1 : Fixation des anticorps

Les anticorps ont été dilués au 1/100 dans le tampon de fixation juste avant utilisation.

Un volume de 100 μ l / puit d'anticorps a été déposé dans la plaque de microtitration.

Incubation : 2 h à 37°C (les plaques sont couvertes avec un film plastique adhésif)

Lavage : 3 lavages avec du PBS-TWEEN

Etape 2 : Dépôt des échantillons

Un volume de 100 μ l / puit d'échantillons comprenant le témoin sain, et le témoin positif a été déposé dans la plaque de microtitration.

Incubation : 1 nuit à +2-8 (les plaques sont couvertes avec un film plastique adhésif).

Lavage : 3 lavages avec du PBS-TWEEN

Etape 3 : Dépôt des anticorps conjugués

Les anticorps conjugués ont été dilués au 1/100 dans le tampon conjugué juste avant utilisation.

Un volume de 100 μ l / puit d'anticorps conjugués a été déposé dans la plaque de microtitration

Incubation : 2 h à 37°C (les plaques sont couvertes avec un film plastique adhésif).

Lavage : 3 lavages avec du PBS-TWEEN.

Etape 4 : Dépôt du substrat

Le PNPP a été dissout dans le tampon de substrat juste avant utilisation. La concentration finale doit être de 1 mg/ml de PNPP.

Attendre la dissolution totale avant utilisation

Incubation : 30 min à 37°C puis à température ambiante

Lecture : 30 min, 1h et 2 h après dépôt du substrat

Lecture et interprétation

Les densités optiques (DO) sont lues à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 405 nm. Un échantillon est considéré comme positif quand la valeur de sa DO est trois fois supérieure ou égale à la valeur de la DO du témoin négatif.

I.2.4.2. Calcul du taux d'infection

Le taux d'infection de la maladie de chaque exploitation est calculé comme suit :

$$\text{Taux d'infection (\%)} = \frac{\text{Nombre de plants positifs}}{\text{Nombre de plants testés}} \times 100$$

Chapitre II : Culture de *Spiroplasma citri* en milieu SP4 modifié (SP4m)

Le diagnostic de l'infection due à *S. citri* était effectué par deux techniques : l'essai de mise en culture de l'organisme et l'ELISA (Bové *et al.*, 1984 ; Saillard *et al.*, 1978). *S. citri* peut être détecté par culture en milieu liquide acellulaire et observé par microscopie sur fond noir pour confirmer sa morphologie hélicoïdale et sa motilité typiques ((Tully, 1983 ; Yokomi *et al.*, 2008).

II.1. Matériel

La composition du milieu utilisé pour la détection de *S. citri* par culture est insérée en annexe N° 01.

II.1.1. Echantillonnage

Des échantillons de jeunes feuilles montrant des symptômes typiques du stubborn prélevés (entre le mois de Novembre et Décembre en 2014) à partir d'arbres d'agrumes (variété Thomson, Double fine et Valencia Late) du verger privé de Baghliia, ont été utilisés dans la culture de *S. citri*.

II.2. Méthodes

II.2.1. Préparation du milieu SP4m

Les étapes de la préparation du milieu de culture des spiroplasmes sont résumées comme suit :

- **Mode opératoire**

Base autoclavée (30min / 115°C) – Conservation à température ambiante.

	1 base	3 bases	6 bases	9 bases
Mycoplasma Broth Base	1g	3g	6g	9g
Peptone	1,6g	4,8g	9,6g	14,4g
Tryptone	3g	9g	18g	37g
Rouge de phénol 0,1%	6mL	18mL	36mL	54mL
ou x mg / y ml NaOH 1M	9mg / 1mL	27mg / 3mL	54mg / 6mL	81mg / 9ml

↳ pH ajusté à 7,8 avec NaOH

H ₂ O	qsp 200mL	qsp 600mL	qsp 1,2L	qsp 1,8L
Agar Noble (si milieu solide)	3g	9g	12g	18g

Additifs stériles: Filtrés sur 0,45µm (avec unité de filtration) – Conservés à 4°C.

	1 complément	3 compléments	6 compléments
Sérum de veau fœtal décomplémenté	50mL	150mL	300mL
10X CMRL 1066 (acides aminés et vitamines)	15 mL	45 mL	90 mL
Yeastolate 4% (p/v)	25,5 mL	76,5 mL	153 mL
Glucose 50% (p/v)	3 mL	9 mL	18 mL
Pénicilline G 2.10 ⁵ Unités/ mL	1,5 mL	4,5 mL	9 mL
Pression osmotique ~350mOsm			

Assemblage du Milieu SP4

Mélanger de manière stérile (pipettes stériles, bouteille stérile, sous hotte...) 1 base autoclavée avec 1 complément soit :

- 100 mL base autoclavée + 47,5 mL de complément
- 200 mL base autoclavée + 95 mL de complément
- 300 mL base autoclavée + 142,5 mL de complément
- 600 mL base autoclavée + 285 mL de complément...

Conserver le tout à 4°C avant utilisation.

II.2.2. Mise en culture du spiroplasma à partir des nervures de feuilles d'agrumes

A l'aide de ciseaux préalablement désinfectés à l'éthanol à 70%, des feuilles montrant des symptômes du stubborn ont été coupées à la base du pétiole et lavées à l'eau puis séchées. Ensuite les nervures principales ont été découpées. Dans une petite boîte de Pétri (55 mm de diamètre) contenant 3 mL du milieu SP4m, 1 g de nervures ont été hachées très finement à la lame de rasoir à usage unique. Après macération de 2 à 3 h à températures ambiantes, sous une hotte microbiologique, la partie liquide du mélange a été aspirée dans une seringue et filtrée sur 0,45 µm. puis 0,3 mL du filtrat a été transféré dans un tube contenant 3 mL du milieu SP4m. Le nombre d'échantillons cultivés était de 05 (02 échantillons de Valencia Late, 02 échantillons de Double fine, 01 échantillon de Thomson), et un témoin négatif sans filtrat a été utilisé. Les tubes ont été incubés à 32°C pendant 15 jours sans agitation.

La détection de *S. citri* par culture a été effectuée au niveau du laboratoire des virus respiratoires à l'Institut Pasteur d'Alger.

Chapitre III : Caractérisation moléculaire de *Spiroplasma citri***Introduction**

L'amplification de gènes est une méthode utile pour la détection des spiroplasmes dans le phloème du végétal infecté ou les insectes vecteurs avec 100-1000 fois plus sensible que la culture (Fletcher *et al.*, 2006). La détection de *S. citri* par PCR (Polymerase Chain Reaction) a été utilisée avec des amorces basées sur la séquence génétique de la spiraline (Bové *et al.*, 1993 ; Foissac *et al.*, 1996), gènes 16 S ARNr en particulier dans l'infection à *Spiroplasma* (Lee *et al.*, 2006), l'adhésine putative P89 et les gènes de type adhésines putatives P58 (Yokomi *et al.*, 2008).

Dans cette étude le test de PCR a été réalisé pour la détection de *S. citri*. La PCR est une réaction permettant d'amplifier un fragment d'ADN à partir de quantités très faibles d'acides nucléiques cibles (Saiki *et al.*, 1988). Cette technique a été utilisée pour la détection d'ADN viraux (Larzul *et al.*, 1988), d'ARN génomique viraux (Gama *et al.*, 1988) et viroïdes de plantes (Hadidi et Yang, 1990). La PCR s'est avérée d'une grande sensibilité permettant de détecter des séquences d'origines virales ou viroïdales présentes à l'état de traces dans des tissus infectés (Barthe, 1992).

III.1. Matériel**III.1.1. Stations prospectées**

Les prospections sur terrain ont été effectuées durant l'année 2013, sur différentes variétés d'agrumes au niveau du verger agrumicole de la région de Baghlia (Boumerdes) qui comporte les variétés suivantes : Thomson, Jaffa, Double fine, Washington navel, Washington sanguine, Hamline, et Valencia Late.

III.1.2. Matériel de laboratoire

Les réactifs et le matériel utilisés pour l'extraction d'ADN sont cités en annexe N° 02.

III.1.3. Echantillonnage

Des échantillons de feuilles et fruits présentant des symptômes du stubborn ont été prélevés le mois de septembre en 2013 sur les variétés : Double fine, Thomson, Washington navel, Jaffa, et Valencia Late. Les nervures principales de feuilles et columelles de fruits ont été testées pour ces échantillons. Le nombre de plants analysé était de 62, dont 11 plants de la variété Thomson, 13 de Double fine, 12 de Washington navel, 12 de Jaffa, et 14 de la variété Valencia Late.

III.2. Méthodes

III.2.1. Préparation du Tampon d'Extraction au CTAB

Les étapes de la préparation du tampon d'extraction des spiroplasmes sont résumées comme suit :

- **Mode opératoire**

Solution de soude 10N (40g/100mL)

Mettre petit à petit 40g de NaOH dans 80mL d'eau
Ajuster ensuite le volume : qsp 100mL

Solution mère EDTA 250mM pH8

Dissoudre l'EDTA dans 400mL d'eau (46,53g d'EDTA. 2H₂O)
Mettre sous agitation jusqu'à dissolution
Mettre à pH 8 en rajoutant de la soude 10N (volume important rajouter ~20mL)
Ajuster ensuite le volume : qsp 500mL
Autoclaver

Solution Tris-HCl 1M pH 8 (60,57g/500ml)

Mettre 60,57g de Tris dans 300mL d'eau
Mettre à pH8 en rajoutant du HCl
Ajuster ensuite le volume : qsp 500mL
Autoclaver

Tampon CTAB

20g CTAB
82g NaCl
20g PVP K25

Dissoudre dans 400mL d'eau (agitateur magnétique / Bain marie à 50°C)

Ajouter : 100mL **Tris** 1M pH 8
 40mL **EDTA** 250mM pH 8
 Ajuster ensuite le volume : qsp 1L

Tampon d'extraction CTAB

10mL Tampon CTAB
 20 μ l β -mercaptoEthanol

III.2.2. Préparation de la solution stock dNTP 5mM

Pour la préparation des solutions stock des dNTP nous avons besoins de :

- 4 dNTP 40 μ moles de chacun – PROMEGA Cat#U1240
- Pendre 200 μ l de chaque dNTP. Mélanger \rightarrow Vf =800 μ l à 25mM
- Diluer 5 fois pour avoir 5mM (V total : 4ml)
- Aliquoter en tubes de 500 μ l et conserver à -20°C

Les quantités nécessaires pour préparer les solutions stocks utilisées pour la PCR sont résumées dans le tableau V.

Tableau V : Préparation du mix 2X

Volume final \rightarrow	125 μ l (5 réactions)	250 μ l (10 réactions)	500 μ l (20 réactions)	1 ml (40 réactions)
Solutions stocks \downarrow				
H ₂ O	65 μ l	130 μ l	260 μ l	520 μ l
10X Taq buffer (sans MgCl ₂)	25 μ l	50 μ l	100 μ l	200 μ l
2,5mM MgCl ₂	20 μ l	40 μ l	80 μ l	160 μ l
dNTP 5mM	10 μ l	20 μ l	40 μ l	80 μ l
100 μ M Primer 1	2,5 μ l	5 μ l	10 μ l	20 μ l
100 μ M Primer 2	2,5 μ l	5 μ l	10 μ l	20 μ l

Le mix se conserve ensuite à -20°C avant utilisation.

Pour préparer un Mix 1X : Mélanger : 25 μ l de mix 2X x Nombre de réaction
 24 μ l H₂O x Nombre de réaction
 0,3 μ l taq polymérase x Nombre de réaction

III.2.3. Préparation des gels – 1,5% agarose – Appareil Mupid

Faire fondre l'agarose au micro-onde (ne pas faire bouillir trop longtemps pour éviter une trop forte évaporation), puis laisser un peu refroidir, agiter puis ajouter le BET (le refroidissement permet d'éviter le dégagement de vapeurs de BET), ensuite couler le gel dans le support Mupid (voir annexe N° 03), et mettre le peigne à puits en place et laisser solidifier (compter au minimum 30 min).

III.2.4. Extraction de l'ADN

La technique d'extraction est celle décrite par Doyle et Doyle (1990). Cette technique est basée sur l'utilisation du bromure de cetyltriméthyl- ammonium (CTAB). Les extractions et les tests de PCR ont été effectués au niveau du laboratoire de Biologie de Fruit et Pathologie (BFP) de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Bordeaux, France.

Les Solutions et Réactifs utilisés pour la PCR sont cités en annexe N° 03.

- **Mode opératoire**

Un gramme de nervures principales ou de columelles de fruits a été broyé dans les sacs de broyage avec 3 mL de tampon de CTAB additionné du β -mercaptoéthanol (0,2%). Un volume de 1,5 à 2 mL de broyat a été transféré dans un tube eppendorf de 2 mL. Les échantillons ont été chauffés au bain-marie à 65°C pendant 15 min puis les tubes ont été retournés et remis au bain-marie pour 15 min suivie d'une centrifugation à 3000 rpm pendant 5 min. Un volume de 1 mL du surnageant a été récupéré dans un tube eppendorf de 2 mL. Les protéines ont été extraites du surnageant avec 1 mL de (V/V) chloroforme mélangé à l'alcool iso amylique (24/1), ensuite les tubes ont été retournés puis centrifugés à 14000 rpm pendant 5 min. Un volume de 0,9 mL de la phase aqueuse (supérieure) a été récupéré dans un tube eppendorf. Pour précipiter l'ADN, un volume de 0,6 V d'isopropanol (soit 540 μ L) a été rajouté puis les tubes ont été remués et incubés à -20°C pendant 30 min ou toute la nuit. Une centrifugation à 4°C a été réalisée à 14000 rpm pendant 20 min et un culot qui contient l'ADN a été obtenu. Ce dernier a été lavé deux fois avec 1 mL d'éthanol à 70% et centrifugé à 14000 rpm pendant 10 min puis séché au speed-VAC à 27°C pendant 5min.

III.2.5. Amplification des séquences

Les amorces (Sc1/Sc1') (Tableau VI) (Foissac *et al.*, 1996) utilisées, ont été choisies dans la séquence du gène de la spiraline, protéine majeure de *S. citri*. Le protocole a été défini comme suit : 1 μ L d'ADN dans 29 μ L du mélange réactionnel qui comprenait : H₂O, MgCl₂ 2,5 mM, Tampon enzyme Taq polymérase, de dNTP 5 mM, et les amorces (Sc1/Sc1').

Tableau VI: Paire d'amorce utilisée pour la PCR.

Amorces	Séquences des amorces	Gène ciblé	Taille attendue de l'amplican	Référence
Sc1 Sc1'	5' ATTTTCAATTTGATGTTTATCAAGACAAC 3' 5' CAAAATCACTTGCTCCTGCATTTGG 3'	Spiralin	336pb	(Foissac <i>et al.</i> , 1996)

Le témoin positif utilisé est celui de l'ADN de la souche GII3 de *S. citri*. Le contrôle négatif est le résultat d'une amplification sans ADN (témoin eau =TO). Les réactions ont été effectuées sur le thermocycleur comme suit : 5 min de dénaturation à 95°C suivie de 40 cycles d'amplification (30 secondes à 95°C, hybridation 30 secondes à 56°C et élongation 90 secondes à 72°C suivie de 5 min à 72°C).

L'analyse des produits de la PCR a été effectuée par électrophorèse en gel d'agarose 1,2%. 3 µL de bromure d'éthidium ont été additionné au gel. 6 µL du tampon de charge a été mélangé avec les produits de PCR et un marqueur d'ADN de taille de 1kb plus a été utilisé.

✓ Migration

Pour effectuer la migration des fragments d'ADN amplifiés, faire sortir doucement le peigne à puits et placer le gel et son support dans l'appareil d'électrophorèse, puis recouvrir le gel de tampon TBE 0,5X et le charger avec les échantillons plus le tampon de charge, Ne pas oublier de mettre un marqueur de taille dans l'un des puits ensuite faire migrer à ~100V. A la fin de la migration observer sous UV.

L'identification des bandes a été déterminée par comparaison des produits obtenus avec le témoin positif de 336 pb et à l'aide d'un marqueur moléculaire de 1kb plus.

Chapitre IV : Impact du stubborn sur la qualité des fruits et des huiles essentielles

Introduction

Le genre *Citrus* appartenant à la famille des Rutaceae, est l'une des cultures les plus largement cultivées dans le monde surtout dans les climats tropicaux et les régions tempérées. Elles sont très riches en composés actifs (polyphénols, flavonoïdes, tanins, alcaloïdes, les huiles essentielles,...etc.) (Chutia *et al.*, 2009; Kamal *et al.*, 2011).

L'écorce des *Citrus* est l'une des parties de la plante riche en métabolites secondaires, tels que les huiles essentielles qui sont étudiées pour ces composés actifs (coumarines, terpènes et linalool,...etc.) (Dhanavade *et al.*, 2011; Kamal *et al.*, 2011).

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressées à l'étude des huiles essentielles extraites d'écorces d'agrumes provenant de fruits d'oranges (espèce *Citrus sinensis* (L.) Osbeck) infectés par *Spiroplasma citri* et de fruits non infectés, de déterminer leur activité antimicrobienne sur certaines bactéries, d'évaluer leurs caractéristiques physicochimiques et de déterminer leur composition chimique par GC-MS.

IV.1. Matériel

IV.1.1. Matériel végétal

Les fruits de l'espèce : *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Orange douce, var : Washington navel) ont été récoltés à maturité, du verger privé de Baghlia, durant 2 campagnes agrumicoles 2016-2017 et 2017-2018. Nous avons réalisé des prélèvements de fruits à partir d'arbres malades extériorisant des symptômes du stubborn (fruits avec columelle courbée) et des prélèvements à partir d'arbres sains. Le produit ayant servi à l'extraction des huiles essentielles est la partie écorce ou flavedo (zeste) des oranges (*Citrus sinensis*).

IV.1.2. Matériel biologique

IV.1.2.1. Microorganismes testés

Le nombre de microorganismes testés, lors de cette étude était de 04 : 03 souches bactériennes (01 Gram+ et 02 Gram-) et un champignon.

✓ Bactéries à Gram négatif

- *Escherichia coli* ATCC 25922

Escherichia coli appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Ce sont des bacilles à coloration de Gram négative, non sporulés, anaérobies facultatifs et qui ne possèdent pas d'oxydase. Le genre *Escherichia* compte 5 espèces : *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris* et *E. blattae*. L'espèce *E. coli* est considérée comme un hôte normal, c'est-à-dire commensal, de la microflore digestive de l'homme et de la plupart des animaux à sang chaud (Russo *et al.*, 2000 ; Kaper *et al.*, 2004), responsables des infections urinaires, septicémie méningite du nourrisson, de plaies opératoires et gastro-entérites (Nataro *et al.*, 1998 ; Tozzi *et al.*, 2003).

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie de la famille des *Pseudomonaceae* (Chaker, 2012) à Gram négatif (Lyczak *et al.*, 2000), bacille d'environ 1 µm de long. Elle est mobile, grâce à son unique flagelle polaire, et aux pili (Stover *et al.*, 2000). En outre, cette bactérie est aérobie mais elle est capable de s'adapter à des conditions anaérobies (Vasil, 1986). Pathogène opportuniste, *P. aeruginosa* profite de défaillance de l'hôte pour le coloniser et l'infecter conduisant à des infections aiguës ou chroniques (Lyczak *et al.*, 2000).

✓ Bactéries à Gram positif

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Staphylococcus aureus fait partie de la famille des *Micrococaceae* (Hill, 1959 ; Wattam *et al.*, 2014), de forme sphérique (coque) et se regroupe généralement en amas. Ces cocci mesurent de 0,5 à 1,5 µm de diamètre, sont immobiles, non sporulés et positifs à la

coloration de Gram (Tille, 2014). A un métabolisme aérobie prédominant et anaérobie facultatif. Parmi les *Staphylococcus*, les espèces les plus fréquemment isolées sont *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* et *Staphylococcus aureus*. Cette dernière, pourvue d'une activité catalase et capable de sécréter de nombreuses toxines, est la plus pathogène du genre (Rosenstein et Gotz, 2013). *S. aureus* fait partie de la flore commensale de l'Homme et de l'animal. Elle est présente sur la peau et les muqueuses (Aly *et al.*, 1977 ; Mulchay *et al.*, 2012). *S. aureus* est une bactérie pyogène pouvant être responsables de différents types d'infections, selon la nature de la souche et la qualité de la réponse immunitaire de l'hôte (Accarias, 2014).

Les *Staphylococcus* font partie de la famille des Micrococaceae, sont des germes ubiquistes. Le principal réservoir et habitat est constitué par le nez, la gorge et la peau des animaux / humain.

✓ **Souche fongique**

- *Botrytis cinerea*

Le genre *Botryotinia* et son anamorphe *Botrytis* font partie des Ascomycètes, de l'ordre des Leotiales et de la famille des Sclerotiniaceae. *B. cinerea* est caractérisé par des hyphes septées, ramifiées, plurinuclées et hétérocaryotiques qui se différencient en conidiophores ramifiés portant des conidies hyalines, ovoïdes à ellipsoïdales (6–18 x 4–11 µm), de couleur brune à grise, considérées comme les unités principales de dissémination du champignon. Il se conserve par des sclérotés.

Botrytis cinerea est un champignon polyphage vivant comme saprophyte sur une multitude de plantes-hôtes. Son développement rapide en période de maturation des raisins entraîne des pertes quantitatives et une dépréciation de la récolte avec des conséquences œnologiques négatives difficilement maîtrisables. L'apparition successive de résistances à différents fongicides spécifiques (benzimidazoles, dicarboximides, anilinopyrimidines, phénylpyrrols,... etc.) et son extrême capacité d'adaptation rendent la lutte de plus en plus complexe et aléatoire dans les conditions climatiques favorables à ce champignon (Viret et Gindro, 1997).

IV.1.3. Matériel de laboratoire

Le dispositif utilisé pour l'extraction des huiles essentielle est celui de type Clevenger (ballon, chauffe-ballon, Thermomètre ; Réfrigérant à eau) et un évaporateur rotatif.

- **Milieux de culture**

Suivant les méthodes employées et selon les souches nous avons utilisés les milieux de culture cités en annexe N° 04.

IV.2. Méthodes

IV.2.1. Préparation des échantillons

Tous les échantillons de fruits ont été nettoyés et coupés pour éliminer les graines et la pulpe. Les écorces collectés ont été découpées en morceaux de 3 mm d'épaisseur puis séchés à 25°C et stockés dans des conditions ambiantes. Les écorces d'agrumes séchées étaient par la suite soumis à une hydrodistillation pendant 4 h à l'aide d'un appareil Clevenger (Zheljazkov *et al.*, 2014).

L'extraction des huiles essentielles et la détermination des indices physico-chimiques ont été réalisés au niveau du laboratoire de chimie organique de l'université de Blida1.

IV.2.2. Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation

IV.2.2.1. Principe

L'hydrodistillation est la méthode la plus couramment employée pour l'extraction des huiles essentielles. Dans son principe, elle consiste à immerger la matière végétale dans un bain d'eau, l'ensemble est ensuite porté à l'ébullition, à pression atmosphérique. Sous l'action de la chaleur, les molécules odorantes contenues dans les glandes sécrétrices des végétaux sont libérées et entraînés par la vapeur d'eau qui est ensuite condensée. Bien que la plupart des constituants aient des températures d'ébullition supérieures à 100°C, ils sont entraînés

mécaniquement avec la vapeur d'eau. Le refroidissement par condensation conduit à la séparation du mélange eau-huile essentielle par décantation. Puis les deux phases, la phase aqueuse (hydrolat) et la phase organique surnageant (huile essentielle) sont séparées par leurs différences de densité. L'HE est ensuite séchée par du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) puis récupérée et conservée à 4°C (Venturini, 2012 ; Herzi, 2013).

IV.2.2.2. Protocole expérimental d'extraction

L'hydrodistillation de l'épicarpe a été accomplie à l'aide d'un dispositif de type Clevenger, où 250 g de matière végétale sont introduites avec 1,5 L d'eau dans un ballon de 2 L. Après installation et fermeture du montage, la mise en marche de chauffe ballon est effectuée avec un réglage optimum du chauffage pour permettre une stabilité de l'extraction à une vitesse constante et bien maîtrisée. L'ensemble est porté à l'ébullition pendant 04 heures (Zheljazkov *et al.*, 2014). Le distillat ainsi recueilli est introduit dans une ampoule à décanter afin de séparer l'eau d'huile essentielle qui la surnage. Les huiles essentielles sont conservées dans des flacons en verre ambré à une température de 4°C (Jazet Dongmo *et al.*, 2008).

Le protocole d'extraction des huiles essentielles est cité en annexe N° 05

IV.2.3. Détermination des indices physico-chimiques

Les propriétés physiques (densité, indice de réfraction, ...etc.), et chimiques (indice d'acide, d'ester ...etc.), sont actuellement exigées pour l'évaluation commerciale des huiles essentielles.

IV.2.3.1. Détermination des indices physique

IV.2.3.1.1. Détermination du rendement en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle est estimé par le rapport de masse d'huile essentielle et de la matière végétale séchée (Ndoye Foe *et al.*, 2016). Il est exprimé en pour cent (%) et calculé par la formule suivante :

$$\text{Rdt}_{\text{HE}} = \frac{M_{\text{HE}}}{M_{\text{VS}}} \times 100$$

Où :

Rdt_{HE} : Rendement en huile essentielle (%) ;

MHE : Masse d'huile essentielle extraite (g) ;

MVS : Masse de la matière végétale sèche utilisée (g).

IV.2.3.1.2. Mesure de la densité

La densité d'HE correspond au rapport entre la masse d'un certain volume d'huile et la masse du même volume d'eau pris à la même température.

- **Mode opératoire**

La mesure de la densité d'HE a été réalisée à l'aide d'un pycnomètre et calculée à partir de la formule suivante :

$$D_{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

Dans laquelle :

m₀ : Masse en gramme du pycnomètre vide.

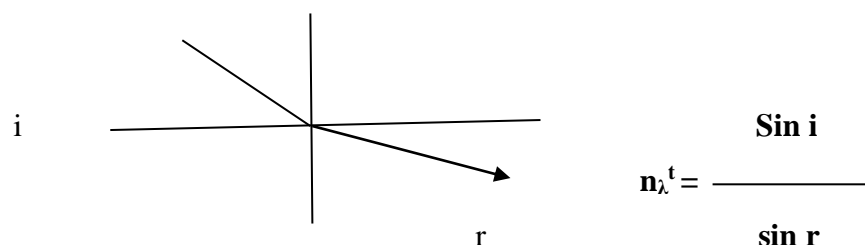
m₁ : Masse en gramme du pycnomètre rempli d'eau distillée.

m₂ : Masse en gramme du pycnomètre rempli d'huile.

D₂₀ : la valeur de la densité est déterminée selon la norme (NF T 75-111).

IV.2.3.1.3. Mesure de l'indice de réfraction

L'indice de réfraction symbolisé par n_{λ}^t est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence du rayon lumineux dans l'air et le sinus de l'angle de réfraction du rayon réfracté dans le milieu considéré (AFNOR, 2000 ; 1999).



i : Rayon d'incidence

r : Rayon réfracté

Cet indice permet de mesurer le pouvoir réfringent des huiles à 20°C par rapport à la raie « D » du dodium ($\lambda=589$ nm) d'où la notation n_{λ}^t .

- **Mode opératoire**

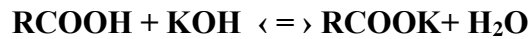
Après étalonnage du réfractomètre en utilisant l'eau distillée jusqu'à ce que le curseur de la règle du réfractomètre soit en parallèle avec la valeur « 1.330 ». On procède à l'ouverture du prisme secondaire afin de déposer à l'aide d'une seringue 2 ou 3 gouttes d'HE à analyser sur la partie centrale du prisme principal. Après ajustement du réfractomètre jusqu'à ce que la phase sombre soit égale à la phase claire, la valeur indiquée sur la règle détermine l'indice de réfraction.

IV.2.3.2. Détermination des indices chimiques

En plus des caractères physiques, on peut doser par des méthodes chimiques les fonctions (acide, ester,...etc.) présentes dans les huiles essentielles. Ces dernières permettent non seulement de mettre en évidence la présence des fonctions organiques mais aussi de mesurer leurs proportions.

IV.2.3.2.1. Indice d'acide

L'indice d'acide I_a est le nombre de milligrammes de potasse (KOH) nécessaire pour neutraliser les acides libres présentes dans un (01) gramme d'HE (NF ISO 1242: 1999 (T 75–103); AFNOR, 2000). La neutralisation d'un monoacide par la potasse se traduit par la réaction chimique suivante :



- **Mode opératoire**

Placer dans un erlenmeyer de 250 mL une quantité précise d'échantillon de matière grasse (0,5 g d'HE), 20 mL d'alcool éthylique à 96°. Bien mélanger, et titrer ce mélange par une solution éthanolique de KOH de concentration C (C= 0,1 M), en présence de phénolphaléine alcoolique comme indicateur, jusqu'à coloration rouge persistante. Noter "V" le volume de KOH utilisé. L'indice d'acide I_a est déterminé par la formule suivante :

$$I_a = V \cdot C \frac{56,11}{m}$$

Dans laquelle :

V : volume en ml de la solution de KOH utilisée pour le titrage.

C : concentration en mol/L de la solution de KOH

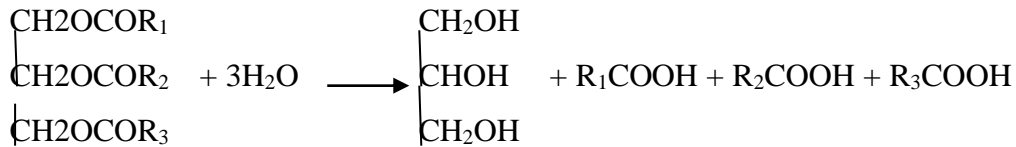
m: masse en gramme de la prise d'essai (huile)

IV.2.3.2.2. Indice de saponification

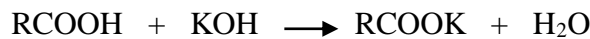
C'est la quantité en milligrammes de KOH nécessaire à la saponification des glycérides et à la neutralisation des acides gras libres présents dans un gramme de matière grasse. De cet indice, on peut déduire la quantité des acides totaux, à l'état libre et à l'état combiné contenus dans une graisse

- **Principe**

Faire bouillir le lipide avec un volume précis et en excès de la solution standard de KOH :



Les acides gras libérés réagissent avec KOH :



L'excès de KOH est titré par une solution d'HCl.

- **Mode opératoire**

Mettre 0,5 g d'huile dans une fiole, ajouter à l'aide d'une pipette ou d'une burette 20 mL de KOH alcoolique 0,1 M, ensuite on porte le mélange à ébullition en agitant de temps en temps pendant 1 h puis, refroidir. Ajouter 2 gouttes de phénolphthaléine et faire le titrage de l'excès de KOH par une solution d'HCl de concentration C₂ (0,1 M). En même temps, on exécute un dosage témoin avec le même volume (environ 25 mL) de KOH alcoolique de 0,1 M, mais sans addition de matière grasse, en opérant dans les mêmes conditions que le dosage précédent. De la différence entre la quantité d'acide chlorhydrique employé dans le dosage témoin et celui utilisé pour le dosage de matière grasse, on déduit la quantité de KOH nécessaire pour saponifier complètement la matière grasse, puis en calculant cette quantité en milligrammes pour 1 gramme de matière grasse, on obtient l'indice de saponification. L'indice de saponification est donné par la formule suivante :

$$I_s = \frac{2,805}{m} (V_0 - V_1) \quad (\text{mg KOH /g d'HE})$$

Dans laquelle:

V₀: le volume en "mL" de la solution d'HCl utilisé pour l'essai à blanc ;

V₁: le volume en "mL" de la solution d'HCl utilisé pour la détermination ;

m: la masse en grammes d'huile essentielle.

IV.2.3.2.3. Indice d'ester

C'est la quantité en milligrammes de KOH nécessaire à la saponification des glycérides présents dans 1 gramme de matière grasse. C'est la différence entre l'indice de saponification et l'indice d'acidité (AFNOR, 2000). L'indice d'ester est calculé par la formule suivante :

$$I_e = \frac{2,805}{m} (V_0 - V_1) - I_a$$

Dans laquelle :

V_0 : le volume "mL" de la solution de HCl utilisé pour l'essai à blanc ;

V_1 : le volume "mL" de la solution de HCL utilisé pour la détermination ;

m : la masse en grammes de l'huile essentielle ;

I_a : la valeur de l'indice d'acide déterminé selon la norme NF T 75- 103

IV.2.4. Analyse chromatographique des huiles essentielles (GC-MS)

L'analyse chromatographique des HEs a été effectuée avec un chromatographe en phase gazeuse type Hewlett-Packard (6890) avec détecteur de masse sélectif 6890, couplé à un spectromètre de masse (HP5973). Une colonne capillaire HP5-MS (30 m x 0,25 mm, Épaisseur de film de 0,25 μ m) a été utilisée. L'analyse a été réalisée à 280°C, le four à 5°C initial pendant 5 minutes. La température de l'injecteur était réglée à 250°C. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur à un débit de 1,0 mL/minute. Les échantillons ont été préparés avec une ionisation à 200°C et un impact électronique à 70 eV. Les pics individuels de la chromatographie gazeuse (CG) et les spectres de masse ont été identifiés par une base de données de spectres de masse correspondant à la norme disponible dans les bibliothèques comme NIST 98 et par comparaison de leur spectre de masse.

IV.2.5. Activité antimicrobienne

Les HEs sont des substances puissantes et très actives. Elles représentent une source inépuisable de remèdes naturels (Ouis, 2015). Elles présentent une importance commerciale dans le cadre d'applications pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires, agronomiques ou dans le domaine de la parfumerie (Bakkali *et al.*, 2008 ; Tajkarimi *et al.*, 2010).

Ces métabolites secondaires jouent un rôle fondamental de protection et de défense antimicrobienne des plantes (Tajkarimi *et al.*, 2010). Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques (Oussou, 2009 ; Avlessi, 2012). Elles peuvent être bactéricides ou bactériostatiques (Oussou *et al.*, 2009). Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs (Oussou, 2009). Ils participent dans les interactions entre la plante et son environnement, aussi bien dans le domaine des interactions végétales (inhibiteurs de la germination), que dans celui des interactions végétal-animal: protection contre les prédateurs, insectes, champignons et attraction des pollinisateurs (Picherski et Gershenzon, 2002; Unsicker *et al.*, 2009).

IV.2.5.1. Tests de vérification des souches bactériennes

IV.2.5.1.1. Tests microbiologiques

Les souches bactériennes que nous avons utilisées ont été fournies par le laboratoire de Microbiologie de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. Nous avons tenu de vérifier leur pureté par quelques tests microbiologiques et biochimiques. La souche fongique (*Botrytis cinerea*) a été fournie aimablement par le laboratoire de bactériologie de l'Ecole National Supérieur Agronomique d'Alger. Chacune des souches a été d'abord revivifiée dans milieu BHIB, puis repiquée afin d'obtenir des cultures jeunes. Après incubation à 37°C pendant 24 h, la coloration de Gram et l'examen microscopique au grossissement x1000 ont été réalisés. Ils permettent l'observation du mode de regroupement, la forme des cellules bactériennes ainsi que le type de Gram.

La coloration de Gram a été réalisée selon la méthode décrite par Delarras (2007), (Annexe N° 06).

- Préparer un frottis de la souche à tester
- Recouvrir le frottis de violet de gentiane, laisser agir 1 minute puis rincer à l'eau distillée ;
- Verser du lugol et laisser agir pendant 1 minute, rincer à l'eau distillée ;
- Décolorer à l'alcool à 95°, entre 15 et 30 secondes, rincer à l'eau distillée ;
- Recolorer avec de la fuchsine pendant 10 à 30 secondes, rincer à l'eau distillée ;

- Sécher au-dessus de la flamme du bec bunsen ;
- Observation au microscope optique à l'objectif x100 à l'immersion.

Les bactéries colorées en violet sont des bactéries à Gram positif, et celles colorées en rose sont des bactéries à Gram négatif.

IV.2.5.1.2. Tests biochimiques

- **Mise en évidence des pigments chez *P. aeruginosa* ATCC 27853**

Pseudomonas aeruginosa est la seule espèce qui produit deux pigments : la pyocyanine et la pyoverdine, les autres espèces ne produisent que la pyoverdine. La production de la pyocyanine est formé sur le milieu King A, en donnant une couleur bleue-verte, et la pyoverdine est de couleur jaune-verte fluorescente sur le milieu King B.

- **Test de la catalase**

Ce test permet de différencier les bactéries à Gram positif de la famille des Micrococcaceae qui sont catalase positive, des familles Streptococcaceae et Enterococcaceae qui sont catalase négative. La catalase agit en dégradant le H₂O₂ (eau oxygénée) en H₂O et oxygène qui se manifeste par un dégagement gazeux.

- **Test de la coagulase**

Le test est réalisé pour différencier les cocci à Gram positif et catalase positive. L'espèce *S. aureus* possède une coagulase libre, l'enzyme capable de coaguler le plasma oxalaté de lapin en 24 h ; des autres espèces et sous espèces de staphylocoques d'origine humaine qui ne possèdent pas de coagulase libre, sauf *S. schleiferi subsp. Coagulan*.

- **Test de l'oxydase**

Le test de l'oxydase permet de distinguer les bactéries à Gram négatif, de la famille des Entérobactériaceae à oxydase négative, des Pseudomonodaceae à oxydase positive. L'enzyme oxydase ou phényl diamine oxydase intervient dans la phosphorylation oxydative.

La présence de cette enzyme chez la bactérie Indique la présence de cytochrome C dans la chaîne respiratoire. Sur le disque d'oxydase imprégné de N-diméthyl paraphénylène diamine (incolore), les bactéries qui produisent l'enzyme oxydase, oxyde le réactif en formant l'indophénol qui est un composé violet.

IV.2.5.2. Préparation de l'inoculum

IV.2.5.2.1. Préparation de pré-culture

Les souches microbiennes à tester ont été cultivées dans des boîtes de Pétri contenant la gélose nutritive et incubées pendant 24 h à 37°C afin d'obtenir une culture jeune, en phase exponentielle de croissance.

IV.2.5.2.2. Préparation de la suspension bactérienne

A partir de cultures jeunes, quelques colonies ont été prélevées et mises dans 10 mL d'eau physiologique stérile. La suspension bactérienne a été standardisée à une DO de 0,08-0,1 à l'aide d'un spectrophotomètre à 620 nm.

IV.2.5.3. Activité antimicrobienne des huiles essentielles

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles obtenues à partir de l'épicarpe séchées à la fois de fruits d'oranges saines et infectés, ont été évaluées sur trois souches bactériennes (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) et une souche de champignon *Botrytis cinerea* par méthode de diffusion sur gélose (Rahal, 2005) (Figure 28). Une suspension contenant 10⁸ UFC/mL de bactéries a étéensemencée par étalement sur la gélose Mueller-Hinton et 10⁴ UFC/mL (déterminé par comptage sur cellule de Malassez) de champignon a été répandues sur gélose Sabouraud. Des disques en papier stériles de 6 mm ont été imprégnés avec 10 µL d'une huile volatile dilué dans du diméthylsulfoxyde (DMSO 5% (V/V)) (huiles essentielles obtenues à partir d'écorces séchées d'oranges saines et infectées) et ont été déposés dans des plaques d'agar. Des contrôles négatifs ont été préparés avec du DMSO. Amoxicilline (AX, 25 µg) et la céfoxitine (FOX, 30 µg) ont été utilisés comme étalons positifs pour déterminer la sensibilité de chaque souche bactérienne testée. L'amphotéricine B a été utilisé comme étalon

positif pour déterminer la sensibilité de la souche fongique testée. Finalement, les boîtes de Pétri ont été incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C.

L'activité antimicrobienne a été évaluée en mesurant les diamètres d'inhibition contre les souches testées. Les tests ont été effectués en triplicata.

Selon Ponce *et al.* (2003) la sensibilité des souches vis-à-vis des HEs est déterminée comme suit :

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre de la zone d'inhibition < 8mm ;
- Sensible (+) : diamètre est compris entre 9 mm et 14 mm ;
- Très sensible (++) : diamètre est compris entre 15 mm et 19 mm ;
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre de la zone d'inhibition > 20 mm.

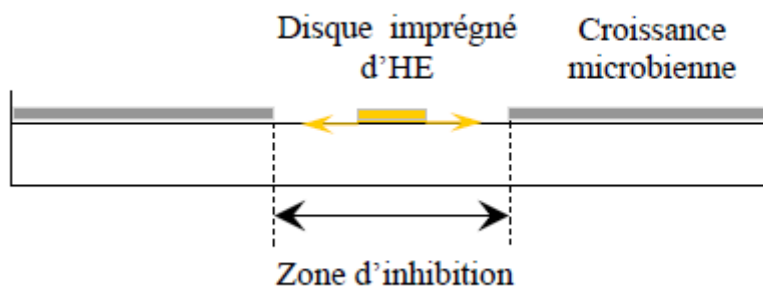


Figure 28 : Aromatoگرامme sur boîte de Pétri à diffusion linéaire à partir d'un disque imprégné d'huile essentielle.

IV.2.5.3.1. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) correspond à la plus faible concentration qui permet l'inhibition de la croissance bactérienne. La CMI des HEs étudiées a été déterminée suivant la technique de microdilution décrite par Oussou *et al.* (2004). Des dilutions géométriques allant de 32 à 0,0625 $\mu\text{L}/\text{mL}$ des huiles essentielles dans le DMSO ont été préparées (Tableau VI). Ensuite, 95 μL de BHIB et 100 μL de chaque dilution ont été ajoutés dans une microplaque de (96 puits). Enfin, 5 μL de suspensions standardisées de microorganismes ont été inoculés. Les mêmes tests ont été réalisés simultanément pour le contrôle positif et négatif. Le contrôle positif est composé de 190 μL de BHIB additionné de 5 μL d'antibiotique gentamycine, et 5 μL de l'inoculum bactérien. Le contrôle négatif est

composé de 185 μL de BHIB additionné de 10 μL de DMSO et 5 μL de l'inoculum bactérien. Les microplaques ont été incubées à 37°C pendant 24 h. La CMI a été calculée comme étant la dilution la plus élevée montrant une inhibition complète des souches testées.

Les valeurs de dilution sont résumées dans le tableau VII.

Tableau VII : Valeurs des dilutions utilisées pour déterminer les CMI d'HE

Rapport de dilution d'HE	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
(%)	50%	25%	12,5%	6,25%	3,12%	1,5%	0,78%	0,4%	0,2%	0,1%
$\mu\text{L HE/mL}$	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625

Deux répétitions ont été réalisées.

La lecture a été faite après 24 h d'incubation à 37°C par l'observation de présence ou absence de trouble.

IV.2.5.3.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

5 μL de chaque dilution ont été prélevés dans les puits montrant une absence totale de croissance et ont été étalés sur des plaques d'agar (BHIB), et incubé dans les mêmes conditions citées précédemment. La CMB était la concentration à laquelle il n'y avait pas de croissance microbienne.

Troisième partie
Résultats et Discussion

Chapitre I : Résultats de la détection sérologique de *Spiroplasma citri*

I.1. Diagnostic symptomatologique du stubborn

Les symptômes observés dans les sites visités durant toutes les campagnes étudiées rappellent ceux du stubborn, ainsi que l'intensité, le type, aussi la dispersion de ces symptômes variaient d'un site à l'autre et d'une campagne à l'autre.

I.1.1. Prospections sur terrains

I.1.1.1. Symptômes du stubborn sur les stations prospectées durant cette étude

Au cours des prospections effectuées au niveau du verger privé de Baghlia, le verger privé d'Oued-Aissi et la station expérimentale d'Agronomie de Blida, des symptômes rappelant ceux du stubborn ont été observés sur différentes variétés d'agrumes.

Dans le verger privé de Baghlia nous avons remarqué que l'intensité des symptômes diffère selon la variété soupçonnée atteinte de la maladie : sur Clémentine le symptôme le plus observé était la forme en cœur des feuilles, dissymétries de la nervure principale et des chloroses foliaires. Sur Double fine des chloroses foliaires sévères (Figure 29_{a,b}), dissymétries de la nervure principale, feuilles en forme de cœur et en cuillère (Figure 30_{a,b}), ainsi des fruits déformés avec columelles courbées et des graines avortés (Figure 31_{a,b}). Sur Thomson nous avons remarqué des dissymétries de la nervure principale (Figure 32_a), chloroses foliaires (Figure 32_b), feuilles en forme de cœur, et balai de sorcière, aussi nous avons remarqué des fruits avec columelle courbée et des graines avortés. La chute prématurée du fruit a été observée sur un seul arbre. Sur Jaffa seules des chloroses foliaires ont été observés (Figure 33). Tandis que sur la variété Valencia Late les chloroses foliaires (Figure 34_a) ont été observés mais moins abondantes que les symptômes de feuilles en forme de cœur et en cuillère ainsi que les dissymétries de la nervure principale (Figure 34_b). Des feuilles en forme de cœur, dissymétries de la nervure principale, feuilles pointues et des fruits avec columelle courbée ont été observées sur la variété Washington navel (Figure 35_{a,b}; 36). Sur l'Hamline le symptôme le plus fréquent était des jaunissements apicaux des jeunes pousses, et un feuillage abondant.

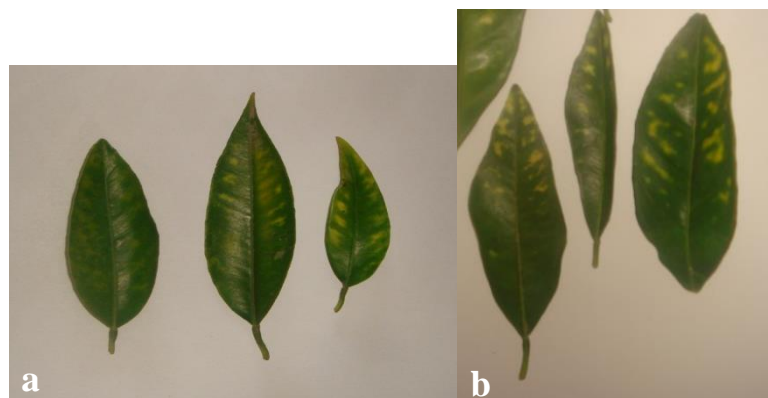


Figure 29: Symptômes du stubborn sur Double fine: **(a,b)** Chloroses sur feuilles (Verger privé de Baghlia)



Figure 30 : Symptômes du stubborn sur Double fine : **(a)** Feuilles en cuillères, **(b)** Feuilles en forme de cœur (Verger privé de Baghlia)

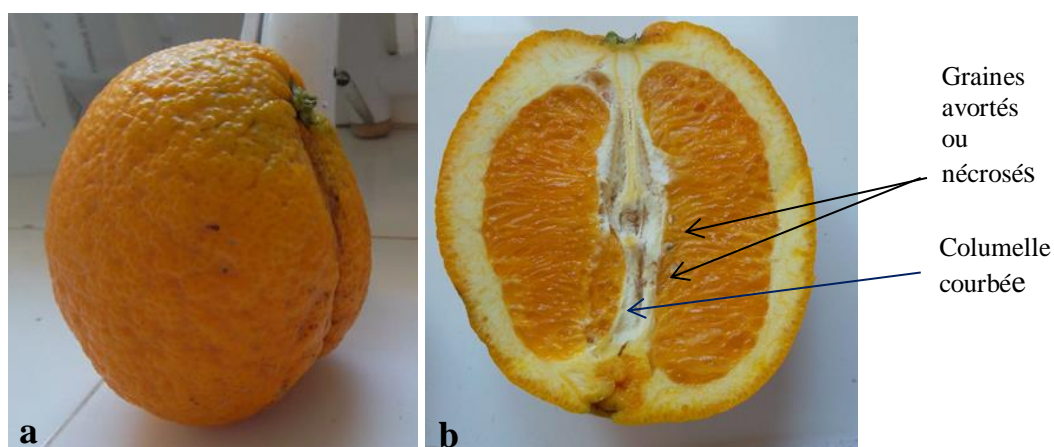


Figure 31 : Symptômes du stubborn sur Double fine: **(a)** Aspect extérieur d'un fruit déformé et **(b)** Coupe vertical du fruit avec columelle courbée et graines avortés (Verger privé de Baghlia)

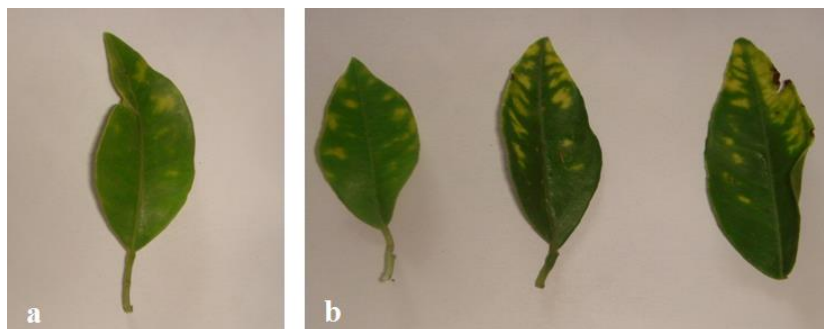


Figure 32 : Symptômes du stubborn sur Thomson: **(a)** dissymétrie de la nervure principale ; **(b)** chloroses foliaires (Verger privé de Baghlia)



Figure 33 : Symptômes de chloroses foliaires sur la variété Jaffa (Verger privé de Baghlia)

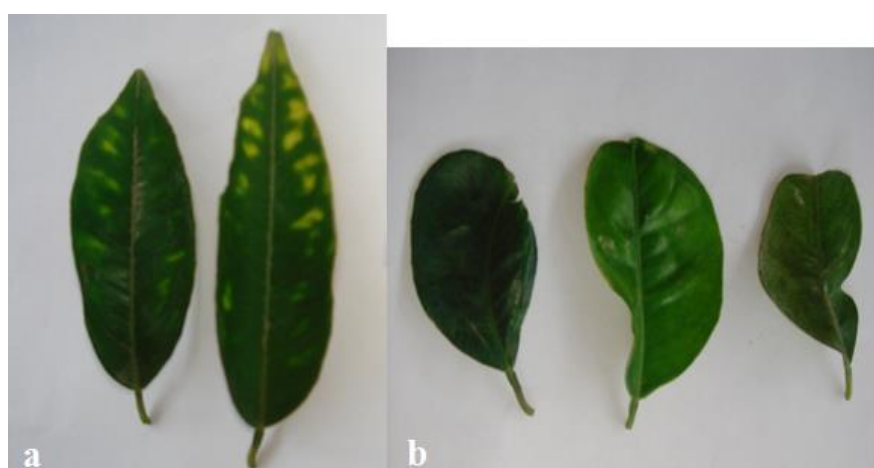


Figure 34: Symptômes du stubborn sur Valencia Late : **(a)** Chloroses apicales, **(b)** Dissymétrie de la nervure principale (Verger privé de Baghlia)

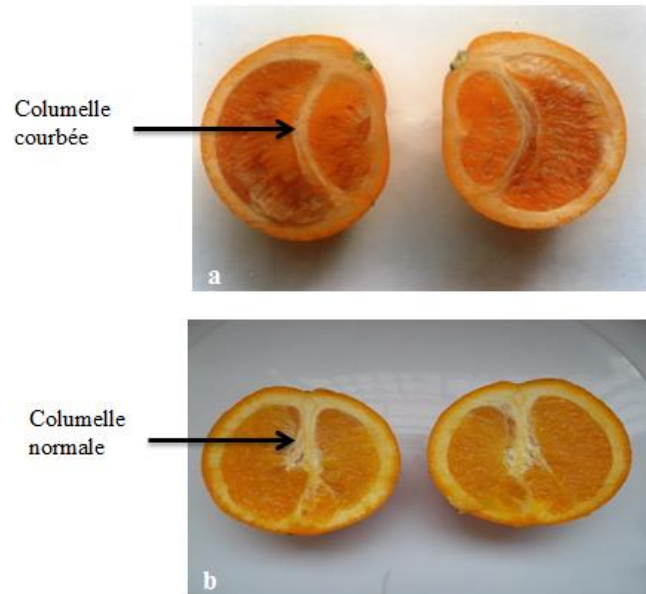


Figure 35 : Coupe vertical d'un fruit d'oranger (*Citrus sinensis*), (a) Var. Washington navel avec columelle courbée, (b) Var. Thomson avec collumelle normale (Verger privé de Baghlia)

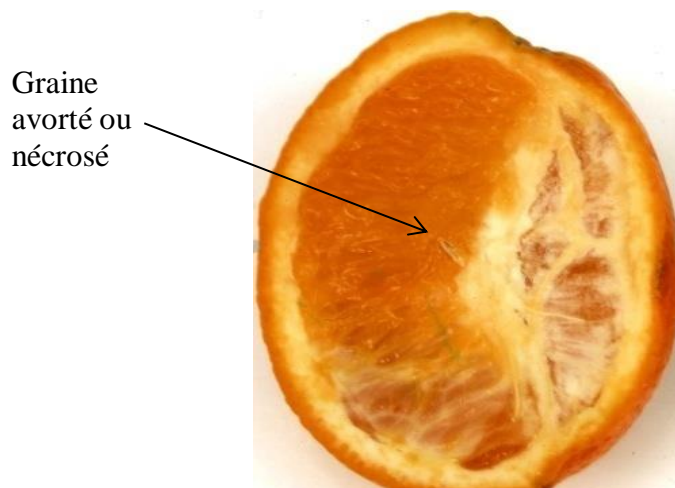


Figure 36 : Coupe vertical d'un fruit d'oranger (*Citrus sinensis*) Var. Washington navel avec columelle courbée et graines avortés (Verger privé de Baghlia)

Par contre le symptôme le plus observé sur la variété Washington navel du verger privé d'Oued-Aissi était la dissymétrie de la nervure principale avec rétrécissement du limbe (Figure 37) et la forme en cœur des feuilles (Figure 38), des chloroses, mais sont moins abondants. Nous avons remarqué aussi le balai de sorcière (Figure 39) qui se caractérisait par des proliférations des bourgeons axillaires, des feuilles opposés et un raccourcissement des entre nœuds.



Figure 37 : Dissymétrie de la nervure principale sur Washington navel
(Verger privé d'Oued-Aissi)



Figure 38 : Feuilles petits en forme de cœur sur Washington navel
(Verger privé d'Oued-Aissi)



Figure 39 : Prolifération des bourgeons axillaires (Balai de sorcière)
sur Washington navel (Verger privé d'Oued-Aissi)

Dans la St. Exp. d'Agr. de Blida, nous avons remarqué des symptômes caractéristiques du stubborn sur la variété Thomson : Chloroses sévères sur la plupart des arbres (Figure 40), feuilles en cuillère, dissymétrie de la nervure principale et feuilles en forme de cœur. Par contre sur la variété Winkler, nous avons remarqué que les symptômes

étaient moins abondants : Balai de sorcière, feuilles en cuillère et dissymétrie de la nervure principale.



Figure 40 : Chloroses foliaires sur Thomson
(St. Exp. d'Agr. de Blida)

Discussion

Les symptômes du stubborn ont été observés dans les trois stations agrumicoles prospectés (verger privé de Baghlia, verger privé d'Oued-Aissi, et la station expérimentale d'Agronomie de Blida). La variabilité de la maladie a été remarquée dans le verger privé de Baghlia vue la présence d'une gamme variétale importante par rapport aux autres vergers. Pour toutes les variétés visitées uniquement le Thomson présentait des symptômes très sévères qui étaient des chloroses importantes en plus des fruits avec columelle courbée, suivie par la Double fine et Valencia Late qui présentaient des chloroses foliaires moins importantes et des fruits avec columelle courbée. Le jaunissement apical des jeunes pousses n'était fréquent que sur la variété Hamline, par contre le symptôme des feuilles en forme de cœur, en cuillère et dissymétrie de la nervure principale ont été relevés sur toutes les variétés. Nous avons remarqué également que le balai de sorcière n'était pas fréquent, il a été signalé que sur la variété Thomson, Washington navel, et Winkler. Le symptôme de feuilles arrondies était rare pour toutes les variétés des différentes stations.

Les symptômes observés sur les différentes variétés au cours de nos prospections étaient similaires à ceux décrits par : Bové (1967 ; 1984 ; 1988 ; 1995) (Symptômes foliaires : feuilles petites, feuilles pointues ; ou jaunes et en forme de cœur (critère de diagnose très

caractéristique), développement d'yeux multiples à aspect de balai de sorcière, fruits rabougris, dissymétriques ou en forme de cupule (c'est à dire avec un zeste épais à la base et fin à l'extrémité), ils peuvent présenter des inversions de couleur (l'extrémité pédonculaire se décolore alors que l'extrémité du côté du style reste verte) ; Fawcette *et al.* (1944) ; Calavan (1968 ; 1979) ; Calavan et Carpenter (1965) ; Calavan et Oldfield (1979) ; Gumpf et Calavan (1981) (arbres rabougris et buissonnants, réduction des entre-nœuds avec formation de bourgeons multiples, feuilles petites, chloroses foliaires, fruits petits déformés avec columelle courbée, inversion de la couleur et graines avortées) ; (Timmer, 1999) (Arbres rabougris et buissonnants, feuilles dissymétriques, fruits déformés) ; (Bové et Garnier, 2000) (Floraison contre saison, fruits petits).

I.2. Résultats de la sérodétection

L'ensemble des échantillons prélevés a été analysé par la technique DAS-ELISA (Clarck et Adams, 1977). Sur 470 échantillons testés, 48 ont répondu positivement ce qui correspond à un pourcentage d'infection de 10,21%.

Au niveau de la station privée de Baghlia (Figure 41), 12 échantillons positifs du Thomson a été obtenu sur un nombre de 51 testés ce qui a donné un pourcentage d'infection de 23,52% et 11,62% sur Double fine pour laquelle un nombre de 43 échantillons a été testé et 5 ont répondu positivement, tandis que un pourcentage d'infection de 15,38% a été calculé pour la variété Clémentine et 11,76% sur Valencia Late où un nombre de 4 échantillons positifs a été enregistré sur les deux variétés sur 26 et 34 échantillons testés respectivement. Par contre aucun échantillon n'a été révélé positif pour Jaffa, Washington navel, Washington sanguine et Hamline. Au niveau du verger privé d'Oued-Aissi de Tizi-Ouzou le résultat du test DAS-ELISA était négatif pour tous les échantillons testés, par contre au niveau de la Station Expérimentale d'Agronomie de Blida, un pourcentage d'infection de 8,22% a été enregistré sur la variété Thomson, tandis que la variété Winkler a donné une incidence de 12,04% (Figure 42).

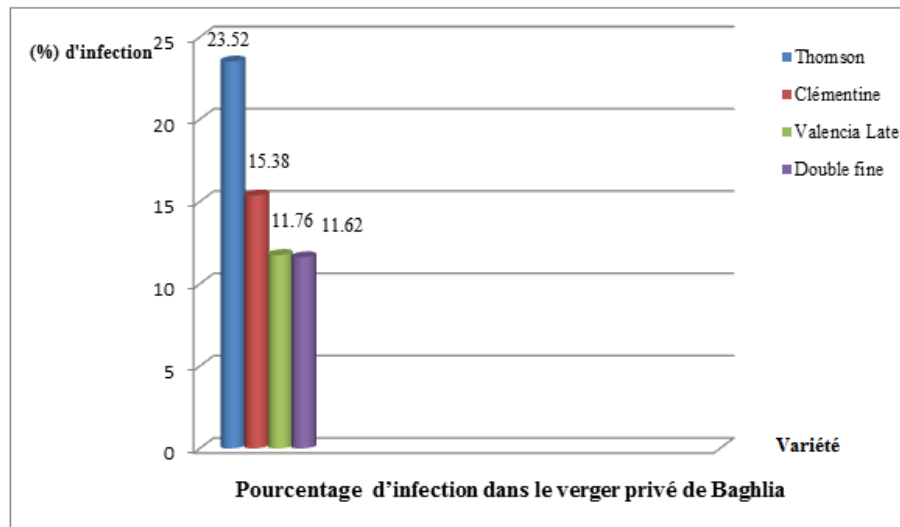


Figure 41 : Pourcentage d'infection dans le verger privé de Baghlia

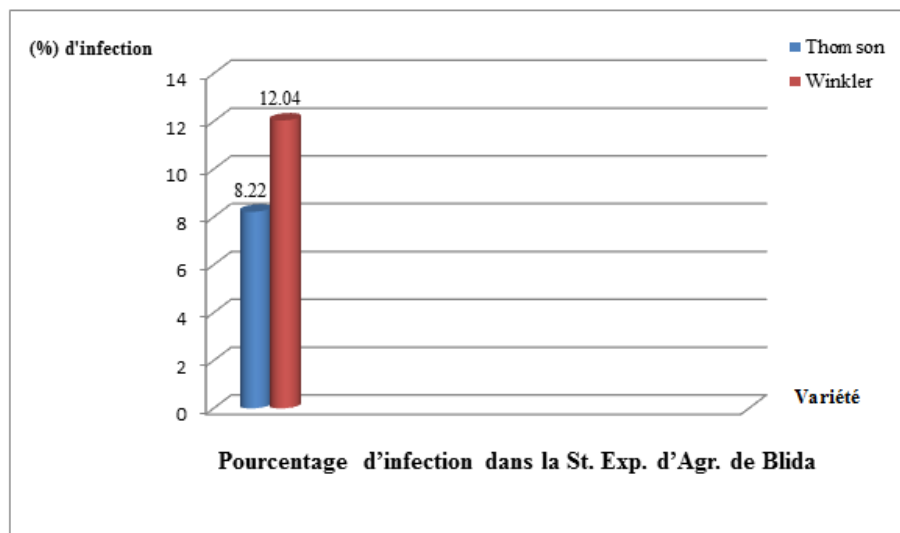


Figure 42 : Pourcentage d'infection dans la St. Exp. d'Agr. de Blida.

Selon le pourcentage d'infection calculé au niveau de ces stations (Figure 43), la région de Boumerdes présentait une valeur de 16,23%, tandis que 09,54% a été signalée dans la région de Blida. D'après ces résultats, il était avéré que la région de Boumerdes était la plus atteinte de la maladie du stubborn par rapport à la région de Blida.

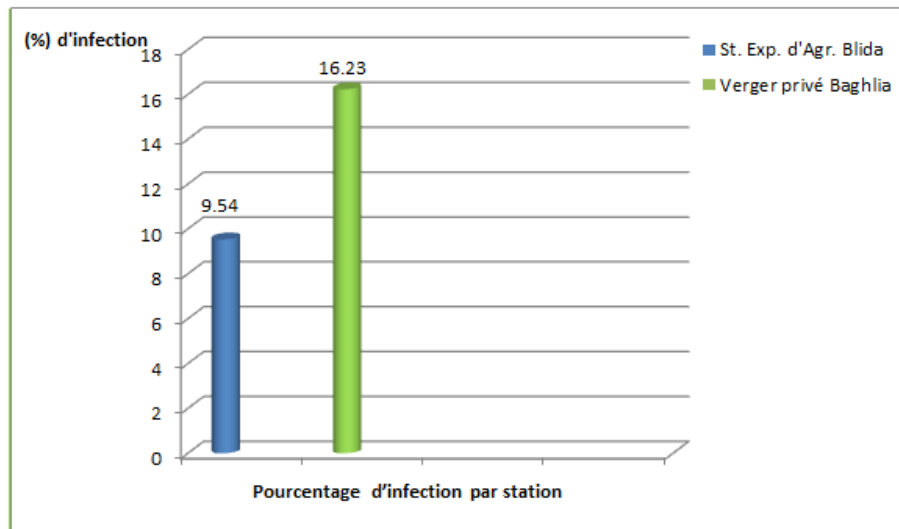


Figure 43 : Pourcentage d'infection de la maladie par station

- **Discussion**

Le travail de prospections entrepris dans les vergers du Nord de l'Algérie a permis de mettre en évidence que *S. citri* était présente sur certaines variétés d'orangers de deux vergers agrumicoles (Baghlia et Blida).

Selon les résultats obtenus par la DAS-ELISA, il a été constaté que le taux d'infection de la maladie du stubborn était variable d'une variété à une autre. La station la plus infectée était la station privée de Baghlia (Boumerdes) qui présentait un pourcentage d'infection de 16,23%, vu le nombre élevé de variétés atteintes de la maladie qui était de 25 sur 154 testés par rapport à la St. Exp. d'Agr. de Blida, où 23 échantillons positifs étaient obtenus sur 241 testés, ce qui a permis d'enregistrer un pourcentage d'infection de 9,54%. En ce qui concerne le verger privé d'Oued-Aissi, malgré la présence des symptômes du stubborn sur la variété Washington navel, aucun cas n'a été révélé positif, cela peut être dû à la concentration de *S. citri* qui était très faible dans les échantillons collectés.

Malgré la présence des symptômes du stubborn dans les différentes stations prospectées, le test DAS-ELISA était révélé négatif pour 422 échantillons.

Dans la région d'Oued-Aissi, et certaines variétés du verger privé de Baghlia, les tests sur feuilles d'arbres montrant des symptômes plus ou moins nets se sont révélés négatifs. Selon Najjar *et al.* (1998) un tel résultat, associé à la constatation de la présence de symptômes

très faibles dans les vergers, pourrait être dû à une faible concentration de *S. citri* dans les arbres, expliquée par le fait que les températures ne sont pas très élevées dans ces zones. En effet une bonne multiplication de *S. citri* implique que la température soit au moins égale à 32°C pendant plusieurs heures dans la journée. En outre selon Barthe (1992), la technique ELISA est rapide et spécifique permet de détecter de 800 à 80ng de protéines de *S. citri*. La limite de détection du test ELISA est de 10⁶ organismes par millilitre, alors qu'il n'est plus que de 10⁷ organismes par millilitre de jus de plante.

Selon Calavan *et al.* (1968) *S. citri* est mal distribué dans les différents organes d'agrumes infectés, ce qui a été prouvé par le test DAS-ELISA sur la variété Thomson où plusieurs échantillons prélevés ont été testés sur différentes parties d'un même arbre, mais uniquement un seul échantillon a été obtenu positif pour l'ensemble d'échantillons testés. Par contre d'après Roïstacher (1991), les meilleurs résultats peuvent être obtenus avec les échantillons collectés pendant la période du Printemps. Ainsi selon Garnier *et al.* (2002) les spiroplasmes se trouvent en faible concentration dans la plante, comme ces résultats négatifs peuvent être dus à l'absence de *S. citri* dans ces variétés, ou les échantillons prélevés présentant des symptômes foliaires ressemblant à ceux de carences nutritionnels ou dus à d'autres maladies causés par d'autres agents pathogènes. Selon Gumpf and Calavan (1981) ; Bové and Garnier (2000) ; Polek *et al.* (2007), les symptômes du stubborn peuvent être confondus avec ceux d'autres agents pathogènes d'agrumes ou à des problèmes nutritionnels.

La plante hôte réservoirs de *S. citri*, *Salsola kali* a été observée sur certains vergers de la région de Baghlia, mais moins abondante (Figure 44). Par contre la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) et les cicadelles vectrices n'ont pas été observés. Selon Bové *et al.* (1987) *Salsola kali* a une large distribution géographique et est considérée comme étant une plante hôte privilégiée de *N. haematoceps*. Dans les autres stations prospectées, aucun de ces facteurs n'est observé, ce qui nous a permis de conclure que la variation de l'incidence entre les différentes stations peut être due aux pratiques culturales (dissémination de la maladie dans le verger d'une variété à une autre), ou à l'utilisation du matériel de multiplication infecté (greffons ou porte-greffes) vue que l'origine des porte greffes utilisés pour l'implantation du verger de la région de Baghlia et de Tizi-Ouzou proviennent de l'Espagne. Selon la recherche bibliographique, l'Espagne n'est pas indemne de cette maladie et celui-ci constitue un danger très important dans la multiplication des variétés par greffage

et contribue à la dispersion de la maladie, cela confirme que les variétés atteintes du stubborn ont été multipliés par des porte-greffes infectés.



Figure 44 : *Salsola kali*, observée sur champ à Baghlia

Chapitre II: Résultats de la détection de *Spiroplasma citri* par culture

L'agent causal de la maladie du stubborn a été isolé à partir de jeunes feuilles d'agrumes montrant des symptômes de la maladie. Le microorganisme a été cultivé dans le milieu SP4m et incubé à 32°C. Le changement de la couleur du milieu liquide inoculé (échantillon de la variété Double fine) a été observé après 15 jours d'incubation. La couleur a été progressivement changée du rouge au jaune marron, indique la présence de *Spiroplasma* dans l'échantillon cultivé (Figure 45).

La croissance de *S. citri* en culture est suivie par le changement de couleur de l'indicateur coloré, le rouge de phénol, présent dans le milieu de culture est induit par la production d'acide lactique au cours de la croissance du spiroplasma.

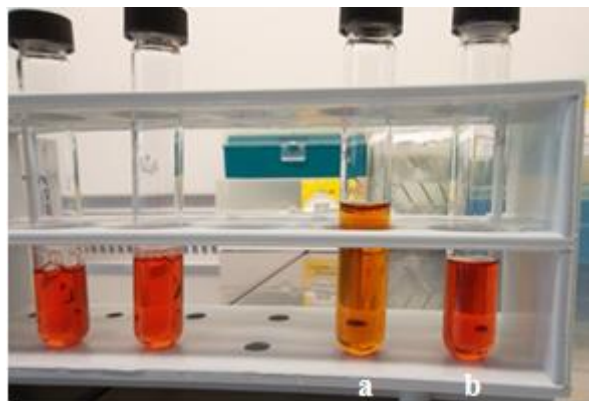


Figure 45 : Résultats de la culture de *S. citri* : (a) changement de la couleur du milieu (du rouge vers le jaune marron) ; (b) témoin négatif (couleur rouge)

- **Discussion**

Selon Plaire (2016), *S. citri* peut être cultivé de manière assez sûre à partir d'arbres présentant des symptômes, les meilleurs matériaux à utiliser sont les semences à des degrés variables d'avortement, les extrémités pédonculaires des fruits, ou les feuilles estivales marbrées récoltées en Octobre. Les jeunes feuilles et les extrémités des tiges sont coupées finement et placées dans un milieu nutritif liquide contenant du sérum animal (SP4). La croissance de *S. citri* induit le changement de la couleur du milieu liquide, qui passe du rouge à ambre et provoque une légère turbidité dans les cultures au bout de 1 à 4 semaines.

La couleur jaune marron obtenu au lieu de la couleur jaune peut être interprété par la faible concentration en cellules de *Spiroplasma citri* dans les échantillons testés. Selon Barthe (1992), une concentration de *S. citri* supérieure ou égale à 10^6 org/mL dans les échantillons est nécessaire pour obtenir une réaction positive avec l'essai de mise en culture. Cela peut expliquer les résultats obtenus par le fait que la concentration de l'échantillon était inférieure ou égale à 10^6 org/mL.

Des résultats similaires ont été obtenus par Rasooly *et al.* (1994) où des arbres qui exhibaient des symptômes typiques étaient négatifs par ELISA et par culture. En effet, selon Najjar *et al.* (1998) une bonne multiplication de *S. citri* implique que la température soit au moins égale à 32°C pendant plusieurs heures dans la journée. Ainsi, en Corse, où les températures sont rarement au-dessus de 32°C, les symptômes du stubborn sont quasiment inexistantes.

Les moyens de détection de routine de *S. citri* sont la culture en milieu liquide acellulaire et l'ELISA. La mise en culture permet l'observation de la morphologie hélicoïdale et la mobilité de l'organisme par microscopie à fond noir (Tully, 1983). Cependant ces derniers ne permettent pas la détection de *S. citri* avant l'apparition de symptômes (Brandsman et Miller, 1980), ainsi que la présence de *S. citri* en faible concentration et sa répartition inégale dans les arbres infectés (Roistacher, 1991 ; Bové *et al.*, 2003) ne permettent pas une détection précoce de la maladie. Par conséquent, l'utilisation de techniques plus sensibles, comme la PCR a de l'être envisagée (Saillard *et al.*, 1993 ; Rangel *et al.*, 2005 ; Fletcher *et al.*, 2006).

Chapitre III : Résultats de la détection moléculaire de *Spiroplasma citri*

III.1. Résultats de la PCR

L'agent causal du stubborn (*Spiroplasma citri*) a été détecté sur les 62 échantillons prélevés et testés par PCR. Sur ce nombre 08 cas étaient positifs du stubborn, dont trois échantillons de la variété Washington navel (un échantillon correspond à l'ADN extrait de columelles de fruits et deux échantillons correspondent à l'ADN extrait de nervure principale de feuilles), trois échantillons de Thomson (feuilles), et deux échantillons de Valencia Late dont un échantillon correspond à l'ADN extrait de columelles de fruits et un échantillon correspond à l'ADN extrait de nervures principales de feuilles.

Certaines des PCR réalisées ont données des résultats conformes. Il y a eu amplification. On observe des bandes distinctes à la taille attendue d'environ de 336 pb (Figure 46 ; 47 ; 48).

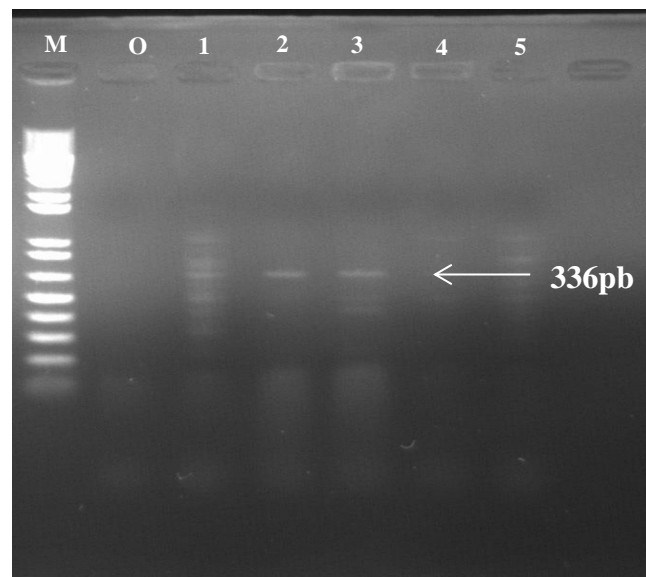


Figure 46 : Profil électrophorétique obtenu sur gel d'agarose 1,2% d'un test PCR pour la détection de *S. Citri* utilisant des amorces spécifiques. **M** : marqueur ADN 1kb plus (Promega) ; **1,4 et 5**: Thomson (fruits) ; **2: Thomson** (feuilles); **3 : Valencia Late** (fruits); **O** : témoin négatif (Eau) (amplification sans ADN).

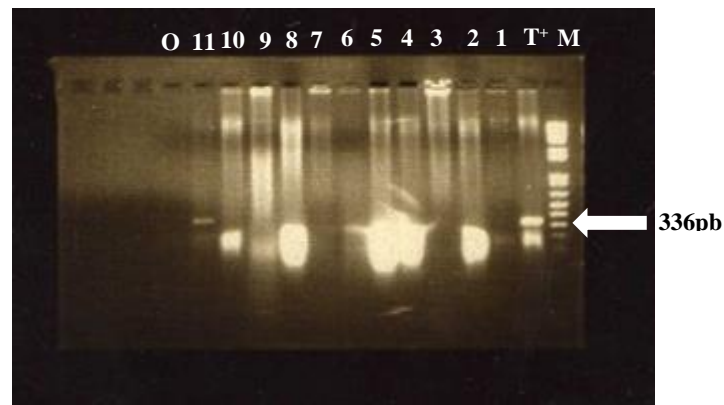


Figure 47 : Profil électrophorétique obtenu sur gel d'agarose 1,2% d'un test PCR pour la détection de *S. citri* utilisant des amorces spécifiques. **M** : marqueur ADN 1kb plus (Promega); **T⁺** : témoin positif de la souche GII3 de 336 pb ; **1-2** : Double fine ; **3-4** : Jaffa ; **5-6-7** : (**6** : Columelle de fruit de Washington navel) ; **8** : Valencia Late ; **9-10** : Thomson; **11** : Valencia Late ; **O** : témoin négatif (Eau) (amplification sans ADN).

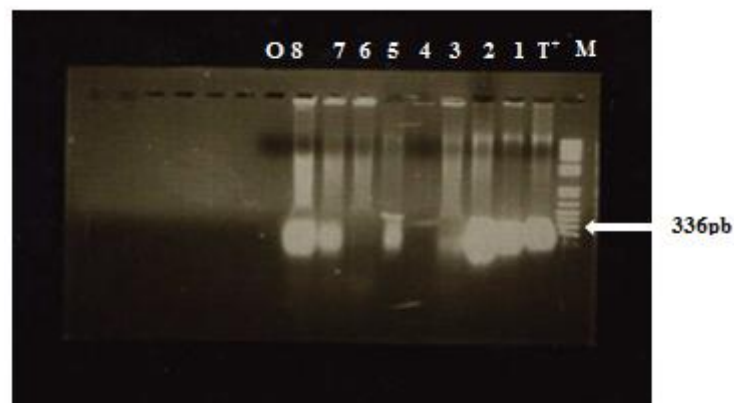


Figure 48 : Profil électrophorétique obtenu sur gel d'agarose 1,2% d'un test PCR pour la détection de *S. Citri* utilisant des amorces spécifiques. **M** : marqueur ADN 1kb plus (Promega) ; **T⁺** : témoin positif de la souche GII3 de 336 pb ; **1-2** : Washington navel ; **3-4-5** : Thomson ; **6** : Valencia Late ; **7-8** : Jaffa ; **O** : témoin négatif (Eau) (amplification sans ADN).

- **Discussion**

L'analyse des produits de l'électrophorèse de la technique PCR obtenue par l'utilisation des amorces (SC1, SC1') a montré la présence de bandes d'ADN d'une taille d'environ de 336 pb appartenant au gène codant la protéine spiruline du siproplasma.

Les résultats de la PCR vérifient bien et confirment les résultats positifs du test DAS-ELISA et de culture. Les extraits d'ADN totaux d'échantillons prélevés sur terrain ont la même distance de migration que le contrôle positif de la souche GII3 de *S. citri* isolé de France. *S. citri* a été détecté dans les échantillons de la variété Thomson et Valencia Late par les deux techniques de diagnostics (ELISA et PCR), tandis qu'il a été isolé par culture que de la variété Double fine. Des extraits d'ADN d'échantillons de la variété Washington navel, Thomson et Valencia Late ont montrés le même profil moléculaire de migration à une taille d'environ de 336 pb (Figure 46 ; 47). Ces résultats ont permis de confirmer sans doute qu'il s'agit de l'espèce *S. citri*.

La maladie du stubborn a été détectée par l'ELISA et par indexage biologique (reproduction des symptômes de la maladie sur des plantes indicatrices) sur les variétés Washington navel, Thomson, Clémentine, Double fine et d'autres variétés (Benazzouz, 2007). Ce travail confirme la présence du stubborn en Algérie par l'application d'autres techniques de diagnostic tel la culture et la PCR.

La détection de *S. citri* dans les régions méditerranéennes est difficile vu sa présence en très faible concentration dans les tissus végétaux (Djelouah *et al.*, 2014).

D'après les variations des résultats obtenus par les techniques effectuées dans la détection de *S. citri*, il est intéressant de choisir la période de prélèvement d'échantillons qui doit être stable de point de vue température dans la journée, celle-ci ne doit pas dépasser les 32°C ou être inférieur à ce seuil, car en plus de son influence sur l'apparition des symptômes, ce facteur intervient dans la multiplication du microorganisme et en conséquence sur sa charge ou sa concentration dans les tissus végétaux ou dans la plante hôte.

De plus, la détection dans les échantillons au champ est irrégulière en raison de faible titre et la répartition inégale du pathogène. Puisque *S. citri* pousse bien à des températures chaudes, le diagnostic du stubborn peut être plus fiable le mois d'été (Bové *et al.*, 2003). Cependant dans cette étude les échantillons ont été prélevés le début du mois de Septembre, ce qui peut être convenable à une période idéale de développement de symptômes. Le climat du Nord de l'Algérie n'est pas stable tous les mois d'été ce qui peut influencer sur le développement de symptômes dans cette période. En plus selon Nejat *et al.* (2011) il existe une variabilité génétique parmi les isolats de *S. citri*. Néanmoins la PCR reste l'outil le plus

prometteur pour la détection et l'identification des virus végétaux et des mycoplasmes par rapport aux autres méthodes, en raison de sa grande sensibilité selon Hadidi and Yang (1990). Aussi Osorio (2000), a indiqué que la détection par PCR devrait être supérieure à la culture en termes de sensibilité et de fiabilité. Il a été ajouté que la méthode PCR est également très spécifique avec pratiquement aucun faux positif en raison de la nature unique des amorces de la spiruline. Mahrous *et al.* (2005) ont démontrés par la technique ELISA et PCR que la concentration de *S. citri* est plus élevée dans les fruits et les nervures principales des feuilles que dans les tiges.

Chapitre IV: Résultats de l'impact du stubborn sur la qualité des fruits et des huiles essentielles

IV.1. Détermination des caractères morphologiques et biochimiques des bactéries testées

Les caractères morphologiques et biochimiques des bactéries testées ont été vérifiés au laboratoire (voir Annexe N° 06), les résultats sont résumés dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Caractères morphologiques et biochimiques des bactéries testées

Espèces bactériennes	Gram	Aspect microscopique	Catalase	Oxydase	Coagulase	Pigments
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Positif	Cocci en grappe de raisin	+	NR	+	NR
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Négatif	Bacille	NR	+	NR	Pyocyanine et pyoverdine
<i>E. coli</i> ATCC 25322	Négatif	Coccobacille	NR	-	NR	NR

(-) : résultat négatif

(+) : résultat positif

(NR) : Non recherché

IV.2. Détermination des indices physico-chimiques

Le rendement en huile essentielle obtenu par hydrodistillation des écorces séchées de fruits d'oranges infectés par le stubborn était de 0.65% p/v. Ce rendement était supérieur à celui obtenus à partir des huiles essentielles d'écorces séchées de fruits d'agrumes sains (0.53% p/v). En revanche, aucune différence de couleur entre les deux huiles essentielles n'a été observée, elles avaient la même couleur jaune d'orée.

Les propriétés physico-chimiques les plus intéressantes des deux huiles essentielles issues des fruits d'oranges infectés et sains sont présentées dans le tableau IX. Ces huiles présentent des propriétés similaires à celles requises par AFNOR (Organisation Nationale Française de Normalisation). Egalement une densité plus faible a été remarquée sur les huiles essentielles des fruits d'oranges infectés par la maladie du stubborn, et l'indice de réfraction

était de 1.365, ce qui était bien inférieur à l'indice de réfraction de référence qui variait généralement de 1.471 à 1.474 selon Garnero (1996) (Tableau IX).

Tableau IX: Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles d'oranger

Paramètres étudiés	HE extraites de fruits d'oranger infectés par le stubborn	HE extraites de fruits d'oranger saints	Standard
Densité	0.49	0.86	0.87 (Garnero, 1996)
Indice d'acide	0.16	0.14	
Indice d'ester	11.40	14.93	
Indice de saponification	11.57	15.07	
Indice de refraction	1.365	1.473	(1.471-1.474) (Garnero, 1996) (1.470-1.476) (Franchomme and Penoël, 2001)

IV.3. Composition chimique des huiles essentielles

Vingt-trois composés ont été détectés par analyse GC-MS à partir d'écorce d'orange séchée, mais parmi ceux-ci, six composés n'ont pu être identifiés car leur fragmentation de masse a montré une faible similitude (Tableau X) (Figure 49-53, citées en Annexe N° 07).

Le d-limonène était le principal composé représentant 95%. Autres composants mineurs ont été enregistrés, ils comprenaient l' α -pinène, le 1 r- α pinène et le β -pinène, aldéhydes (octanal, décanal), monoterpènes oxygénés (β -citronellal) en plus des cyclohexènes et le β -phellandrène. Tous les autres composés se sont révélés présents à l'état de traces (Tableau X).

La présente étude a mis en évidence la production de certains composés (trans-p-mentha-2,8-diénolet 2-cyclohexène-1-ol, 1-méthyl-4- [1-méthyl-4- (1-méthyléthyl)] - cis) par des oranges infectées par le stubborn, (les oranges saines ne les produisent pas).

Tableau X: Composés chimiques en pourcentage des deux huiles essentielles extraites de fruits d'oranges saines et infectés par le stubborn.

Composés	Contenu relatif (%) HE des oranges saines	Contenu relatif (%) HE des oranges infectés par le stubborn	t _R (min)
1r-α- pinene	0.53	0.25	3.09
β-phellandrene	0.6	0.7	3.65-3.69
naphtalene, 1,2,3,5,6,7,8, 8a-octahydro-1,8a- dimethyl-7-[1- methylethenyl]-, [1R-(1 α ,7 β ,8 $\alpha\alpha$)]-	0.03	0.03	21.88
d-limonene	95.40	95.42	4.68-4.72
3-cyclohexen-1-ol, 4- methyl-1-[1-methylethyl]-, [R]- butylatedhydroxytoluene	0.01	0.03	9.35-9.39
	0.30	0.00	22.32-22.37
1,6-octadien-3-ol,3,7- dimethyl- (β-linalool)	0.60	0.28	6.51
β-pinene	0.25	0.27	3.78
1-cyclohexene-1- carboxaldehyde, 4-[1- methylethenyl]-	0.02	0.01	13.07
2-cyclohexen-1-one, 2- methyl-5-(1- methylethenyl)-, [S]-	0.01	0.01	11.79
decanal	0.01	0.03	10.28
2-cyclohexen-1-ol,2- methyl-5-(1- methylethenyl)-, <i>cis</i>	0.01	0.52	10.78
<i>trans</i> -p-mentha-2,8-dienol	0.00	0.02	7.28
2-cyclohexen-1-ol, 1- methyl-4-[1-methy-4-(1- methylethyl)]-, <i>cis</i>	0.00	0.01	7.39
octanal (n-caprylaldehyde)	0.09	0.05	4.03
2,6-octadienal, 3,7- dimethyl-,[Z]- (β-citral)	0.03	0.06	11.55
2,6-octadienal, 3,7- dimethyl- (citral)	t	T	12.74
<i>cis</i> -p-mentha-2,8-dien-1-ol	t	T	7.76
benzene, 2-ethyl-1,3- dimethyl-	t	T	4.57-4.59
1,3-cyclohexadiene,1- methyl-4-(1-methylethyl)- (α-terpinen)	t	T	4.40

3-cyclohexene-1-methanol, α , α ,4-trimethyl-	t	T	9.91
p-mentha-1-[7], 8(10)-dien-9-ol	t	T	13.68
6-octenal, 3,7-dimethyl- (β -citronellal)	0.00	0.09	8.25

t: trace (valeur en pourcentage inférieure à 0.01%); t_R : temps de rétention

IV.4. Résultats de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

Selon les résultats de cette étude, l'huile essentielle extraite d'écorce séchée d'orange saine a montrée l'activité la plus élevée, en particulier sur *S. aureus* ATCC 25923 (25.16 ± 2.75 mm) que celle de l'huile essentielle issue d'oranges infectées par *S. citri* (16.00 ± 2.64 mm) (Tableau XI). Alors que l'huile essentielle extraite d'oranges infectées par *S. citri* a montré l'activité la plus faible sur *E. coli* ATCC 25922 (7.00 ± 0.00 mm) et sur *P. aeruginosa* ATCC 27853 (6.00 ± 0.00 mm). Cependant, aucune activité antifongique n'a été révélée; les deux huiles essentielles n'ont montré aucun effet sur *B. cinerea*. Concernant les concentrations minimales inhibitrices (CMI) enregistrés sur *S. aureus* à partir de l'huile essentielle extraite de fruits sains était d'environ $4 \mu\text{L}/\text{mL}$ tandis que celle extraite d'oranges infectées par *S. citri* à exhibée une CMI de l'ordre de $32 \mu\text{L}/\text{mL}$.

Tableau XI. Diamètres d'inhibition (mm) observés sous l'effet des deux huiles essentielles d'oranges extraites (n=3)

Diamètres d'inhibition Souches	HE des oranges saines	HE des oranges infectées par <i>S. citri</i>
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	25.16 ± 2.75	16.00 ± 2.64
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	7.00 ± 0.00	6.00 ± 0.00
<i>E. coli</i> ATCC 25922	8.00 ± 0.00	7.00 ± 0.00
<i>Botrytis cinerea</i>	-	-

(-) : négatif

• Discussion

La variabilité des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles évaluées peut être attribuée à l'effet de l'agent pathogène sur la photosynthèse. L'utilisation du fructose par les spiroplasmes conduit à la diminution de cet élément dans les cellules compagnes, altérant ainsi la charge de saccharose dans la sève élaborée. L'utilisation préférentielle du fructose

augmentait l'activité de l'invertase, entraînant une accumulation de glucose et une inhibition de la photosynthèse. Les deux mécanismes peuvent contribuer à la pathogénicité de *S. citri* (Renaudin, 2006), et par conséquent, à la composition chimique de l'huile essentielle et sur leur densité.

En 2017, Bozkurt *et al.* ont déterminés la composition chimique des huiles essentielles de certaines variétés d'agrumes. Ils ont constatés que les principaux constituants étaient l' α -pinène, le sabinène, le β -pinène, le β -myrcène, le d-limonène, linalol, m-cymène et 4-terpinéol. En outre, le d-limonène était le composé le plus abondant.

Ces résultats étaient différents de ceux de Bousbia (2011), qui avait analysé la composition de l'huile essentielle par GC-MS de la même variété Washington navel et Tangelo, extraite par extraction assistée par Micro-ondes, hydrodistillation et expression à froid. La plupart des études avaient souligné que le rapport de limonène est élevé dans les huiles d'agrumes (Hosni *et al.*, 2010 ; Bozkurt *et al.*, 2017). Certaines variations ont été observées dans la composition et le pourcentage de constituants dans les huiles essentielles par rapport aux études précédentes. Ces variations étaient probablement dues aux changements climatiques, au sol, à l'altitude, à l'état de santé de la plante et de l'organe infecté, et à d'autres conditions (Möller, 2008 ; M'hiri, 2015).

La présente étude, a montré que l'agent du stubborn induisait la diminution de nombreux composés et a permis l'apparition de composés toxiques tels que le décanal. Une exposition chronique à ces composés toxiques peut entraîner un certain nombre de désordres physiologiques, y compris des dommages rénaux, maladies rénales chroniques et maladies cardiovasculaires (Young and Wu, 2012 ; Schulz *et al.*, 2014).

Selon les études de toxicité du cyclohexane chez les souris et les rats exposés à 7000 ppm, des signes cliniques d'une hyperactivité et une stimulation du système nerveux central ont été observés. Les signes cliniques de toxicité inclus: hyperactivité, contournement, toilettage excessif, coups de pied des pattes arrière, debout sur les pattes arrière et comportement de retournement occasionnel (Malley *et al.*, 2000). Yasugi *et al.* (1994) ont constatés que des travailleurs exposés à des niveaux même faibles de cyclohexane par inhalation pendant 6 heures, ont développés une baisse visuelle. La même étude, réalisée par Yuasa *et al.* (1996) a décrit d'autres effets, notamment : somnolence, étourdissements,

faiblesse des membres, perturbations sensorielles (hypoesthésie et paresthésie) et dysfonctionnement de la motricité des nerfs médians, cubital et perinéal.

Les résultats obtenus sur l'activité antimicrobienne, ont confirmé que la faible sensibilité des bactéries Gram négatif était liée à la présence d'une membrane lipopolysaccharidique (LPS) qui joue le rôle de barrière contre les huiles essentielles. En effet, le LPS de la paroi des bactéries à Gram-négatives leur confère un caractère hydrophile qui rend leur membrane externe imperméable à la plupart des constituants hydrophobes des huiles essentielles (Saei-Dehkordi *et al.*, 2010). Les résultats obtenus étaient en accord avec ceux d'autres chercheurs, qui avaient confirmé que l'activité antimicrobienne de certaines huiles essentielles pourrait être attribuée à la présence de composés mineurs (alcools terpéniques (linalool, etc.) présents à de faibles concentrations selon Aberchane *et al.* (2003) El Malki *et al.* (2018), et l'efficacité antimicrobienne d'une huile essentielle était principalement due au contenu et à la nature des constituants pouvant agir séparément ou en synergie.

Les effets antibactériens de l'huile essentielle des agrumes s'expliquent principalement par la présence de terpènes C₁₀ et C₁₅, car les hydroxyles des groupements phénoliques pouvaient se lier aux sites actifs des enzymes cibles par des liaisons hydrogènes. Les alcools terpéniques (bornéol, linalol, p-cymène-8-ol, α -terpinéol, etc.) sont connus pour leur fort pouvoir antimicrobien et leur solubilité dans l'eau, ce qui leur confère une grande capacité à pénétrer les parois des cellules bactériennes (Belletti *et al.*, 2004). Dans cette étude, le potentiel inhibiteur des huiles essentielles étudiées est principalement dû à la présence de linalool et ses dérivés connus pour leurs efficacités contre les agents microbiens selon Satrani *et al.* (2004). Une action bactéricide avec une valeur de CMI = CMB = 4 μ L/mL a été enregistrée pour l'huile essentielle de l'échantillon sain. Ces résultats coïncident avec ceux obtenus par Oussalah *et al.* (2007) en travaillant sur 28 huiles essentielles dont 24 étaient capables d'inhiber *S. aureus*. Parmi les 28 HEs testées à des concentrations $\leq 4 \mu$ L/mL, cette dernière était la bactérie la plus sensible à l'activité des huiles essentielles. En outre, Bozkurt *et al.* (2017) ont travaillé sur l'activité antimicrobienne de huit huiles essentielles de certaines variétés d'agrumes sur six souches bactériennes (*E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes* et *E. faecalis*). Les huit huiles essentielles ont eu des effets inhibiteurs sur les six bactéries testées, et l'huile essentielle de l'orange sanguine Moro était plus efficace contre *E. coli* et *S. typhimurium*. Il a été noté que l'action d'une molécule antifongique dépend de l'ultra-structure de la cellule fongique qui présentait trois barrières : la

paroi cellulaire chitineuse, la membrane ergo-stérol et le noyau eucaryote, et les molécules antifongiques elles-mêmes, qui peuvent naturellement générer une résistance (Prasad et Kapoor, 2004).

Généralement, la composition chimique des huiles essentielles doit être prise dans son intégralité. En effet, il ne faut pas négliger l'effet synergique entre les différents constituants, y compris les constituants minoritaires. Les écorces d'oranges sont une riche source d'ingrédients nutritionnels (eau, protéines, sucres et minéraux) et ingrédients fonctionnels (huiles essentielles, fibres, caroténoïdes, vitamine C et composés phénoliques) (Singh *et al.*, 2010).

Les écorces d'oranges peuvent être utilisées pour la production de biocarburants (éthanol), de biogaz (Lohrasbi *et al.*, 2010) et du plastique biodégradable (Byrne *et al.*, 2004). Ces composés peuvent être extraits par les industries de transformation non seulement des bonnes oranges, mais aussi des oranges infectées et impropres à la consommation. L'extraction d'huiles essentielles à partir d'écorces d'oranges génère des sous-produits intéressants tels que des huiles concentrés et déterpénées, formulations d'alcools et de d-limonène (Kesterson et Braddock, 1976). Ce dernier peut être utilisé dans grands domaines d'applications en tant que composant de résines synthétiques, un solvant comme substitut des solvants minéraux et comme base pour la synthèse de composés aromatiques (Di Giacomo *et al.*, 1992).

Conclusion et Perspectives

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Dans cette présente étude, trois techniques de diagnostic ont été appliqués pour la détection de *S. citri* en Algérie, à savoir la culture dans un milieu artificiel liquide (SP4m), le test DAS-ELISA et la technique de PCR. *S. citri* a été recherché dans la station expérimentale du département de biotechnologie de l'université de Blida₁, dans le verger privé d'Oued-Aissi (Tizi-Ouzou) et dans le verger privé de Baghlia (Boumerdes). Les prospections effectués ont permis de déceler, prélever et de tester des échantillons d'agrumes montrant des symptômes typiques du stubborn.

Les techniques réalisées ont permis de détecter l'agent pathogène responsable de la maladie du stubborn (*Spiroplasma citri*) sur certaines variétés de vergers agrumicoles situés au Nord de l'Algérie, à savoir la wilaya de Blida et la wilaya de Boumerdes.

Les symptômes du stubborn provoquent des répercussions irréversibles sur l'aspect économique des fruits et sur l'aspect morphologique de l'arbre. Les arbres atteints auront un aspect plus ou moins rabougris. Les feuilles sont plus courtes et plus larges, bombées, anormalement dressées. Les pousses peuvent être anormalement groupées et le développement de bourgeons axillaires peut entraîner l'apparition de balais de sorcières. La production de fruits tend à être supprimée sur les plantes touchées. Les fruits peuvent être rabougris, dissymétriques ou en forme de cupule, ils peuvent présenter des inversions de couleur. Pour cette raison, l'introduction de cet agent pathogène est interdite dans de nombreux pays et une mise en quarantaine des plants d'agrumes infectés ou importés est requise.

Selon les résultats des prospections symptomatologiques et des tests effectués, il a été constaté que l'intensité des symptômes sur les différentes variétés varie d'une saison à l'autre et d'une région à l'autre. La température joue un rôle clés sur l'extériorisation des symptômes et sur la charge en cellules bactérienne dans les tubes criblés du phloème des plants d'agrumes. Ainsi, Les agrumes atteints par la maladie du stubborn sont autant de source d'infection pour les vecteurs. Etant donné que l'agent causal n'étant pas transmis par la graine, les agrumes obtenus par semis sont indemnes de la maladie du stubborn. D'après cette étude les arbres malades ont été infectés soit par vecteur soit par l'utilisation de greffes

Conclusion générale et perspectives

malades. Egalement Les fruits déformés et décolorés sont défavorables aux consommateurs, ce qui rend les fruits gravement atteints inutilisables.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons pu mettre en évidence l'impact du Mollicute *S. citri* sur la qualité des huiles essentielles des fruits. Les huiles essentielles de fruits d'orange infectées et non infectées par le stubborn (*Spiroplasma citri*) ont été extraites par hydrodistillation et analysés par GC-MS. Les principaux constituants d'huiles essentielles d'oranges étaient : d-limonène, α -pinène, 1 r- α -pinène et β -pinène. Le d-limonène était le composé le plus abondant. Le rendement en huile essentielle à partir d'écorces séchées d'oranges infectées par le stubborn était plus élevé que celui obtenus à partir d'agrumes sains. Également la présente étude a mis en évidence la production de certains composés toxiques (trans-p-mentha-2,8-diéanol et 2-cyclohexène-1-ol, 1-méthyl-4- [1-méthyl-4- (1-méthyléthyl)] - cis) par des oranges infectées (les oranges saines ne les produisent pas). En outre, les huiles essentielles d'orange saines et infectées avaient un puissant effet inhibiteur sur *S. aureus* ATCC 25923. Néanmoins, les deux huiles essentielles n'ont pas montré d'effets sur *B. cinerea*.

L'agrumiculture Algérienne est confrontée à beaucoup de contraintes : tel que le manque d'études sur les maladies des agrumes surtout celles transmises par greffage et de leur répartition à travers le pays, la désorganisation de la filière au niveau de toutes les activités (production de plants, transformation, commercialisation...etc.), et l'absence des parcs à bois agrumicoles, comme source d'approvisionnement en matériel végétal de multiplication (semences et greffons certifiés).

Pour limiter ces inconvénients, nous devons d'abord connaître l'état sanitaire de nos vergers et ce par la détection de toutes les maladies graves pouvant répercuter sur la qualité et la quantité du rendement comme le stubborn et donc de repérer les zones les plus touchés. Pour cela :

- Il est important d'isoler les souches de *S. citri* présent ou existants dans notre pays, pour pouvoir déterminer les moyens les plus efficaces pour leur détection.

Conclusion générale et perspectives

- La détermination de la paire d'amorces la plus spécifique et la plus efficace pour la détection de la souche Algérienne de *S. citri*, améliorera et facilitera les programmes de certification des agrumes en Algérie
- L'identification des plantes hôtes de *S. citri* en Algérie, autres que les agrumes, serait judicieuse puisque ces plantes constituent vraisemblablement une source d'inoculum pour les cicadelles.
- Il est également important de rechercher et identifier les cicadelles vectrices de ce Mollicute et si certaines d'entre-elles renfermaient *S. citri*.

Pour réduire la propagation de cette maladie, les arbres présentant des symptômes devraient être arrachés et remplacés, car en plus du risque qu'ils constituent pour les arbres voisins, ils ne fructifieront jamais de manière satisfaisante.

Dans le cadre de l'amélioration de la production fruitière, il est important de sélectionner des variétés résistantes indemnes de cet agent pathogène par les techniques d'embryogenèse somatique, et de mettre à la disposition aux agriculteurs des fiches techniques démontrant l'aspect symptomatologique de certaines maladies virales et bactériennes dans le but de les sensibiliser et la nécessité de faire des inspections dans le verger a fin de signaler tout apparition de symptômes douteux.

Grâce à leurs nombreuses activités biologiques, les huiles essentielles provenant de fruits atteints ou non du stubborn doivent être valorisées via plusieurs domaines, principalement la santé humaine, la chimie verte et l'agriculture durable. Cependant, de nombreux des investigations devraient être menées sur leur mode d'action et leurs effets toxicologiques probables afin d'optimiser leurs utilisations potentielles.

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Abd El-Fatah, W.H., A.O. Egiza, S.A. Youssef, and A. A. Shalaby. 2016.** Isolation and Identification of *Spiroplasma citri* Associated with *Citrus* stubborn disease in Egypt. Int. J. of Adv. Res. in Biological Sci. Volume 3, Issue 9. p. 10. ISSN: 2348-8069. doi: <http://dx.doi.org/10.22192/ijarbs.2016.03.09.030>.
2. **Aberchane, M., B. Satrani, M. Fechtal, and A. Chaouch. 2003.** Effect of infection of Atlas cedar wood by *Trametes pini* and *Ungulina officinalis* on the chemical composition, antibacterial and antifungal activity of essential oils. Acta Bot. Gallica 150(2):223–229. doi: 10.1080/12538078.2003.10515420.
3. **Accarias, S. 2014.** Impact du phénotype des macrophages résidents sur la nature de la réponse inflammatoire précoce lors d'une infection par *Staphylococcus aureus*. Thèse Doc. Université Paul Sabatier Toulouse III. France. p. 212.
4. **AFNOR NF ISO 1242 (T 75-103). 1999.** Essential oils: Determination of essential oils -Determination of the acid index -Reference method (approved September 5, 1994). Official Journal of February 23, 1999, N° 147: Notice relating to the approval and cancellation of standards. NOR: ECOI9910009V.
5. **AFNOR. 2000.** Compendium of standards: Essential oils, p. 661–663. Vol. 2. Monographs relating to essential oils, Paris.
6. **Agroligne. 2020.** L'essentiel de l'Agroalimentaire et de l'Agriculture en Méditerranée Vers l'effondrement de la production d'agrumes en méditerranée. <https://www.agroligne.com/actu/24839-2019-2020-vers-l-effondrement-de-la-production-d-agrumes-en-mediterranee.html>.
7. **Aguilar, E., W. Villalobos, L. Moreira, C.M. Rodriguez, E.W. Kitajima, and C. Rivera. 2005.** First report of *Xylella fastidiosa* infecting *Citrus* in Costa Rica. Plant Disease, 89 : 687.
8. **Agustí, M., C. Mesejo, C. Reig and A. Martínez-Fuentes. 2014.** *Citrus* production. In: Dixon G.R., and D. E. Aldous (eds.), Horticulture : Plants for People and Place, Volume 1: Production Horticulture, Ed. Springer (Dordrecht), pp. 159 - 195.
9. **Ahlawat, Y.S., V.V. Chenulu, S.M. Viswanath, P.K. Pandey, and K.N. Bhagabati. 1985.** Mosaic disease of *Citrus* in India. Current Science, 54 : 873–874.
10. **Albagnac, G., P. Varoquaux, J.C. Montigaud. 2002.** Technologie de transformation des fruits, Lavoisier, Paris, pp. 302-304.
11. **Aly, R., H.I. Shinefield, W.G. Strauss, H.I. Maibach. 1977.** Bacterial adherence to nasal mucosal cells. Infect. Immun. 17 :546-549.

12. **Ammar, E. D., D. Fulton, X. Bai, T. Meulia, and S. A. Hogenhout. 2004.** An attachment tip and pili-like structures in insect- and plant-pathogenic spiroplasmas of the class Mollicutes. *Arch. Microbiol.* 181(2): 97-105.
13. **ANDI. 2015.** Agence Nationale de Développement de l'Investissement, p. 32.
14. **Andre, A., W. Maccheroni, F. Doignon, M. Garnier, and J. Renaudin. 2003.** Glucose and trehalose PTS permeases of *Spiroplasma citri* probably share a single IIA domain, enabling the spiroplasma to adapt quickly to carbohydrate changes in its environment. *J. Microbiol.* 149(Pt 9): 2687-96.
15. **CIRAD – GRET. 2009.** Mémento de l'agronome. Quae : France, p. 1695.
16. **Archer, D.B, R. Townsend and P.G. Markham. 1982.** Detection of *Spiroplasma citri* in plants and insect hosts by ELISA. *J. Plant Pathol.* 31 :299-306.
17. **Avlessi, F., J. Dango, V.D. Wotto, G.A. Alitonou, D.K. Sohounhloue, et C. Menut. 2004.** Propriétés antioxydantes de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* (Wild) Hook. *Comptes Rendus Chimie.* 7(10-11): 1057-1061. doi : 10.1016/j.crci.2003.11.015.
18. **Bachés, B., et M. Bachés. 2002.** Agrumes - Comment les choisir et les cultiver facilement, (eds.) Eugen Ulmer. France, p. 128.
19. **Bakkali, F., S. Averbek, D. Averbek, and M. Idaomar. 2008.** Biological effects of essential oils. *Rev. Food. Chem. Toxicol.* 46(2):446-475. doi: 10.1016/j.fct.2007.09.106.
20. **Bampidis, V.A., P.H. Robinson. 2006.** *Citrus* by-products as ruminant feeds: a Rev. *Anim. Food Sci. Technol.* 128, 175-217.
21. **Barboni, T. 2006.** Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d'incendie. Thèse Doc. Ecole doctorale environnement et société. Univ. de Corsica – Pasquale Paoli : 35-38p.
22. **Bar Joseph, M., S.M. Garnsey, D. Gonsalves, M. Moskovitz, D.E. Puriful, M.F. Clark, and G. Loebenstein. 1979.** The use of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of Citrus tristeza virus. *J. Phytopathol.* 69:190-194.
23. **Barthe C., 1992.** Mise au point et optimisation de techniques de détection de *Spiroplasma citri*: Application à la détection au champ. D.E.A. Biologie-Santé. Option III- Pathologie Microbienne et Virale. Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire. I.N.R.A. Univ. Bordeaux II, 29, 14-23.
24. **Benazzouz, K. 2007.** Connaissances sur les phytoplasmes des agrumes caractérisation immuno-enzymatique DAS-ELISA du stubborn (*Spiroplasma citri*) en Algérie. Mémoire de Magister, spécialité : Protection des végétaux. Univ. Blida, Algérie. p. 178.

25. **Belletti, N., M. Nidagijimana, C. Sistro, M.E. Guerzoni, R. Lanciotti, and F. Gardini. 2004.** Evaluation of the antimicrobial activity of *Citrus* essences on *Saccharomyces cerevisiae*. J. Agric. Food Chem. 52(23):6932–6938. doi: 10.1021/jf049444v.
26. **Bennici, A., C. Tani. 2004.** Anatomical and ultrastructural study of the secretory cavity development of *Citrus sinensis* and *Citrus limon*: evaluation of schizolysigenous ontogeny. Flora. 199 : 464-475.
27. **Benttayer, Z. 2003.** Performance du greffage des arbres fruitiers. Ed office des publications universitaires. Novembre, p. 14.
28. **Bessah, R., et E-H. Benyoussef. 2015.** La filière des huiles essentielles. Etat de l'art, impacts et enjeux socioéconomiques. Rev. des Energ. Renouv. 18(3) : 513-528.
29. **Billing, J., et P. W. Sherman. 1998.** Antimicrobial functions of spices: why some like it hot. The Quarterly Rev. of biol. 73(1) : 3-49.
30. **Blanchard, A. 1990.** *Ureaplasma urealyticum* urease genes : use of UGA tryptophan codon. Mol. Microbiol. 4 :669-676.
31. **Bouhelier, R. 1947.** Affections et maladies diverses des agrumes. Diresction de l'Agriculture, Maroc. Les agrumes au Maroc. Rev. Appl.Myc. 27 (7):319-320.
32. **Bousbia, N. 2011.** Extraction of essential oils rich in antioxidants from natural products and agro-food co-products. Algiers, Process Science, Food Science. National School of Agronomy, PhD diss. p. 175.
33. **Boutareaud, A., J. L. Danet, M. Garnier, et C. Saillard. 2004.** Disruption of a gene predicted to encode a solute binding protein of an ABC transporter reduces transmission of *Spiroplasma citri* by the leafhopper *Circulifer haematoceps*. Appl. Environ. Microbiol. 70(7): 3960-7.
34. **Bouyahya, A. 2016.** Alicaments: des aliments aux médicaments, quel apport pour la santé? Annales des sciences de la santé, 1(4) : 1-3.
35. **Bové, J.M. 1967.** Maladies à virus des *Citrus* dans les pays du Bassin méditerranéen. Fruits, 22 (3) :125-140.
36. **Bové, J.M. 1984.** Wall-less prokaryotes of plants. Ann. Rev. of Phytopathol. 22:361-396.
37. **Bové, J.M. 1986.** Stubborn and its natural transmission in the Mediterranean area and the Near East, FAO. Plant. Prot. Bull. 34 (1) : 15-24.
38. **Bové, J. M. 1988.** *Spiroplasma citri*: Fifteen Years of Research. 10th Proc. Conf. Int. Organ. *Citrus* Virol., (1957-2010), 10(10) : 12. ISSN: 2313-5123.
39. **Bové, J.M. 1995.** Virus and virus-like diseases of *Citrus* in the Near East region. Food and agriculture organisation of the United Nation Rome, ed. Italy, Univ.

- Bordeaux, I.N.R.A. p. 518.
40. **Bové, J. M. 1997.** Spiroplasmas: infections agents of plants, arthropods and vertebrates. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 109(14-15): 604-612.
 41. **Bové, J.M. 2006.** Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of *Citrus*. *J. of Plant Pathol.* 88 : 7–37.
 42. **Bové, J. M., P. Carle, M. Garnier, F. Laigret, J. Renaudin, and C. Saillard. 1989.** Molecular and cellular biology of spiroplasmas. In *The Mycoplasmas*, (Ed.) R.F. Whitcomb, and J.G. Tully. New York: Academic Press. 5 : 243–364.
 43. **Bové, J. M., Foissac, X., and C. Saillard. 1993.** Spiralins. *Subcell. Biochem.* 20:203-223.
 44. **Bové, J.M., A. Fos, and J. Lallemand. 1987.** Epidemiology of *Spiroplasma citri* in the Old World, *J. Med Sci.*, 23 (6): 663-666.
 45. **Bové, J.M., and M. Garnier. 1997.** Recent developpment in phloem-restricted wall-less bacteria of *Citrus*: Candidates *Phytoplasma aurantiifolia* and *Spiroplasma citri*, two Mycoplasmal plants pathogen, *Fruit*, 52: 349-359.
 46. **Bové, J. M., and M. Garnier. 2000.** Stubborn. Pages 48-50 in: *Compendium of Citrus Diseases*. L. W. Timmer, S. M. Garnsey, and J. H. Graham, eds. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
 47. **Bové, J. M., and M. Garnier. 2003.** Phloem- and xylem-restricted plant pathogenic bacteria. *Plant Science* 164 : 423–438.
 48. **Bové, J.M., A., Nhami, C. Saillard, J.C. Vignault, C. Mouches, M. Garnier, G. Moutous, A. Fos, J. Bonfils, M. Abassi, K. Kabbage, B. Hafidi, et G. Viennot. 1979.** Présence au Maroc de *Spiroplasma citri*, l’agent causal de la maladie du stubborn des Agrumes dans les pervenches (*Vinca rosea L.*) implantées en bordure d’orangeraias malades et contamination probable du chiendent (*Cynodon dactylon L.*) par le Spiroplasma, *C.R. Acad. Sci. Paris. Sér. D.* 288 : 399-402.
 49. **Bové, J.M., J. Renaudin, X. Foissac, P. Gaurivaud, P. Carle, F. Laigret, et al. 2002.** *Spiroplasma citri*: From functional genomics to genomics!. In N. Duran-Vila, R.G. Milne, and J.V. da Graça (Eds.), *Proc. of the 15th Conf. of the Int. Organ. of Citrus Virol.* pp. 278–287.
 50. **Bové, J. M., J. Renaudin, C. Saillard, X. Foissac, and M. Garnier. 2003.** *Spiroplasma citri*, a plant pathogenic mollicute: Relationships with its two hosts, the plant and the leafhopper vector. *Ann. Rev. of Phytopathol.* 41: 483-500.
 51. **Bové, J.M., C., Saillard, J.C. Vignault, and A. Fos. 1984.** *Citrus* stubborn disease in Iraq and Syria: correlation between symptom expression and detection of *Spiroplasma citri* by culture and ELISA”, In *Proc. 9th Conf. IOCV*, Riverside, Univ. Calif, 145-152.

52. **Bozkurt, T., O. Gulnaz, and Y.A. Kacar. 2017.** Chemical composition of the essential oils from some *Citrus* species and evaluation of the antimicrobial activity. IOSR J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol. 05. doi: 10.9790/2402-1110XXXXX.
53. **Brandsman, J., G. Miller. 1980.** Nucleic acid spot hybridization : rapid quantitative screening of lymphoid cells lines for Epstein barr viral DNA. Proc. Natl. Acad. Sci., 77(11) :6851-6855.
54. **Breton, M. 2009.** Les plasmides pSci de *Spiroplasma citri* GII3: Caractérisation fonctionnelle et rôle dans la transmission par l'insecte vecteur. Thèse DOC n°1673. UNIV. Victor Segalen Bordeaux 2, p. 174.
55. **Breton, M., S. Duret, N. Arricau-Bouvery, L. Beven, and J. Renaudin. 2008.** Characterizing the replication and stability regions of *Spiroplasma citri* plasmids identifies a novel replication protein and expands the genetic toolbox for plantpathogenic spiroplasmas. J. Microbiol. 154(10): 3232-44.
56. **Brlansky, R.H. et L.W. Timmer. 2014.** Florida *Citrus* Pest Management Guide: Exocortis, Cachexia, and Other Viroids. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. p.179.
57. **Brown, D.R., R.F. Whitcomb, and J.M. Bradbury. 2007.** Revised minimal standards for description of new species of the class Mollicutes (division Tenericutes). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57:2703-2719.
58. **Bruneton, J. 1997.** Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales, 2^{ème} éd. (Eds.) Tec et Doc. Paris. p.915.
59. **Budbury, J.F. 1991.** *Spiroplasma citri*, description of fungi and bacteria", n° 1045, CAB international, waling ford, Royaume-Unis, p. 49.
60. **Byrne, C.M., S.D. Allen, E.B. Lobkovsky, and G.W. Coates. 2004.** Alternating copolymerization of limonene oxide and carbon dioxide. J. Am. Chem. Soc. 126:11404–11405. doi: 10.1021/ja0472580.
61. **Calavan, E.C. 1968.** A review of stubborn and greening disease of *Citrus*. Proceeding of the 4th International Organization of *Citrus* Virology Conference, (IOCV 68), Riverside, USA. pp. 105-117.
62. **Calavan, E.C. 1979.** Symptoms of stubborn disease and the culture of *Spiroplasma citri*. Proceeding of the Republic of China-United States Cooperative Science Seminar on Mycoplasma Diseases of Plants, (CSSMDP 79), National Science Council, Republic of China. pp. 67-72.
63. **Calavan, E.C. 1980.** Stubborn: In description and illustration of virus and Virus-like diseases of *Citrus*, (Ed.) J.M. Bové, Secto-IRFA, Paris, France, p. 422.

64. **Calavan, E.C., and J.M. Bové. 1989.** Ecology of *Spiroplasma citri*, In : R.F. Whitcomb, and J. G. Tully (eds.), the mycoplasmas. Academic Press, Inc., New York, 5: 425-485.
65. **Calavan, E.C., and J.B. Carpenter. 1965.** Stubborn disease of *Citrus* retards growth, impairs quality and decreases yields. Calif. Citrogr. 50:86-88, 96 : 98-99.
66. **Calavan, E.C., and G.N. Oldfield. 1979.** Symptomatology of Spiroplasma Plant diseases. In : Whitcomb, R.F., and J.G. Tully (Eds.). The Mycoplasma, Academic Press, New York. 3 : 37-64.
67. **Calavan, E.C., C.N. Roistacher, and D.W. Christiansen. 1968.** Distribution of stubborn disease virus in trees of *Citrus sinensis* and *C. paradisi* at different seasons. In Proc. 4th Conf: IOCV, Gainesville, Univ. Fla. Press. p. 145-153.
68. **Cambra, M., J. Serra, D.Villalba, and P. Moreno. 1988.** Present situation of the *Citrus tristeza* virus in the Valencian Community. In: L.W. Timmer, S.M. Garnsey, and L. Navarro, (Eds.), Proceedings of the 10th International Conference Organ *Citrus* Virology, IOCV. Riverside, pp. 1-7.
69. **Carle, P., F. Laigret, J.G. Tully, and J.M. Bove. 1995.** Heterogeneity of genome sizes within the genus *Spiroplasma*. Int. J. Syst. Bacteriol. 45(1): 178-81.
70. **Carle, P., C. Saillard, N. Carrere, S. Carrere, S. Duret, S. Eveillard, P. Gaurivaud, G. Gourgues, J. Gouzy, P. Salar, E. Verdin, M. Breton, A. Blanchard, F. Laigret, J. M. Bové, J. Renaudin, and X. Foissac. 2010.** Partial chromosome sequence of *Spiroplasma citri* reveals extensive viral invasion and important gene decay. Appl Environ Microbiol., 76(11): 3420-3426.
71. **Caruso, A., Davino, M., and G. Terranova. 1993.** Observation of impietratura disease symptoms in four *Citrus* species. In P. Moreno, J. V. da Graça, and L. W. Timmer (Eds.), Proceedings of the 12th conference of the International Organisation of *Citrus* Virologists, pp. 379-382.
72. **Chaker E.K. 2010.** Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse Doc. Université de Toulouse, 70-71.
73. **Chaker, H. 2012.** Régulation de l'adaptation de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* à son hôte : implication des métabolites du tryptophane». Thèse Doc. Université de Grenoble, Science agricole. p. 291. HAL Id: tel-00682876, <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00682876>
74. **Chang, C. J., J. Renaudin, et J. M. Bové. 1994.** Nutritional requirements of *Spiroplasma citri*. 10th Int. Congr. of the Int. Organ. for Mycoplasmaology, Bordeaux, IOM. Letters.
75. **Changyong, Z., Z. Xueyuan, J. Yuanhui, and H. Xinhua. 1993.** The occurrence of satsuma dwarf virus in China. In P. Moreno, J. V. da Graça, & L. W. Timmer (Eds.), Proc. Of the 12th Conf. of the Int. Organ. of *Citrus* Virol. pp. 349-351. 95.

76. **Chapot, H., et V.L. Delutchi. 1959.** Maladies, troubles et ravageurs des agrumes au Maroc. Edit. INRA, Rabat, p. 339.
77. **Charabot E., J. Dupont, and L. Pillet. 1899.** Les huiles essentielles et leurs principaux constituants, (Ed). C.. Beranger, Paris. p. 1002.
78. **Cheetham, P.S.J. 2010 :** Natural sources of flavours. Cité In : A.J. Taylor, and R.S.T. Linforth, 2010 : Food flavour technology. Edition Wiley-Blackwell, Snd ed. p. 360.
79. **Chegrani-Conan, C. 2009.** Les agrumes : citron, orange, pamplemousse. Anagramme édition, Paris, ISBN-13 : 978-2350352138. p. 72.
80. **Chen, T.A., and C.H. Liao. 1975.** Corn Stunt *Spiroplasma* - Isolation, Cultivation, and Proof of Pathogenicity. J. Sci. 188(4192): 1015-1017.
81. **Childs, J.F.L. 1950.** The cachexia disease of Orlando tangelo. The Plant Disease Reporter, 34 : 295–298.
82. **Chutia, M., P. Deka Bhuyan, M.G. Pathak, T.C. Sarma, et P. Boruah. 2009.** Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. LWT –J. Food Sci. Technol. 42: 777–780.
83. **Ciccarelli, F.D., T. Doerks, C. Von Mering, C. J. Creevey, B. Snel, et P. Bork. 2006.** Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. J. Sci. 311(5765): 1283-1287.
84. **Citti, C., L. Marechal-Drouard, C. Saillard, J.H. Weil, and J.M. Bové. 1992.** *Spiroplasma citri* UGG and UGA tryptophan codons: sequence of the two tryptophanyl-tRNAs and organization of the corresponding genes. J. Bacteriol. 174(20): 6471-8.
85. **Clark, M.F., and M.R. Adams. 1977.** Characteristic of microplate methods of enzymes immunosorbent assay of the detection of plant virus. J. Gen. Virol, 34: 475-483.
86. **Cole, R.M., J.G. Tully, T. J. Popkin, and J. M. Bové. 1973.** Morphology, ultrastructure, and bacteriophage infection of the helical mycoplasma-like organism (*Spiroplasma citri* gen. nov. sp. nov.) cultured from stubborn disease of *Citrus*. J. Bacteriol. 115(1): 367-84.
87. **Cui, P.F., C.F. Gu, and C.N. Roistacher. 1991.** Occurrence of Satsuma dwarf virus in Zhejiang Province, China. Plant Disease, 75 : 149–153.
88. **Dakshinamurti, V., and G. S. Reddy. 1975.** Mosaic-A transmissible disorder of sweet orange. J. Indian Phytopathol., 28 : 398–399.
89. **Daniels, M. J., J. M. Longland, and J. Gilbert. 1980.** Aspects of motility and chemotaxis in spiroplasmas. J. of Gen. Microbiol. 118: 429-436.

90. **Danos, E. 1990.** La psorosis de los cítricos: la epidemia en curso en Argentina y el desafío de su control. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*. 22:265–277.
91. **Da Rocha J.C., J.A. Da Cunha Ponciano Gomes, and E. D’Elia. 2010.** Corrosion inhibition of carbon steel in hydrochloric acid solution by fruit peel aqueous extracts. *J. Corros. Sci.* 52 :2341-2348. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2010.03.033>.
92. **Davino, M., R. Areddia, et S.M. Garnsey. 1988.** Distribution of *Citrus* Variegation Virus within *Citrus* Hosts. Proceedings of the 10 th. Conference of the International Organization of *Citrus* Virologists (IOCV), Riverside. pp. 322-326.
93. **Delarras, C. 2007.** Microbiologie pratique pour le laboratoire d’analyses ou de contrôle sanitaire. Tec. et Doc., Lavoisier, Paris. p. 476.
94. **DGF. 2006.** Rapport, Recensement des Plantes Médicinale, Direction Générale des Forêts, 2006.
95. **Djelouah, K., D. Frasher, F. Valentini, A. M. D’Onghia, and M. Digiario. 2014.** Direct tissue blot immunoassay for detection of *Xylella fastidiosa* in olive trees. *Phytopathol. Mediterr.*, 53(3) :207-212.
96. **Dhanavade, M.J., C.B. Jalkute, J.S. Ghosh, et K.D. Sonawane. 2011.** Study antimicrobial activity of lemon (*Citrus lemon* L.) peel extract. *Br. J. Pharmacol. Toxicol.* 2(3): 119-122.
97. **Dhuique-Mayer, C. 2007.** Evaluation de la qualité nutritionnelle des jus d'agrumes: estimation in vitro de la biodisponibilité des caroténoïdes. Thèse de doctorat, université de Montpellier II, p. 112.
98. **DI Giacomo, A., P. Rapisarda, et G. Safina. 1992.** L’industria dei Derivati Agrumari., Stazione Sperimentale Industria Essenze Derivati Agrumari, Reggio Calabria, Italy. p. 71.
99. **Doi, Y., M. Teranaka, K. Yora, et H. Asuyama. 1967.** Mycoplasma or P. L. T. group-like microorganisms found in the phloeme elements of plant infected with mulberry dwarf, potato witches'-broom, aster yellows or paulownia witches'-broom. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 33: 259-266.
100. **D’Onghia, A.M, K. Djelouah, V. Savino. 2000.** Serological detection of *Citrus* psorosis virus in seeds but not in seedlings of infected mandarin and sour orange. *J. Plant Pathol.* 82(3):233–235.
101. **Doyle J.J., and J.L. Doyle. 1990.** A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus*, 12 :13-15.
102. **DSA. 2018.** Direction des services agricoles: Production record d’agrumes à Boumerdes. <https://www.algerie-eco.com/2017/06/12/production-record-dagrumes-a-boumerdes/>.

103. **Dugo, G., et A. Di Giacomo. 2002.** *Citrus*. The genus *Citrus*. Taylor & Francis Publishing, London. 638 p.
104. **Dujardin-Beaumetz, E. 1900.** Le microbe de la péripneumonie et sa culture. Paris, Ed. OD: p. 55.
105. **Duran-Vila, N., C.N. Roistacher, R. Rivera-Bustamante, and J.S. Semancik. 1988.** A definition of *Citrus* viroids groups and their relationship to the exocortis disease. J. of Gen. Virol. 69 :3069–3080.
106. **Duret, S., B. Batailler, M.P. Dubrana, C. Saillard, J. Rnaudin, L. Béven, and N. Arricau-Bouvery. 2014.** Invasion of insect cells by *Spiroplasma citri* involves spiralin relocalization and lecti/glycoconjugate-type interactions. Cell. Microbiol.16: 1119-1132.
107. **Duret, S., N. Berho, J.L. Danet, M. Garnier, et J. Renaudin. 2003.** Spiralin is not essential for helicity, motility, or pathogenicity but is required for efficient transmission of *Spiroplasma citri* by its leafhopper vector *Circulifer haematoceps*. Appl. Environ. Microbiol. **69**(10): 6225-6234.
108. **Durville, J.P. 1893.** Fabrication des essences et des parfums. (Ed). Fritsch, Paris. p. 448.
109. **Durville, J.P. 1930.** Fabrication des essences et des parfums. Plantes à parfums - Extraction des essences et des parfums, Ed. Desforges, Girardot et Cie, p. 807.
110. **Eden-Green, S.J. 1982.** Detection of corn stunt *Spiroplasma* in vivo by ELISA using antisera to extracts from infected corn plants (*Zea mays*). J. Plant Pathol. 31:289-297.
111. **Edward, D.G., and F.A. Freundt. 1967.** Proposal for Mollicutes as name of the class established for the order Mycoplasmatales. Int. J. Syst. Bacteriol. **17**(3): 267-268.
112. **Eliautout, R. 2014.** Etude de la réponse immunitaire de la cicadelle *Circulifer haematoceps* lors de l'infection par *Spiroplasma citri*. Thèse Doc. Ecole doctorale des sciences de la vie, spécialité Biologie- Santé, Université de Bordeaux. p. 170.
113. **El Macane, W. L. D., S. Ahmed, and H. Alattir. 2003.** Le bananier, la vigne et les agrumes. Ed. Programme National de Transfert de Technologie en Agriculture, Maroc, p. 4.
114. **El Malki, F., K. Eddaraji, R. Alloudane, H. Greche, H. Essalmani, and S. Barrijal. 2018.** Antimicrobial activity of essentials oils extracted from leaves of native Moroccan plants against clinical bacterial isolates. Int. Arab. J. Antimicrob. Agents 8,1(4):2174–9094. doi: 10.3823/819.
115. **El-Otmani, M. 2005.** Les agrumes et le maraîchage et le froid hivernal. Ed. Programme National de Transfert de Technologie en Agriculture, Maroc, p. 4.
116. **Escartin, I. 2011.** Guide des agrumes. Fondation d'entreprise pour la protection Et la valorisation du patrimoine végétal. L'Institut Klorane. p. 15.

117. **Fletcher, J., and C.E. Eastman. 1984.** Translocation and multiplication of *Spiroplasma citri* in turnip (*Brassica rapa*). *Curr. Microbiol.*, 11 : 289-292.
118. **Fawcett, H.S. 1936.** *Citrus* diseases and their control. New York/London: McGraw-Hill Book Co., Inc, p. 656.
119. **Fawcett, H.S., J.C. Perry and J.C. Johnson. 1944.** The stubborn disease of *Citrus*. *Calif. Citrog.*, 29 :146-147.
120. **Festy D. 2011.** Les huiles essentielles ça marche ! Avec 78 formules à commander en pharmacie, S. Leduc (Ed.), 22-26, ISBN: 978-2- 84899-316-4.
121. **Fletcher, J., U. Melcher, and A. Wayadande. 2006.** The Phytopathogenic *Spiroplasma*. *Prokaryotes*, 4 : 905-947.
122. **Fletcher, J., G.A. Schultz, R.E. Davis, C.E. Eastman, and R.M. Goodman. 1981.** Brittle Root Disease of Horseradish - Evidence for an Etiological Role of *Spiroplasma citri*. *J. Phytopathol.* 71(10): 1073-1080.
123. **Fletcher, J., A. Wayadande, U. Melcher, and F. Ye. 1998.** The phytopathogenic mollicuteinsect vector interface: a closer look. *J. Phytopathol.* 88(12): 1351-8.
124. **Foissac, X., C. Saillard, J. Gandar, L. Zreik, and J.M. Bové. 1996.** Spiralin polymorphism in strains of *Spiroplasma citri* is not due to differences in posttranslational palmitoylation. *J. Bacteriol.* 178(10): 2934-2940.
125. **Fos A., J.M. Bové, J. Lallemant, C. Saillard, J.C. Vignault, Y. Ali, P. Brun, R. Vogel. 1986.** The leafhopper *Neoliturus haematoceps* is a vector of *Spiroplasma citri* in the mediterranean area. *Ann. Institut Pasteur-Microbiol.* 137A: 97-107.
126. **Franchomme, P., and D. Penoel. 2001.** Aromatherapy exactly: Encyclopedia of the therapeutic use of aromatic extracts, (Eds.) Roger, J., ISSBN: 2-87819-001-7, France, p. 512.
127. **Freeman, B.A., R. Sissenstein, T.T. Mc Manus, J.E. Woodward, I.M. Lee, and J.B. Mudd. 1976.** Lipid composition and lipid metabolism of *Spiroplasma citri*, 125 (3): 946-954.
128. **Garnero, J. 1996.** Essential oils, engineering techniques K 345: Physico-chemical constants, Vol. N°: K2. France, 45: 10.
129. **Garnier, M., A. Boutareaud, J. M. Bové, P. Carle, J.L. Danet, X. Foissac, P. Gaurivaud, E.S. Jagoueix, F. Laigret, J. Renaudin, and C. Saillard. 2002.** Pouvoir pathogène des *Mollicutes*: du modèle *Spiroplasma citri* aux *Phytoplasmes*, 12^{ème} colloque sur les recherches fruitières. Les apports de la biologie moléculaires en arboricultures fruitières, Bordeaux, p. 3.
130. **Garnier, M., M. Clerc, and J. M. Bové. 1984.** Growth and division of *Spiroplasma citri*: elongation of elementary helices. *J. Bacteriol.* 158(1): 23-8.

131. **Garnier, M., X. Foissac, P. Gaurivaud, F. Laigret, J. Renaudin, C. Saillard, and J. M. Bové. 2001.** Mycoplasmas, plants, insect vectors: a matrimonial triangle. *C.R. Acad.Sci.Paris.* 324(10): 923-928.
132. **Garnier, M., S. Jagoueix-Eveillard, P.R. Cronje, H.F. Roux, J.M. Bové. 2000.** Genomic characterization of a liberibacter present in an ornamental rutaceous tree, *Calodendrum capense*, in the Western Cape province of South Africa. Proposal of *Candidatus Liberibacter africanus* subsp. *capensis*. *Int. J. of Systematic and Evolut. Microbiol.*, 50(6):2119-2125.
133. **Garnsey, S.M. 1974.** Mechanical transmission of a virus that produces tatter leaf symptoms in *Citrus excelsa*. In: *Proceedings of 6th Conf. of Int. Organ. of Citrus Virologists* (Ed.) J.G. Weathers, M. Cohen. Division of Agricultural Science, University of California, Riverside, USA. pp. 137-140.
134. **Garnsey, S. M., E. L. Civerolo, D. J. Gumpf, C. Paul, M. E. Hilf, R. F. Lee, et al. 2005.** Biological characterization of an international collection of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates. In M. E. Hilf, N. Duran-Vila, and M. A. Rocha-Pena (Eds.), *Proceedings of the 16th conference of the International Organisation of Citrus Virologists*, pp. 75–93.
135. **Gasparich, G.E. 2002.** *Frontiers in Bioscience. Spiroplasmas: Evolution, Adaptation and Diversity*, Dep. Biol. Sci. Univ. Towson., 7(d): 619-640.
136. **Gaurivaud, P., J.L. Danet, F. Laigret, M. Garnier, et J.M. Bové. 2000.** Fructose utilization and phytopathogenicity of *Spiroplasma citri*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(10): 1145-1155.
137. **Gilly, G. 1997.** *Les plantes à parfum et huiles essentielles à grasse*. Ed : L'Harmatan. P 97-104.
138. **Goldschmidt, E.E. 1997.** Effect of climate on fruit development and maturation. *The Hebrew University of Jerusalem, Israel.* p. 5.
139. **González-Molina, E., R. Domínguez-Perles, D.A. Moreno, et C. García-Viguera. 2010.** Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51: 327–345.
140. **Grosso, M., J.R. Pirani, M.L.F. Salatino, S.R. Blanco, and J.A. Kallunki. 2008.** Phylogeny of Rutaceae based on twononcoding regions from cp DNA. *Am. J. Bot.*, 95 : 985–1005.
141. **Guignard, J.L. 1995.** *Abrégé de botanique*. Ed. Masson, p. 285.
142. **Guimaraes, R., L. Barros, J.C.M. Barreira, M. J. Sousa, A.M. Carvalho et Ferreira I.C.F.R. 2010.** Targeting excessive free radicals with peels and juices of *Citrus* fruits: Grapefruit, lemon, lime and orange. *Food Chem. Toxicol.*, 48: 99 –106.

143. **Gumpf, D. J., and E. C. Calavan. 1981.** Stubborn disease of *Citrus*. In: K. Maramorosch and S. P. Raychaudhuri (Eds.). *Mycoplasma Diseases of Trees and Shrubs*, Academic Press, New York. 97-134.
144. **Hadidi, A., and X. Yang. 1990.** Detection of pome fruit viroids by enzymatic cDNA amplification. *J. Virol. Methods.* 30 : 261-270.
145. **Harley, I. M., S. B. Richard, V.E. Smith, W. Deborah, and R. E. Craig. 2006.** *Citrus* (citrus) and *Fortunella* (kumquat). *Species Profiles for Pacific Island Agroforestry*, pp. 2-22.
146. **Hartung, J.S., J. Beretta, R.H. Brlansky, J. Spisso, and R.F. Lee. 1994.** *Citrus* variegated chlorosis bacterium: Axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. *J. Phytopathol.* 84:591–597.
147. **Herzi, N. 2013.** Extraction et purification de substances naturelles: comparaison de l'extraction au CO₂-supercritique et des techniques conventionnelles. Thèse Doc., Université de Toulouse. p. 185.
148. **Hill, D. S. 2008.** *Pests of crops in warmer climates and their control*. Ed. Springer, Netherlands, p. 704.
149. **Hill, L.R. 1959.** The adansonian classification of the staphylococci. *J. Gen. Microbiol.* 20 :277-283.
150. **Hopkins, D.L., and A.H. Purcell. 2002.** *Xylella fastidiosa*: Cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. *J. of Plant Dis.* 86 :1056–1066.
151. **Hosni, K., N. Zahed, R. Chrif, I. Abid, W. Medfei, M. Kallel, N.B. Brahim, and H. Sebei. 2010.** Composition of peel essential oils from four selected Tunisian *Citrus* species: Evidence for the genotypic influence. *Food Chem.* 123:1098–1104. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.05.068.
152. **Houël, E. 2011.** Etude des substances bioactives issues de la flore amazonienne. Analyse de préparations phytothérapeutiques à base de *Quassia amara* L. (Simaroubaceae) et *Psidium acutangulum* D.C. (Myrtaceae) utilisées en Guyane Française pour une indication antipaludique. Identification et analyse métabolique d'huiles essentielles à activité antifongique. Thèse de doctorat en chimie des substances. Université des Antilles et de la Guyane. p. 220.
153. **Huet, R. 1991.** Les huiles essentielles d'agrumes. *Fruits*, 4 : 551-576.
154. **Iglesias, D. J., M. Cercos, J. M. Colmeneroflores, M. A. Naranjo, G. Rios, E. Carrera, O. Ruiz-Rivero, I. Lliso, R. Morillon, F. R. Tadeo, et M. Talon. 2007.** Physiology of *Citrus* fruiting. *Brazilian journal of plant physiology.* pp. 333-362.
155. **Igwegbe, K., and E.C. Calavan. 1970.** Occurrence of mycoplasma like body in phloem of stubborn infected seedlings. *J. Phytopathol.* 60: 1525-1526.

156. **INRAA. 2006.** Rapport National, Etat des Ressources Phytogénétiques pour l'Alimentation et l'Agriculture.
157. **Isman, M.B. 2005.** Problems and opportunities for the commercialization of botanical insecticides, p. 283–291. In: C. Regnault-Roger, B.J.R. Philogene, and C. Vincent (Eds.). Biopesticides of plant origin. Lavoisier, Paris.
158. **ITAFV. 2013.** Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne (ITAFV). La culture des agrumes. Algérie. p. 24.
159. **ITAFV. 2017.** Production d'agrumes: Plus de 13 millions de quintaux enregistrés annuellement. ITAFV. <https://www.express-dz.com/2017/12/12/production-dagrumes-plus-de-13-millions-de-quintaux-enregistres-annuellement/>.
160. **IUCN. 2003.** Rapport, « Programme de la Biodiversité en Afrique du Nord » - Phase I, 80, International Union for Conservation of Nature (IUCN), 2003.
161. **Iwanami, T., T. Kano, M. Koizumi. 1991.** Pathogenic diversity of *Citrus* tatter leaf virus isolates. Annals of the Plant Pathological Society of Japan, pp. 57-74.
162. **Jacquemond, C., F. Curk, and M. Heuzet. 2013.** Les clémentiniers et autres petits agrumes. Eds. Quae Gie., Versailles. France. p. 364. ISBN: 978-2-7592-2067-0.
163. **Jagoueix, S., J.M., Bové, and M. Garnier. 1994.** The phloem-limited bacterium of greening disease of *Citrus* is a member of the alpha subdivision of the proteo-bacteria. Int. J. of Syst. Bacteriol. 44 : 379–386.
164. **Jamoussi, B. 1955.** Mises au point bibliographiques ; Les maladies de dépérissement des Agrumes. Rev. de Mycol. Supplément Colonia. Paris, 20(1):47.
165. **Jazet Dongmo, P.M., J., Kuate, V. Ngouana, F. Damesse, E.T. Sonwa, P.H. Amvan Zollo, et C. Menut. 2008.** Comparaison des propriétés anti-radicalaires et anti-inflammatoires des huiles essentielles de *Citrus reticulata* var. Madagascar et *Citrus sinensis* var. Casagrande du Cameroun. Fruits, 63: 201–208.
166. **Joffin, J.N. 2004.** Classification de la classe des Mollicutes, (Mycoplasmes), J. Bactériol. Syst. 59-63.
167. **Jouault, S. 2012.** La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité. Thèse Doc. en pharmacie. Université de Lorraine. France. p. 142. HAL Id: hal-01732038 <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732038>.
168. **Kaloostian, G.H. 1975.** Leafhopper, natural vector of *Citrus* stubborn disease. Calif. Agric. 29 (2): 14-15.
169. **Kaloostian, G.H. 1976.** Leafhopper transmits disease to weed host, Citrogr, 61 (11): 389-390.

170. **Kamal, G.M., F. Anwar, A.I. Hussain, N. Sarri, et M.Y. Ashraf. 2011.** Yield and chemical composition of *Citrus* essential oils as affected by drying pretreatment of peels. *Food Res. Int.* 18(4): 1275-1282.
171. **Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. T. Mobley. 2004.** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:123-140.
172. **Kaufmann, S. 1997.** Host response to intracellular pathogens. Ed. Springer ; R.G. Landes, New York; Austin, p. 345.
173. **Kesterson, J.W., and R.J. Braddock. 1976.** By-products and specialty products of Florida *Citrus*. *Fla. Agr. Exp. Sta. Tech. Bull. N° 784*, p. 4–25. University of Florida, Gainesville.
174. **Khan, I., Z.A. Shan, M. Saeed, et H.U. Shan. 2010.** Physicochemical analysis of *Citrus sinensis*, *Citrus Reticulate* and *Citrus paradise*. *Society of Pakistan, J. of the Chem.*, 32(6): 774-780.
175. **Khefifi, H. S. 2015.** Etudes physiologiques et genetiques de caracteres morpho-physicochimiques des fruits d'agrumes au cours de la maturation jusqu'à l'abscission. Montpellier. France.pp18-31.
176. **Khemiri, M. 2000.** Stubborn: Etiologie, Epidémiologie et diagnostic: Cours de protection intégrée des cultures fruitières méditerranéennes. I. A. M. Bari, p. 34.
177. **Killiny, N., B. Batailler, X. Foissac, et C. Saillard. 2006.** Identification of a *Spiroplasma citri* hydrophilic protein associated with insect transmissibility. *Microbiol. Read. Engl.* 152: 1221-1230.
178. **Killiny, N., M. Castroviejo, and C. Saillard. 2005.** *Spiroplasma citri* spiralin acts in vitro as a lectin binding to glycoproteins from its insect vector *Circulifer haematoceps*. *Phytopathol.* 95 : 541–548.
179. **Klein, M., R. Rasooly, and B. Raccah. 1988.** Transmission of *Spiroplasma citri*, the agent of *Citrus* stubborn by a leafhopper of the *Circulifer tenellus* complex in Israel. *Proc. Int. Citrus Congr. Midle East (Tel Aviv)*, 2 :49.
180. **Köhler, F.E. 1887.** Medicinal plants, Gera: Gustav Pabst. p. 300.
181. **Koizumi, M., T. Kano, H. Ieki, and H. Mae. 1988.** China laurestine: A symptomless carrier of Satsuma dwarf virus which accelerates natural transmission in the fields. In L. W. Timmer, S. M. Garnsey, and L. Navarro (Eds.), *Proc. of the 10th Conf. of the Int. Organ. of Citrus Virol.* pp. 348–352.
182. **Kwon, M.O., A.C. Wayadande, and J. Fletcher. 1999.** *Spiroplasma citri* movement into the intestines and salivary glands of its leafhopper vector, *Circulifer tenellus*. *J. Phytopathol.* 89(12): 1144-1151.
183. **Labroussa, F., N. Arricau-Bouvery, M.P. Dubrana, and C. Saillard. 2010.** Entry of *Spiroplasma citri* into *Circulifer haematoceps* cells involves interaction between

- Spiroplasma* Phosphoglycerate kinase and leafhopper lectin. Appl. Environ. Microbiol. 76 :1879-1886.
184. **Labroussa, F., M.P. Dubrana, N. Arricau-Bouvery, N. Béven, and C. Saillard. 2011.** Involvement of a minimal actin-binding region of *Spiroplasma citri* phosphoglycerate kinase in *Spiroplasma* transmission by its leafhopper vector. PloS One 6, e17357.
185. **Lacirignola, C., and A. M. D'Onghia. 2009.** The Mediterranean citriculture: Productions and perspectives. Options Méditerranéennes, B 65 : 13 - 17.
186. **Ladanyi, A. 2008.** Division of Fruits and Horticultural Technology, Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, India, 110-112.
187. **Lafèche, D., and J. M. Bové. 1970.** Mycoplasmes dans les agrumes atteints de greening, du stubborn ou de maladies similaires. Fruits, 25: 455-465.
188. **Lakhdar, L. 2015.** Evaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles marocaines sur *aggregatibacter actinomycetemcomitans* : étude in vitro. Thèse Doc. Université Mohammed V de Rebat. p.164.
189. **Larzul, D., F. Guigue, J.J. Sninsky, D.H. Mack, C. Brechot, et J.L. Guesdon. 1988.** Detection of hepatitis B virus sequence in serum by using in vitro enzymatic amplification. J. Virol. Methods, 20:227-237.
190. **LebdiGrissa, K. 2010.** Etude de base sur les cultures d'agrumes et de tomates en Tunisie. Regional integrated pest management program in the Near East GTFS/REM/070/ITA. Ed. FAO., Rome, p. 93.
191. **Ledesma-Escobar, C.A., M.D. Luque de Castro. 2014.** Towards a comprehensive exploitation of citrus. Trends Food Science and Technology. 39 : 63-75.
192. **Le Dantec, L., M. Castroviejo, J. M. Bové, and C. Saillard. 1998.** Purification, cloning, and preliminary characterization of a *Spiroplasma citri* ribosomal protein with DNA binding capacity. J. of Biol. Chem. 273(38): 24379-24386.
193. **Lee, R.F. 2014.** Control of Virus Diseases of *Citrus*, California, Elsevier Inc. pp. 143-173. ISSN 0065-3527. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.aivir.2014.10.002>.
194. **Lee, R. F., P. S. Baker, and M. A. Rocha-Pena. 1994.** The *Citrus Tristeza Virus* (CTV): An introduction to current priorities with special reference to the worsening situation in Central America and the Caribbean. Rome: International Institute of Biological Control, Centre for Agriculture and BioSciences International, and Food and Agricultural Organization, p. 197.
195. **Lee, R.F., K.S. Derrick, M.J.G. Beretta, C.M. Chagas, and V. Rosetti. 1991.** *Citrus* variegated chlorosis: A new destructive disease of citrus in Brazil. *Citrus Industry Magazine*, 15 : 12–13.

196. **Lerchl, J., P. Geignberger, M. Stitt, and U. Sonnewald. 1995.** Impaired photoassimilate partitioning caused by phloem-specific removal of pyrophosphate can be complemented by a phloem-specific cytosolic yeast-derived invertase in transgenic plants. *Plant Cell*. 7 : 259-270.
197. **Lieutaghi, P. 2004.** Le livre des arbres arbustes et arbrisseaux. Ed Actes SVD, p. 462.
198. **Liu, H.Y., D.J. Gumpf, G.N. Oldfield, E.C. Calavan. 1983.** Transmission of *Spiroplasma citri* by *Circulifer tenellus*. *J. Phytopathol.* 73 : 582-585.
199. **Lobo, V., A. Patil, A. Phatak, and N. Chandra. 2010.** Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn, Rev.* 4(8):118-126. doi: 10.4103/0973-7847.70902.
200. **Lohrasbi, M., M. Pourbafrani, C. Niklasson, and M.J. Taherzadeh. 2010.** Process design and economic analysis of a *Citrus* waste biorefinery with biofuels and limonene as products. *Bioresour. Technol.* 101:7382–7388. doi: 10.1016/j.biortech.2010.04.078.
201. **Loiseau, M., M. Plaire, I. Renaudin, R. Taylor, T. Fujikawa, R. Griffin, R. Mann, A. Pion, and J-P. Renvoisé. 2019.** Detecting *Spiroplasma citri*: A comparison of PCR methods to be used for quarantine diagnostics, *Eur. J. of Plant Pathol.* 155:71–80.
202. **Lopes, S.A., Frare, G.F., Bertolini, E., Cambra, M., Fernandes, N.G., A.J. Ayres, et al. 2009.** Liberibacters associated with *Citrus* huanglongbing in Brazil: *Candidatus Liberibacter asiaticus* is heat tolerant, *Candidatus L. americanus* is heat sensitive. *Plant Disease*, 93 : 257–262.
203. **Lopes, S.A., G.F. Frare, L.E.A. Camargo, N.A. Wulff, D.C. Teixeira, R.B. Bassanezi, et al. 2010.** Liberibacters associated with orange jasmine in Brazil: Incidence in urban areas and relatedness to *Citrus* Liberibacters. *J. Plant Pathol.* 59 : 1044–1053.
204. **Loussert, R. 1987.** Les agrumes ; production. Vol. 2. Edition scientifiques universitaires mkulles, Mar. France, Paris, p. 9.
205. **Loussert, R. 1989.** Les Agrumes. Tome 2 : Production. Ed. Technique et Documentation-Lavoisier (Paris), p. 158.
206. **Lovisolo, O. 1993.** Agro-ecology and centres of origin of grafft-transmissible diseases of *Citrus*. Proc. 12th. Conf. of Int. Org. of citrus virologists IOC. Riverside, pp 406-411.
207. **Luro, F. 2015.** Histoire de plantes - Jardins de France 636, pp. 35-37
208. **Lyczak, J. B., C. L. Cannon, and G. B. Pier. 2000.** Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect.* 2(9): 1051-1060.

209. **Mackee, H. S. 1985.** Flore de la Nouvelle-Calédonie et Dépendances. Suppl: Les plantes introduites et cultivées en Nouvelle-Calédonie: Hors série 1. Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, p. 159.
210. **MADR. 2011.** Le Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural. Bilan de la production agrumicole. La Direction des statistiques Agricoles et des Systèmes d'Information MADR. Algérie.
211. **MADRP. 2019.** Le ministre de l'Agriculture, du développement rural et de la pêche. La production nationale agrumicole. <https://www.reporters.dz/la-production-nationale-dagrumes-a-depasse-les-14-millions-de-quintaux-en-2018/>
212. **MADRP. 2020.** Le ministre de l'Agriculture, du développement rural et de la pêche. Agrumes : restructurer les vergers pour une production annuelle continue. <https://www.aps.dz/economie/100182-agrumes-restructurer-les-vergers-pour-une-production-annuelle-continue>.
213. **Mahrous, R. M., T.A. Moustafa, A. Galal Farag, A.S. Sadik, S.I. El-Afifi, and A.S. Gamal El-Din. 2005.** Isolation and identification of *spiroplasma citri* using some sensitive methods. Arab Univ. J. Agric. Sci., Ain Shams Univ., Cairo, 13(3), 625 - 639, 2005.
214. **Malley, L.A., J.R. Bamberger, J.C. Stadler, G.S. Elliott, J.F. Hansen, T. Chiu, J.S. Grabowski, and K.L. Pavkov. 2000.** Subchronic toxicity of cyclohexane in rats and mice by inhalation exposure. Drug. Chem. Toxicol. 23(4):513–537. doi: 10.1081/DCT-100101969.
215. **Maniloff, J. 2002.** Phylogeny and evolution. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. S. Razin, et R. Herrmann. New-York, Kluwer Academic/Plenum. pp. 31-43.
216. **Martín, S., D. Alioto, R.G. Milne, S.M. Garnsey, M.L. García, and O. Grau. 2004.** Detection of *Citrus* psorosis virus by ELISA, molecular hybridization, RT-PCR and immunosorbent electron microscopy and its association with citrus psorosis disease. Eur. J. Plant Pathol. 110:747–757.
217. **Martín, S., D. Alioto, R.G. Milne, J. Guerri, P. Moreno. 2002.** Detection of *Citrus* psorosis virus in field trees by direct tissue immunoassay in comparison with ELISA, symptomatology, biological indexing and cross-protection tests. Plant Pathol. 51:134–141.
218. **Mello, A. F., A. C. Wayadande, R. K. Yokomi, and J. Fletcher. 2009.** Transmission of different isolates of *Spiroplasma citri* to carrot and *Citrus* by *Circulifer tenellus* (Hemiptera: Cicadellidae). J. Econ. Entomol. 102(4): 1417-22.
219. **M'hiri, N. 2015.** Comparative study of the effect of extraction methods on phenols and the antioxidant activity of orange peel extracts « Half-blooded Maltese » and exploration of the corrosion inhibiting effect of carbon steel. I. N.A. Tunis, PhD. diss. p. 204.

220. **Miao, H., M. Seyran, J.V. Garcia et M. Svaria. 2005.** Preliminary observations on a possible association between *Citrus* psorosis virus and Olpidium- like fungus on *Citrus* in texas. In Proceedings of the 16th Conference of International Organization of the *Citrus* Virologists, (abstract).
221. **Miyakawa, T., and T. Ito. 2000.** Tatter leaf-citrange stunt. In: L.W. Timmer, S.M. Garnsey, and J.H. Graham (Eds.), Compendium of *Citrus* Diseases. American Phytopathological Society, Press, St. Paul, MN. pp. 60.
222. **Miyakawa, T., and C. Matsui. 1977.** A budunion abnormality of Satsuma mandarin on *Poncirus trifoliata* rootstock in Japan. in: Proc. Conf. Int. Organ. *Citrus* Virol. 7th. IOCV, Riverside, CA. pp. 125-131.
223. **Milne, R. G., M. L. Garcia, and O. Grau. 2000.** Genus *Ophiovirus*. In M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquest, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Moyo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wickner (Eds.), Viruses taxonomy: Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses, San Diego: Academic Press. pp. 626–631.
224. **Milne, R.G., M.L. García, P. Moreno. 2003.** *Citrus* psorosis virus. In: AAB descriptions of plant viruses. p. 401.
225. **Moller, K. 2008.** Still distillation, an art for everyone. (ed.), Editorial UNICO. ISBN-13: 978-8493055806, France, p. 152.
226. **Moreno, P., S. Ambrós, M.R. Albiach-Marti, J. Guerri, and L. Peña. 2008.** *Citrus* tristeza virus: A pathogen that changed the course of the citrus industry. Mol. Plant Pathol. 9 : 251–268.
227. **Mulchay, M.E., J.A. Geoghegan, I.R. Monk, K.M. O’keeffe, E.J. Walsh, T.J. Foster et al. 2012.** Colonisation by *Staphylococcus aureus* depends upon clumping factor B binding to the squamous epithelial cell envelope protein lorocrin. (ed.) Peschel A. PloS. Pathog. E1003092. doi : 10.1371/journal.ppat.1003092.
228. **Murray, R.G., et E. Stackebrandt. 1995.** Taxonomic note: Implementation of the provisional status Candidatus for incompletely described procaryotes. Int. J. Syst. Bacteriol. 45(1): 186-7.
229. **Ndoye Foe, F.M.C., T.F. Kemegni Tchingang, A.M. Nyegue, J-P. Abdou, A.J. Gbaweng Yaya, A.T. Tchinda, J-L. Oyono Essame, et F-X. Etoa. 2016.** Chemical composition, in vitro antioxidant and anti-inflammatory properties of essential oils of four dietary and medicinal plants from Cameroon. BMC Complementary and Alternative Medicine, 16:117.
230. **Najar, S., S. Bouachem, J.L. Danet, C. Saillard, M. Garnier, and J.M. Bové. 1998.** Presence of *Spiroplasma citri*, the pathogen responsible for *Citrus* stubborn disease, and its vector, the leafhopper *Circulifer haematoceps* in Tunisia contamination of both *C. haematoceps* and *C. opacipennis*. J. Fruits, 53(6):391-396.

231. **Nataro, J. P., and J. B. Kaper. 1998.** Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11:142-201.
232. **Navarro, L., J. Jaurez, J.F. Ballester, et J.A. Pina. 1980.** Elimination of some citrus pathogens producing psorosis-like leaf symptoms, by shoot-tip grafting in vitro. Proc. 8th. Conf. Int. Organ *Citrus* virologists, IOCV Riverside: 162-166
233. **Navas-Castillo, J., F. Laigret, J.G. Tully, and J.M. Bové. 1992.** Le mollicute *Acholeplasma florum* possède un gène du système phosphoénolpyruvate sucrophosphotransférase et il utilise UGA comme codon tryptophane. C. R. Acad. Sci. Paris, série III. 315 : 43-48.
234. **Naves, Y.R. 1976.** Parfums, Cosmétiques, savons, Vol. 58, p. 105. Cité in J. Garnero 1996 : Huiles essentielles. Techniques de l'ingénieur K345, pp. 1-45.
235. **Nejat, N., G. Vadamalai, and M. Dickinson. 2011.** *Spiroplasma citri* : A wide host range phytopathogen. J. Plant Pathol. 10(2) : 46-56. ISSN 1812-5387/ DOI : 10.3923/ppj.2011.46.56.
236. **Nicolosi, E. 2007.** Origin and taxonomy. In: Khan I. A. (ed.), *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*, Ed. CAB International (UK), pp. 19 - 44.
237. **Nishio, T., A. Kawai, M. Kato, T. Kobayashi. 1982.** A sap-transmissible closterovirus in *Citrus* imported from China and Formosa. Research Bulletin of the Plant Protection Service Japan, 18 : 11-18.
238. **Nocard, E., et E. Roux. 1898.** Le microbe de la péripneumonie. Annales de l'institut Pasteur 12: 240-262.
239. **Oldfield, G.N. 1988.** Ecological association of *Spiroplasma citri* with insects, plants and other plant Mycoplasmas in the Western Unites States, In: K. Maramorosch, S.P. Raychaudhuri (Ed.), *Mycoplasma diseases of crops. Basic and applied aspects*, Springer-Verlag, New York, Etats-Unis. pp. 175-191.
240. **Oldfield, G.N., C.H. Kaloostian, H.D. Pierce, E.C. Calavan, A.L. Granett, and R.L. Blue. 1976.** Beet leaf hopper transmits *Citrus* stubborn disease. Calif. Agric, 30:15
241. **Olsen, M., M. Matheron, and Z. Xiong. 2000.** Mycoplasma disease: diseases of *Citrus* in Arizona. Stubborn disease, p. 925.
242. **ONUAA. 2016.** Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture. Protocoles de diagnostic pour les organismes nuisibles réglementés PD 15: *Citrus* tristeza virus, p. 26.
243. **Osorio, F.A. 2000.** Development of labortary-based assays for psorosis virus and stubborn mycoplasma. Annual Report, USDA-ARS National Clonal Germplasm Repository for *Citrus* & Dates. pp. 21-27. Riverside California, USA.

244. **Ouis, N. 2015.** Chemical and biological study of coriander essential oils, fennel and parsley. Algeria, University of Oran, PhD. diss. p. 239.
245. **Oussalah, M., S. Caillet, L. Saucier, and M. Lacroix. 2007.** Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Food Control 18:414–420. doi: 10.1016/j.foodcont.2005.11.009.
246. **Oussou, K.R. 2009.** Chemical study and biological activity of the essential oils of seven aromatic plants of the Ivorian pharmacopoeia. Abidjan, University of Cocody, PhD. diss. p. 241.
247. **Oussou, K.R., K. Coffi, G. Nathalie, S.K. Gerard, D. Mireille, T.N. Yao, F. Gilles, and C.H. Jean-Claude. 2004.** Antibacterial activities of essential oils of three aromatic plants of Ivory Coast. Chem. Rep. 7:1081–1086.
248. **Ozbek, E., S. A. Miller, T. Meulia, and S. A. Hogenhout. 2003.** Infection and replication sites of *Spiroplasma kunkelii* (Class: Mollicutes) in midgut and Malpighian tubules of the leafhopper *Dalbulus maidis*. J. Invertebr. Pathol. 82(3): 167-175.
249. **Pefia, L., and L. Navarro. 1999.** Transgenic *Citrus*. In: Bajaj Y. P. S. (ed.), Transgenic Trees, Ed. Springer (Berlin), pp. 39 - 54.
250. **Peña, L., M. Cervera, C. Fagoaga, J. Romero, J. Juárez, J. A. Pina, and L. Navarro. 2007.** *Citrus*. In: E. C. Pua, and M. R. Davey (Eds.), Transgenic Crops V, Ed. Springer (Berlin), pp. 35 - 50.
251. **Peyron, L. 1992.** Techniques classiques actuelles de fabrication des matières premières naturelles aromatiques. Chapitre 10, pp 217 – 238. Cité In : Les arômes alimentaires. Coordinateurs H. Richard et J.L. Multon. (Ed.) Tec & Doc-Lavoisier et Apria. p. 438.
252. **Pichersky, E. J. Gershenzon. 2002.** The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. Curr. Opin. In Plant Biol. 5: 237– 243.
253. **Pinchuk I., H. Shoval, Y. Dotan, D. Lichtenberg. 2012.** Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays. Chemistry and Physics of Lipids, 165: 638– 647.
254. **Plaire, M. 2016.** Evaluation des méthodes de détection de *Spiroplasma citri* par amplification génique, Anses (agence nationale de sécurité sanitaire, alimentation, environnement, travail) Laboratoire de la santé des végétaux. Unité bactériologie, virologie et OGM (Angers) Virologie-Phytoplasmodologie p.41.
255. **Polek, M., G. Vidalakis, and K. Godfrey. 2007.** *Citrus* Bacterial Canker Disease and Huanglongbing (*Citrus* Greening). UC ANR Publication 8218. Oakland, CA. ISBN-13: 978-1-60107-439-3, p. 12.

256. **Ponce, A.G., R. Fritz, C. Del Valle, and S.I. Roura. 2003.** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lbensmittel-Wissenschaft und Technologic*, 36 :679-684.
257. **Pourbafrani, M., G. Forgacs, I.S. Horváth, and C. Niklasson. 2010.** Production of biofuels, limonene and pectin from citrus wastes. *Bioresour. Technol.* 101 : 4246-4250.
258. **Powell, C.A., R.R. Pelosi, R.M. Sonoda, and R.F. Lee. 1998.** A psorosis-like agent prevalent in Florida's grapefruit groves and budwood sources. *J. Plant Dis.*, 82 : 208–209.
259. **Praloran, J.C. 1971.** Les agrumes. Ed. G.-P. Maisonneuve et Larose, Paris, p. 565.
260. **Prasad, R., and K. Kapoor. 2004.** Multi drug resistance in yeast *Candida*. *Int. Rev. Cytol.* 242:215–248.
261. **Quezel, P., and S. Santa. 1962.** Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales', Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Vol. 2, p.1170.
262. **Raju, B.C., G. Nyland. 1981.** Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of corn stunt *Spiroplasma* in plant and insect tissues. *Current Microbiol.* 5 :101-104.
263. **Rahal, K. 2005.** Standardization of the antibiogramme in human medicine on a national scale according to recommendations of the World Health Organization (WHO). 4th ed. Ministry for Health, the Population and the Hospital Reform, Algeria, p. 95.
264. **Ramful, D., T. Bahorunb, E. Bourdonc, E. Tarnusc, O.I. Aruoma. 2010.** Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian *Citrus* fruits: potential prophylactic ingredients for functional foods application. *J. Toxicol.* 278 : 75-87.
265. **Rana, G.L., G.H. Kaloostian, G.N. Oldfield, A.L. Granett, E.C. Calavan, E.D. Pierce, I.M. Lee, and D.J. Gumpf. 1975.** Acquisition of *Spiroplasma citri* through membranes by homopterous insects, *J. Phytopathol.* 65:1143-1145.
266. **Rangel, B., R.R. Krueger, and R.F. Lee. 2005.** Current research on *Spiroplasma citri* in California. Proceedings of the 16th International Organisation of *Citrus* Virology Conference, (IOCV 05), Riverside, CA., pp. 439-441.
267. **Rasooly, R., B. Raccah, and M. Klein. 1994.** Laboratory transmission of the *Citrus* stubborn disease agent by a leafhopper from the *Circulifer tenellus* complex from the Jordan valley. *Phytoparasitica.* 22 :209-218.
268. **Razin, A., D. Yogeve, et Y. Naot. 1998.** Molecular biology and pathogenicity of mycoplasma. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 1094-1156.

269. **Reichert I. et E. Hellinger. 1930.** Internal decline. A new physiological disease of *Citrus* fruits in Palestine. *Hadar*, 3: 220-224.
270. **Renaudin, J. 2006.** Sugar metabolism and pathogenicity of *Spiroplasma citri*. INRA-University of Bordeaux 2, I.B.V.M., *J. Plant Pathol.* 88(2):129–139. (ed.). ETS Pisa.
271. **Roistacher, C.N. 1988.** The cachexia and xyloporosis diseases of *Citrus*, a review; In *Proc. 10th Conf Int. IOCV*, Riverside, Univ. Calif, pp. 116-124.
272. **Roistacher, C. N. 1991.** Graft-transmissible disease of citrus. Handbook for detection and diagnosis. Rome: FAO-IOCV, p. 286.
273. **Roistacher, C. N. 1993.** Psorosis, a review. In P. Moreno, J. V. da Graça, and L. W. Timmer (Eds.), *Proceedings of the 12th conference of the International Organisation of Citrus Virologists*, pp. 139–154.
274. **Roistacher, C.N. 1995.** A historical review of the major graft transmissible disease *Citrus*. FAO. Ed. Rome, p. 89.
275. **Roistacher C. N., A. M. D’Onghia, et K. Djelouah. 2000.** Defining psorosis by biological indexing and ELISA. In: da Grac, a J. V., Lee R. F. And Yokomi R. H. (eds). *Proceedings of the 14th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV)*, Riverside, California, USA., pp. 144-151.
276. **Roistacher, C. N., J. V. da Graça, and G. W. Muller. 2010.** Cross protection against *Citrus* tristeza virus, A review. In N. Duran-Vila, R. G. Milne, and J. V. da Graça (Eds.), *Proceedings of the 17th conference of the International Organisation of Citrus Virologists*, pp.1–27.
277. **Roistacher, C.N., E.M. Nauer, and R.C. Wagner. 1980.** Transmissibility of cachexia, dweet mottle, psorosis, tatterleaf and infectious variegation viruses on knife blades and its prevention. In E.C. Calavan, S.M. Garnsey, and L.W. Timmer (Eds.), *Proc. of the 8th Conf. of the Int. Organ. of Citrus Virol.* pp. 225–229.
278. **Rosenstein, R., et F. Gotz. 2013.** What distinguishes highly pathogenic staphylococci from médium and non pathogenic ? *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 358 : 33-89. doi : 10.1007/82.2012.286.
279. **Ruggieri G. 1955.** L’arance impietrate. *Riv. Agrumic.*, 1(2): 65-69.
280. **Russo, T. A., and J. R. Johnson. 2000.** Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J. Infect. Dis.* 181:1753-4.
281. **Saei-Dehkordi, S.S., H. Tajik, M. Moradi, and F. Khalighi-Sigaroodi. 2010.** Chemical composition of essential oils in *Zataria multiflora* Boiss from different parts of Iran and their radical scavenging and antimicrobial activity. *Food Chem. Toxicol.* 48:1562–1567. doi: 10.1016/j.fct.2010.03.025.

282. **Saglio, P., D. Lafleche, C. Bonissol, et J.M. Bové. 1971.** Isolement, culture et observation au microscope électronique des structures de type mycoplasme associées à la maladie du stubborn des agrumes et leur comparaison avec les structures observées dans le cas de la maladie du greening des agrumes. *Physiol. Vég.*, 9:569-582.
283. **Saglio, P., M. Hospital, D. Laflèche, J.M. Bové, J. G. Tully, and E.A. Freundt. 1973.** *Spiroplasma citri* gen. and spn: A mycoplasma-like organism associated with stubborn disease of *Citrus*. *Int. J. of Syst. Bacteriol.* 23 :191–204.
284. **Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, and H.A. Erlich. 1988.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Sci.* 239 :487-491.
285. **Saillard, C. 1980.** Application of ELISA to the detection of *Spiroplasma citri* in plants and insects. In *Proc. 8th Conf. IOCV*. Riverside, 145-152.
286. **Saillard, C., C. Barthe, J. Renaudin, J.M. Bové, and P. Moreno. 1993.** Detection of *Spiroplasma citri* by Culture, ELISA, Dot-Blot Hybridization, PCR, and Immuno-Capture PCR: an Evaluation. In: *Proc. 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. pp. 470-467. Moreno, J. V. da Graça, and L. W. Timmer, eds. Riverside, CA.
287. **Saillard, C., P. Carle, S. Duret-Nurbel, R. Henri, N. Killiny, S. Carrere, J. Gouzy, J.M. Bové, J. Renaudin, and X. Foissac. 2008.** The abundant extrachromosomal DNA content of the *Spiroplasma citri* GII3-3X genome." *BMC Genomics*. 9: 195.
288. **Saillard, C., J. Dunez, O. Garcia-Jurado, A. Nhami, and J. M. Bové. 1978.** Detection de *Spiroplasma citri* dans les agrumes et les pervenches par la technique immuno- enzymatique "ELISA." *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci., ser. D*, 286: 1245-48.
289. **Saillard, C., J.C. Vignault, J.M. Bové, A. Raie, J.G. Tully, D.L. Williamson, A. Fos, M. Garnier, A. Gadeau, P. Carle, et R.F. Whitcomb. 1987.** *Spiroplasma phoeniceum* sp. nov. a new plant pathogenic species from Syria. *Int. J. of Syst. Bacteriol.* 37(2): 106-115.
290. **Saillard, C., J.C. Vignault, A. Fos, and J.M. Bové. 1984.** *Spiroplasma citri* induced lethal wilting of periwinkles is prevented by prior or simultaneous infection of the periwinkle by an MLO. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* 135 A :163-168.
291. **Saleh, R.M., A.A. Ismail, and A.A. EI Hosary. 1982.** Corrosion inhibition by naturally occurring substances. *J. of Br. Corros.* 17 (3) : 130-135.
292. **Salle J.L. 2004.** Les huiles essentielles, synthèse d’aromathérapie. Editions Frison-Roche, 2ème édition. p.220.
293. **Satrani, B., A. Farah, M. Fechtal, M. Talbi, and M.L. Bouamrani. 2004.** Chemical composition and antibacterial and antifungal activity of the essential oil of *Ammi*

- visnaga* (L.) Lam. from Morocco. Acta Bot. Gallica 151(1):65–71. doi:10.1080/12538078.2004.10516021.
294. **Schulz, A.M., C. Terne, V. Jankowski, G. Cohen, M. Schaefer, F. Boehringer, M. Tepel, D. Kunkel, W. Zidek, and J. Jankowski. 2014.** Modulation of NADPH oxidase activity by known uraemic retention solutes. Eur. J. Clin. Invest. 44(8):802–811. doi: 10.1111/eci.12297.
295. **Scora, R.W. 1975.** On the history and origin of *Citrus*. Bull Torrey Bot Club, 102 : 369–375.
296. **Serra, P., C.J. Barbosa, J.A. Daro's, R. Flores, and N. Duran-Vila. 2007.** *Citrus* viroid V: Molecular characterization and synergistic interactions with other members of the genus Apscaviroid. Virology, 370 : 102–112.
297. **Sharopov, F., M. Santhosh Braun, I. Gulmurodov, D. Khalifaev, S. Isupov, et M. Wink. 2015.** Antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of essential oils of selected aromatic plants from Tajikistan. J. Foods, 4(4): 645-653.
298. **Shaw, P.E., C.W. Wilson, et R.E. Berry. 1981.** Some important flavor compound in mandarin, grapefruit and orange juices and peel essential oils. *Proc. Int. Soc. Citric.* 2: 911–914.
299. **Singh, S., and M. V. Rajam. 2009.** *Citrus* biotechnology: Achievements, limitations and future directions. J. Physiol. and Mol. Biol. of Plants, 15 : 3 - 22.
300. **Singh, P., R. Shukla, B. Prakash, A. Kumar, S. Singh, and P. Kumar. 2010.** Chemical profile, antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DLlimonene. Food Chem. Toxicol. 48 :1734-1740.
301. **Sirand-Pugnet, P., C. Lartigue, M. Marena, D. Jacob, A. Barre, V. Barbe, C. Schenowitz, S. Mangenot, A. Couloux, B. Segurens, A. de Daruvar, A. Blanchard et C. Citti. 2007.** Being 168 pathogenic, plastic, and sexual while living with a nearly minimal bacterial genome. PLoS Genet, 3(5): 744-758.
302. **Smith, I.M., D.G. McNamara, P.R. Scott, K.M. Harris. 1992.** Quarantine Pests for Europe, CABI and EPPO for the European Communities (Ed.), p. 1048. ISBN-13 : 978-0851988252.
303. **Smith, I.M., D.G. McNamara, P.R. Scott, and M. Holderness. 2005.** List of A2 pests regulated as quarantine pests in the EPPO region, CABI International, Wallingford, UK: EPPO/CABI Quarantine Pests for Europe, 2nd (ed.), p. 1425.
304. **Somon, F. 1987.** Arbres, arbustes et arbrisseau en Algérie, INRA. Ed. OPU. pp. 67-68.
305. **Spiegel-Roy P., et E.E. Goldschmidt. 1996.** Biology of *Citrus*. 1ère édition; Edition Cambridge University Press. p. 239.

306. **Statista₁. 2020.** <https://www.statista.com/statistics/264002/production-of-Citrus-fruits-worldwide-by-region/>.
307. **Statista₂. 2020.** Statista, Évolution de la production d'agrumes en Algérie entre 2016 et 2017, par type d'agrumes (en milliers de quintaux), par E. Moyou. <https://fr.statista.com/statistiques/990991/production-totale-d-agrumes-par-type-algerie/>.
308. **STM. 1995.** Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes. Revised minimum standards for description on new species of the class Mollicutes (Division Tenericutes). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:605-612.
309. **Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrenner, M. J. Hickey, F. S. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. Hancock, S. Lory, and M.V. Olson. 2000.** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799): 959-64.
310. **Tadeo, F. R., M. Cercós, J. M. Colmenero-Flores, D. J. Iglesias, M. A. Naranjo, G. Ríos, E. Carrera, O. Ruiz-Rivero, I. Lliso, R. Morillon, P. Ollitrault, and M. Talon. 2008.** Molecular physiology of development and quality of *Citrus*, *Advances in Botanical Research* 47:147 - 223.
311. **Tajkarimi, M.M., S.A. Ibrahim, and D.O. Cliver. 2010.** Antimicrobial herb and spice compound in food. *Food Control.* 21:1199–1218. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.02.003.
312. **Tanaka, H. 1972.** Mechanical transmission of viruses of satsuma dwarf and natsudaidai dwarf from *Citrus* to *Citrus*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 38 : 156–160.
313. **Teixeira, D.C., J. Ayres, E.W. Kitajima, L. Danet, S. Jagoueix, C. Saillard, et al. 2005.** First report of a Huanglongbing-like disease of *Citrus* in Sao Paulo state, Brazil and association of a new *Liberibacter* species, *Candidatus Liberibacter americanus*, with the disease. *J. Plant Dis.*, 89 : 107–111.
314. **Tennant, P.F., D. Robinson, L. Fisher, S.M. Bennett, D. Hutton, P. Coates-Beckford, and W. Mc Laughlin. 2009.** Disease and pests of *Citrus* (*Citrus* spp.). *Tree and forestry science and biotechnology* 3 (Special Issue 2), pp. 81-107.
315. **Tille, P.M. 2014.** Bailey and Scott's diagnostic microbiology. 13th ed., St. Louis: Elsevier, pp. 1013-1038.
316. **Timmer, L.W. 1999.** Systemic disease. In : Timmer L.W., Duncan L.W. (Eds) *Citrus Health Management*, American phytopathology Society Press, St. Paul, MN, pp. 97-98

317. **Tozzi, A. E., A. Caprioli, F. Minelli, A. Gianviti, L. De Petris, A. Edefonti, G. Montini, A. Ferretti, T. De Palo, M. Gaido, and G. Rizzoni. 2003.** Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections associated with hemolytic uremic syndrome, Italy, 1988-2000. *Emerg. Infect. Dis.* 9:106-8.
318. **Trachtenberg, S., S. B. Andrews, and R. D. Leapman. 2003.** Mass distribution and spatial organization of the linear bacterial motor of *Spiroplasma citri* R8A2. *J. Bacteriol.* 185(6): 1987-94.
319. **Tully, J. G. 1983.** Dark-field microscopy. In: *Methods In Mycoplasmaology*. S. Razin and J.G. Tully, eds. Academic Press, New York.
320. **Tully, J.G., J.M. Bové, F. Laigret, and R.F. Whitcomb. 1993.** Revised Taxonomy of the class Mollicutes - Proposed elevation of a monophyletic cluster of arthropod-associated Mollicutes to ordinal rank (Entomoplasmatales Ord-Nov), with provision for familial rank to separate species with nonhelical morphology (Entomoplasmataceae Fam-Nov) from helical species (Spiroplasmataceae), and emended descriptions of the order Mycoplasmatales, family Mycoplasmataceae, *Int. J. of Syst. Bacteriol.* 43(3): 630-630.
321. **Tully, J.G, D.L. Rose, E. Clark, P. Carle, J.M. Bové, R.B. Henegar, R.F. Whitcomb, D.E. Colflesh, and D.L. Williamson.1987.** Revised group classification of the genus *Spiroplasma* (class Mollicutes), with proposed new groups XII to XXIII, *J. Syst. Bacteriol.* 37: 357-364.
322. **Tully, J.G., R.F. Whitcomb, K.J. Hackett, D.L. Rose, R.B. Hennegar, J.M. Bové, P. Carle, D.L. Williamson, and T.B. Clark. 1994.** Taxonomie description of eight new non-sterol-requiring Mollicute assigned to the genus *Mesoplasma*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44 :685-693.
323. **Tumbas Vesna, T., S. Cetkovic Gordana, M. Djilas Sonja, M. Canadanovic-Brunet Jasna, V. Željko Knez Jelena, J. Škerget Mojca. 2010.** Antioxydant activity of mandarin (*Citrus reticulata*) peel; *BIBLID* ; 40: 195-203.
324. **Unsicker, S.B.G. et G. Kunert. 2009.** Protective perflumers: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Curr. Opin. In Plant Biol.* 12(4):479-485.
325. **Van Itersson, W., et A. Ruys. 1960.** The fine structure of Mycoplasmataceae. *J. ultrastruc. Res.* 3:282-301.
326. **Vasil, M. L. 1986.** *Pseudomonas aeruginosa*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. *J. Pediatr.* 108(5 Pt 2): 800-5.
327. **Velázquez, K., J.A. Pina, L. Navarro, P. Moreno, and J. Guerr. 2012.** Association of *Citrus* psorosis B symptoms with a sequence variant of the *Citrus* psorosis virus RNA2. *Plant Pathol.* 61:448–456.
328. **Venturini, N. 2012.** Contribution chimique à la définition de la qualité : exemples des spiritueux de myrte (*Myrtus communis* L) et de cédrat (*Citrus medica* L) de corse.

- Thèse Doc., Université de Corse-Pascal Paoli. Ecole doctorale environnement et société UMR CNRS 6134 (SPE). p. 242.
329. **Vernière, C. 2003.** Organismes nuisibles: Hop stunt viroid (HSVd-c).Analyse du Risque Phytosanitaire. (ARP)Référence: AGR-v 1.Réunion CIRAD.
330. **Ververis, C., K. Georghiou, D. Danielidis, D. G. Hatzinikolaou, P. Santas, R. Santas. 2007.** Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. *Bioresour. Technol.* 98(2):296-301.
331. **Vignault, J.C., J.M. Bové, C. Saillard, R. Vogel, A. Farro, L. Venegas, W. Stemmer, S. Aoki, R. Mc Coy, A.S. Albeldawi, M. Larue, O. Tuzcu, M. Ozsan, A. Nhami, M. Abassi, J. Bonfils, G. Moutous, A. Fos, F. Poutiers, G. Viennot-Bourgin. 1980.** Mise en culture de Spiroplasmes à partir de matériel végétal et d'insectes provenant de pays circum-méditerranéens et du Proche-Orient. *C.R. Acad. Sci. Paris. T, 290, Série D-775-778.*
332. **Viret, O., et K. Gindro. 1997.** La vigne, maladies fongiques, (ed.) Agroscope/Amtra, ISBN 978-3-85928-097-7, France, 1. 118-136.
333. **Virost, M., V. Tomao, G. Ginies, F. Visinoni, and F. Chemat. 2008.** Green procedure with a green solvent for fats and oils" determination Microwave-integrated Soxhlet using limonene followed by microwave Clevenger distillation. *J. of Chromatogr. A.* 1196 :147-152.
334. **Vogel, R., and J. M. Bové. 1968.** Cristacortis, a virus disease inducing stem pitting on sour orange and other *Citrus* species. In J. F. L. Childs (Ed.), *Proc. of the 4th Conf. of the Int. Organ. of Citrus Virol.* pp. 221–228.
335. **Wallace, J.M., and R.J. Drake. 1962.** Tatter leaf, a previously undescribed virus effect on *Citrus*. *Plant Disease Reporter* 46 : 211-212.
336. **Wallace, J.M. R.J. Drake. 1963.** New information on symptom effects and host range of the *Citrus* tatter-leaf virus. *Plant Disease Reporter* 47 : 352-353.
337. **Walter, A., et C. Sam. 2002.** Fruits of Oceania. « trans, P. Ferrar from Fruits d'Océantique » ACIAR Monograph N° 85. Australian centre for international agricultural research. Canberra, ISBN 1 86320 331 1, Australia, p. 329.
338. **Wattam, A.R., D. Abraham, O. Dalay, T.L. Disz, T. Driscoll, J.L. Gabbard, et al. 2014.** PATRIC, the bacterial bioinformatics database and analysis resource. *Nucleic Acids. Res.* 42: D581-591. Doi : 10.1093/nar/gkt1099.
339. **Weisburg, W. G., J. G. Tully, D. L. Rose, J. P. Petzel, H. Oyaizu, D. Yang, L. Mandelco, J. Sechrest, T. G. Lawrence, J. Van Etten, J. Maniloff and C. R. Woese. 1989.** A phylogenetic analysis of the Mycoplasmas: Basis for Their Classification, *J. of Bacteriol.*, 171(12):6455-6467.

340. **Whitcomb, R.F. 1983.** Culture media for *Spiroplasma*. In: S. Razin, and J.G. Tully (ed.). Methods in mycoplasmaology volume I, pp. 147-158, Academic Press, New York, USA.
341. **Whitcomb, R.F., T.A. Chen, D.L. Williamson, C. Liao, J.G. Tully, J.M. Bové, C. Mouches, D.L. Rose, M.E. Coan, and T.B. Clark. 1986.** *Spiroplasma Kunkelii* Sp-Nov - Characterization of the Etiologic Agent of corn stunt disease. Int. J. of Syst. Bacteriol. 36(2): 170-178.
342. **Whitcomb, R.F. and D.L. Williamson. 1975.** Helical Wall-Free Prokaryotes in Insects - Multiplication and Pathogenicity. Annals of the New York Academy of Sciences, 266 (NOV28): 260-275.
343. **Whiteside, J.O., S.M. Garnsey, L.W. Timmer. 1988.** Compendium of *Citrus* diseases. Association for Psychological Science, Press, St. Paul, MN. (Ed.) Amer Phytopathological Society, p. 80. ISBN-13: 978-0890540923.
344. **Wilkins, M. R., W. Widmer, K. Grohmann. 2007.** Simultaneous saccharification and fermentation of *Citrus* peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol. Process Biochem. 42 (12) : 1614-1619.
345. **Williamson, D.L., R.F. Whitcomb, J.G. Tully, G.E. Gasparich, D.L. Rose, P. Carle, J.M. Bové, K.J. Hackett, J.R. Adams, R.B. Henegar, M. Konai, C. Chastel et F.E. French. 1998.** Revised group classification of the genus *Spiroplasma*. Int. J. of Syst. Bacteriol. 48(1): 1-12.
346. **Woese, C.R., J. Maniloff, et L.B. Zablen. 1980.** Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. Proc Natl Acad Sci U. S. A., 77(1): 494-498.
347. **Woese, C.R., E. Stackebrandt, et W. Ludwig. 1984.** What are mycoplasmas: the relationship of tempo and mode in bacterial evolution. J. Mol. Evol. 21(4): 305-316.
348. **Xiao, Y.J., M. Hu, and B. Tomlinson. 2014.** Effects of grapefruit juice on cortisol metabolism in healthy male Chinese subjects. Food and Chem. Toxicol. 74 : 85 - 90.
349. **Xu, W., W. Qu, K. Huang, F. Guo, J. Yang, H. Zhao, and Y. Luo. 2007.** Antibacterial effect of Grapefruit Seed Extract on food-borne pathogens and its application in the preservation of minimally processed vegetables. J. Postharvest Biol. and Technol. 45 :126 - 133.
350. **Yamao, F., A. Muto, Y. Kawauchi, M. Iwani, S. Iwagami, Y. Azumi, and S. Osawa. 1985.** UGA is read as tryptophan in *Mycoplasma capricolum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82 :2306-2039.
351. **Yasugi, T., T. Kawai, K. Mizunuma, R. Kishi, I. Harabuchi, J. Yuasa, T. Eguchi, R. Sugimoto, K. Seiji, and M. Ikeda. 1994.** Exposure monitoring and health effect studies of workers occupationally exposed to cyclohexane vapor. Int. Arch. Occup. Environ. Health 65(5):343–350. doi: 10.1007/BF00405700.

352. **Ye, F., F. Laigret, J.C. Whitley, C. Citti, L.R. Finch, P. Carle, et al. 1992.** A physical and genetic map of the *Spiroplasma citri* genome. *Nucleic Acids Research*, 20 :1559–1565.
353. **Yin, X., C. L. Gyles, and J. Gong. 2012.** Grapefruit juice and its constituents augment the effect of low pH on inhibition of survival and adherence to intestinal epithelial cells of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* PT193. *Int. J. of Food Microbiol.* 158 : 232 - 238.
354. **Yokomi, R.K., A.F.S. Mello, M. Saponari, and J. Fletcher. 2008.** Polymerase chain reaction-based detection of *Spiroplasma citri* associated with Citrus stubborn disease. *Plant Dis.*, 92 :253-260.
355. **Young, J.M., G.S. Saddler, Y. Takikawa, S.H. De Boer, L. Vauterin, L. Gardan, R.I. Gvozdyak, and D.E. Stead. 1996.** Names of plant pathogenic bacteria. *Rev. Plant Pathol.* 1864-1995. 75: 721-763.
356. **Young, G.H., and V.C. Wu. 2012.** KLOTHO methylation is linked to uremic toxins and chronic kidney disease. *Kidney Int.* 81(7):611–612. doi: 10.1038/ki.2011.461.
357. **Yuasa, J., R. Kishi, T. Eguchi, I. Harabuchi, T. Kawai, M. Ikeda, R. Sugimoto, H. Matsumoto, and H. Miyake. 1996.** Investigation on neurotoxicity of occupational exposure to cyclohexane: A neurophysiological study. *Occup. Environ. Med.* 53:174–179. doi: 10.1136/oem.53.3.174.
358. **Zenasni, L. 2014.** Etude de polymorphisme chimique des huiles essentielles de *Thymus satureioides* Coss et d'*Origanum compactum* Benth et du genre *Nepeta* et évaluation de leur propriété antibactérienne. Thèse Doc. Université Mohammed V Agdal, Rabat. p. 155.
359. **Zanek, M.C., E. Peña, C.A. Reyes, J. Figueroa, B. Stein, O. Grau, and M.L. Garcia. 2006.** Detection of *Citrus* psorosis virus in the northwestern citrus production area of Argentina by using an improved TAS-ELISA. *J Virol Methods.* 137:245–251.
360. **Zeraia, L. 1983.** Protection de la Flore: Liste et Localisation des Espèces Rares, très Rares et Rarissimes d'Algérie', Document Interne, INRF, p.124.
361. **Zheljzakov, V.D., T. Astatkie, and V. Schlegel. 2014.** Hydrodistillation extraction time effect on essential oil yield, composition, and bioactivity of coriander oil. *J. Oleo Sci.*, 63(9): 857-865.

Annexes

Annexe 01

Composition du Milieu de culture SP4m de *Spiroplasma citri*

Matériel :

- ✓ Unités de filtration de 300 ou 600 ml Filtre 0,22 µm + pompe associée
- ✓ Pipettes 10 ml stériles pour le prélèvement des réactifs stériles (Sérum de veau foetal, CMRL...)

Réactifs :

Mycoplasma Broth Base, Peptone, Tryptone, Agar noble (pour les milieux solides)

Rouge de phénol 0,1 % ou 9mg Rouge phénol poudre dans 1ml NaOH 1M / base 200ml

Pénicilline G 2.10⁵ Unités/ml:

6g Pénicilline G sodium salt 1663Unités/mg

H₂O qsp50ml

↳ Stérilisation par filtration 0,22µm et conservation en aliquots 4,6mL à -20°C

Glucose 50% et Yeastolate 4%:

Les solutions sont préparées par 600ml, filtrées sur 0,45µm (avec les unités de filtration) et conservées à 4°C.

Sérum de veau foetal et CMRL :

Ces solutions sont conservées à -20°C avant ouverture puis à 4°C une fois entamées.

10X CMRL 1066 (-LGlutamine ; -NaHCO₃) : Gibco Cat#21540-026

Décomplémentation du Sérum de veau foetal :

Sortir une bouteille de sérum à -20°C et incuber 1h à 56°C. Conserver à 4°C.

Les additifs sont généralement préparés par 3 ou 6 car les unités de filtration 0,45µm peuvent contenir 300 ou 600mL, les bases sont préparées par 3.

Pour les milieux solides, laissez refroidir les bases autoclavées à ~50°C avant de rajouter le complément. Couler les boîtes avec une pipette 25mL stérile. Pour les petites boîtes (Ø2,5cm) mettre ~12,5mL de milieu par boîte.

Annexe 02

Extraction de l'ADN

Matériels nécessaires : Bêchers, bouteilles... , Bain-marie, Agitateur magnétique, pH-mètre, Sorbonne...

✓ **Réactifs et matériel utilisés dans la préparation du tampon d'Extraction au CTAB**

- **Réactifs**

NaOH

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tetra Acétique

Tris

HCl

CTAB (Hexadecyltrimethylammonium bromide)

NaCl

PVP K25

H₂O milliQ

Tampon CTAB

Chloroforme/Alcool Isoamylique (24:1)

Isopropanol pur, Ethanol 70%

- **Matériels nécessaires**

Broyeur à pilon

Bain-marie

Centrifugeuse de paillasse

Tubes eppendorf 2mL et 1,5 mL propres, autoclavés

Sorbonne

Annexe 03 Solutions et Réactifs utilisés pour la PCR

✓ **Matériels nécessaires** : Cuves et appareil électrophorèse Mupid, micro-ondes, Système acquisition UV...

✓ **Préparation de la solution stock dNTP 5mM**

4 dNTP 40µmoles de chacun – PROMEGA Cat#U1240

- Pendre 200µl de chaque dNTP. Mélanger ➔ Vf =800µl à 25mM

- Diluer 5 fois pour avoir 5mM (V total : 4ml)

- Aliquoter en tubes de 500µl et conserver à -20°C

Pièce PCR 1

- Préparer le mix 2X (à diluer 2 fois avant utilisation) :

Volume final→	125µl (5 réactions)	250µl (10 réactions)	500µl (20 réactions)	1 ml (40 réactions)
Solutions stocks↓				
H ₂ O	65µl	130µl	260µl	520µl
10X Taq buffer (sans MgCl ₂)	25µl	50µl	100µl	200µl
2,5mM MgCl ₂	20µl	40µl	80µl	160µl
dNTP 5mM	10µl	20µl	40µl	80µl
100µM Primer 1	2,5µl	5µl	10µl	20µl
100µM Primer 2	2,5µl	5µl	10µl	20µl

Le mix se conserve ensuite à -20°C avant utilisation.

- Préparer un Mix 1X : Mélanger : 25µl de mix 2X x Nombre de réaction
24µl H₂O x Nombre de réaction
0,3µl taq polymérase x Nombre de réaction

✓ **Electrophorèse ADN Détection BET**

• Réactifs

BET 10mg/ml

Marqueur de taille et/ou de quantité (Ex: 1kb ladder - Invitrogen – Cat#15615-016)

Tampon de charge 6X 60mM EDTA pH8 30ml EDTA 200mM
pH8

0,6% (p/v) SDS 3ml SDS 20% (p/v)
30% (v/v) Glycérol 30ml Glycérol 100%

0,25% (p/v) Bleu de bromophénol 0,25g

0,25% (p/v) Xylène Cyanol 0,25g

↳ H₂O qsp 100mL

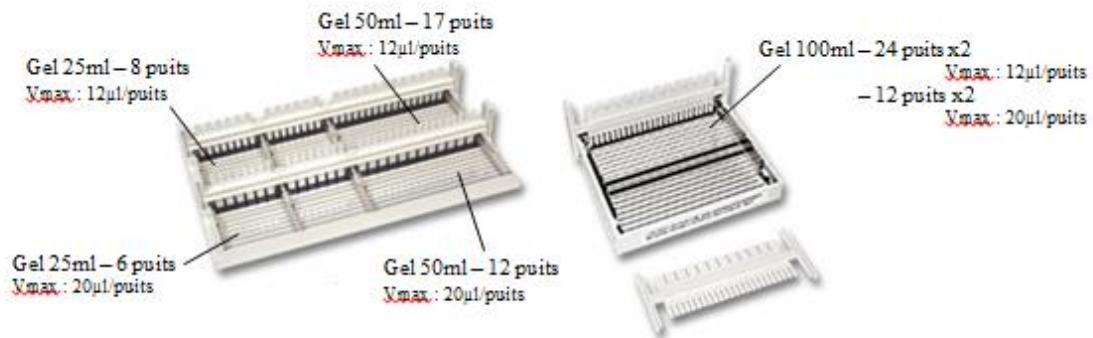
Tampon de migration TBE 10X pH 8,4 890mM Tris 107,8g
890mM Borate 55,03g
20mM EDTA 100ml EDTA 0,2M pH8
↳ H₂O qsp 1L

- **Mode opératoire**

1. Préparation du marqueur de taille 1kb Ladder – Invitrogen

Mélanger : 50 μ l de solution stock de marqueur
 100 μ l de bleu de charge 6X
 850 μ l H₂O

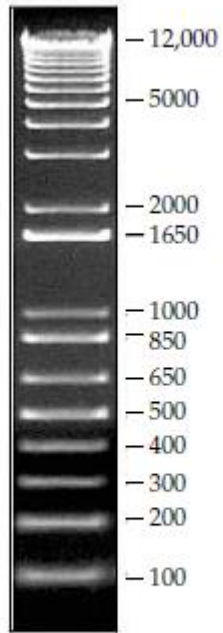
2. Préparation des gels – 1,5% agarose – Appareil Mupid



Agarose TBE 0,5X	Petit Gel 25ml 0,37g 25ml	Grand Gel 50ml 0,75g 50ml	Très grand gel 100ml 1,5g 100ml
BET 1mg/ml	Petit Gel 25ml 2 μ L	Grand Gel 50ml 3 μ L	Très grand gel 100ml 6 μ L

Types de support Mupid

3. Le marqueur de taille de 1 kb



0.9 μ L/lane
0.9% agarose gel stained
with ethidium bromide

Annexe 04
Composition chimique des milieux de cultures utilisés
Pour le test d'activité antimicrobienne

✓ **Composition chimique des milieux liquides**

• **Bouillon Brain Heart Infusion (BHIB)**

Composition en g/l

Protéase-peptone.....	10g
Infusion de cervelle de veau.....	12,5g
Chlorure de sodium.....	2,5g
Phosphate disodique.....	2,5 g
Eau distillée.....	1000ml

pH= 7,4

Stérilisation à 120°C/15min

• **Eau physiologique stérile**

Composition en g/l

Chlorure de sodium (NaCl)	9g
Eau distillée.....	1000ml

pH = 7

Stérilisation à 120°C/15min

✓ **Composition chimique des milieux de culture solide**

• **Gélose Mueller Hinton (MH)**

Composition en g/l

Extrait de viande.....	3g
Hydrolysate acide de caséine.....	17,5g
Agar.....	18g

pH=7,4

Stérilisation à 120°C/15min

• **Gélose nutritive (GN)**

Composition en g/l

Peptone	10g
Extrait de viande.....	3g
Extrait de levure.....	3g

Annexes

Chlorure de sodium.....	5g
Agar.....	18g

pH=7 ±0,2

Stérilisation à 120°C/15min

- **Gélose Chapman**

Composition en g/l

Extrait de viande	1g
Extrait de levure.....	3g
Tryptone.....	5g
Peptone bactériologique.....	10g
Mannitol.....	10g
Rouge de phénol.....	0,025g
Agar.....	15g

pH=7,4

Stérilisation à 120°C/15min

- **Gélose Hecktöen**

Composition en g/l

Peptone pepsique de viande	15g
Extrait de viande.....	3g
Extrait de levure.....	3g
Lactose.....	12g
Salicine.....	2g
Saccharose.....	12g
Chlorure de sodium.....	5g
Thiosulfate de sodium.....	5g
Citrate de fer ammoniacal.....	1,5g
Sels biliaires.....	4g
Bleu de bromothymol.....	0,064g
Fuschine acide.....	0,1g

pH=7,4

Stérilisation à 120°C/15min

- **Gélose King A**

Composition en g/l

Peptone de viande.....	20g
Glycérol (Glycérine).....	10g

Annexes

Potassium sulfate1,5g

Agar.....20g

pH=7,2

Stérilisation à 120°C/15min

- **Gélose King B**

Composition en g/l

Protéose-peptone.....20g

Glycérol.....10ml

Phosphatedipotassique.....1,5g

Sulfate de magnésium.....1,5g

Agar.....15g

pH=7,2

Stérilisation à 120°C/20min

Annexe 05 **Protocole d'extraction des huiles essentielles**

Dessécher et découper le zeste en petits morceaux et peser une quantité à raison de 250 g par ballon. Après distillation, le distillat est récupéré dans des bouteilles en verre et conservé à l'abri de la lumière. Pour la séparation de la phase aqueuse et la phase organique :

Verser le mélange dans une ampoule, ajouter quelques « mL » d'éther, agiter l'ensemble puis dégazer, agiter plusieurs fois jusqu'à disparition du gaz. Fixer l'ampoule sur le statut, laisser le mélange se reposer jusqu'à séparation de l'huile essentielle de l'éther (après 20 mn à 30 mn). Après séparation des deux phases on évacue l'eau et on récupère la phase organique (huile essentielle). Pour dessécher de la quantité d'eau restante on rajoute du sulfate de sodium (Na_2SO_4) qui a pour rôle d'absorber l'eau (les gouttes d'eau restante), on laisse agir quelques minutes avec le mélange à l'abri de la lumière puis on met la solution (huile essentielle et éther) dans des petites ampoules spécifique fixée sur un évaporateur rotative. L'opération s'effectue à une vitesse déterminée, cet appareil a pour but d'évaporer toute la quantité d'éther, à la fin on récupère une huile essentielle pure. En fin, La conservation de l'huile essentielle se fait dans des bouteilles en verre à l'abri de la lumière.

Annexe 06

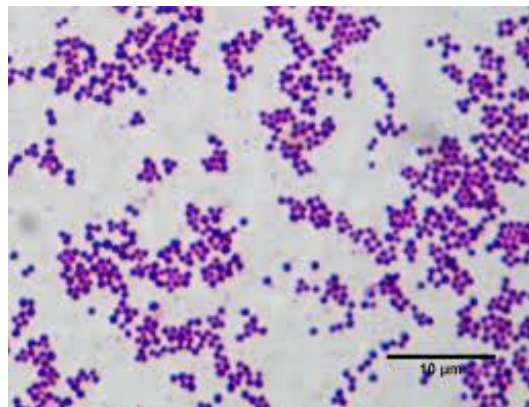
Colorations de Gram des bactéries testées.



Escherichia coli (GX1000)



Pseudomonas aeruginosa (GX1000)



Staphylococcus aureus (GX1000)

Annexe 07

**Chromatogrammes de la GC-MS des deux huiles essentielles
Extraites de fruits infectés par le stubborn et de fruits sains**

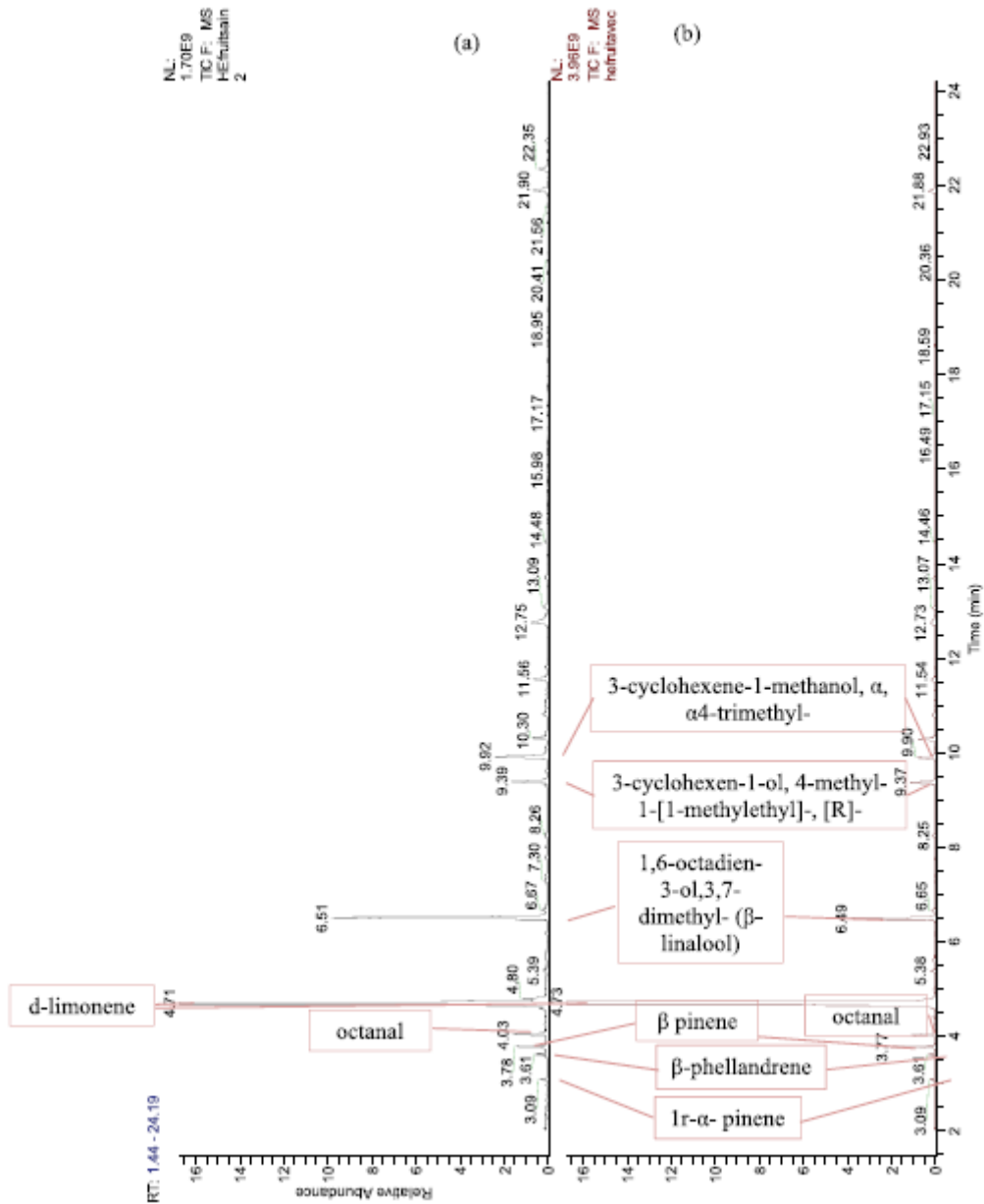


Figure 49: Chromatogrammes de la GC-MS des huiles essentielles d'agrumes: (a) HE extraite de fruits d'oranges saines, (b) HE extraite de fruits d'oranges infectés par l'agent de stubborn.

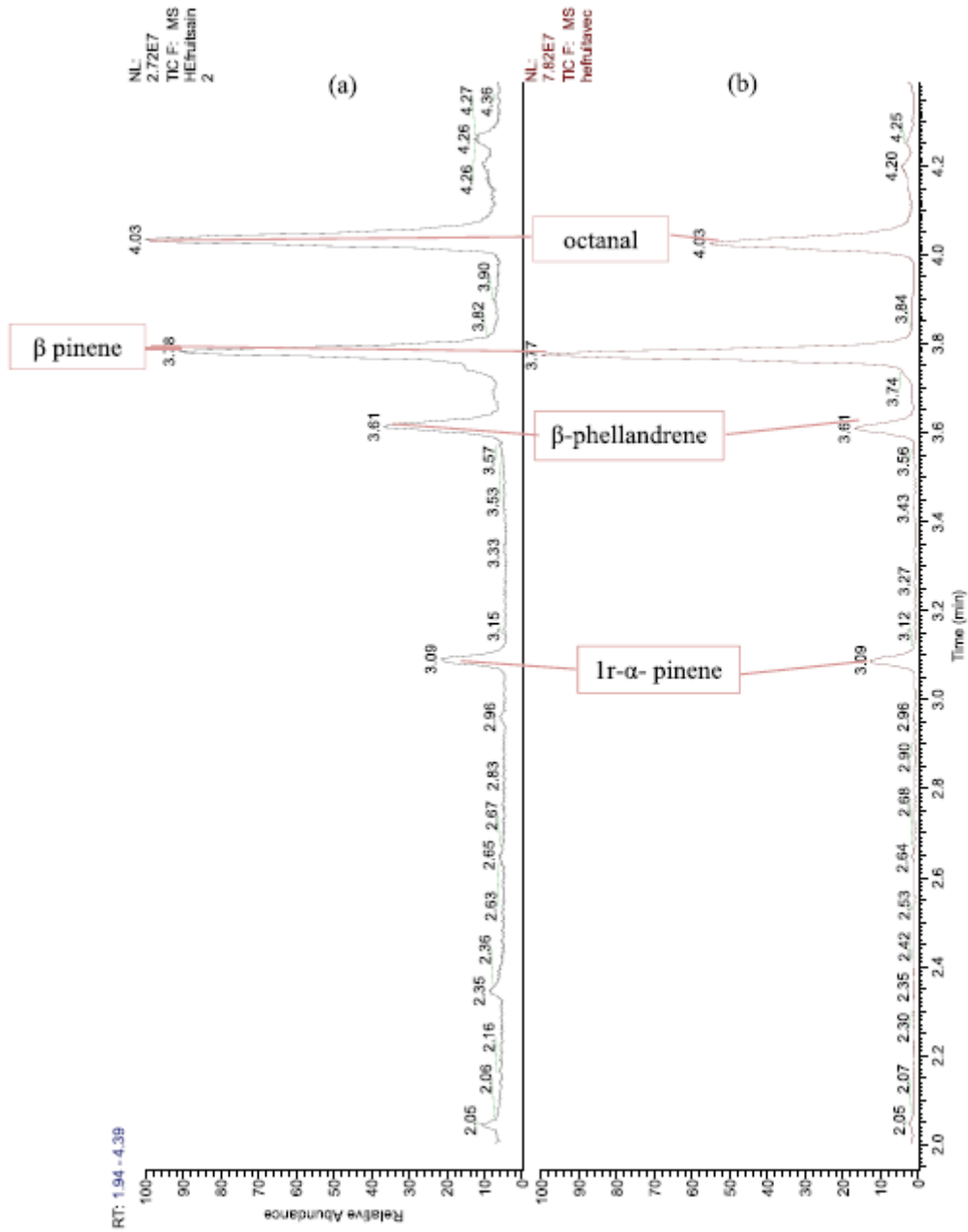


Figure 50: Chromatogrammes de la GC-MS des huiles essentielles d'agrumes: (a) HE extraite de fruits d'oranges saines, (b) HE extraite de fruits d'oranges infectés par l'agent de stubborn.

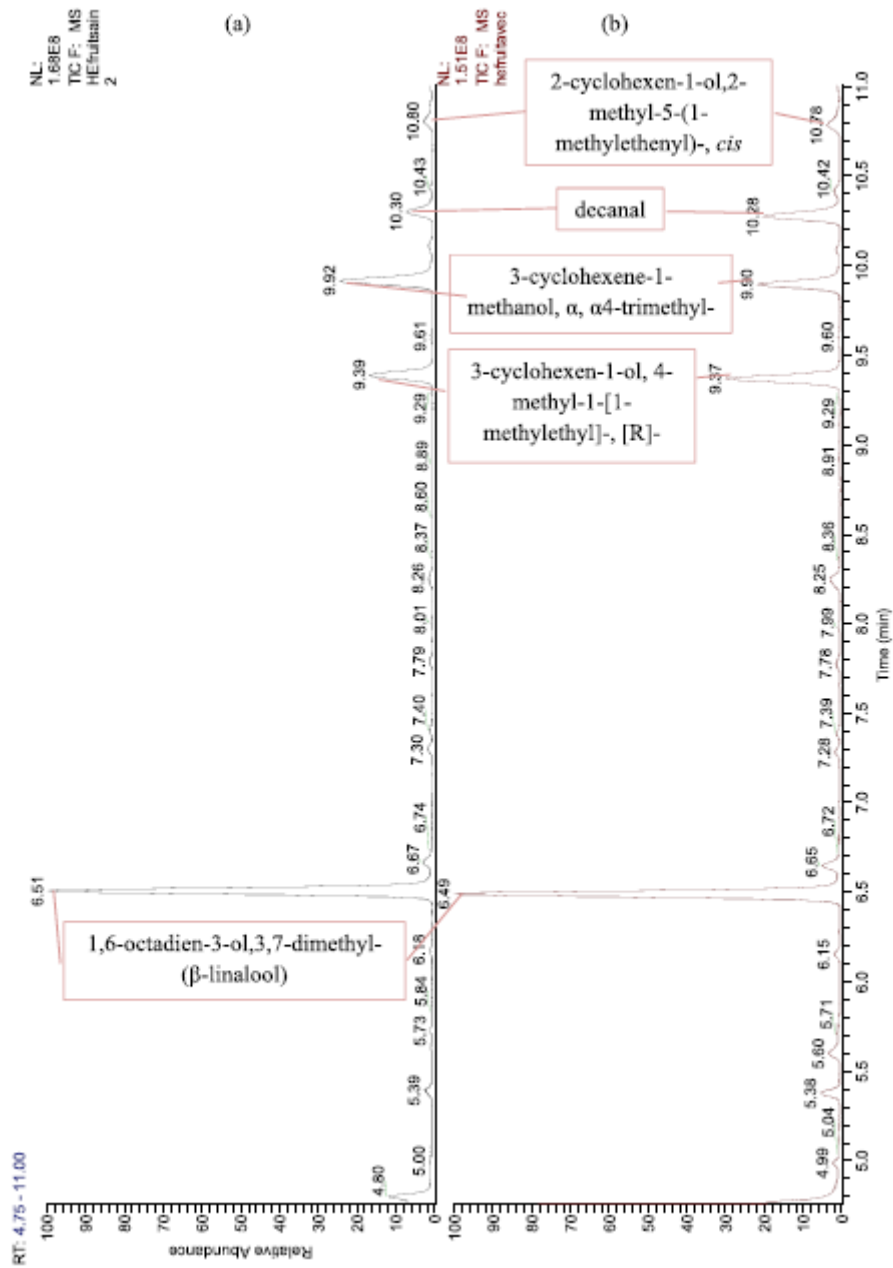


Figure 51: Chromatogrammes de la GC-MS des huiles essentielles d'agrumes: (a) HE extraite de fruits d'oranges saines, (b) HE extraite de fruits d'oranges infectés par l'agent de stubborn.

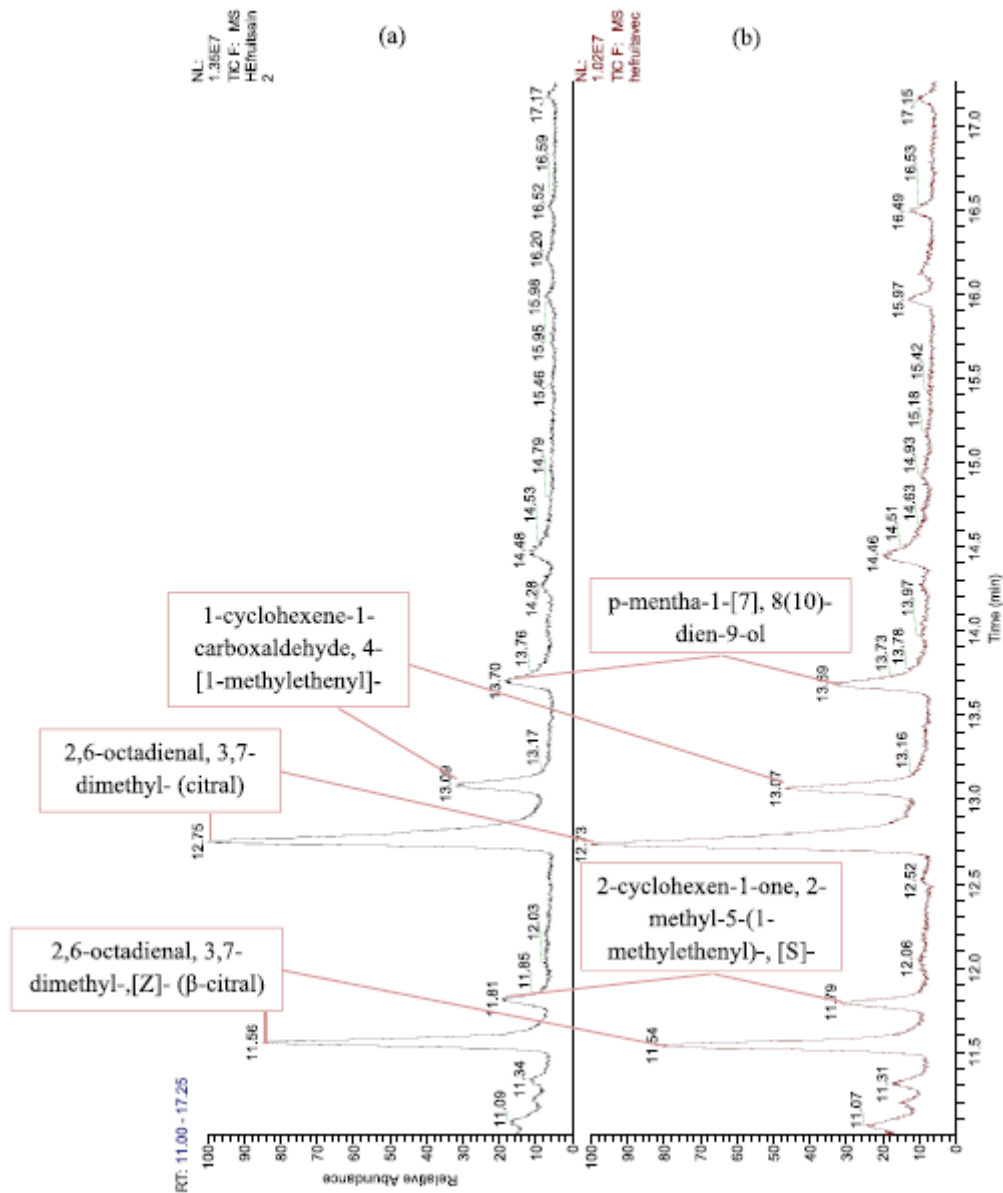


Figure 52: Chromatogrammes de la GC-MS des huiles essentielles d'agrumes: **(a)** HE extraite de fruits d'oranges saines, **(b)** HE extraite de fruits d'oranges infectés par l'agent de stubborn.

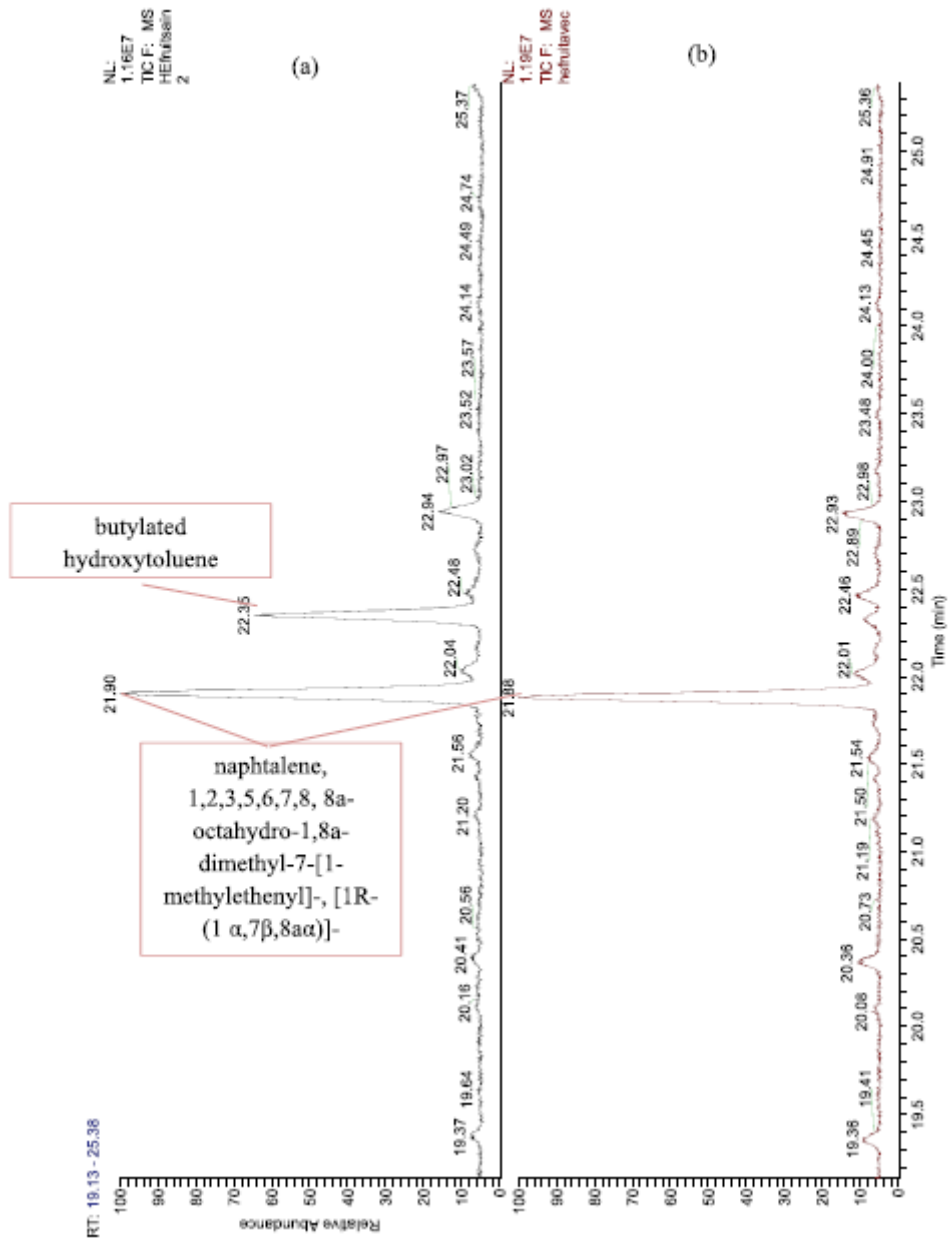


Figure 53: Chromatogrammes de la GC-MS des huiles essentielles d'agrumes: **(a)** HE extraite de fruits d'oranges saines, **(b)** HE extraite de fruits d'oranges infectés par l'agent de stubborn.