



REVUE SCIENTIFIQUE ÉDITÉE PAR  
LE LABORATOIRE DE RECHERCHE EN  
BIOTECHNOLOGIE DES PRODUCTIONS VÉGÉTALES  
UNIVERSITE BLIDA 1



# AGROBIOLOGIA

Revue Agrobiologia, (2019), volume 9(2)  
ISSN (P): 2170-1652 - Dépôt légal: 5895-2011  
e-ISSN: 2507-7627 - [www.agrobiologia.net](http://www.agrobiologia.net)

**L**a revue scientifique *AGROBIOLOGIA* est éditée par le Laboratoire de Recherche en Biotechnologie des Productions Végétales de l'Université Saad Dahlab (Blida 1), Faculté des sciences de la nature et de la vie, Département de Biotechnologies. C'est une revue semestrielle où des travaux de recherche spécialisés en sciences agronomiques et biologiques peuvent être publiés.

**Directeur de publication**

Pr SNOUSSI Sid Ahmed, Laboratoire de Biotechnologie des Production Végétale, Département des Biotechnologies, Faculté des Sciences de la Nature et de Vie, Université Saad Dahleb Blida 1, Algérie

**Rédacteur en chef**

Pr DJAZOULI Zahr-Eddine, Laboratoire des Production Végétale, Département des Biotechnologies, Faculté des Sciences de la Nature et de Vie, Université Saad Dahleb Blida 1, Algérie

**Editeur**

MAISON ALYA PRESTIGE, Blida, Algérie

**Contact**

Adresse : Université Saad Dahleb Blida1, B.P. 270, route de Soumaa, Ouled Yaich, Blida, Algérie

E-mail : [contact@agrobiologia.net](mailto:contact@agrobiologia.net)

## Membres du comité de lecture :

- Pr. **Abdelly Chedly** : Centre de Biotechnologie de Sfax Tunisie
- Dr. **Abdulhussaine Maria Stella** : (Algérie : Université de Blida 1)
- Pr. **Arab Karim** : (Algérie : Université de Boumerdes)
- Dr. **Aroun Mohamed Elfodhil** (Algérie : Université de Blida 1)
- Dr. **Ayadi Radia** (Algérie : Université de Blida 1)
- Pr. **Benrebha Fatima Zohra** (Algérie : Université de Blida 1)
- Pr. **Bele constantin** : Université Cluj Napoka Faculté des Sciences agricoles et Médecine Vétérinaire. Roumanie
- Pr **Benlemlih Mohammed** Faculté des sciences de Fès .Maroc
- Pr. **Benmoussa Mebrouk** (Algérie : Université de Blida 1)
- Dr. **Bounaceur Farid** (Algérie : Université de Tiaret)
- Dr. **Chaouia chérifa** : (Algérie : Université de Blida 1)
- Dr. **Cohen Nozha**: (Institut Pasteur , Casablanca - Maroc)
- Pr. **Couderchet Michel** : (Université du Reims Champagne - Ardenne - France)
- Pr. **Doumandji Salah Eddine** : Ecole Nationale Supérieure Agronomique Le Harrach
- Dr. **Djazouli Alim Fatma Zohra**: (Algérie : Université de Blida 1)
- Pr. **Guendouz –Benrima Atika** (Algérie : Université de Blida 1)
- Dr. **Merah Othmane** Université Paul Sabatier Toulouse France
- Pr **Merzouki .Mohamed** Faculté des sciences de Fès .Maroc
- Pr. **Mesli Lotfi** : (Algérie : Université de Tlemcen)
- Pr. **Mitiche Bahia** Ecole Nationale Supérieure Agronomique El Harrach
- Pr. **Petit Daniel** : Université de Limoges
- Dr. **Rouibi Abelhak** (Algérie : Université de Blida 1)
- Pr. **Saidi Fairouz** (Algérie : Université de Blida 1)
- Dr. **Saladin Gaele** : Université de Limoges
- Pr. **Valles Vincent** Université d'Avignon (France)
- Dr. **Zebib Bachar** Université Paul Sabatier Toulouse France
- Dr. **Zouaoui Ahmed** : (Algérie : Université de Blida 1)

La revue *Agrobiologia* accepte tout article présentant de nouvelles études sur tout aspect de recherche fondamentale, appliquée et développement dans les domaines des sciences agronomiques et biologiques. L'article peut être de nature scientifique que technique.

Quant un auteur reprend une figure, une photographie ou un tableau provenant d'une autre source (autre publication), il doit indiquer l'origine du document après avoir obtenu au préalable le droit de reproduction.

- **Langue :** Les articles peuvent être rédigés en français ou en anglais
- **Présentation du manuscrit :** Il doit être saisi sur du papier standard (préférence A4 en interligne (1,50 cm) avec des marges de 2,50 cm de chaque côté en recto seulement

**Le manuscrit doit en général comprendre dans l'ordre suivant :**

**1. Page du titre :** Le titre contient

- Le titre de l'article qui doit être aussi explicite que concis
- Le nom des auteurs et leur affiliation
- L'adresse complète et l'email si possible

**2. Page du résumé :** la page du résumé comprend

- **Le titre de l'article :** le résumé en français et en anglais, chaque résumé ne doit pas dépasser 250 mots.
- **Les mots clés**

**3. Nomenclature :** tous les paramètres cités dans le texte doivent être définis et les unités utilisées reportées. Les symboles utilisés doivent être de type standard (ISO par exemple). Les unités doivent être conformes au système international.

**4. Texte :** le texte doit être divisé en chapitre ayant chacun un titre. Les chapitres et sous chapitres doivent être numérotés en chiffres arabes.

**5. Remerciements :** Ceux-ci devraient être retenus et groupés dans un paragraphe séparé à la fin du texte.

**6. Référence :** Les références doivent être identifiées dans le texte à l'aide de chiffres arabes entre crochets. La liste de référence des auteurs devrait être dans leur ordre d'apparition à la fin du manuscrit. Les noms des publications périodiques et des périodiques cités devraient être écrits entièrement

**7. Figures :** les illustrations doivent être numérotées dans le texte en chiffres arabes entre parenthèses, chaque figure doit être aussi explicite que possible. Les légendes sont regroupées sur des feuilles séparées.

**8. Tableaux :** ils doivent être inclus dans le manuscrit et numérotés en chiffres arabes dans l'ordre de leur apparition dans le texte.

- **Soumission du manuscrit :** le manuscrit doit être envoyé en quatre exemplaires à l'adresse du laboratoire de recherche (Université de Blida, Département d'agronomie) L'article ne doit ni avoir fait l'objet d'une publication antérieure ; ni simultanément soumis (ou publié) dans d'autres revues. Chaque article doit être complet dans sa forme finale.

- **Evaluation du manuscrit :** tout manuscrit est soumis à l'avis de trois experts qui jugent de l'intérêt de sa publication. Ces experts peuvent demander des modifications ou des compléments aux auteurs. Dans ce cas, les manuscrits doivent être corrigés et retournés. Toutefois, aucune modification majeure ne sera acceptée à ce stade de la publication. Seuls les articles ayant reçu un avis favorable seront acceptés pour publication.

Pour tout article accepté pour publication, le manuscrit définitif doit être accompagné de l'adresse électronique et un CD.



- ANTIHYPERLIPIDEMIC AND ANTIOXIDANT EFFECTS OF THE MICROALGAE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* IN STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS** **1474**  
 NACER Wassila, BABA AHMED Fatima Zohra, MERZOUK Hafida, BENYAGOUB Ouahiba and BOUANANE Samira
- EVALUATION OF POLYMORPHISM OF ICAM-1 GENE IN A POPULATION ON RUSSIAN FEDERATION TERRITORY** **1484**  
 MOKRANE Ahlem, PERENKOV Aleksei Dmitrievitch, NOVIKOV Dmitry Viktopivitch, FOMINA Svetlana Grigorivna, NOVIKOV Viktor Vladimirovitch
- ÉFFETS DU THIAMETHOXAME ET DE LA TEFLUTHRINE SUR LES BIOMARQUEURS PHYSIOLOGIQUES DE L'ESCARGOT TERRESTRE *HELIX ASPERSA*** **1491**  
 AÏT HAMLET Smina, DJEKOUN Mohamed, BENSOLTANE Samira et BERREBBAH Houria
- ACETAMIPRIDE INDUCED HISTOPATHOLOGICAL ALTERATION IN LUNG AND LIVER OF MALE MICE** **1499**  
 SAADI Leila, BOUAZZA Marwa and LEBAILI Nemcha
- CHANGEMENT DES COMPOSANTS BIOCHIMIQUES DU SANG ET DU LAIT DURANT LA LACTATION CHEZ LA VACHE LAITIÈRE DANS LES ÉLEVAGES DE L'EST ALGÉRIEN** **1506**  
 DEGHNOUCHE Kahramen, BOUKHALFA Hassina Hafida, TITAOUINE Mohamed et GABA Marwa
- ANALYSE MORPHOMETRIQUE OVARIENNE ET UTÉRINE ET PROFIL ENDOCRINIEN SUIVANT LA RÉCEPTIVITÉ SEXUELLE *POST COÏTUM* CHEZ LA LAPINE DE POPULATION LOCALE** **1513**  
 BOUMAHDHI MERAD Zoubeïda, TARZAALI Dalila
- CHARACTERIZATION OF POSTHARVEST PHYSIOLOGY OF THERMISED DATES (*PHOENIX DACTYLIFERA* L.), PACKED UNDER A MODIFIED ATMOSPHERE (MAP).** **1528**  
 MAROUF ARIBI Mohamed and KHALI Mustapha
- ESSAI DE VALORISATION DE LA DATTE MECH-DEGLA PAR SA SUBSTITUTION AU SUCRE BLANC DANS LA FORMULATION D'UN BISCUIT** **1543**  
 YEFSAH-IDRES Aïcha, BENRIMA Atika, HAMMOUCHI Khoudir et BENNAZOUG Yasmina
- MORPHOLOGICAL AND END-USE QUALITY CHARACTERISATION OF TUNISIAN DURUM WHEAT** **1560**  
 BABAY Elyes, MNASRI Sameh, KHAMASSI Khalil, ICHRAK ouriri and HANANA Mohsen
- CHARACTERIZATION OF 7 *VICIA* L. TAXA FROM ALGERIA BASED ON EVIDENCE FROM MORPHOLOGY AND ECOGEOGRAPHY** **1568**  
 BECHKRI Sakina, BOUTEKRABT Lynda et KHELIFI Douadi
- GENETIC RESOURCES OF CAROB TREE (*CERATONIA SILIQUA* L.) IN ALGERIA: INSIGHT FROM POD AND SEED MORPHOLOGY** **1581**  
 KOCHERANE Rima , KROUCHI Fazia and DERRIDJ Arezki

**COMPARATIVE EFFECT OF TWO VARIETIES OF TOMATO (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.) TO SALINITY** **1601**

ABBAD Mohamed, SNOUSSI Sid Ahmed, DJERDJOURI Amina and GHANEM BOUGHANMI Néziha

**RÉPONSES MORPHO-PHYSIOLOGIQUES DES PLANTULES DE *RETAMA RAETAM* À DES NIVEAUX DE SALINITÉ EXTRÊMES** **1610**

MALLEM Hamida, HOUYOU Zohra et BENRIMA Atika

**ADVENTICES LIANESCENTES DES CASIERS RIZICOLES DANS LE DELTA DU FLEUVE SÉNÉGAL** **1621**

BASSENE César , MBALLO Rahimi , MBAYE Mame Samba , CAMARA Abdoul Aziz et NOBA Kandioura

**INITIATION A LA MICROPROPAGATION PAR MICROBOUTURAGE DE L'ARGANIER (*ARGANIA SPINOSA* L. Skeels)** **1628**

AIZER Nassima, ABDELLATIF Nabila, SAIDI fairouz, CHAOUIA Cherifa

**PATHOGENICITY OF *FUSARIUM* AND *MICRODOCHIUM* SPECIES ASSOCIATED WITH CROWN ROT OF BARLEY (*HORDEUM VULGARE* L.)** **1636**

BOUNGAB Karima, MOKRANI Slimane and RIGHI Kada

**PREVISION DU MILDIOU DE LA POMME DE TERRE DANS LE NORD-OUEST ALGERIEN** **1644**

ABDERRAHMANE Omar , BERDJA Rafik et BENCHABANE Messaoud

**MÉTHODES D'EXTRACTION ET DE DISTILLATION DES HUILES ESSENTIELLES : REVUE DE LITTÉRATURE** **1653**

BOUKHATEM Mohamed Nadjib ·FERHAT Amine et KAMELI Abdelkrim

**ANTIOXYDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF ESSENTIAL OIL AND ETHANOL EXTRACT OF *SANTOLINA CHAMAECYPARISSUS* L.** **1660**

CHIRANE Manel Soumia, BENCHABANE Otman, BOUSBIA Nabil and ZENIA Safia.

**ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE DE L'HUILE ESSENTIELLE DES FRUITS DU PISTACHIER LENTISQUE (*PISTACIA LENTISCUS* L.)** **1669**

AMARA Nacira, BENRIMA Atika, ANBA Chahira, BELKHIR Houria

**IMPACT DE LA FORMULATION SUR LE POTENTIEL ANTIFONGIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DU BIGARADIER *CITRUS AURANTIUM* L.** **1677**

BENDALI Abdelaziz, OULEBSIR Chahinez, El HADI Djamel et DJAZOULI Zahr-Eddine

**DIVERSITÉ DES MODALITÉS DE PRODUCTION APICOLES DANS LA PLAINE DE MITIDJA (ALGÉRIE) 1694**

OUAKLI Khalissa, NEGGACHE Soumia, MEFTI-KORTEBY Hakima et BENCHERCHALI Mohamed

**ECOLOGICAL ANALYSIS OF LOCUST FAUNA IN THREE REGIONS OF EASTERN ALGERIA (MILA, ALGERIA) BIODIVERSITY, INVENTORY AND CENSUS 1701**

BETINA Sara Imène , BOUCHAIR Nadjat , SAADALLAH Dalal and HARRAT Abboud

**INVENTAIRE DES COCHENILLES DES AGRUMES (CLÉMENTINIER ET ORANGER) DANS DEUX RÉGIONS DE LA MITIDJA (ALGÉRIE) 1707**

AROUA Khaoula , KAYDAN Mehmet Bora , BELGUENDOZ Rachida. ACHIRI Tange Denis et BICHE Mohammed

**DYNAMIQUE DES POPULATIONS ET DES INFESTATIONS DE LA MINEUSE SUD-AMÉRICAINNE DE LA TOMATE *TUTA ABSOLUTA* SUR TROIS CULTURES MARAÎCHÈRES EN ALGÉRIE : INFLUENCE DE LA PLANTE-HÔTE ET DES VARIATIONS DE TEMPÉRATURE 1715**

ZAID Radouane ; GAUTHIER Nathalie et DJAZOULI Zahr Eddine

## ANTHYPERLIPIDEMIC AND ANTIOXIDANT EFFECTS OF THE MICROALGAE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* IN STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS

NACER Wassila<sup>1</sup>, BABA AHMED Fatima Zohra<sup>1\*</sup>, MERZOUK Hafida<sup>1</sup>, BENYAGOUB Ouahiba<sup>1</sup> and BOUANANE Samira<sup>1</sup>

1. University of Tlemcen, Faculty of SNVSTU, Department of Biology, Laboratory of Physiology and Biochemistry of Nutrition, Tlemcen, Algeria.

Reçu le 24/10/2019, Révisé le 28/12/2019, Accepté le 30/12/2019

### Abstract

**Description of the subject:** Marine organisms, such as microalgae, have attracted universal interest in the field of research as an alternative source of therapeutic and biological compounds that can be used for treatment of different diseases.

**Objective:** The aim of the present study was to investigate the possible hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant effect of the microalgae *Nannochloropsis gaditana* in streptozotocin-induced diabetic rats.

**Methods:** Diabetes was induced in male Wistar rats by single intraperitoneal injection of streptozotocin (45 mg/kg). Male rats were fed on control diet supplemented or not with *Nannochloropsis gaditana* (10%) for two months. At the end of the experiment, plasma and tissues biochemical parameters and oxidant/antioxidant markers were determined.

**Results:** The results obtained in this study show that streptozotocin induced animal diabetes characterized by adverse alterations of the metabolic and the balance oxidant /antioxidant. However, *Nannochloropsis gaditana* supplementation resulted in a significant reduction in the level of plasma glycated hemoglobin, plasma and tissue lipids and attenuates oxidative stress and thus improves metabolic status. In addition, it induced a modulation of lipase activities in diabetic rats. On the other hand, due to its antioxidant properties, *Nannochloropsis gaditana* was shown to have the capacity to mitigate the oxidative stress by increasing the antioxidant defense.

**Conclusion:** This study suggests that the microalgae *Nannochloropsis gaditana* has a beneficial effect in controlling diabetes by reducing blood glucose, lipid profile and oxidative stress, which reduces the risk of developing complications of diabetes.

**Keywords:** *Nannochloropsis gaditana* ; diabetes ; streptozotocin ; lipid profile ; oxidative stress

## EFFETS ANTIHYPERLIPIDÉMIQUES ET ANTIOXYDANTS DE LA MICROALGUE *NANNOCHLOROPSIS GADITANA* CHEZ LES RATS DIABÉTIQUES INDUITS PAR LA STREPTOZOTOCINE

### Résumé

**Description du sujet:** Les organismes marins, tels que les microalgues, ont suscité un intérêt universel dans le domaine de la recherche en tant que source alternative de composés thérapeutiques et biologiques pouvant être utilisés pour le traitement de différentes maladies.

**Objectifs:** Le but de la présente étude était d'évaluer le possible effet hypoglycémique, hypolipidémique et antioxydant de la microalgue *Nannochloropsis gaditana* chez les rats rendus diabétiques par streptozotocine.

**Méthodes:** Le diabète a été induit chez les rats Wistar mâles par injection de streptozotocine (45 mg / kg). Les rats mâles ont été nourris avec un régime standard témoin supplémenté ou non en *Nannochloropsis gaditana* (10%) pendant deux mois. À la fin de l'expérimentation, les paramètres biochimiques et les marqueurs oxydants/antioxydants plasmatiques et tissulaires sont déterminés.

**Résultats:** Les résultats obtenus montrent que la streptozotocine induit chez l'animal un diabète caractérisé par de nombreuses altérations métaboliques et de la balance oxydant/antioxydant. Cependant, la supplémentation en *Nannochloropsis gaditana* provoque une diminution significative de la concentration plasmatique de glucose, l'hémoglobine glyquée, des lipides plasmatiques et tissulaires et atténue le stress oxydatif et améliore ainsi le statut métabolique. De plus, il induit une modulation des activités des lipases chez le rat diabétique. D'autre part, en raison de ses propriétés antioxydantes, *Nannochloropsis gaditana* a la capacité d'atténuer le stress oxydatif en augmentant les défenses antioxydantes.

**Conclusion:** La présente étude suggère que les microalgues *Nannochloropsis gaditana* ont un effet bénéfique sur le contrôle de diabète par diminution de la glycémie, du profil lipidique et du stress oxydant, ce qui permet de réduire le développement des complications associées au diabète.

**Mots clés:** *Nannochloropsis gaditana* ; diabète ; streptozotocine ; profil lipidique ; stress oxydatif

\* Auteur correspondant: BABA AHMED Fatima Zohra, E-mail:fatimazohra\_7@yahoo.fr



## INTRODUCTION

Diabetes mellitus is a metabolic disorder characterized by the presence of hyperglycemia as a result of defective insulin secretion, faulty insulin action or both [1]. This metabolic disorder is widely prevalent throughout the world, and is considered today as a major public health issue that seriously threatens human health. Indeed, recent studies have found that this disease affects about 4% of the world population and is expected to rise to 5.4% in 2025 [2, 3].

Dyslipidemia is recognized as one of the most prominent risk factors for cardiovascular diseases due to diabetes; it is characterized by hypertriglyceridemia, low high-density lipoprotein cholesterol levels, and increased small and dense low-density lipoprotein-cholesterol particles [4].

Oxidative stress plays a crucial role in the development of diabetic complications. This phenomenon occurs when the balance between oxidant and antioxidant systems shifts in favour of the former, leading to the production of oxygen free radicals [5]. The involvement of oxidative stress in the pathogenesis of diabetes is suggested not only by oxygen free radicals generation, but also due to nonenzymatic protein glycosylation, auto-oxidation of glucose, impaired glutathione metabolism, alteration in antioxidant enzymes and formation of lipid peroxides [6].

It is worth stating that recently, marine organisms, such as microalgae, have attracted universal interest in the field of research as an alternative source of therapeutic and biological compounds that can be used in pharmaceutical,

nutraceutical, antioxidant, anticancer and antiviral applications [7].

Microalgae are microscopic photosynthetic organisms encountered in marine and freshwater environments [8].

*Nannochloropsis gaditana* is a microalga that belongs to the *Eustigmatophyceae* class, which is known as a source of proteins and polyunsaturated fatty acids [9, 10]. Recently, it has been documented that this marine alga possesses a variety of bioactive compounds that exhibit highly beneficial effects on health through their hypoglycemic and hypolipidemic properties [11, 12].

However, to the best of our knowledge, no prior studies have been reported in the literature so far on the effect of *Nannochloropsis gaditana* on streptozotocin-induced diabetic rats. Consequently, the purpose of the present work consists of exploring the effects of *Nannochloropsis gaditana* on lipid profile, lipase activities and redox status in diabetic rats.

## MATERIALS AND METHODS

### 1. Biological material

The microalgae *Nannochloropsis gaditana* used in our experimental protocol originated from Mediterranean Sea; it came from closed microalgae photo bioreactors (Sidi Bel-Abbes, a northwestern Algerian town). After cultivation, the microalgae biomass was harvested and lyophilized. The resulting lyophilisate was then analyzed in order to determine the physico-chemical composition of *Nannochloropsis gaditana*, as shown in Table 1.

Components	Amount
Water content	42.9 g/100g
Dry mater content	57 g/100g
Ash content / DM	5.74 g/100g
Protein content / DM	28 g/100
Fat content / DM	18.4 g/100g
Cellulose content / DM	386 mg/100g
Carbohydrate content / DM	45 g/100g
Calcium content / DM	4.41 g/100g
Manganese content / DM	420 mg/100g
Zinc content / DM	10 mg/100g
Copper content / DM	5 mg /100g
Iron content / DM	17 mg/100g
Beta carotene content / DM	7.85 mg/100g
Vitamin C content/ DM	0.334 g/100g
Vitamin B1content / DM	610 µg /100 g
Vitamin B2 content / DM	2.17 mg/100 g
Vitamin B3content / DM	830 µg/100 g
Vitamin B12 content / DM	1.92 mg/100 g
Linoleic Acid content	11 mg/100 g
Linolenic Acid content	17 mg/100 g
Oleic Acid content	61 mg/100 g

Table 1: Composition of the microalgae *Nannochloropsis gaditana* DM: dry material

## 2. Animals and experimental design

Male Wistar rats, eight weeks old and weighing between 150 and 200 g, were obtained from the Pasteur institute in Algiers (Algeria), and were used in this study. All experiments were conducted according to the recommendations of the Committee on the Ethics of Animal Experiments and experimental animal care at the University of Tlemcen, in Algeria. The rats were housed in wood-chip bedded plastic cages and maintained under standard laboratory conditions, i.e. 12:12 h light-dark cycle, temperature of 25 °C and relative humidity of 60±5%. Animals had free access to food (control commercial diet for rats ONAB, Algeria) and water.

Diabetes was induced in rats by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ), dissolved in 0.1 M citrate buffer (pH 4.5), at a dose of (45 mg/kg). Diabetes was confirmed three days following the injection, through the estimation of blood glucose level using a glucose meter. It is worth clarifying that rats were considered diabetic only if their blood glucose level exceeded 127 mg/dL; they were then used in the present study.

The selected animals were divided into 4 experimental groups. The first group (control, C,  $n = 10$ ) included normal rats fed a control diet (ONAB); the second group (control microalgae, CM,  $n = 10$ ) contained normal rats fed a control diet enriched with 10% microalgae *Nannochloropsis gaditana*; the third one (diabetic group, D,  $n = 10$ ) involved diabetic rats fed only with control diet; and the fourth and last one (diabetic microalgae, DM,  $n = 10$ ) comprised diabetic rats fed a control diet enriched with 10% microalgae *Nannochloropsis gaditana*. The microalgae *Nannochloropsis gaditana* dosage used in this study was performed according to the protocol of Markovits et al. [13].

## 3. Blood and tissue samples

After the eight week, the experimental animals were fasted overnight and sacrificed. They were anaesthetized with intraperitoneal injection of 10% chloral (0.3 ml per 100 g of body weight). Their blood was then collected from abdominal aorta in two tubes, with and without anticoagulant, for plasma and serum separation. Serum was used for separation of different lipoprotein fractions and plasma was used for biochemical determinations and oxidant/antioxidant status parameters.

After removal of plasma, erythrocytes were washed with isotonic saline and were lysed with ice-cold distilled water and stored at 4 °C for 15 min. The cell debris was removed by centrifugation (2000 g for 15 min). Erythrocyte lysates were assayed for oxidant/antioxidant markers.

Afterwards, the liver, adipose tissue and pancreas were removed, washed with ice-cold saline, quickly blotted and weighed. An aliquot of each tissue was homogenized by means of an Ultra-Turrax homogenizer (Bioblock Scientific, Illkirch, France) in 10 volumes of ice-cold 10 mmol/l phosphate-buffered saline (pH 7.4) containing 1.15% KCl. The homogenates were subjected to a 6000 g centrifugation at 4°C for 15 min. The supernatant fractions were collected and used for tissue triglycerides and total cholesterol assays.

A second aliquot of tissues was homogenized in 0.9% (w/v) NaCl containing heparin (from Sigma in St. Louis, MO, USA) which was used for the determination of the lipoprotein lipase (LPL) activity.

Another portion of the adipose tissue was homogenized in ice cold buffer containing 0.25 M sucrose, 1 mM dithiothreitol and 1 mM EDTA, pH 7.4, supplemented with 20 mg/ml leupeptin, 2 mg/ml antipain and 1 mg/ml pepstatin; it was then used in the adipose hormone sensitive lipase (HSL) assay.

## 4. Chemical analysis

The plasma glucose level was determined using colorimetric enzymatic assays (kits from BioAssay Systems, Hayward, CA). In addition, the plasma and tissue triglycerides (TG) and total cholesterol (TC) were measured using colorimetric enzymatic kits (Sigma, St. Louis, MO, USA). The liquid chromatography method was employed to quantify the glycated hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) in whole blood using a kit from Pointe Scientific Inc., United States. Also, the blood cell hemoglobin levels were measured using a hemoglobinometer (HemoCue Ltd., Dronfield, United Kingdom). Serum low density lipoprotein (LDL), very low density lipoprotein (VLDL) and high density lipoprotein (HDL) fractions were separated according to the method of Burstein et al. [14]. Different precipitate fractions were obtained from successive centrifugation with 0.1 ml phosphotungstic acid (30.3 mmol/L) and MgCl<sub>2</sub> (100 mmol/L) reagent mixture. HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and VLDL-cholesterol concentrations were measured by enzymatic methods (Sigma).

The lipase activity (LPL, EC 3.1.1.34; HSL, EC 3.1.1.79) was measured using the pH-stat technique by titrimetric measurement of fatty acids released after hydrolysis of triglycerides of synthetic substrate with NaOH 0.05 M at pH 8 and at temperature 25 °C. The enzyme activity was expressed in international units (IU). One unit corresponds to the release of one micro-equivalent of fatty acid per minute.

### 5. Oxidant/antioxidant marker determination

Plasma vitamin C levels were determined using dinitrophenylhydrazine as previously described [15]. Catalase activity was measured on erythrocyte lysate by spectrophotometric analysis of the rate of hydrogen peroxide decomposition at 240 nm [16]. Erythrocyte reduced glutathione (GSH) levels was assayed by colorimetric method based on the reduction of 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid by GSH to generate 2-nitro-5-thiobenzoic acid (DTNB or Ellman reagent) [17]. Superoxide dismutase (SOD) activity was measured by the NADPH oxidation procedure [18]. Malondialdehyde (MDA) levels, a marker of lipid peroxidation, were determined in plasma and erythrocyte by the procedure of Ohkawa et al. [19] based on the reaction of MDA with thiobarbituric acid. Carbonyl proteins (CARP) (markers of protein oxidation) in plasma and erythrocyte were assayed by the 2,4-dinitrophenyl hydrazine reaction [20].

### 6. Statistical analysis

The results obtained were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). The results were tested for normal distribution using the Shapiro–Wilk test. Data not normally distributed were logarithmically transformed. Significant differences among the groups were analyzed statistically by a one-way analysis of variance (ANOVA). When significant changes were observed in ANOVA tests, Fisher least significant difference tests were applied to locate the source of significant difference. The significance level was set at  $P < 0.05$ . These calculations were performed using Statistica version 4.1 (Statsoft, Tulsa, OK).

## RESULTS

### 1. Effect of *Nannochloropsis gaditana* on plasma glucose, hemoglobin and glycated hemoglobin

It was found that rats in the diabetic group presented significantly high levels of plasma glucose and glycated hemoglobin, while the hemoglobin level decreased in a significant manner when compared with that of control group rats. However, when microalgae *Nannochloropsis gaditana* was fed to diabetic rats, it tended to bring the above values to near normal (Table 2).

Table 2: Levels of plasma glucose, hemoglobin and glycated hemoglobin in different experimental groups

	Control rats		Diabetic rats		P (ANOVA)
	C	CM	D	DM	
Glucose (g/L)	1.17 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	1.20 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	4.41 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	2.44 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.001
HbA <sub>1c</sub> (%)	4.40 $\pm$ 0.14 <sup>c</sup>	4.10 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	10.70 $\pm$ 0.87 <sup>a</sup>	9.60 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	0.004
Hb (mg/dL)	12.22 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	12.63 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	9.53 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	11.03 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	0.005

Values are presented as means  $\pm$  standard deviations (SD). C: normal rats fed a control diet; CM: normal rats fed a control diet enriched with microalgae at 10%; D: diabetic rats fed only with control diet; DM: diabetic rats fed a control diet enriched with microalgae at 10%. HbA<sub>1c</sub>, glycated hemoglobin; Hb, hemoglobin. Values with different superscript letters (a, b, c, d) are significantly different (ANOVA).

### 2. Effect of *Nannochloropsis gaditana* on lipid profile

A significant increase in total cholesterol, triglycerides, VLDL-C and LDL-C with significant decline in HDL-C concentrations was observed in diabetic rats as compared to control rats.

The treatment of rats with *Nannochloropsis gaditana* results in an important decrease in the level of total cholesterol, triglycerides, VLDL-C and LDL-C, while HDL-C was considerably increased compared to streptozotocin-induced diabetic rats (Table 3).

Table 3: Lipid profile in different experimental groups

	Control rats		Diabetic rats		P (ANOVA)
	C	CM	D	DM	
TC (mg/dL)	153.23±0.01 <sup>c</sup>	144.14±0.01 <sup>c</sup>	243.78±0.04 <sup>a</sup>	202.37±0.03 <sup>b</sup>	0.004
TG (mg/dL)	115.12±0.01 <sup>c</sup>	110.32±0.01 <sup>c</sup>	228.68±0.04 <sup>a</sup>	194.28±0.03 <sup>b</sup>	0.006
HDL-C (mg/dL)	81.06±1.12 <sup>b</sup>	92.75±1.47 <sup>a</sup>	59.06±1.18 <sup>d</sup>	73.08±1.21 <sup>c</sup>	0.001
LDL-C (mg/dL)	55.84±1.42 <sup>c</sup>	45.14±2.38 <sup>d</sup>	90.14±2.38 <sup>a</sup>	69.18±1.40 <sup>b</sup>	0.001
VLDL-C (mg/dL)	38.84±2.5 <sup>c</sup>	40.13±1.59 <sup>c</sup>	70.92±1.06 <sup>a</sup>	59.52±2.90 <sup>b</sup>	0.001

Values are presented as means ± standard deviations (SD). C: normal rats fed a control diet; CM: normal rats fed a control diet enriched with microalgae at 10%; D: diabetic rats fed only with control diet; DM: diabetic rats fed a control diet enriched with microalgae at 10%. TC, total cholesterol; TG, triglycerides; HDL-C, HDL cholesterol; LDL-C, LDL cholesterol; VLDL-C, VLDL cholesterol. Values with different superscript letters (a, b, c, d) are significantly different (ANOVA).

**3. Effect of *Nannochloropsis gaditana* on tissue lipid levels**

The group of diabetic rats showed significantly elevated levels of total cholesterol and triglycerides in their liver, pancreas and adipose tissue as compared to those of the control group.

However, liver, pancreas and adipose tissue total cholesterol and triglycerides contents were remarkably lower in diabetic rats fed a diet supplemented with *Nannochloropsis gaditana* (Fig. 1).

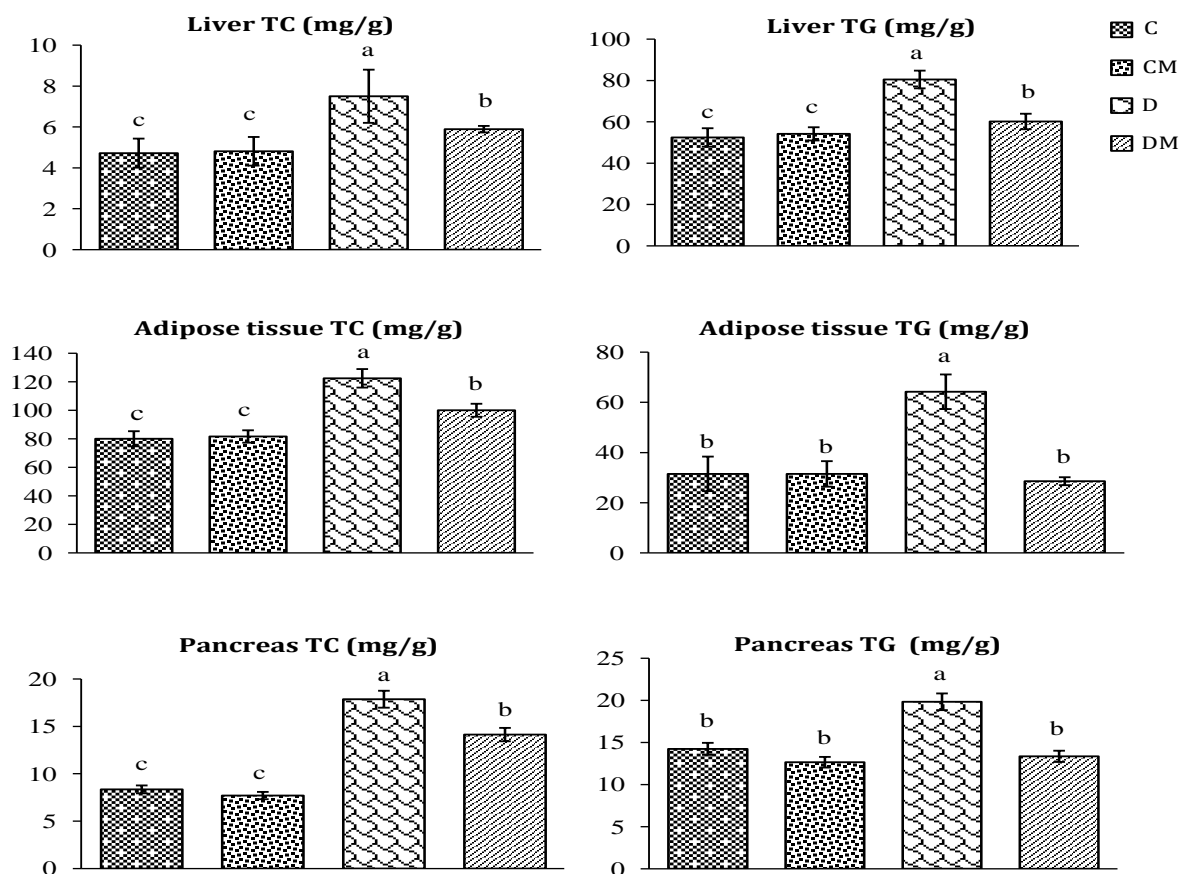


Figure 1: Tissue lipid levels in different experimental groups

Values are presented as means ± standard deviations (SD). C: normal rats fed a control diet; CM: normal rats fed a control diet enriched with microalgae at 10%; D: diabetic rats fed only with control diet; DM: diabetic rats fed a control diet enriched with microalgae at 10%. TC, total cholesterol; TG, triglycerides. Values with different superscript letters (a, b, c, d) are significantly different (ANOVA).

**4. Effect of *Nannochloropsis gaditana* on lipase activities in liver, pancreas and adipose tissue**

The LPL activity in liver, pancreas and adipose tissue decreased significantly in diabetic rats by comparison with control rats, whereas higher adipose HSL activity

was detected in streptozotocin-induced diabetic rats. It is worth noting that diabetic rats fed a diet rich in microalgae *Nannochloropsis gaditana* markedly improved their lipase activities as compared to diabetic rats fed a control diet (Fig. 2).

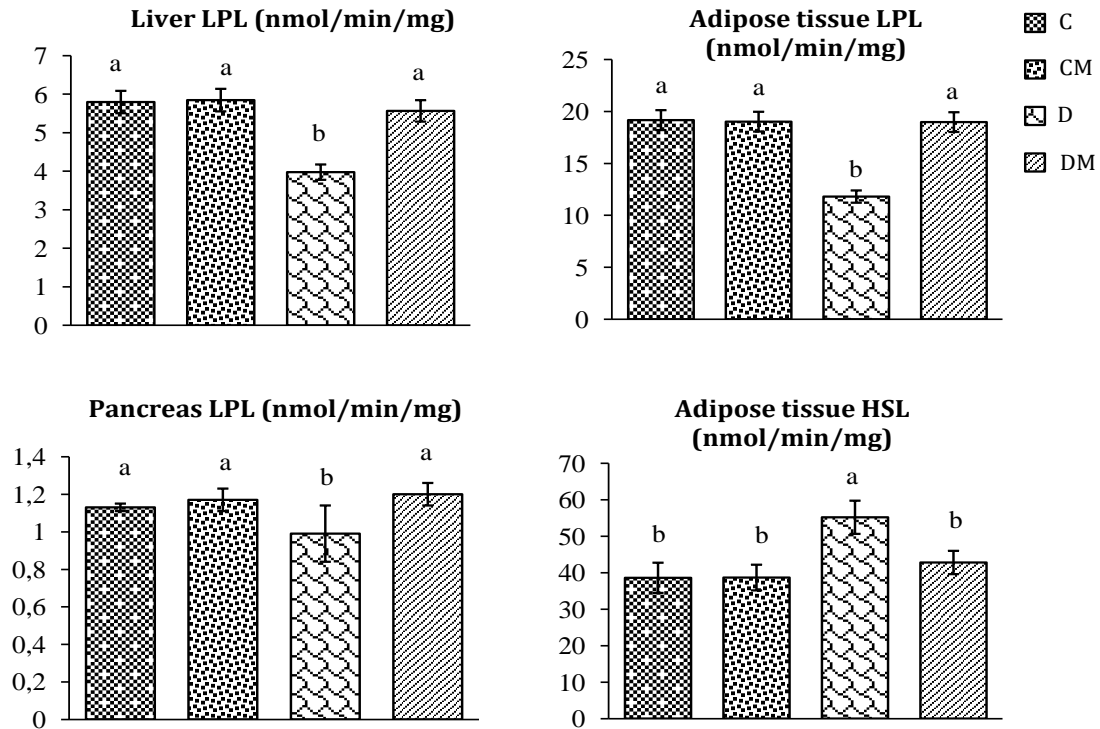


Figure 2: Liver, pancreas and adipose tissue lipase activities in different experimental groups. Values are presented as means ± standard deviations (SD). C: normal rats fed a control diet; CM: normal rats fed a control diet enriched with microalgae at 10%; D: diabetic rats fed only with control diet; DM: diabetic rats fed a control diet enriched with microalgae at 10%. LPL, lipoprotein lipase; HSL, hormone sensitive lipase. Values with different superscript letters (a, b, c, d) are significantly different (ANOVA).

**5. Effect of *Nannochloropsis gaditana* on oxidative stress markers**

In diabetic rats, there was a significant increase in oxidant markers (MDA and carbonyl proteins levels) in plasma and erythrocyte, while antioxidant defense markers (plasma vitamin C, erythrocyte GSH, catalase and SOD) were significantly reduced compared to control rats;

however, when these antioxidant enzymes were measured after dietary supplementation with *Nannochloropsis gaditana*, contradictory results were obtained. In addition, *Nannochloropsis gaditana* was able to reduce levels of MDA and carbonyl proteins in plasma and erythrocyte of diabetic rats (Table 4).

Table 4: Plasma and erythrocyte oxidant/antioxidant markers in different experimental groups

	Control rats		Diabetic rats		P (ANOVA)
	C	CM	D	DM	
<b>Plasma</b>					
CARP (nmol/l)	1.12±0.23 <sup>c</sup>	1.31±0.37 <sup>c</sup>	4.68±1.98 <sup>a</sup>	2.89±0.56 <sup>b</sup>	0.000
MDA (µmol/l)	4.52±1.08 <sup>b</sup>	4.18±1.23 <sup>b</sup>	8.37±3.50 <sup>a</sup>	6.37±1.49 <sup>b</sup>	0.018
vitamin C (µmol/l)	18.27±4.63 <sup>a</sup>	18.85±3.90 <sup>a</sup>	10.24±1.78 <sup>c</sup>	12.51±1.69 <sup>b</sup>	0.000
<b>Erythrocyte</b>					
CARP (nmol/l)	3.75±1.72 <sup>b</sup>	3.71±1.10 <sup>b</sup>	6.55±1.88 <sup>a</sup>	5.03±0.82 <sup>b</sup>	0.001
MDA (µmol/l)	2.89±0.19 <sup>c</sup>	3.05±0.82 <sup>c</sup>	6.31±1.33 <sup>a</sup>	4.91±0.91 <sup>b</sup>	0.000
GSH (µmol/l)	5.26±0.56 <sup>a</sup>	5.91±1.27 <sup>a</sup>	2.82±0.52 <sup>c</sup>	4.30±0.73 <sup>b</sup>	0.001
Catalase (U/min/ml)	153.67±35.27 <sup>a</sup>	183.00±10.61 <sup>a</sup>	93.56±11.66 <sup>c</sup>	143.79±3.76 <sup>b</sup>	0.000
SOD (mmol/min/ml)	487.25±4.10 <sup>a</sup>	496.17±1.25 <sup>a</sup>	279.81±17.06 <sup>c</sup>	376.19±38.42 <sup>b</sup>	0.000

Values are presented as means ± standard deviations (SD). C: normal rats fed a control diet; CM: normal rats fed a control diet enriched with microalgae at 10%; D: diabetic rats fed only with control diet; DM: diabetic rats fed a control diet enriched with microalgae at 10%. CARP, carbonyl proteins; MDA, malondialdehyde; GSH, reduced glutathione; SOD, superoxide dismutase. Values with different superscript letters (a, b, c, d) are significantly different (ANOVA).

## DISCUSSION

Streptozotocin, an antibiotic and anticancer agent, has been widely used for inducing diabetes in animals by effecting degeneration and necrosis of pancreatic β-cells [21]. The present study allowed showing that the intraperitoneal injection of streptozotocin to normal rats resulted in significantly elevated glucose levels, which is in good agreement with the findings of Akberzadah et al. [22] and Jin et al. [5]. In contrast, *Nannochloropsis gaditana* supplementation was shown effective in lowering the levels of plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats. The hypoglycemic action of this microalga might be due to the potentiation of the pancreatic secretion of insulin hormone by pancreatic beta cells. *Nannochloropsis gaditana*, through its ability to scavenge free radicals and inhibit lipid peroxidation [11] can prevent the oxidative stress damage caused by streptozotocin and protect the beta cells, thus resulting in decreased plasma glucose levels. Similar findings have been reported in diabetic rats fed a diet supplemented with *Nannochloropsis oculata* [23].

Low levels of hemoglobin observed in diabetic rats suggest an increased production of glycated hemoglobin. Glycated hemoglobin has always been considered as an important indicator of long-term glycemic control [24]. The excess glucose present in the blood of diabetic animals reacts with hemoglobin to form glycated hemoglobin [25]. According to Jangir et al. [26] and Gandhi et al. [27], a higher level of glycated hemoglobin was found in the blood of streptozotocin-induced diabetic rats, indicating their poor glycemic control, thus corroborating our findings.

Therefore, treatment of diabetic rats with *Nannochloropsis gaditana* caused reduction in the levels of glycated hemoglobin. This may be attributed to the improved glycemic control in the body.

In general, diabetes mellitus is associated with lipid disorders [28]. It is important to recall that the most common lipid abnormalities in diabetic subjects are hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia [29]. Indeed, the high lipid levels observed in diabetic rats are normally linked to an increased mobilization of free fatty acids from the peripheral fat depots [30].

In present study, diabetic rats showed a significant increase in total cholesterol, triglycerides, LDL-C, VLDL-C associated with significant decrease in HDL-C levels.

The results obtained were found consistent with those reported by Kebir et al. [31]. However, supplementation with *Nannochloropsis gaditana* at 10% could help to correct the lipid abnormalities observed in streptozotocin-induced diabetic rats. These findings were supported by Aboulthana et al. [23] who found that *Nannochloropsis oculata* decreased the levels of cholesterol, triglycerides, LDL-C but increased the HDL-C content in streptozotocin-induced diabetic rats. It was also revealed that *Nannochloropsis gaditana* has the capacity to improve the lipid metabolism [12]. On the other hand, *Nannochloropsis gaditana* caused a significant reduction in liver, pancreas and adipose tissue total cholesterol and triglycerides contents in diabetic rats. Thus, observed results indicate that *Nannochloropsis gaditana* possesses interesting antihyperlipidemic properties.

In this context, Bendaoud et al. reported that a diet supplemented with 10% *Nannochloropsis gaditana* during a period of 2 months reduced the plasma and tissue triglycerides and cholesterol levels in obese rats subjected to high fat diet [11]. In addition, other studies have discovered that *Nannochloropsis* alga has potential hypocholesterolemic effects on rats fed on high-cholesterol diets [32].

Furthermore, it is well known that lipoprotein lipase (LPL) is a rate-limiting enzyme that catalyzes the hydrolysis of the triglyceride core of the circulating triglyceride-rich lipoproteins, including chylomicrons, with a very low density of lipoproteins [33]. The data obtained revealed a significant decrease in the LPL activities of liver, pancreas and adipose tissue in rats of diabetic groups, as previously reported by Tavangar et al. [34] and Ranganathan et al. [35]. Regarding the adipose hormone-sensitive lipase, a higher level of HSL was observed in diabetic rats as compared to normal rats. These results were found to be highly consistent with those reported in previous studies. In addition, it was suggested that adipocytes isolated from streptozotocin-induced diabetic rats exhibited elevated lipolytic activity which was accompanied by increased HSL activity [36]. Consequently, treatment of diabetic rats with *Nannochloropsis gaditana* induces an important modulation of lipase activities. Moreover, the results achieved indicate that this microalga has the potential to counteract the development of many metabolic diseases and to prevent a number of complications associated with diabetes. It is interesting to note that previous studies have shown that *Nannochloropsis* is considered as a good potential source of EPA (20: 5 $\omega$ 3), and also an important polyunsaturated fatty acid that helps to prevent many diseases [37].

It has been shown that oxidative stress in diabetes mellitus coexists with a reduction in the antioxidant status, which can increase the deleterious effects of free radicals [25]. In a living organism, antioxidant enzymes as well as nonenzymatic antioxidants are the first line of defense against reactive oxygen species (ROS) induced oxidative damage [38]. In the present experiments, oxidative markers such as MDA and carbonyl proteins were elevated, while the antioxidant markers such as vitamin C, GSH, SOD and catalase activity were significantly reduced in diabetic rats.

These results were completely reversed upon treatment with *Nannochloropsis gaditana*, suggesting their antioxidant effect. In this respect, the previous studies have also supported that *Nannochloropsis gaditana* has the capacity to mitigate oxidative stress and enhance antioxidant status in obese rats subjected to a high fat diet [11]. Moreover, the antioxidant properties of *Nannochloropsis gaditana* could be due to various valuable pigments contained in this microalga such as the carotenoids, which are strong antioxidants and radical scavengers [39].

## CONCLUSION

From the present investigation, it can be concluded that *Nannochloropsis gaditana* is effective in improving the lipid profile and modulating the lipase activities in streptozotocin-induced diabetic rats. In addition, these microalgae, because of their antioxidant properties, could also mitigate oxidative stress and prevent complications associated with diabetes.

## REFERENCES

- [1]. Ozougwu J.C., Obimba K.C., Belonwu., C.D. and Unakalamba C.B. (2013). The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J. Physiol. Pathophysiol*, 4(4): 46-57.
- [2]. Kim S.H., Hyun S.H. and Choung S.Y. (2006). Anti-diabetic effect of cinnamon extract on blood glucose in db/db mice. *J Ethnopharmacol*, 104: 119-123.
- [3]. Pandey A., Tripathi P., Pandey R., Srivastava R. and Goswami S. (2011). Alternative therapies useful in the management of diabetes: A systematic review. *J Pharm Bioall Sci*, 3(4): 504-512.
- [4]. Chen S.C. and Tseng C.H. (2013). Dyslipidemia, kidney disease, and cardiovascular disease in diabetic patients. *Rev Diabet Stud*, 10: 88-100.
- [5]. Jin L., Xue H.Y., Jin L.J., Li S.Y. and Xu Y.P. (2008). Antioxidant and pancreas-protective effect of aucubin on rats with streptozotocin-induced diabetes. *Eur J Pharmacol*, 582: 162-167.
- [6]. Samarghandian S., Borji A., Delkhosh M.B. and Samini F. (2013). Safranal treatment improves hyperglycemia, hyperlipidemia and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pharm Pharm Sci*, 16(2):352-362.
- [7]. Valli Nachiyar V. and Renugadevi K. (2015). Bio-prospecting microalgae for value added products. *RJPBCS*, 6(3): 893-900.

- [8]. Priyadarshani I. and Rath B. (2012). Commercial and industrial applications of micro algae- A review. *J. Algal Biomass Utiln*, 3(4): 89-100.
- [9]. Baba Hamed S., Baba Hamed M.B., Kassouar S. and Abi Ayad S.M.E. (2016). Physicochemical analysis of cellulose from microalgae *Nannochloropsis gaditana*. *Afr. J. Biotechnol*, 15(24): 1201-1207.
- [10]. Camacho-Rodríguez J., Cerón-García M.C., González-López C.V., Fernández-Sevilla J.M., Contreras-Gómez A. and Molina-Grima E. (2013). A low-cost culture medium for the production of *Nannochloropsis gaditana* biomass optimized for aquaculture. *Bioresour Technol*, 144: 57-66.
- [11]. Bendaoud A., Baba Ahmed F.Z., Merzouk H., Bouanane S. and Bendimerad S. (2018). Effects of dietary microalgae *Nannochloropsis gaditana* on serum and redox status in obese rats subjected to a high fat diet. *Phytothérapie*, 1-11.
- [12]. Bendimerad-Benmokhtar S., Bouanane S., Merzouk H., Baba Ahmed F.Z. and Bendaoud A. (2018). Effects of *Nannochloropsis* fed on serum and tissue lipids metabolism in obese offspring of overfed dams. *Curr Nutr Food Sci*, 14: 1-15.
- [13]. Markovits A., Conjeros R., Lopez L. and Lutz M. (1992). Evaluation of marine microalga *Nannochloropsis* sp. As a potential dietary supplement. Chemical, nutritional and short term toxicological evaluation in rats. *Nutr Res*, 12: 1273-1284.
- [14]. Burstein M., Fine A., Atger V., Wirbel E. and Girard-Globa A. (1989). Rapid method for the isolation of two purified subfractions of high density lipoproteins by differential dextran sulfate-magnesium chloride precipitation. *Biochimie*, 71(6): 741-746.
- [15]. Bouanane S., Merzouk H., Benkalfat N.B., Soulimane N., Merzouk S.A. and Grest J. (2009). Time course of changes in serum oxidant/antioxidant status in overfed obese rats and their offspring. *Clin Sci*, 116: 669-680.
- [16]. Aebi H. (1974). Catalase. In *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd ed., pp. 673-684 [HU Bergmeyer, editor]. Weinheim: Verlag Chemie.
- [17]. Ellman G. (1995). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, 82: 70-77.
- [18]. Elstner E.F., Youngman R.J. and Obwad W. (1983). Superoxide dismutase. In *Methods of Enzymatic Analysis*, third ed., pp. 293-302 [HU Bergmeyer Verlag, editor]. Chemie, Weinheim.
- [19]. Ohkawa H., Ohishi N. and Yagi K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95: 351-358.
- [20]. Levine R.L., Garland D., Olivier C.N., Amica A., Climent I., Lenz A.G., Ahn B.W., Shantiel S. and Stadtman E.R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol*, 186: 464-478.
- [21]. Merzouk H., Madani S., Chabane D., Prost J., Bouchenak M. and Belleville J. (2000). Time course of changes in serum glucose, insulin, lipids and tissue lipase activities in macrosomic offspring of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Clin Sci*, 98: 21-30.
- [22]. Akbarzadeh A., Norouzi D., Mehrabi M.R., Jamshidi Sh., Farhangi A., Verdi A.A., Mofidian S.M. and Rad B.L. (2007). Induction of diabetes by streptozotocin in rats. *Indian J Clin Biochem*, 22(2): 60-64.
- [23]. Aboulthana W.M., El-Feky A.M., Ibrahim N.E., Sahu R.K. and El-Sayed A.B. (2018). Evaluation of the pancreatoprotective effect of *Nannochloropsis oculata* extract against streptozotocin-induced diabetes in rats. *J App Pharm Sci*, 8(6): 46-58.
- [24]. Sirsikar M., Supriya., Mohanty S. and Pinnelli V.B.K. (2016). Role of glycated hemoglobin (HbA1c) as a dual marker to predict glycemic status and dyslipidemia in type II diabetes mellitus. *Int J Res Med Sci*, 4(10): 4524-4529.
- [25]. Rajasekaran S., Sivagnanam K. and Subramanian S. (2005). Antioxidant effect of Aloe vera gel extract in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Pharmacol Rep*, 57(1): 90-96.
- [26]. Jangir R.N. and Jain G.C. (2017). Evaluation of antidiabetic activity of hydroalcoholic extract of *Cassia fistula* Linn. Pod in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacogn J*, 9(5): 599-606.
- [27]. Gandhi G.R. and Sasikumar P. (2012). Antidiabetic effect of *Merremia emarginata* Burm. F. in streptozotocin induced diabetic rats. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2(4): 281-286.
- [28]. Shankarprasad D.S., Gundalli S., Mahantesh B., Kashinakunti S.V. and Sunitha P. (2015). Lipid profile in diabetes mellitus. *Indian J Pathol Oncol*, 2(4): 290-294.
- [29]. Karan S.K., Mondal A., Mishra S.K., Pal D. and Rout K.K. (2013). Antidiabetic effect of *Streblus asper* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharm Biol*, 51(3): 369-375.
- [30]. Akah P.A., Alemji J.A., Salawu O.A., Okoye T.C. and Offiah N.V. (2009). Effects of *Vernonia amygdalina* on biochemical and hematological parameters in diabetic rats. *Asian J. Med. Sci*, 1(3): 108-113.
- [31]. Kebir N.E., Aichouni A. and Zahzeh T. (2017). Raw camel milk properties on alloxan-induced diabetic wistar rats. *Rom J Diabetes Nutr Metab Dis*, 24(1): 41-47.



- [32]. **Werman M.J., Sukenik A. and Mokady S. (2003).** Effects of the marine unicellular alga *Nannochloropsis* sp. to reduce the plasma and liver cholesterol levels in male rats fed on diets with cholesterol. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 67(10): 2266-2268.
- [33]. **Bensalah M., Bouanane S., Baba Ahmed F.Z., Merzouk H., Merzouk S.A. and Michel N. (2016).** Effect of cafeteria diet on lipid metabolism and lipase activities in Wistar rats. *Eur. Chem. Bull*, 5(3): 99-103.
- [34]. **Tavangar K., Murata Y., Pedersen M.E., Goers J.F., Hoffman A.R. and Kraemer F.B. (1992).** Regulation of lipoprotein lipase in the diabetic rat. *J Clin Invest*, 90(5): 1672-1678.
- [35]. **Ranganathan G., Li C. and Kern P.A. (2000).** The translational regulation of lipoprotein lipase in diabetic rats involves the 3'-untranslated region of the lipoprotein lipase mRNA. *J Biol Chem*, 275(52): 40986-40991.
- [36]. **Sztalryd C. and Kraemer F.B. (1995).** Regulation of hormone-sensitive lipase in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metabolism*, 44(11): 1391-1396.
- [37]. **Abirami S., Murugesan S., Sivamurugan V. and Sivaswamy S.N. (2017).** Screening and optimization of culture conditions of *Nannochloropsis gaditana* for omega 3 fatty acid production. *J App Biol Biotech*, 5(3): 13-17.
- [38]. **Sellamuthu P.S., Arulselvan P., Kamalraj S., Fakurazi S. and Kandasamy M. (2013).** Protective nature of mangiferin on oxidative stress and antioxidant status in tissues of streptozotocin-induced diabetic rats. *ISRN Pharmacol*, 1-10.
- [39]. **Zuluaga M., Gueguen V., Pavon-Djavid G. and Letourneur D. (2017).** Carotenoids from microalgae to block oxidative stress. *Bioimpacts*, 7(1): 1-3.

## EVALUATION OF POLYMORPHISM OF ICAM-1 GENE IN A POPULATION ON RUSSIAN FEDERATION TERRITORY

MOKRANE Ahlem<sup>1,2\*</sup>, PERENKOV Aleksei Dmitrievitch<sup>1</sup>, NOVIKOV Dmitry Viktorpivitch<sup>1</sup>, FOMINA Svetlana Grigorivna<sup>1</sup>, NOVIKOV Viktor Vladimirovitch<sup>1</sup>

1. Département de Biologie Moléculaire et Immunologie. Institut de Recherche en Biologie Moléculaire et en Ecologie Régionale. Université d'État Lobatchevski de Nijni Novgorod - Université Nationale de Recherche (UNN). Russie.

2. Département de Biologie et de Physiologie Cellulaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Saad Dahleb Blida-1, B.P. 270, route de Soumaa, Blida, Algérie.

Reçu le 05/06/2019, Révisé le 02/08/2019, Accepté le 15/09/2019

### Abstract

**Description of the subject:** Cancer is one of the leading causes of death in the world. Currently, colorectal cancer can be described as a basis for a global problem. It is believed that genetic polymorphism is related to the risk of colorectal cancer development. The intercellular adhesion molecule-1 is shown in several types of cells, such as endothelial cells and leukocytes, and plays an important role in several physiological processes. In addition, this molecule is also expressed in various cancer cells, in particular melanoma, colorectal cancer and lymphoma.

**Objective:** The purpose of this study was to investigate the relationship between the level of ICAM-1 gene expression and genetic polymorphism (rs5498 A/G) in patients with colorectal cancer.

**Methods:** A total of 115 peripheral blood samples of young adults from Nizhny Novgorod were examined. The ICAM-1 mRNA expression was analyzed by real-time PCR. The genotypic distribution of the rs5498 E469K(A/G) gene polymorphism was carried out using a specific polymerase chain reaction allele.

**Results:** The results showed a significant difference between control and colorectal cancer patients for the GG genotype ( $p=0.002$ ; OR=1.35) and for the G allele ( $p=0.005$ ; OR=2.20). The present study shows the relationship between SNP rs5498 (A/G) and colorectal cancer with AG genotype ( $p=0.002$ ; OR=3.55).

**Conclusion:** Our results revealed that polymorphism of rs5498 (E469K) ICAM-1 may be associated with the risk of colorectal cancer.

**Keywords:** Colorectal cancer; adhesion molecule; cancer cells; polymorphism; genotyping.

## ÉVALUATION DU POLYMORPHISME DU GÈNE ICAM-1 DANS UNE POPULATION SUR LE TERRITOIRE DE LA FÉDÉRATION DE RUSSIE

### Résumé

**Description du sujet :** Le cancer est l'une des principales causes de décès dans le monde. Actuellement, le cancer colorectal peut être décrit comme la base d'un problème mondial. On croit que le polymorphisme génétique est lié au risque de développement du cancer colorectal. La molécule d'adhésion intercellulaire-1 est présente dans plusieurs types de cellules, telles que les cellules endothéliales et les leucocytes, et joue un rôle important dans plusieurs processus physiologiques. De plus, cette molécule est également exprimée dans diverses cellules cancéreuses, notamment le mélanome, le cancer colorectal et le lymphome.

**Objectifs :** Le but de cette étude était d'étudier la relation entre le niveau d'expression des gènes d'ICAM-1 et le polymorphisme génétique (rs5498 A/G) chez les patients atteints de cancer colorectal.

**Méthodes :** Un total de 115 échantillons de sang périphérique de jeunes adultes de Nijni Novgorod ont été examinés. L'expression de l'ARNm d'ICAM-1 a été analysée par PCR en temps réel. La distribution génotypique du polymorphisme du gène rs5498 E469K (A / G) a été réalisée en utilisant un allèle de réaction en chaîne de la polymérase spécifique.

**Résultats :** Les résultats ont montré une différence significative entre les contrôles et les patients atteints d'un cancer colorectal pour le génotype GG ( $p=0,002$ ; OR = 1,35) et pour l'allèle G ( $p=0,005$ ; OR=2,20). La présente étude montre la relation entre le SNP rs5498 (A / G) et le cancer colorectal avec un génotype AG ( $p=0,002$ ; OR=3,55).

**Conclusion :** Nos résultats ont révélé que le polymorphisme d'ICAM-1 rs5498 (E469K) peut être associé au risque de cancer colorectal.

**Mots clés:** Cancer colorectal; molécule d'adhésion; cellules cancéreuses; polymorphisme, génotypage.

\* Auteur correspondant: MOKRANE Ahlem, E-mail: dr.mokrane30@gmail.com

## INTRODUCTION

According to the World Health Organization (WHO), colorectal cancer (CRC) is one of the most-diagnosed types of cancer and is the second leading cause of cancer-related death in 2018. Colorectal cancer is the most common form of cancer in the world [1]. Infection is a key factor affecting the development and progression of this disease [2]. In the large intestine, endothelial cells, macrophages and epithelial cells can express the cell adhesion molecule 1 (ICAM-1). Expression of ICAM-1 is associated with the degree and nature of the inflammation. Recent studies showed an increased susceptibility of cancer cells to the expression of ICAM-1. Several mediators can influence the metastatic progression, among these factors the adhesion molecules that are expressed on the cancer cells and the cells of the target organ playing a crucial role. The adhesion molecules generate the initial cell contacts and result in extravasation of the cancer cells and colonization of the organs [3].

The molecule ICAM-1 may be involved in immune surveillance and protection of the first line on the surface of epithelial cells and macrophages in patients with colon cancer. Expression of the ICAM-1 molecule and/or other leukocyte adhesion receptors by neoplastic epithelial cells can promote the direction of leukocyte infiltration and the interaction between leukocytes and epithelial cells in the tumor site of the large intestine [4]. ICAM-1, known as CD54, is a transmembrane glycoprotein, which is generally expressed on immune system cells and endothelial cells [5].

ICAM-1 is a transmembrane glycoprotein belonging to the CAMs superfamily, consisting of five extracellular Ig-like domains, a transmembrane domain and a short cytoplasmic tail [3]. The gene encoding ICAM-1 is located on the short arm of chromosome 19. The expression of ICAM-1 plays an important role in a number of oncological diseases. The level of expression of ICAM-1 is increased in breast, stomach and colorectal cancer [6-8]. A number of studies have revealed that there is a correlation between the expression of ICAM-1 and colorectal cancer [9-11], and the effect of ICAM-1 depends on the protein, if expressed in soluble or membrane form [9].

The purpose of this study was to investigate the relationship between the level of ICAM-1 gene expression and genetic polymorphism (rs5498 A/G) in patients with colon cancer.

## MATERIEL AND METHODES

### 1. Cases and controls

59 samples of peripheral blood from healthy donors and 56 samples of peripheral blood from patients with colon cancer were analyzed. These samples were obtained from the hospital "Nizhny Novgorod Regional Clinical Oncology Center" and were analyzed at the Center for Molecular Biology and Biomedicine of Nizhny Novgorod State University. N.I. Lobachevsky.

### 2. Genotypic analysis

Genomic DNA was isolated from peripheral blood using phenol-chloroform extraction, SNP rs5498 (A/G) was genotyped using allele specific polymerase chain reaction (PCR). To analyze the variants of the ICAM-1 allele, we used the following oligonucleotides F (5'-CTCACTGTGTGCCTATTCCA-3') with RA (5'-AGCACATTCACGGTCACCTT-3') and F with RG (5'-AGCACATTCACGGTCACCTC-3') to detect allele A and G, respectively. Amplification parameters: 5 min at 94°C and 45 cycles (30 sec at 94°C, 45 sec at 65°C and 60 sec at 72°C) and 2 min at 72°C. The results were analyzed by agarose gel electrophoresis.

### 3. Real-time PCR

Synthesis of cDNA was performed using reverse transcription, followed by real-time PCR in a Bio-Rad CFX96 Touch device. When simultaneous detection of the mRNA of the ICAM-1 gene and the mRNA of the UBC gene using the following oligonucleotides: F (GAGCTTCGTGTCCTGTATGG), R (CTCATACCGGGGGGAGAGCA), Z (ROX-CCCATTGCCCGAGCTCAAGTGTCTAAA GGA- BHQ-2) and UBC- F (GCACAGCTAGTTCCGTCGCA), UBC- R (TGCATTGTCAAGTGACGAT), UBC- Z (CY5- ATTTGGGTTCGCAGTTCTTGTGTTTGTGGAT- BHQ-2). Amplification parameters: 94°C - 10 min, 49 cycles (94°C for 30 sec, 60°C for 30 sec and 72°C for 30 sec). Simultaneous detection of the relative levels of the mRNA of the ICAM-1 molecule with UBC is present in the polymerase chain reaction in real time.

#### 4. Statistical analysis

We used Hardy-Weinberg to test the genotypes using the  $\chi^2$  distribution test for the difference in the expected frequencies and the observed ones. All tests with  $p < 0.05$  were considered statistically significant. Comparison of the ICAM-1 mRNA level was performed using the Graph Pad Prism 5 computer program.

The correspondence of the distribution of quantitative characteristics to the normal law was evaluated using the Kolmogorov-Smirnov test with the Lilliefors amendment. To compare the two independent groups by

quantitative characteristics, a two-sided U-Mann-Whitney test. Differences were considered statistically significant at a level of  $p < 0.05$ .

### RESULTS

#### 1. Comparison of ICAM-1 gene expression in donors and colorectal cancer patients

In the blood of patients with colorectal cancer ( $n=56$ ), the ICAM-1 mRNA level was determined (Fig. 1).

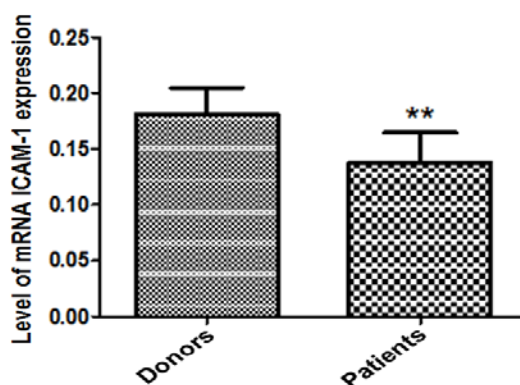


Figure 1 : Level of mRNA expression of the ICAM-1 gene in healthy donors and in patients with colorectal cancer

The level of mRNA ICAM-1 in patients with colorectal cancer showed a significant difference ( $p < 0.05$ ). There is a decrease in ICAM-1 gene expression in the peripheral blood of colorectal cancer patients. It appears that the expression of adhesion molecules ICAM-1 can interact with cells that control immunity (Fig. 1).

#### 2. Comparison of genotypes 5498 A/G ICAM-1 of peripheral blood in healthy donors and colon cancer patients

ICAM-1 polymorphisms are given in Table 1, with two cases of patients with colon cancer, and means of control in accordance with the Hardy-Weinberg equilibrium. The genotypic distribution of ICAM-1 in patients with colon cancer was significantly different and controls ( $p < 0.05$ ), among patients with colon cancer, the distribution of allelic variants of SNP rs 5498 were distributed as follows: AA in 13 patients (23.2%), GA in 38 patients (67.9%)

and GG in 5 patients (8.9%). The distribution of genotypes differs significantly from that of healthy donors: AA in 33 healthy donors (55.9%), GA in 22 healthy donors (37.3%) and GG in 4 healthy donors (6.8%).

G allele was significantly associated with the risk of colon cancer (OR = 2.20,  $\chi^2 = 7.79$ , 95% C.I. = [1.26-3.85],  $p = 0.005$ ). Frequency of heterozygous GA in cases of patients was more, than in the control group (67.9% vs. 37.3%,  $\chi^2 = 13.00$ ,  $p = 0.002$ ). Individuals with the GA genotype had a 3.55-fold increase in the risk of the disease compared with the AA genotypes. Expression of ICAM-1 gene was higher in patients with colon cancer ( $p = 0.002$ ) compared to healthy donors. In addition, there was a significant association under the dominant model GG + GA (OR = 4.20,  $\chi^2 = 12.81$ , 95% C.I. = [1.88-9.40],  $p = 0.0003$ ) (Table 1).

Tableau 1: Allele and genotype frequencies SNP rs5498 E469K (A/G) of the ICAM-1 gene in healthy donors and patients with colon cancer

Alleles, genotypes	Control group (n=59)	Patients with colorectal cancer (n=56)	$\chi^2$ ; P	OR (95% C.I.)
A : G	0.746 : 0.254	0.571 : 0.429	7.79 ; 0.005	0.45 (0.26–0.79) : 2.20 (1.26 – 3.85)
AA	33 (55.9%)	13 (23.2%)		0.24 (0.11 – 0.53)
AG	22 (37.3%)	38 (67.9%)	13.00; 0.002	3.55 (1.64 – 7.67)
GG	4 (6.8%)	5 (8.9%)		1.35 (0.34 – 5.30)
AG+GG	0.441	0.768	12.81; 0.0003	4.20 (1.88 – 9.40)

Notes: n is the number of samples,  $\chi^2$  is the chi-square value, d.f. - number of degrees of freedom, P is the confidence value, OR (odds ratio) is the odds ratio, 95% C.I. (Confidence Interval) - 95% confidence interval.

## DISCUSSION

Progression of tumors can be determined by two fundamental factors. Internal cellular changes can cause cellular de-differentiation and aggressive proliferation, or changes in the extracellular microenvironment can promote or prevent tumor growth. It was suggested that the expression of ICAM-1 on the surface of cancer cells could play the role of a suppressor in the progression of the tumor in the host's immune surveillance system [10]. It turns out that the expression of adhesion molecules ICAM-1 can interact with cells that control immunity. Our results (Fig. 1) are consistent with the studies of Tanaka and Yashiro which showed that a decrease in ICAM expression leads to metastasis to the lymph nodes [12 ; 13].

In a study of the ICAM-1 gene in Nizhny Novgorod hospitals, it was found that genetic polymorphisms of ICAM-1 are associated with colon cancer. Our results suggest that the G allele and genotype AG of ICAM-1 are overexpressed in colon cancer cells. Regulation of ICAM-1 is also observed in several types of cancer associated with the progression of the disease [14]. Genetic changes can be considered as prognostic markers for colon cancer disease, they can be used in studies of the ICAM-1 molecule and its role in the development of tumors [15]. The frequencies of alleles of SNP rs5498 A/G vary between ethnic groups of people living in different territories. The lowest frequency of the A (K) allele is recorded among the indigenous population of Africa [16]. American and European populations occupy intermediate value [17], and the highest frequency was found in Asia [18].

There is also a connection between this genotype and the syndrome of differentiation in acute myeloid leukemia [19] and with the degree of differentiation of tumor cells in colorectal cancer [20 ; 21]. However, these associations are often characteristic of individual ethnic groups [22], which determine the need for research of each population separately.

Analysis of frequencies of alleles and genotypes SNP rs5498 A/G revealed associations with certain diseases. Among the people suffering inflammatory diseases (multiple sclerosis, Crohn's disease) [23] or those with myocardial infarction, the frequency of the GG (EE) genotype is higher than in healthy people living in the same territory [24]. An increase in the frequency of genotype AA (KK) is recorded among patients with colorectal cancer [25] and carcinoma of the stomach [26].

During inflammatory processes, the soluble form of ICAM-1 (sICAM-1) is widely distributed in several cells that are activated by cytokines, and then produce a large number of ICAM-1 membranes [27]. Several recent studies have shown that sICAM-1 is considered a biomarker of cancer that has been associated with diagnosis, clinical stage and metastasis [28-32]. ICAM-1 is expressed on the surface of many malignant cells [33-36] and present in soluble form and circulates in plasma of cancer patients at high levels [31 ; 37].

The level of mRNA in the blood of patients with colon cancer with heterozygote AA and AG was higher than in patients with homozygous GG. It was found that the level of mRNA of the ICAM-1 molecule in patients with GG homozygote tended to decrease in comparison with patients having the AG and AA genotype, which is related to the peculiarities of the neoplastic process and the reaction of the organism to the tumor. Metastases in lymph nodes are a common type of metastasis in patients with colorectal cancer

The SNP in the ICAM-1 gene associated with the risk of developing breast cancer, colorectal cancer, and melanoma was detected [38]. Serum sICAM-1 positively correlated with tumor size, metastases, including pancreatic cancer, lung cancer, breast cancer and stomach cancer [39-41]. Our results suggest that ICAM-1 expression is closely related to metastases and can be a useful predictor of predictors in patients with colorectal cancer.

ICAM-1 polymorphism of K469E can induce functional deterioration of the gene product. This genetic product facilitates the mechanism of inflammation and immune response. A set of cytokines produced by inflammation and an immune response participate in the formation of an oncogenic microenvironment playing a decisive role in initiating carcinogenesis of the stomach, which stimulates angiogenesis, damaging DNA and proliferation of epithelial cells and subsequent malignant transformation [42].

## CONCLUSION

Our results show that there is no relationship between the polymorphism of ICAM-1 K469E and the susceptibility to cancer. It is observed that the genotype is not linked to the level of ICAM-1 expression. In oncology, the role of ICAM-1 is under intensive research reduces the level of expression of the ICAM-1 molecule in patients with colorectal cancer. The ICAM-1 expression is associated with metastases and can be a useful indicator for predicting colorectal cancer. In this regard, the level of expression and polymorphism of ICAM-1 in patients with colon cancer can provide detailed information on the regulation of this molecule, allowing doctors to provide a new diagnostic marker.

## REFERENCES

- [1]. **Saunders M. & Iveson T. (2006).** Management of advanced colorectal cancer: state of the art. *Br J Cancer*. 95: 131-138.
- [2]. **Parkin D.M., Bray F., Ferlay J. & Pisani P. (2005).** Global cancer statistics 2002. *CA Cancer J Clin*. 55: 74-108.
- [3]. **Benedicto A., Romayor I. & Arteta B. (2017).** Role of liver ICAM-1 in metastasis. *Oncol Lett*. 14: 3883-3892.
- [4]. **Long E.O. (2011).** Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1): Getting a Grip on Leukocyte Adhesion. *J Immunol*. 186, 1-3.
- [5]. **Huang W.C., Chan S.T., Yang T.L., Tzeng C.C. & Chen C. C. (2004).** Inhibition of ICAM-1 gene expression, monocyte adhesion and cancer cell invasion by targeting IKK complex: molecular and functional study of novel  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -butyrolactone derivatives. *Carcinogenesis*. 25, 1925-1934.
- [6]. **Ogawa Y., Hirakawa K., Nakata B., Fujihara T., Sawada T., Kato Y., Yoshikawa K & Sowa M. (1998).** Expression of intercellular adhesion molecule-1 in invasive breast cancer reflects low growth potential, negative lymph node involvement, and good prognosis. *Clin Cancer Res*. 4: 31-36.
- [7]. **Fujihara T., Yashiro M., Inoue T., Sawada T., Kato Y., Ohira M., Nishiguchi Y., Ishikawa T., Sowa M & Chung KH. (1999).** Decrease in ICAM-1 expression on gastric cancer cells is correlated with lymph node metastasis. *Gastric Cancer*. 2, 221-225.
- [8]. **Tachimori A., Yamada N., Satake Y., Yashiro M., Maeda K., Ohira M., Nishino H & Hirakawa K. (2005).** Up regulation of ICAM-1 gene expression inhibits tumor growth and liver metastasis in colorectal carcinoma. *Eur J Cancer*. 41:1802-1810.
- [9]. **Alexiou D., Karayiannakis A.J., Syrigos K.N., Zbar A., Kremmyda A., Bramis I & Tsigris C. (2001).** Serum levels of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in colorectal cancer patients: correlations with clinicopathological features, patient survival and tumour surgery. *Eur J Cancer*. 37: 2392-2397.

- [10]. Maeda K., Kang S.M., Sawada T., Nishiguchi Y., Yashiro M., Ogawa Y., Ohira M., Ishikawa T., Hirakawa-YS & Chung K. (2002). Expression of intercellular adhesion molecule-1 and prognosis in colorectal cancer. *Oncol Rep.* 9: 511-514.
- [11]. Taglia L., Matusiak D., Matkowskyj K.A & Benya R.V. (2007). Gastrin-releasing peptide mediates its morphogenic properties in human colon cancer by upregulating intracellular adhesion protein-1 (ICAM-1) via focal adhesion kinase. *Am J Physiol Gastro intest Liver Physiol.* 292:182-190.
- [12]. Tanaka H., Yashiro M., Sunami T., Ohira M., Hirakawa-Y S & Chung K. (2002). Lipid-mediated gene transfection of intercellular adhesion molecule-1 suppresses the peritoneal metastasis of gastric carcinoma. *Int J Mol Med.*10: 613-617.
- [13]. Yashiro M., Sunami T & Hirakawa K. (2005). CD54 expression is predictive for lymphatic spread in human gastric carcinoma. *Dig Dis Sci.* 50: 2224-2230.
- [14]. Roland C.L., Harken A.H., Sarr M.G & Barnett C.C. (2007). ICAM-1 expression determines malignant potential of cancer. *Surgery.*141: 705-707.
- [15]. Novikov V.V., Kalugin A.V., Novikov D.V., Fomina S.G & Karaulov A.V. (2016). Genetic Instability in Locus rs5498 E469K (A/G) of ICAM-1 Gene in Patients with Colorectal Cancer and Breast Cancer Bulletin of Experimental Biology and Medicine. *Oncology.* 160: 813.
- [16]. Amodu O.K., Gbadegesin R.A., Ralph S.A., Adeyemo A.A., Brenchley P.E, Ayoola O.O., Orimadegun A.E., Akinsola A.K., Olumese P.E & Omotade O.O. (2005). Plasmodium falciparum malaria in southwest Nigerian children. Is the polymorphism of ICAM-1 and E-selectin genes contributing to the clinical severity of malaria? *Acta Trop.* 95: 248-255.
- [17]. Gbadegesin R.A., Watson C.J., Cotton S.A., Brenchley P.E.C & Webb N.J.A. (2002). PCR-REFLP typing method for adhesion molecule gene polymorphisms and allele frequencies in a normal UK population. *Eur. J Immunogenet.* 29: 109-111.
- [18]. Qing-lei W., Bing-hui L., Bin L., Ya-bin L., Yue-Ping L., Sui-Bing M., Yi H., Jin-Kun W & Mei H. (2009). Polymorphisms of the ICAM-1 exon 6 (E469K) are associated with differentiation of colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 28: 139.
- [19]. Dore A.I., Santana-Lemos B.A.A., Coser V.M., Santos L.S., Dalmazzo L.F., Ana Lima S.G., Jacomo R.H., Elias J.Jr., Falca R.P., Pereira W.V & Rego E.M. (2007). The association of ICAM-1 Exon 6 (E469K) but not of ICAM-1 Exon 4 (G241R) and PECAM-1 Exon 3 (L125V) polymorphism with the development of differentiation syndrome in acute promyelocytic leukemia. *Journal of Leukocyte Biology.* 82: 1340-1343.
- [20]. Cheng D & Liang B. (2015). Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) Polymorphisms and Cancer Risk: A Meta-Analysis. *Iran J Public Health.* 44: 615-624.
- [21]. Wang Q., Li B.H., Liu B., Liu Y.B., Liu Y.P., Miao S.B., Han Y., Wen J.K & Han M. (2009). Polymorphisms of the ICAM-1 exon 6 (E469K) are associated with differentiation of colorectal cancer. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research.* 28: 139-144.
- [22]. Ozen S.C., Dagli U., Kiliç M.Y., Törüner M., Celik Y., Ozkan M., Soykan I., Cetinkaya H., Ulker A., Ozden A & Bozdayi A.M. (2006). NOD2/CARD15, NOD1/CARD4, and ICAM-1 gene polymorphisms in Turkish patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* 41: 304-310.
- [23]. Killestein J., Schrijver H.M., Crusius J.B., Pérez C., Uitdehaag B.M., Peña A.S & Polman C.H. (2000). Intracellular adhesion molecule -1 polymorphism and genetic susceptibility to multiple sclerosis; additional data and meta-analysis. *Ann Neurol.* 47: 277-279.
- [24]. Jiang H., Klein R.M., Niederacher D., Du M., Marx R., Horlitz M., Boerrigter G., Lapp H., Scheffold T., Krakau I & Gülker H. (2002). C/T polymorphism of the intercellular adhesion molecule -1 gene (exon 6, codon 469). A risk factor for coronary heart disease and myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 84: 171-177.
- [25]. Theodoropoulos G., Papaconstantinou I., Felekouras E., Nikiteas N., Karakitsos P., Panoussopoulos D., Lazaris A.C., Patsouris E., Bramis J & Gazouli M. (2006). Relation between common polymorphism in genes related to inflammatory response and colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 12: 5037-5043.
- [26]. Tian M.M., Sun Y., Li W.Z., Wu Y., Zhao A.L & Li J.Y. (2012). Polymorphisms of ICAM-1 are associated with gastric cancer risk and prognosis. *World J Gastroenterol.* 18: 368-374.

- [27]. **Gho Y.S., Kim P.N., Li H.C., Elkin M & Kleinman H.K., 2001.** Stimulation of tumor growth by human soluble intercellular adhesion molecule-1. *Cancer Res.* 61: 4253-4257.
- [28]. **Dymicka P.V., Guzinska U.K., Kuklinski A & Kemonia H. (2012).** Prognostic significance of adhesion molecules (sICAM-1, sVCAM-1) and VEGF in colorectal cancer patients. *Thromb Res.* 129: 47-50.
- [29]. **Gogali A., Charalabopoulos K., Zampira I., Konstantinidis A.K., Tachmazoglou F., Daskalopoulos G., Constantopoulos S.H & Dalavanga Y. (2010).** Soluble adhesion molecules E-cadherin, intercellular adhesion molecule-1, and E-selectin as lung cancer biomarkers. *Chest.* 138: 1173-1179.
- [30]. **Toiyama Y., Miki C., Inoue Y., Okugawa Y., Koike Y., Yokoe T., Tanaka K & Kusunoki M. (2008).** Soluble intercellular adhesion molecule-1 as a prognostic marker for stage II colorectal cancer patients. *Ann Surg Oncol.* 15:1617-1624.
- [31]. **Basoglu M., Atamanalp S.S., Yildirgan M.I., Aydinli B., Ozturk G., Akcay F & Oren D. (2007).** Correlation between the serum values of soluble intercellular adhesion molecule-1 and total sialic acid levels in patients with breast cancer. *Eur Surg Res.* 39: 136-140.
- [32]. **Aboughalia A.H. (2006).** Elevation of hyaluronidase-1 and soluble intercellular adhesion molecule-1 helps select bladder cancer patients at risk of invasion. *Arch Med Res.* 37: 109-116.
- [33]. **Choi Y.L., Xuan Y.H., Shin Y.K., Chae S.W., Kook M.C., Sung R.H., Youn S.J., Choi J.W & Kim S.H., (2004).** An immunohistochemical study of the expression of adhesion molecules in gallbladder lesions. *J Histochem Cytochem.* 52: 591-601.
- [34]. **Hemmerlein B., Scherbening J., Kugler A & Radzun H.J. (2000).** Expression of VCAM-1, ICAM-1, E- and P-selectin and tumour-associated macrophages in renal cell carcinoma. *Histopathology.* 37: 78-83.
- [35]. **Lin Y.C., Shun C.T., Wu M.S & Chen C.C. (2006).** A novel anticancer effect of Thalidomide: Inhibition of intercellular adhesion molecule-1 mediated cell invasion and metastasis through suppression of nuclear factor-kB. *Clin Cancer Res.* 12: 7165-7173.
- [36]. **Tempia C.A.A., Horvath L.Z., Zimmermann A., Tihanyi T.T., Korc M., Friess H & Buchler M.W. (2002).** Adhesion molecules in human pancreatic cancer. *J Surg Oncol.* 79: 93-100.
- [37]. **Dowlati A., Gray R., Sandler A.B., Schiller J.H & Johnson D.H. (2008).** Cell adhesion molecules, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in patients with non-small cell lung cancer treated with chemotherapy with or without bevacizumab—an Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Clin Cancer Res.* 14: 1407-1412.
- [38]. **Kammerer S., Roth R.B., Reneland R., Marnellos G., Hoyal C.R., Markward N.J., Ebner F., Kiechle M., Schwarz-Boeger U & Griffiths L.R. (2004).** Large-scale association study identifies ICAM gene region as breast and prostate cancer susceptibility locus. *Cancer Res.* 64: 8906-8910.
- [39]. **Eggeman H., Stöblen F., Thill M., Korlach S., Schmid P., Lüftner D., Elling D., Taran F.A., Kümmel S & Landt S. (2011).** Influence of a dose-dense adjuvant chemotherapy on sVCAM-1/sICAM-1 serum levels in breast cancer patients with 1-3 positive lymph nodes. *Anticancer Res.* 31: 2617-2622.
- [40]. **Nakata B., Hori T., Sunami T., Ogawa Y., Yashiro M., Maeda K., Sawada T., Kato Y., Ishikawa T & Hirakawa K. (2000).** Clinical significance of serum soluble intercellular adhesion molecule 1 in gastric cancer. *Clin Cancer Res.* 6: 1175-1179.
- [41]. **Moriyama M., Matsumura H., Shioda J., Aoki H., Nakamura H., Arakawa Y., Nirei K., Yamagami H., Kaneko M., Tanaka N & Arakawa Y. (2006).** Measurement of human intercellular adhesion molecule 1 in the blood is useful for predicting the occurrence of hepatocellular carcinomas from chronic hepatitis C and liver cirrhosis. *Intervirology.* 49: 327-338.
- [42]. **Macarthur M., Hold G.L & El-Omar E.M. (2004).** Inflammation and Cancer II. Role of chronic inflammation and cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of gastrointestinal malignancy. *Am J Physiol Gastro intest Liver Physiol.* 286: G515-G520.



## ÉFFETS DU THIAMETHOXAME ET DE LA TEFLUTHRINE SUR LES BIOMARQUEURS PHYSIOLOGIQUES DE L'ESCARGOT TERRESTRE *HELIX ASPERSA*

AIT HAMLET Smina<sup>1\*</sup>, DJEKOUN Mohamed<sup>1,2</sup>, BENSOLTANE Samira<sup>1,3</sup> et BERREBBAH Houria<sup>1</sup>

1. Université Badji Mokhtar Annaba, Faculté des Sciences, Département de Biochimie, B.P.12, 23000, Annaba, Algérie

2. Université du 08 Mai 1945 Guelma, Faculté des Sciences et de l'Univers, Département de Biologie, Guelma, Algérie

3. Université Badji Mokhtar Annaba, Faculté de Médecine, 23000, Annaba, Algérie

Reçu le 06/10/2019, Révisé le 25/12/2019, Accepté le 29/12/2019

### Résumé

**Description du sujet :** Cette étude montre une inhibition de la croissance pondérale chez les juvéniles de l'escargot terrestre *Helix aspersa* exposés à la laitue contaminée par deux insecticides, le thiaméthoxame et la téfluthrine, appartenant à deux classes chimiques différentes. Cette approche est susceptible d'être utilisée dans la bio-indication, et notamment celle de la pollution des sols pour une éventuelle évaluation des risques qu'ils pourraient engendrer aux écosystèmes terrestres.

**Objectifs :** Evaluation par une approche expérimentale de l'effet de deux insecticides, un néonicotinoïde et un pyréthrianoïde utilisés à large spectre dans la région Nord-Est algérienne sur la croissance pondérale des juvéniles.

**Méthodes :** Des escargots juvéniles ont été exposés par voie orale à des feuilles de laitue fraîche imbibées d'insecticides pendant 8 semaines. Les effets des deux molécules, ayant des modes d'action différents ont été comparés. La viabilité, la mortalité et la croissance sont notées d'une façon hebdomadaire.

**Résultats :** La progression avec le temps de la toxicité des deux insecticides sur les paramètres cinétiques n'est pas similaire.

**Conclusion :** Les résultats de cet essai suggèrent que les juvéniles de *Helix aspersa* peuvent être utilisés comme bio-indicateurs pour tester et comparer l'effet des insecticides appartenant aux familles chimiques des néonicotinoïdes et des pyréthrianoïdes.

**Mots clés :** *Helix aspersa*; escargots juvéniles; insecticides; thiaméthoxame; téfluthrine; croissance.

## EFFECTS OF THE THIAMETHOXAME AND THE TEFLUTHRINE ON THE PHYSIOLOGICAL BIOMARKERS OF THE LAND SNAIL *HELIX ASPERSA*

### Abstract

**Description of the subject:** This study shows an inhibition of the ponderal growth in juveniles of the land snail *Helix aspersa* exposed to lettuce contaminated by two insecticides the thiamethoxame and the tefluthrin, belonging to two different chemical classes. This approach is likely to be used in the bio-indication, and in particular that of the soil pollution for a possible evaluation of the risks which they could generate to terrestrial ecosystems.

**Objective :** Evaluadon by an experimental approach of the effect of two insecticides, widely used in the north-eastern region of Algeria, the first one is a neonicotinoid and the second is a pyrethroid on the ponderal growth of juveniles.

**Methods :** The juvenile snails were exposed orally to fresh lettuce leaves soaked in insecticides for 8 weeks. The effects of the two molecules with different modes of action were compared. Viability, mortality and growth are noted weekly.

**Results :** The progression of the toxicity of the insecticides on the kinetic parameters is not similar.

**Conclusion :** The results of this test suggest that the juveniles of the land snail *Helix aspersa* can be used as bioindicators to test and compare the effects of insecticides belonging to the chemical families of neonicotinoids and pyrethroids.

**Key words:** *Helix aspersa*; juvenile snails; insecticides; thiamethoxame; tefluthrin; growth.

\* Auteur correspondant: AIT HAMLET Smina, E-mail: smina1981@hotmail.fr

## INTRODUCTION

Les insecticides constituent un moyen de lutte, le plus efficace contre les parasites majeurs des plantes cultivées et leur utilisation dans l'agriculture est incontournable. Cependant, la majorité de ces produits sont toxiques et difficilement biodégradables. Leur utilisation excessive peut entraîner des risques et quelques fois des conséquences néfastes pour toutes les composantes de l'environnement.

Après le traitement de la partie aérienne des plantes, une part des produits atteint le sol, où vivent des microorganismes, des champignons, des insectes et des invertébrés terrestres. Parmi ces invertébrés, l'escargot *Helix aspersa*, herbivore et détritivore, joue un rôle majeur dans de nombreux écosystèmes [1]. Il est la proie de nombreux prédateurs, tels que les oiseaux, les mammifères ou les invertébrés et peut donc être à l'origine de transferts de contaminants dans la chaîne trophique [2]. C'est pourquoi ce gastéropode terrestre est de plus en plus utilisé pour évaluer l'impact de contaminations sur diverses fonctions physiologiques et comportementales [3,12].

En Algérie, l'usage des pesticides, des engrais, des fertilisants et autres produits phytosanitaires est excessif, avec souvent le non-respect des doses recommandées et les durées d'utilisation par ignorance de l'agriculteur. Cependant, ces substances chimiques ne sont pas anodines. Elles ont des conséquences environnementales directes et un impact sanitaire sur le long terme lié aux infiltrations de ces molécules non dégradables dans les sols, dans les nappes, puis vers les écosystèmes: les végétaux, les animaux et nécessairement l'homme [13].

Dans ce contexte, nous avons estimé par une étude expérimentale l'effet de deux insecticides utilisés à large spectre dans la région Nord-Est algérienne sur la croissance pondérale, la viabilité et la mortalité des juvéniles de l'escargot *Helix aspersa* potentiellement exposé à ces deux produits.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Animaux

Les escargots utilisés sont les juvéniles de *Helix aspersa aspersa* (syn. *Cantareus aspersus* ou *Cornu aspersum* O.F. Müller, 1774), dont les individus sont âgés de 4 semaines, d'une masse fraîche moyenne de  $0,511 \pm 0,1$  g et un diamètre de coquille moyen de  $10,69 \pm 1$  mm.

Les juvéniles utilisés proviennent d'une même ponte réalisée dans notre laboratoire. Les escargots reproducteurs ayant produit la ponte utilisée pour cette étude, proviennent d'une collecte réalisée dans la forêt de Lefjoudj (Wilaya de Guelma) non contaminée par les pesticides. Ensuite, ils sont maintenus en élevage aux conditions de laboratoire pendant une année. Les juvéniles sont élevés sous des conditions décrites par Gomot [14], température  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , photopériode 18hL/6hO, hygrométrie 80 à 90%. Cependant, ils sont nourris exclusivement de feuilles de laitue fraîche.

### 2. Insecticides

Le premier insecticide utilisé est un néonicotinoïde, le thiaméthoxame utilisé sous forme de préparation commerciale (25 g de thiaméthoxame dans 100 g d'insecticide). Il est utilisé dans la région Nord-Est algérienne contre les insectes piqueurs et suceurs des céréales, des arbres fruitiers et des cultures maraîchères. Il est utilisé en culture à des doses allant de 800 à 4000 mg/L d'insecticide (formulation commerciale), correspondant à 200 à 1000 mg/L de thiaméthoxame (matière active).

Le deuxième insecticide testé est un pyréthrianoïde, la téfluthrine utilisée également sous forme de préparation commerciale (1,5 g de téfluthrine dans 100 g d'insecticide). Il est couramment utilisé contre les insectes du sol qui s'attaquent aux cultures maraîchères, à la pomme de terre, aux arbres fruitiers, à la vigne et aux céréales. Il est utilisé en cultures à des doses allant de 12 à 50 kg/ha d'insecticide (formulation commerciale), correspondant à 18 à 75 mg/m<sup>2</sup> de téfluthrine (matière active). Toutes les solutions d'insecticides sont préparées avec l'eau distillée, et sont renouvelées chaque semaine.

### 3. Schéma expérimental

75 escargots juvéniles sont répartis en 5 groupes de 15 animaux chacun (3 réplicats par groupe). Chaque réplicat est constitué de 5 escargots maintenus dans une boîte de polystyrène perforée de dimensions 25 × 13,5 × 16,5 cm. Une éponge imbibée d'eau assure l'humidité élevée. Les 5 groupes de juvéniles sont nourris de laitue fraîche (escargots témoins), ou de laitue imbibée (durant 30 s) de solutions d'insecticides inférieures à celles utilisées en agriculture et n'induisant pas l'estivation chez les escargots (Tableau 1).

La nourriture est fournie trois à quatre fois par semaine, de même que le nettoyage des boîtes. Pour déterminer l'effet des deux insecticides,

l'expérience est menée durant 8 semaines sous les conditions de laboratoire citées auparavant.

Tableau 1. Dilutions utilisées pour chaque insecticide et pH correspondant.

Groupe		pH
Groupe T	Escargots témoins non traités	5,80
Groupe Th1	Escargots traités avec 25 mg/L de thiaméthoxame	6,52
Groupe Th2	Escargots traités avec 50 mg/L de thiaméthoxam	6,12
Groupe Te1	Escargots traités avec 5 mg/L de tefluthrine	6,61
Groupe Te2	Escargots traités avec 10 mg/L de tefluthrine	6,69

#### 4. Estimation de la croissance et de la mortalité

La croissance pondérale est évaluée chaque semaine en pesant les escargots à presque  $\pm 0,1$  g avec une balance modèle OHAUS® ANALYTICAL Plus, et en mesurant

le diamètre coquillière à presque  $\pm 1$  mm avec un pied à coulisse précision 0,02 cm. Le pourcentage d'inhibition du poids moyen ( $P_{pi}$ ) [10] est calculé pour comparer le poids moyen des groupes traités avec celui du groupe témoin,

$$P_{pi} \text{ du groupe } G_X = \frac{(m_{Tn} - m_{T0}) - (m_{Gn} - m_{G0})}{(m_{Tn} - m_{T0})} \times 100$$

Où le groupe  $G_X$  représente les groupes d'escargots  $G_{Th1}$ ,  $G_{Th2}$ ,  $G_{Te1}$  et  $G_{Te2}$ ;  $m_{Tn}$  est la masse des escargots du groupe témoin à l'instant  $t = n$  semaines;  $m_{T0}$  est la masse des escargots du groupe témoin au début de l'expérience;  $m_{Gn}$  est la masse des escargots du

groupe  $G_X$  à l'instant  $t = n$  semaines;  $m_{G0}$  est la masse des escargots du groupe  $G_X$  au début de l'expérience. Le pourcentage d'inhibition du diamètre moyen ( $P_{di}$ ) [10] est calculé pour comparer le diamètre des groupes traités avec celui du groupe témoin,

$$P_{di} \text{ du groupe } G_X = \frac{(d_{Tn} - d_{T0}) - (d_{Gn} - d_{G0})}{(d_{Tn} - d_{T0})} \times 100$$

Où  $d_{Tn}$  est le diamètre coquillière des escargots du groupe témoin à l'instant  $t = n$  semaines;  $d_{T0}$  est le diamètre des escargots du groupe témoin au début de l'expérience;  $d_{Gn}$  est le diamètre des escargots du groupe  $G_X$  à l'instant  $t = n$  semaines;  $d_{G0}$  est le diamètre des escargots du groupe  $G_X$  au début de l'expérience.

Le nombre de juvéniles dans chaque groupe est compté chaque semaine pour estimer le pourcentage de mortalité après 8 semaines de traitement. La quantité de laitue consommée par les escargots n'a pas été mesurée parce que la laitue imbibée d'insecticides perdait rapidement de sa fraîcheur par rapport à celle des escargots témoins, et donc, il était pratiquement impossible de la quantifier avec précision.

#### 5. Analyses statistiques

Pour chaque concentration d'insecticide, le poids moyen et le diamètre coquillière moyen sont exprimés en moyennes  $\pm$  déviation standard (SD) chaque semaine. A la fin de l'expérience, les résultats obtenus des traitements sont comparés avec ceux du témoin

en utilisant le test 't' de Student suivi par l'analyse de la variance (ANOVA) à deux critères de classification. Tous les calculs ont été effectués à l'aide du logiciel MINITAB d'analyse et de traitement des données version 13.31.

#### RÉSULTATS

Durant l'expérience, la mortalité était faible, avec seulement 8 individus sur 75 escargots juvéniles, ce qui représente 10,66%. La mortalité est survenue comme suit : 1 individu durant la cinquième semaine dans le groupe  $G_T$ , 1 individu durant la sixième semaine dans le groupe  $G_{Te2}$ , 4 individus durant la septième semaine : 2 individus dans le groupe  $G_{Th2}$  et 2 autres dans le groupe  $G_{Te1}$ , et enfin 2 individus durant la huitième semaine dans le groupe  $G_{Te2}$ .

Les juvéniles témoins ont multiplié leur masse moyenne par un facteur de 2,04. Les escargots des groupes  $G_{Th1}$ ,  $G_{Th2}$ ,  $G_{Te1}$  et  $G_{Te2}$  ont multiplié leur masse moyenne par un facteur 1,59, 1,32, 1,36 et 1,55 respectivement.

Les escargots des groupes  $G_T$ ,  $G_{Th1}$ ,  $G_{Th2}$ ,  $G_{Te1}$  et  $G_{Te2}$  ont multiplié leur diamètre coquillère moyen par un facteur 1,25, 1,14, 1,08, 1,08 et 1,10 respectivement.

A la fin de l'expérience, la masse moyenne des escargots traités diminue avec l'augmentation de la concentration de chacun des deux insecticides (Fig. 1). Cependant, cette diminution est très hautement significative ( $p < 0,001$ ) par rapport à la masse des témoins dans les groupes d'escargots  $G_{Th2}$ ,  $G_{Te1}$  et  $G_{Te2}$ . La concentration 25 mg/L de thiaméthoxame entraîne une diminution de la masse moyenne des juvéniles d'une façon hautement significative ( $p < 0,001$ ) comparée aux escargots témoins (Fig.1) à partir de la troisième semaine de traitement. Quant à la concentration 50 mg/L, la diminution de la masse moyenne est survenue dès la première semaine de traitement d'une façon hautement significative ( $p < 0,001$ ). A la fin de l'essai, la masse moyenne des escargots traités par le thiaméthoxame diminue avec l'augmentation de la concentration de l'insecticide comparée à celle des escargots du groupe témoin. Cette diminution est hautement significative ( $p < 0,001$ ) comparée à la masse moyenne des juvéniles du groupe témoin dès la première semaine de traitement.

La concentration 5 mg/L de téfluthrine entraîne une diminution de la masse moyenne d'une façon hautement significative ( $p < 0,001$ ) comparée aux escargots témoins (Fig. 1) à partir du début du traitement. Cependant, une augmentation de la masse moyenne des juvéniles après exposition à la concentration 10 mg/L de l'insecticide a été observée durant la troisième, la quatrième et la cinquième semaine de traitement. Ensuite, une diminution hautement significative ( $p < 0,001$ ) de la masse moyenne des escargots est observée à partir de la sixième semaine de traitement.

L'analyse de la variance à deux critères de classification (ANOVA), révèle un effet du traitement, de la durée de traitement et de l'interaction traitement-durée de traitement hautement significatif ( $p < 0,001$ ) pour les deux insecticides.

A la fin de l'expérience, le diamètre coquillère moyen des escargots traités diminue d'une façon hautement significative ( $p < 0,001$ ) par rapport aux escargots témoins (Fig. 2). Cette diminution était significative ( $p < 0,05$ ) dans les groupes  $G_{Th2}$  et  $G_{Te1}$  à partir de la sixième semaine de traitement. Cette diminution devient significative ( $p < 0,05$ ) pour le groupe  $G_{Th1}$  et très significative ( $p < 0,01$ ) pour le groupe  $G_{Te2}$  à partir de la septième semaine de traitement.

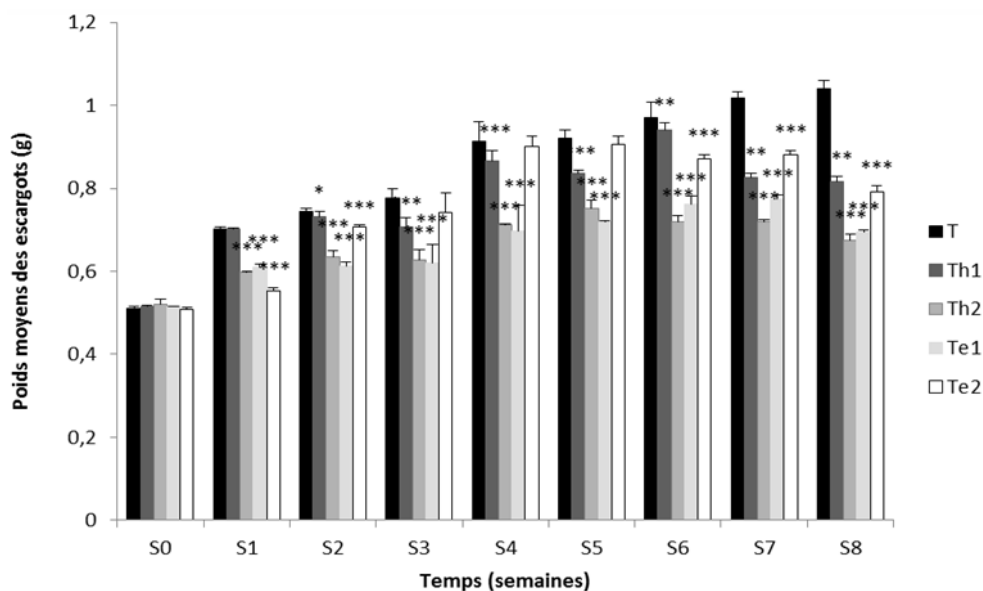


Figure 1 : Effets du thiaméthoxame et de la téfluthrine sur le poids moyen des juvéniles de l'escargot *Helix aspersa* (nourris de laitue imbibées de solution d'insecticide) pendant une période de huit semaines.

Moyennes  $\pm$  SD ; n = 8-15. Les astérisques symbolisent une différence significative dans les masses moyennes des escargots soumis aux différents traitements par rapport à celles des escargots témoins. Test 't' de Student : \* pour  $p < 0,05$ , \*\* pour  $p < 0,01$ , \*\*\* pour  $p < 0,001$ .

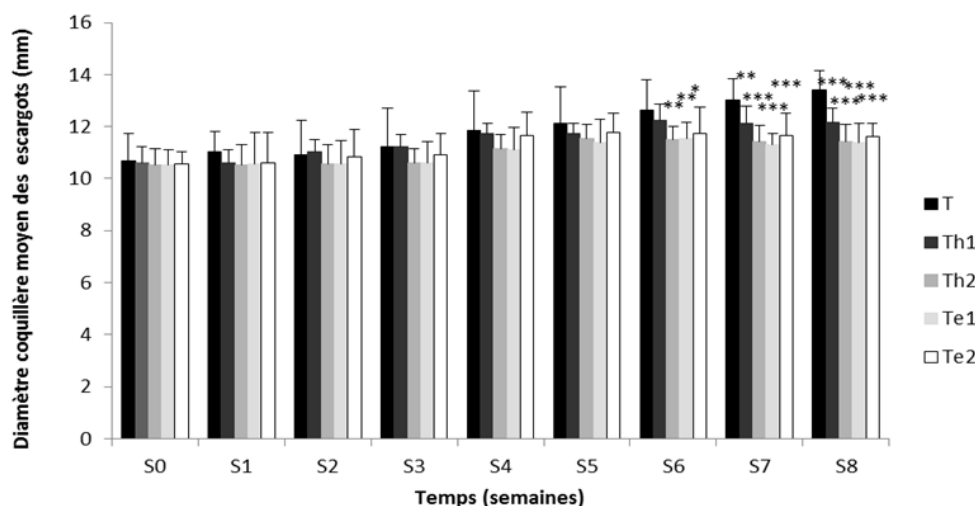


Figure 2 : Effets du thiaméthoxame et de la téfluthrine sur le diamètre moyen des coquilles des juvéniles de l'escargot *Helix aspersa* (nourris de laitue imbibées de solution d'insecticide) pendant une période de huit semaines.

Moyennes  $\pm$  SD ; n = 8-15. Les astérisques symbolisent une différence significative dans les masses moyennes des escargots soumis aux différents traitements par rapport à celles des escargots témoins. Test 't' de Student : \* pour  $p < 0,05$ , \*\* pour  $p < 0,01$ , \*\*\* pour  $p < 0,001$ .

Au bout de 4 semaines de traitement, le pourcentage d'inhibition de la masse moyenne des groupes  $G_{Th1}$ ,  $G_{Th2}$ ,  $G_{Te1}$  et  $G_{Te2}$  calculé (Tableau 2) est de 11,57, 50,06, 53,70 et 2,82 respectivement. Le pourcentage d'inhibition du diamètre coquillière moyen est de 1,30, 47,82, 50,00 et 2,17 respectivement. Après 8

semaines de traitement, le pourcentage d'inhibition de la masse moyenne des mêmes groupes est de 42,50, 69, 65,36 et 45,89 respectivement. Le pourcentage d'inhibition du diamètre coquillière moyen était de 42,61, 67,71, 68,26 et 60,88 respectivement

Tableau 2 : Effets des insecticides sur le poids et le diamètre coquillière moyens des juvéniles de *Helix aspersa*.

Concentration (mg/L)	Début de l'expérience		2 <sup>ème</sup> semaine		4 <sup>ème</sup> semaine		6 <sup>ème</sup> semaine		8 <sup>ème</sup> semaine	
	$P_m$ (mg) SD	$D_m$ (mm) SD	% I $P_m$	% I $D_m$	% I $P_m$	% I $D_m$	% I $P_m$	% I $D_m$	% I $P_m$	% I $D_m$
Témoins non traités	510,06 $\pm$ 100	10,69 $\pm$ 1	0	0	0	0	0	0	0	0
25 mg/L de Th	509,15 $\pm$ 100	10,75 $\pm$ 1	5,55	- 89,13	11,57	1,30	6,69	15,20	42,50	42,61
50 mg/L de Th	512,38 $\pm$ 100	10,84 $\pm$ 1	47,02	84,78	50,06	47,82	54,46	49,22	69,00	67,71
5 mg/L de Te	508,80 $\pm$ 100	10,76 $\pm$ 1	55,99	86,95	53,70	50,00	45,14	48,19	65,36	68,26
10 mg/L de Te	512,51 $\pm$ 100	10,80 $\pm$ 1	16,24	- 17,39	2,82	2,17	21,68	39,17	45,89	60,88

$P_m$  : poids moyen (mg)  $\pm$  SD,  $D_m$  : diamètre moyen (mm)  $\pm$  SD, % I  $P_m$  : pourcentage d'inhibition du  $P_m$ , % I  $D_m$  : pourcentage d'inhibition du  $D_m$ , Th : thiaméthoxame, Te : téfluthrine

## DISCUSSION

La mortalité des escargots observée dans cette étude (10,66%) est supérieure à celle remarquée dans l'expérience de plusieurs auteurs (5%) [15], (4,3 %) [16] et (3 à 7 %) [17].

Durant cette étude, l'humidité relative et la température n'étaient pas des facteurs limitant vis-à-vis de la croissance des escargots juvéniles. Cependant, plusieurs auteurs [14, 18] ont montré que les températures supérieures à 15°C stimulent la croissance avec un optimum de croissance à 23°C. Cependant, la qualité de la nourriture joue un rôle crucial [16, 17] dans la croissance des escargots.

Ainsi, dans cette expérience, les escargots témoins nourris avec les feuilles de laitue ont montré un facteur de croissance (2,04) supérieur à celui des escargots des travaux antérieurs [17], nourris également de laitue fraîche (1,26), et inférieur à celui des escargots nourris de farine (5,25), ou encore avec la combinaison farine et laitue (6,92), ou la combinaison farine et feuilles de trèfle (6,41), ou enfin, la combinaison farine plus laitue et feuilles de trèfle (6,91).

Les effets induits sur la croissance (poids et diamètre coquillière moyens) par les deux concentrations de thiaméthoxame augmentent d'une manière dose-dépendante en fonction du temps.

Cette progression de la toxicité de chacun des deux insecticides n'est cependant pas semblable. Une rapide récupération de la croissance (poids moyen) des juvéniles après la troisième semaine de traitement à la concentration 10 mg/L de téfluthrine est observée jusqu'à la cinquième semaine, et un freinage dès la sixième semaine jusqu'à la fin du traitement. Ceci suggère un effet réversible possible de la téfluthrine vis-à-vis de la croissance par rapport à celui du thiaméthoxame qui est irréversible. Ainsi, Bluzat et Seuge [19] ont fait les mêmes constatations avec le lindane. Ils ont rapporté que cet insecticide avait un caractère réversible vis-à-vis de la croissance et de la minéralisation coquillère.

Ces données reflètent le déclin de la croissance des escargots (masse et diamètre coquillère) sous l'effet de tous les traitements. La réduction significative de la croissance des juvéniles exposés au thiaméthoxame et à la téfluthrine peut s'expliquer par une réduction des réserves énergétiques, allouées à la croissance (contenus en lipide et en glucides) dans les cellules de stockage des tissus des escargots, cette réduction est probablement provoquée par la mobilisation de ces ressources pour l'initiation des processus de détoxification.

La réduction de la croissance pondérale notée dans les groupes d'escargots traités par le thiaméthoxame et la téfluthrine comparés aux escargots témoins est en parfait accord avec les résultats de certains auteurs [6, 20, 21]. En effet, ils ont rapporté que la réduction significative ( $p < 0,05$ ) du poids et du diamètre coquillère des escargots traités avec l'aminocarbe, le méthyl parathion et le paraquat est liée à la nature et à la concentration du pesticide administré. De plus, l'ensemble des résultats semble indiquer que la réduction de la croissance est liée au mode [8, 22] et à la durée d'exposition [6, 20, 23] à un pesticide testé. D'autre part, Bluzat et Seuge [19] ont montré chez le mollusque *Lymnea stagnalis* que le carbaryl et le lindane provoquent dans le cas d'une intoxication chronique, une diminution de la croissance des coquilles.

Aussi, les effets des pesticides diffèrent selon les espèces de gastéropodes traités. Ainsi, Genena et Mostafa [24] ont constaté une large différence de sensibilité aux pesticides entre deux genres d'escargots *Monacha cantiana* et *Eobania vermiculata*.

Judge [25] avait fait les mêmes constatations entre deux espèces de limaces du genre *Deroceras* traitées par les mêmes molluscicides.

D'un autre côté, la différence de croissance observée entre les deux insecticides pourrait être attribuée à la structure chimique de la matière active des insecticides [26, 27] et (ou) notamment de leurs adjuvants consécutifs. Cependant, les données toxicologiques sur les adjuvants sont rares, pour argumenter les effets possibles d'un pesticide (matière active et adjuvant) donné.

Cette différence de croissance peut être attribuée également à la différence de solubilité des molécules testées et des mixtures, leurs affinités vis-à-vis des différentes cibles biologiques ou à d'autres facteurs ignorés jusqu'à présent chez les gastéropodes.

En se basant sur le pourcentage d'inhibition du poids moyen (Tableau. 2) et au bout de 8 semaines de traitement, la toxicité des insecticides décroît dans l'ordre suivant : Th2 (69%) > Te1 (65,36%) > Te2 (45,89%) > Th1 (42,50%). D'autre part, en se basant sur le pourcentage d'inhibition du diamètre coquillère moyen, le classement était comme suit : Te1 (68,26%) > Th2 (67,71%) > Te2 (60,88%) > Th1 (42,61%).

## CONCLUSION

Les interrogations sur l'impact des pesticides sur l'environnement nécessitent le développement de méthodes adaptées pour l'analyse de leurs effets sur les invertébrés terrestres, notamment sur l'escargot *Helix aspersa aspersa*. La sensibilité du modèle au thiaméthoxame et à la téfluthrine montre bien leur effet, plus ou moins important sur les paramètres cinétiques étudiés : le poids et le diamètre coquillère. Il serait intéressant de détecter la présence des deux produits dans les tissus des escargots exposés en continu aux plus fortes concentrations dans la nourriture. Les résultats peuvent indiquer, par la suite, les effets des insecticides à des concentrations représentatives de l'environnement, cependant, la détection de résidus dans les tissus peut présenter un danger potentiel de transfert dans la chaîne alimentaire. Cette approche toxicodynamique globale, a montré une inhibition de croissance chez les juvéniles exposés à la laitue contaminée par deux insecticides, appartenant à deux classes de composés sur une espèce d'invertébré du sol,

*Helix aspersa aspersa*, susceptible d'être utilisée comme bioindicateur de pollution des sols, d'abord à d'autres insecticides actuellement utilisés et présents dans l'environnement, ensuite et par référence à ces résultats, à d'autres produits phytosanitaires plus récemment utilisés, pour une éventuelle évaluation des risques qu'ils pourraient engendrer aux écosystèmes terrestres.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. **Russell-Hunter W.D. (1983).** Overview: Planetary distribution and ecological constraints upon the Mollusca. In: *The Mollusca*. ed. WD Russell-Hunter. London, Academic Press, Vol. 6: Ecology, 1-27.
- [2]. **Laskowski R., Hopkin S.P. (1996b).** Accumulation of Zn, Cu, Pb and Cd in the garden snail (*Helix aspersa*) : implications for predators. *Environ. Pollut.*, 91(3), 289-297.
- [3]. **Beeby A., (1998).** Richmond L. Variation in the mineral composition of eggs of snail, *Helix aspersa* between populations exposed to different levels of metal contamination. *Environ. Pollut.*, 101(1), 25-31.
- [4]. **Radwan M.A., Salama A.K. (1999).** Thiocarb biotransformation to methyl, toxicities and acetylcholinesterase inhibition in the land snail, *Helix aspersa* (Muller). *J. Pest. Cont. Environ. Sci.*, 7 : 59-70.
- [5]. **Coeurdassier M., Gomot-De Vaufleury A., Badot, P.M. (2000).** Dose-dependent growth inhibition and bioaccumulation of hexavalent chromium in land snail *Helix aspersa aspersa*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19, 2571-2578.
- [6]. **Coeurdassier M., Saint-Denis M., Gomot-De Vaufleury A., Ribera D., Badot P.M. (2001).** The garden snail (*Helix aspersa*) as a bioindicator of organophosphorus exposure: effects of dimethoate on survival, growth, and acetylcholinesterase activity. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20 (9), 1951-1957.
- [7]. **Snyman R.G., Reinecke A.J., Reinecke, S.A. (2002).** Field application of a lysosomal assay as biomarker of copper oxychloride exposure, in the snail *Helix aspersa*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 69, 117-122.
- [8]. **Salama A.K., Osman K.A., Saber N.A., Soliman, S.A. (2005).** Oxidative stress induced by different pesticides in the land snail, *Helix aspersa*. *Pak. J. Biol. Sci.*, 8 : 92-96.
- [9]. **Snyman R.G., Reinecke A.J., Reinecke, S.A. (2005).** Quantitative changes in the digestive gland cells of the snail *Helix aspersa* after exposure to the fungicide copper oxychloride. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 60, 47-52.
- [10]. **ISO 15952 (2006).** Effects of pollutants on juvenile land snails (Helicidae), Determination of the effects on growth by soil contamination, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- [11]. **Regoli F., Gorbi S., Fattorini D. (2006).** Use of the land snail *Helix aspersa* as sentinel organism for monitoring ecotoxicologic effects of urban pollution: an integrated approach. *Environ. Health Perspect.*, 114, 63-69.
- [12]. **Ait Hamlet S., Djekoun M., Smati M., Semassel A., Djekoun Bensoltane S., Berrebbah H. (2014).** Histopathological effects of neonicotinoid insecticide in the hepatopancreas of terrestrial gastropod *Helix aspersa*. *Fresenius Environ. Bul.*, 23 (11) : 3041-3047.
- [13]. **Bouziati M. (2007).** L'usage immodéré des pesticides. De graves conséquences sanitaires. Le guide de médecine et de la santé. Santémaghreb. [www.santetropicale.com/santemag/algerie/poivue51.htm](http://www.santetropicale.com/santemag/algerie/poivue51.htm), 26/06/2007.
- [14]. **Gomot A. (1994).** Contribution à l'étude de la croissance d'escargots du genre *Helix* : influence de facteurs de l'environnement. Nutrition et composition biochimique. Contrôle neuroendocrine. Doctorat Sciences de la Vie, n°398, Université de Besançon, France.
- [15]. **Gomot A. (1997).** Dose-dependent effects of cadmium on the growth of snails in toxicity bioassays. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 33 : 209-216.
- [16]. **Scheifler R., Gomot-De Vaufleury A., Badot P.M. (2002).** Transfert of cadmium from plant leaves and vegetable flour to the snail *Helix aspersa* : Bioaccumulation and Effects. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2002, 53 : 148-153.
- [17]. **Viard B., Maul A., Pihan J.C. (2004).** Standard use conditions of terrestrial gastropods in active biomonitoring of soil contamination. *J. Environ. Monit.*, 6 : 103-107.
- [18]. **Jess S., Marks R.J. (1998).** Effect of temperature and photoperiod on growth and reproduction of *Helix aspersa* var. *maxima*. *J. Agricult. Sc.*, 130 : 367-372.

- [19]. **Bluzat R., Seuge J. (1979).** Etude de la toxicité chronique de deux insecticides (Carbaryl et Lindane) à la génération F1 de *Lymnea stagnalis* L. (Mollusque Gastéropode pulmoné). 1. Croissance des coquilles. *Hydrobiol.*, 65 (3) : 245-255.
- [20]. **Seuge J., Buzat R. (1980).** Toxicité à long terme d'un insecticide organophosphoré (Fenthion) chez le mollusque *Lymnea stagnalis* L. *Hydrobiol.*, 26 : 241-248.
- [21]. **Schuytema G.S., Nebeker A.V., Griffis W.L. (1994).** Effects of Dietary to Forest Pesticides on the Brown Garden Snail *Helix aspersa* Müller. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 26 : 23-28.
- [22]. **Radwan M.A., Essawy A.E., Abdelmeguid N.E., Hamed S.S., Ahmed, A.E. (2008).** Biochemical and histochemical on the digestive gland of *Eobania vermiculata* snails treated with carbamate pesticides. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 90 : 154-167.
- [23]. **Rorke M.A., Gardner D.R., Greenhalgh, R. (1974).** Lethality and behavioral symptoms produced by some organophosphorus compounds in the snail (*Helix aspersa*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 11 : 417-424.
- [24]. **Genena M.A.M., Mostafa F.A.M. (2008).** Molluscicidal activity of six pesticides against the two land snails, *Monacha cantiana* and *Eobania vermiculata* (Gastropoda : Helicidae) under laboratory conditions. *J. Agric. Sci. Mansoura Univ.* 33 (7) : 5307-5315.
- [25]. **Judge F.D. (1969).** Preliminary screening of candidate molluscicides. *J. Econ. Entomol.*, 62 : 1393-1397.
- [26]. **Oliveira-Filho E.C., Geraldino C.K., Paumgarten F.J. (2005).** Acute toxicity of endosulfan, nonylphenol ethoxylate, and ethanol to different life stages of the freshwater snail *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 52 : 104-112.
- [27]. **Druart C., Scheifler R., De Vaufleury A. (2010).** Towards the development of an embryotoxicity bioassay with terrestrial snails : Screening approach for cadmium and pesticides. *J. Haz. Mat.*, 184 : 26-33.



## ACETAMIPRIDE INDUCED HISTOPATHOLOGICAL ALTERATION IN LUNG AND LIVER OF MALE MICE

SAADI Leila<sup>1,2\*</sup>, BOUAZZA Marwa<sup>1</sup> and LEBAILI Nemcha<sup>2</sup>

1. University of Blida 1, Faculty of SNV, Department of Cellular Biology and Physiology, Laboratory of BMC, Algeria

2. Kouba Higher Normal School, Department of Natural Sciences, laboratory of Animal Ecobiology, Algeria

Reçu le 06/06/2019, Révisé le 17/06/2019, Accepté le 12/09/2019

### Abstract

**Description of the subject:** Oral toxicity of low doses of acetamiprid remains poorly explored at the tissue and molecular level.

**Objective :** Evaluation of the two low doses acetamiprid effects on lung and liver structure and on liver function.

**Methods :** Two batches of treated mice were fed daily with acetamiprid at rate of 1/20 LD50 and 1/10 LD50 respectively for 15 days. The witnesses were force-fed with distilled water.

**Results :** Liver enzymes assay showed non-significant changes in plasma concentration of AST and ALT. In addition, the histological examination showed haemorrhages, leukocyte infiltrates and thickening of the endothelial walls of capillaries and alveolar septa.

**Conclusion :** According to the results, we can conclude that even with low doses, acetamiprid is toxic at tissue level in male mice.

**Keywords:** Acetamiprid; Lung; Liver; Oral toxicity; Male mice.

## ALTÉRATIONS HISTOPATHOLOGIQUES INDUITES PAR L'ACÉTAMIPRIDE AU NIVEAU DU POUMON ET DU FOIE CHEZ LES SOURIS MÂLES

### Résumé

**Description du sujet :** La toxicité par voie orale de l'acétamipride à faibles doses reste mal explorée à l'échelle tissulaire et moléculaire.

**Objectifs :** Evaluation des effets à faibles doses de l'acétamipride sur la structure du poumon et du foie et sur la fonction hépatique.

**Méthodes :** Deux lots de souris traités ont été gavés quotidiennement avec l'acétamipride à raison de 1/20 DL50 et 1/10 DL50 respectivement pendant 15 jours. Les témoins ont été gavés avec de l'eau distillée.

**Résultats :** Les teneurs plasmatiques des enzymes hépatiques, ASAT et ALAT, restent stables. Cependant, l'examen des coupes histologiques a montré des hémorragies, d'infiltrat leucocytaire et l'épaississement des parois endothéliales des capillaires et des cloisons alvéolaires.

**Conclusion :** D'après les résultats obtenus, nous pouvons conclure que même à faible dose, l'acétamipride est toxique à l'échelle tissulaire chez les souris mâles.

**Mots clés:** Acétamipride, Poumons, Foie, Toxicité orale, Souris mâles.

\*Auteur correspondant: SAADI Leila, Email. Saadileila4@gmail.com,

## INTRODUCTION

Neonicotinoid are a group of insecticides that has quickly became one of the most insecticides used around the world [1]. They dominate the market with total global sale's part of 25% [2] and a turnover exceeding one billion dollars [3]. These insecticides act selectively on nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) [4][5]. The nAChRs activation results of intracellular  $Ca^{2+}$  increase while their over-activation generates a blockage causing a fatal paralysis [6][7]. Acetamiprid (ACE) is a first-generation neonicotinoid insecticide mainly used in fruit and vegetable farming [3] to control fungal infections of crops [8], and sucking insects [9][10]. Neonicotinoids can negatively affect non-target fauna by causing neurological dysfunctions in insects [11][12], affecting memory and learning ability in rats [13], inducing hepatotoxicity and pneumotoxicity in fish [14], decreasing haemoglobin level and leukocyte count [15] and unbalancing plasma concentration of liver enzymes in mice [16] and electrolytes in rats [17]. They can also affect reproductive activity by decreasing testosterone level and inducing abnormalities in mitochondria and endoplasmic reticulum of Leydig cells in mice [18] [19]. However, low dose toxicity's is poorly explored at tissue level. In this context, we are interested by searching the oral toxicity of ACE at rate of two low doses in adult male mice. The study targets biochemical parameters, changes in body weight and histopathological study of pulmonary and hepatic parenchyma. Results can help proving the toxic effects of ACE and guide research in order to understand the molecular effectors in toxicity at tissue level.

## MATERIAL AND METHODS

### 1. *Animals*

Our study was conducted on 17 male mice of the *Naval Medical Research Institute* strain (N.M.R.I.). Male mice were chosen to avoid the influence of hormonal changes that exist in females. Animals were allowed to acclimatize for a period of one week prior to experiment, at room temperature and an alternating photoperiod of 12 hours of darkness followed by 12 hours of light. The mice were housed in polyethylene cages, which were lined with litter made of woodchips. The cages were cleaned and the litter was changed every two days until the end of the experiment. All animals received water and food ad-libitum.

The food was composed of a balanced mixture of proteins, carbohydrates, lipids, vitamins and minerals.

### 2. *Chemical*

Acétamiprid, insecticide marketed by MOPISTOP, is presented in aluminium bag containing 50g of powder with 20% of purity. It was used as solutions prepared at a rate of 1/10 (19.8 mg/kg/d) and 1/20 (9.9 mg/kg/d) of the LD50. ACE suspension was administered by oral gavage with a volume of 10 ml/kg. The daily oral administration was continued for 15 days.

### 3. *Experimental design*

After adaptation to laboratory conditions, mice were marked and divided into three groups: the first group contained 6 control mice that were fed daily with distilled water at a rate of 10 ml / kg. The second group contained 5 mice treated daily by 1/20 of ACE LD50 dissolved in distilled water at a rate of 10ml / kg. The third group contained 6 mice treated daily by 1/10 of ACE LD50 dissolved in 10 ml / kg of distilled water. Period and doses were chosen to deepen previous studies [20]. Body weight gain was measured three times: before treatment, after one week and the day of sacrifices. The doses were adjusted weekly. At the end of the experiment on day 15<sup>th</sup>, sacrifices were made in the morning, by rapid decapitation and without anaesthesia. Plasma samples were collected in heparinized tubes for the estimation of some biochemical parameters. The organs: lungs and liver were rapidly removed, fixed and then intended for histologic study.

### 4. *Histopathology*

Histologic study was conducted by using standard method [21] in which, tissue samples were collected in 10% neutral buffered formalin. After dehydration and inclusion, the blocks were cut using a microtome to have a paraffin tape of 3µm of thickness. The cuts were stained with haematoxylin and eosin and Masson Trichrom staining.

### 5. *Plasma analysis*

Alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) plasma level were measured by using kit on automate. The unit for the measurement of lever enzymes was expressed as IU/L.

## 6. Statistical analysis

The results are presented as mean  $\pm$  standard deviation. The normality of samples distribution was verified by using a *Shapiro-Wilk* test via the Statistic Package for Social Science (S.P.S.S). Intra and intergroup comparisons were carried out by using a *student test* after applying a *Fischer test*. The differences were considered as statistically insignificant when  $p < 0.05$ .

## RÉSULTATS

### 1. Animals behaviour

Under our experimental conditions, we noticed that treated mice showed a decrease in activity with a tendency to stay in the corners of the cages and diarrhoea. also, we noticed that mice treated with 1/10 LD50 of ACE had a probable difficulty of breathing characterized by an acceleration or a slowing down of respiratory rhythm.

This became remarkable and make gavage difficult during the 2<sup>nd</sup> week.

### 2. Biochemical assay

According to results, the two groups of treated mice show a regression in plasma level of AST. In mice treated with 1/20 DL50, regression is of the order of 258.00 IU/L  $\pm$  4.24 vs. 338.33 IU/L  $\pm$  52.73 in controls ( $P = 0.13$ ). Mice treated with 1/10 LD50 have an average rate of 261.00 IU/L  $\pm$  50.91 ( $P = 0.20$ ). Compared to controls, mice treated with 1/20 LD50 show a sharp increase in plasma level of ALT (142.00  $\pm$  73.54 vs. 75.00  $\pm$  20.95) with  $P=0.21$ . However, mice treated with 1/10 LD 50 show a slight increase of 93.50  $\pm$  27.58 with  $P=0.45$ . All deference between control and treated mice are statistically insignificant (Tableau 1).

Tableau 1: Effect of acetamidrid on plasma level of liver enzymes after exposure.

Parameters	Treated groups		Control
	1/20 LD50	1/10 LD50	
AST (UI/L)	258.00 $\pm$ 4.24	261.00 $\pm$ 50.91	338.33 $\pm$ 52.73
ALT (UI/L)	142.00 $\pm$ 73.54	93.50 $\pm$ 27.58	75.00 $\pm$ 20.95

### 3. Weight change

Our results show an increase in body weight of control and treated mice. In control mice, the increase is of the order of 2.07% during the 1<sup>st</sup> week (24.17g  $\pm$  4.71 vs. 24.67g  $\pm$  4.32) with a  $P=0.85$  and 12.41% during the 2<sup>nd</sup> week (24.17g  $\pm$  4.71 vs. 27.17g  $\pm$  3.92) with a  $P=0.26$ . In mice treated with 1/20 LD50, the increase is of the order of 10.61% during the 1<sup>st</sup> week (26.40g  $\pm$  3.44 vs. 29.20g  $\pm$  3.70 with a  $P = 0.25$ ) and 15.15% during the 2<sup>nd</sup> week

(26.40g  $\pm$  3.44 vs. 30.40g  $\pm$  3.44 with a  $P = 0.10$ ). Mice treated with 1/10 LD50 show an increase in weight of the order of 1.32% during the first week (25.17g  $\pm$  4.88 vs. 2.88  $\pm$  25.50g with a  $P = 0.89$ ) and 10.60% during the 2<sup>nd</sup> week (25.17g  $\pm$  4.88 vs. 27.83g  $\pm$  4.62 with a  $P = 0.35$ ). Statistical analysis of weight differences during the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> weeks show a statistically insignificant changes ( $p < 0.05$ ) in all mice groups (Fig. 1).

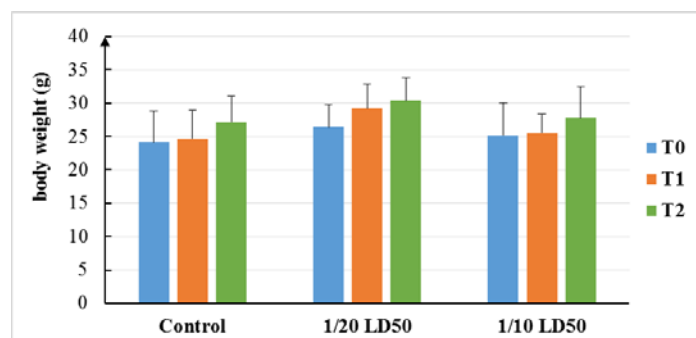


Figure 1 : Body weight evolution of control and mice treated with 1/10 and 1/20 LD50 of acetamidrid.

**4. Histopathology**

**4.1. Lung parenchyma**

Histological examination of lungs tissue sections in mice treated with 1/20 LD50 showed an haemorrhagic appearance with intra-alveolar congestions (fig. 2 part (c) and (d) and fig. 3 part (c)) and an invasion of the terminal and respiratory bronchial lumen by blood (fig. 2 part (c) and figure 3 part (c)). In addition, the intra-alveolar space contains red blood cells and cell debris probably caused by cell lyses (fig. 2 part (d)),

with thickness of the alveolar walls, causing a reduction of alveolar sacs and alveolus diameters (fig. 2 par (d) and fig. 3 part (d)). The results show a similar appearance in both mice treated. However, the alterations are more important in mice treated with the highest dose (fig. 2 part (e) and figure 3 part (e)). We notice more bleeding with very frequent congestions (fig. 2 part (e) and (f), fig. 3 part (e) and (f)) and thickness of blood vessels endothelial wall (fig. 3 part (f)).

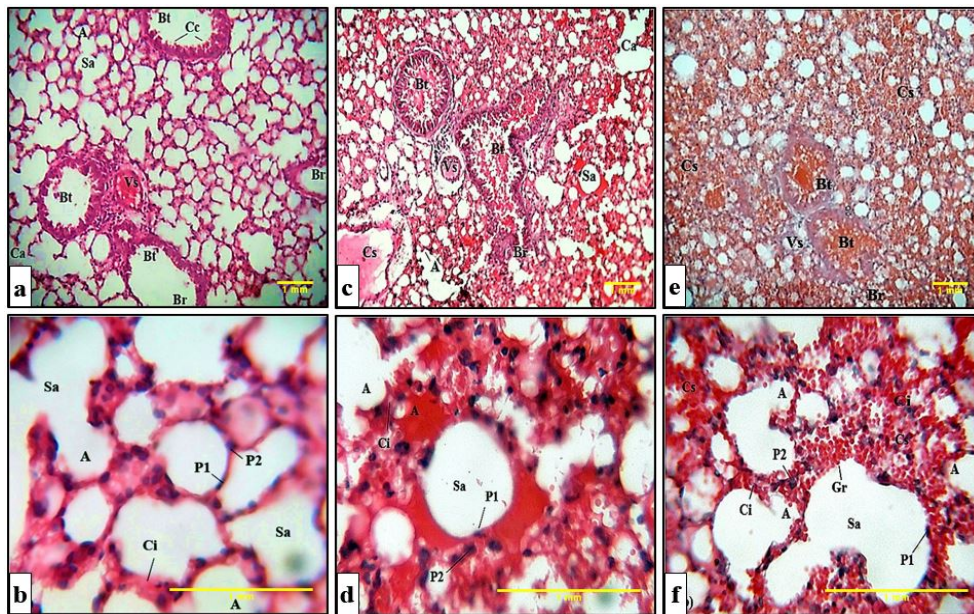


Figure 2 : Lung parenchyma structure in control (left), mice treated with 1/20 LD50 (middle) and mice treated with 1/10 LD50 of acetamiprid (right). H.E staining; magnification: x100 and x400  
 A : alveolus; Br : respiratory bronchiole; Bt : terminal bronchiole; C : blood capillary; Ca : alveolar duct; Cc : Clara cell; Ci : alveolar wall; Cs : blood congestion; Gr :red blood cells; NI : lymph node; P1 : pneumocyte type I ; P2 : pneumocyte type II ; Sa : alveolar sac; Vs : blood vessel.

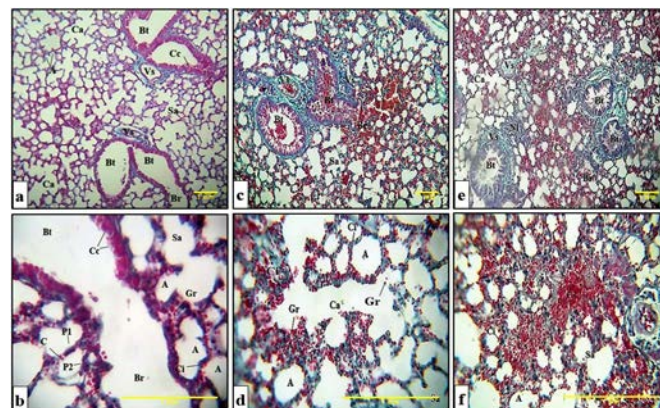


Figure 3 : Lung parenchyma structure in control (left), mice treated with 1/20 LD50 (middle) and mice treated with 1/10 LD50 of acetamiprid (right). Masson Trichrome staining; magnification: x100 and x400  
 A : alveolus; Br : respiratory bronchiole; Bt : terminal bronchiole; C : blood capillary; Ca : alveolar duct; Cc : Clara cell; Ci : alveolar wall; Cs : blood congestion; Gr :red blood cells; NI : lymph node; P1 : pneumocyte type I ; P2 : pneumocyte type II ; Sa : alveolar sac; Vs : blood vessel.

#### 4.2. Liver parenchyma

The observation of liver sections in treated mice shows structural alterations in liver parenchyma. The central veins present blood congestion (fig. 4 part (c) and (e)) and portal triads are dilated (fig. 4 part (e)).

An abundant presence of leukocytes (fig. 4 part (d) and (f)) with cases of margination, leukocytes infiltration (fig. 4 part (d)) and endothelial membrane thickening are shown (fig. 4 part (c) and (d)).

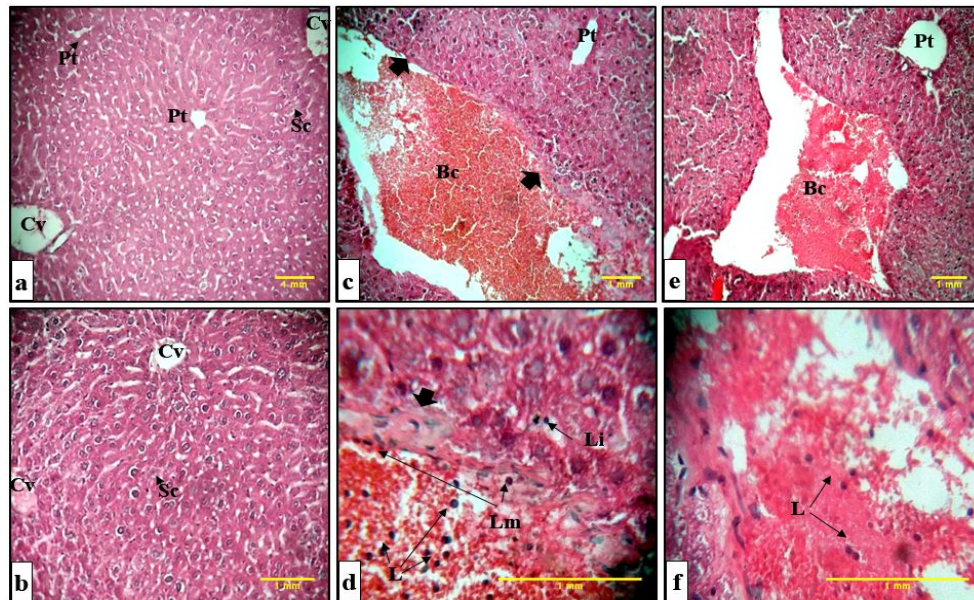


Figure 4: liver parenchyma structure in control (left), mice treated with 1/20 LD50 (middle) and mice treated with 1/10 LD50 of acetamiprid (right). H.E staining; magnification: x100, x100 with zoom and x400  
Bc : blood congestion; Cv : central vein; L : leukocytes; Li : leukocytes infiltration; Lm : leukocytes margination; Pt : portal triad; Sc : sinusoidal capillary.

#### DISCUSSION

In our study we investigate the short-term toxicity of ACE administered orally at rate of 1/20 LD50 (9.9 mg / kg / day) and 1/10 LD50 (18.9 mg / kg / day) in adult male mice of *N.M.R.I.* strain, several toxic effects were noted especially at structural level. The clinical signs like respiratory depression and diarrhoea were also observed by Mondal in female rats given orally acetamiprid [22].

All control and treated mice show a non-significant increase in body weight. These results corroborate with those found by Singh & *al.* who reported that male mice treated with ACE for 28 days showed an increase in body weight until the day 15<sup>th</sup> and then a decrease until the day 28<sup>th</sup> [20]. Zhang & *al.* found that the decrease in body weight was related to an increase in markers of oxidative stress, including activation of P38 mitogen-activated protein kinases, and decrease of the activity of antioxidant enzymes [18]. However, Jain & *al.* reported no effect on body weight in male Wistar rats treated with imidacloprid [23].

AST and ALT are liver enzymes, useful in measuring liver toxicity and particularly cell injury and necrosis [24]. Though enzymes are not known to have any function or role in the plasma, but their increase level in the blood indicate cellular damage and increased membrane permeability [25]. However, ALT is considered as more sensitive indicator of hepatocellular damage than AST [26]. Our results show a non-significant decrease in plasma AST concentration and also a non-significant increase in plasma ALT concentration in both treated groups. Our findings are correlated with findings of Zhang & *al.* which reported a significant increase in ALT plasma concentration of male mice in acetamiprid sub-acute toxicity [27], Wang & *al.* confirmed the significant increase of liver enzymes in a sub-acute exposure of male mice to ACE [28].

Structurally, microscopic observation of lung parenchyma in treated mice reveals frequent haemorrhages with intra-alveolar congestions,

cell lyses and thickening of alveolar and endothelial walls. Alteration degree seems to be dose dependent. The invasion of bronchial lumen and alveolar sacs by blood may probably explain the observed respiratory discomfort in mice treated with the highest dose. Similar results were reported in albino rats intoxicated with nitrosodiethylamine, in which severe congestion and moderate interstitial inflammation in lungs were observed [29]. Haemorrhages and thickened intra-alveolar septa with infiltration of mononuclear cells in lungs were reported after benzalkonium administration by Swiercz & *al.* [30]. According to Mondal & *al.*, the lung lesions may be the result of cyclic reduction oxidation of ACE, which were brought via circulation with subsequent release of superoxide radicals, leading to lipid peroxidation in the cell of the alveolar wall [31]. In our study, congestion was found in blood vessels, bronchi and bronchioles which were filled with red blood cells. Because of infiltration, the intra-alveolar walls were thickened. According to Rivolta & *al.*

The poisonous substances cause damage in vascular endothelium as well as to the alveolar epithelial cells. As a result of damage in vascular endothelium and increased vascular permeability excessive fluid and plasma proteins leaks out initially into the interstitium and subsequently into the alveoli [32].

In liver, structural alterations seem to be non-dose dependant. Optical microscopy shows the presence of congestion at the central veins and dilated portal triads. Similar results were reported in intoxication studies in which, an enlargement of sinusoids, degeneration of hepatic cords and hepatocytes and vacuole formation in hepatocyte in rat liver were observed [33]. According to Mondal & *al.* congestion and reduction in blood circulation may cause anoxia, which resulted in vacuolar degeneration in the hepatocytes. ACE could possibly be a hepatotoxin that alters mitochondrial and microsomal functions, increase free fatty acid synthesis, diminished triglyceride utilization and decrease fatty acid oxidation [31].

## CONCLUSION

According to the results, we can conclude that low-dose ACE causes toxicity at tissue level in male mice. These results remain preliminary. It would be interesting to deepen the research in other organs and molecular scale.

## REFERENCES

- [1]. **Thany S. H. (2010).** Neonicotinoid insecticides: historical evolution and resistance mechanisms. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **683**: 75-83.
- [2]. **Bass C., Denholm L., Williamson M. S., Nauen R. (2015).** The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **121**: 78-87.
- [3]. **Bodereau-Dubois B. (2011).** Récepteurs nicotiniques neuronaux d'insectes et insecticides : caractérisation de facteurs cellulaires impliqués dans la modulation de l'efficacité des néonicotinoïdes. Thèse de doctorat, école doctorale végétal, environnement, nutrition, agroalimentaire, mer- université Angers, **190p**.
- [4]. **Tomizawa M., Casida J. E. (2002).** Selective toxicity of néonicotinoïdes attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual Review of Entomology*, **48**: 339-364.
- [5]. **Jeschke P., Nauen R., Schindler M., Elbert A. (2011).** Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**: 2897-2908.
- [6]. **Testud F. (2014).** Insecticides néonicotinoïdes. EMC., Pathologie professionnelle et de l'environnement, **9** :1- 6.
- [7]. **Zoumenou B., Aïna M. P., Agbohessi P., Imorou Toko I., Scippo M. L. (2015).** Effets toxicologiques et méthodes d'analyse de la lambda-cyhalothrine et de l'acétamipride utilisés dans la protection phytosanitaire du cotonnier au Bénin. *Int. International Journal of Biological and Chemical Sciences*, **4**: 2184-2199.
- [8]. **Rasgele P. G., Oktay M., Kekecoglu M., Muranli F. D. G. (2015).** The histopathological investigation of liver in experimental animals after short-term exposures to pesticides. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, **21**: 446-453.
- [9]. **Ambrose, M. L. (2003).** Characterization of the insecticidal properties of acetamiprid under field and laboratory conditions. Thèse de doctorat, université de Carolina, **70p**.
- [10]. **Index des produits phytosanitaires à usage agricole (2015).** Ministère de l'agriculture, du développement rurale et de la pêche, **216p**.
- [11]. **Sandrock C., Tanadini M., Tanadini L.G., Fauser-Misslin A., Potts S.G., Neumann P. (2014).** Impact of chronic neonicotinoid exposure on honeybee colony performance and queen supersedure. *PLOS ONE*, **9**: 1-13.

- [12]. Pisa L. W., Amaral-Rogers V., Belzunces L. P., Bonmatin J. M., Downs C. A., Goulson D., Kreutzweiser D. P., Krupke C., Liess M., Mcfield M., Morrissey C. A., Noome D. A., Settele J., Simon-Delso N., Stark J. D., Van Der Sluijs J. P., Van Dyck H., Wiemers M. (2015). Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environmental Science and Pollution Research*, **22**: 68-102.
- [13]. Mandal P. S., Mondal S., Karnam S. S., Purohit K. (2015). A Behavioral study on learning and memory in adult sprague dawley rat in induced acetamiprid toxicity. *Exploratory Animal and Medical Research*, **15**: 27-32.
- [14]. Raj S. J., Joseph B. (2015). Impact of acetamiprid toxicity on biochemical biomarkers (protein and carbohydrate) in some tissues of the fish *Oreochromis mossambicus*. *International Journal of Zoological Research*, **11**: 222-227.
- [15]. Mondal S., Ghosh R. C., Mate M.S., Karmakar D. B. (2009). Effects of acetamiprid on immune system in female Wistar rats. *Proceedings of the Zoological Society*, **62**: 109-117.
- [16]. Keshta A. T., Hataba A. A., Mead H. M. I., El-Shafey N. M. (2016). Oxidative stress and biochemical changes induced by thiamethoxam and acetamiprid insecticides in rats. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **5**: 44-60.
- [17]. Mondal S., Ghosh R. C., Mukhopadhyaya S. K. (2011). Studies on the electrolytes and microelements in Wistar rat following multiple exposures to acetamiprid. *Toxicology and Industrial Health*, **28**: 422-427.
- [18]. Zhang J. J., Wang Y., Xiang H. Y., Li M. X., Li W. H., Ma K. G., Wang X. Z., Zhang J. H. (2011). Oxidative stress: role in acetamiprid-induced impairment of the male mice reproductive system. *Agricultural Sciences in China*, **10**: 786-796.
- [19]. Straub L., Villamar-Bouza L., Bruckner S., Chantawannaku P., Gauthier L., Khongphinitbunjong K., Retschnig G., Troxler A., Vidondo B., Neumann P., Williams G. R. (2016). Neonicotinoid insecticides can serve as inadvertent insect contraceptives. *Proceedings of the Royal Society B*, **283**: 1-8.
- [20]. Singh T. B., Mukhopadhyay S. K., Sar T. K., Ganguly S. (2012). Acetamiprid induces toxicity in mice under experimental conditions with prominent effect on the hematobiochemical parameters. *Journal of drug and metabolism toxicology*, **6**: 1-5.
- [21]. Martoja R., Martoja M. (1967). *Initiation aux techniques de l'histologie animale*. Ed., Masson, Paris, 345p.
- [22]. Mondal S. (2007). Studies on the toxicopathology of acetamiprid in rats. *Veterinary and Medicine Sciences*. Thesis submitted to College Of Veterinary Science and Animal Husbandry, Indira Gandhi Krishi Vishwavidyalaya, Durg, India.
- [23]. Jain N. C. (1993). *Essentials of Veterinary Haematology*. Lea and Febiger, Philadelphia 19-71.
- [24]. Cornelius, C. E. (1989). Liver function. In: Kaneko, J.J., editor. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic Press Inc., San Diego : 364-397.
- [25]. Sabina, E. P., Rasool, M., Vedi, M., Navaneethan, D., Ravichander, M., Parthasarthy, P. and Thella, S. R. (2013). Hepatoprotective and antioxidant potential of withania somnifera against paracetamol - induced liver damage in rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **5(2)**: 648-651.
- [26]. Oser, B. L. (1976). *Hawk's Physiological Chemistry*. McGraw-Hill Book Company, New York, London.
- [27]. Zhang J. J., Wang Y., Xiang H. Y., Li M. X., Li W. H., et al. (2010). Oxidative stress: Role in acetamiprid induced impairment of the male mice reproductive system. *Agricultural Sciences in China* **10**: 786-796.
- [28]. Wang Y., Zhang J. J., Xiang H. Y., Zhang H. J., Wang X. Z. (2012). Acetamiprid residues in male mice and its effects on liver function. *Journal of Animal and veterinary Advances*, **11**: 2706-2710.
- [29]. Kaushal, V., Sharma, S., Brar, A. P. S. and Soni, G. (2007). NDEA induced oxidative stress in albino rats-impact of dietary protein level. *Toxicology International*, **14(1)**: 33-39.
- [30]. Swiercz R., Halatek T., Stetkiewicz J., Wąsowicz W., Kur B., Grzelińska Z. and Majcherek W. (2013). Toxic effect in the lungs of rats after inhalation exposure to benzalkonium chloride. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, **26(4)**: 647-656.
- [31]. Mondal S., Ghosh R. C., Karnam S. S., Purohit K. (2014). Toxicopathological changes on Wistar rat after multiple exposures to acetamiprid. *Veterinary World*, **7**: 1058-1065.
- [32]. Rivolta, I., Lucchini, V., Rocchetti, M., Kolar, F. Palazzo, F., Zaza, A. and Misericocchi, G. (2011). Interstitial pressure and lung oedema in chronic hypoxia. *European Respiratory Society Journal*, **37(4)**: 943-949.
- [33]. Aravinthan, A., Verma, S., Coleman, N., Davies, S. Allison, M. and Alexander, G. (2012). Vacuolation in hepatocyte nuclei is a marker of senescence. *Journal of Clinical Pathology*, **65(6)**: 557-60.

## CHANGEMENT DES COMPOSANTS BIOCHIMIQUES DU SANG ET DU LAIT DURANT LA LACTATION CHEZ LA VACHE LAITIÈRE DANS LES ÉLEVAGES DE L'EST ALGÉRIEN

DEGHNOUCHE Kahramen<sup>1\*</sup>, BOUKHALFA Hassina Hafida<sup>1</sup>, TITAOUINE Mohamed<sup>1</sup> et GABA Marwa<sup>1</sup>

1. Laboratoire Diversité des écosystèmes et dynamiques des systèmes de production agricole en zones arides, Université Mohamed Khider de Biskra. Algérie.

*Reçu le 26/05/2019, Révisé le 16/06/2019, Accepté le 09/09/2019*

### Résumé

**Description du sujet :** Le stade de lactation chez les vaches laitières est un facteur responsable des changements des constituants du lait, qui sont synthétisés à partir de précurseurs sanguins.

**Objectif :** Cette étude a pour objectif d'évaluer l'adaptation métabolique des constituants biochimiques du lait et du sang pendant ce stade physiologique.

**Méthodes :** Un effectif de 125 vaches laitières hautes productrices de race prime 'Holstein, multipares, appartenant à douze fermes de la région de Tébessa dans l'Est algérien, a été utilisé. Des prélèvements sanguin et du lait à des intervalles de 21 jours ont été réalisés durant la période du début de la lactation jusqu'à la fin de ce stade. Des analyses biochimiques de quelques métabolites du sang et du lait ont été effectuées.

**Résultats :** Les résultats ont montré une glycémie normale mais plus faible en début de lactation par rapport à la fin de lactation, Hypotriglycéridémie plus marquée en début de lactation, un taux de cholestérol normal qui tend à diminuer vers la fin de la lactation. Les protéines du lait changent de sens de l'évolution vers l'augmentation du début à la fin de la lactation, et une teneur en lactose faible. L'étude des liens entre les composants du sang et ceux du lait a révélé des corrélations positives significatives entre les triglycérides et les matières grasses du lait, aussi entre la glycémie et le lactose du lait.

**Conclusion :** Les modifications des paramètres biochimiques du sang et du lait chez la vache laitière pendant la lactation peuvent être utilisées comme indicateurs biologiques de l'état nutritionnel.

**Mots clés :** Composants biochimiques, lait, sang, lactation, vaches laitières.

## BIOCHEMICAL COMPONENTS CHANGEMENT OF BLOOD AND MILK DURING LACTATION IN DAIRY COWS IN EASTERN REGION OF ALGERIA

### Abstract

**Description of subject:** The stage of lactation in dairy cows is a factor responsible for changes in milk constituents, which are synthesized from blood precursors.

**Objective:** The objective of this study is to assess adaptive changes in blood and milk biochemical constituents during this physiological stages

**Methods:** This study was conducted on 125 high-yielding dairy cows of premium Holstein breed, multiparous, at the beginning and the end of lactation belonging to 12 farms in the region of Tebessa in eastern Algeria. Blood and milk samples were taken at intervals of 21 days during the period from the beginning to the end of lactation. Biochemical analyzes of some blood metabolites and milk were performed.

**Results:** The results showed a normal glucose level which is lower at the beginning of lactation than at the end. Hypotriglyceridemia more marked at the beginning of lactation. Normal cholesterol level which tends to decrease towards the end of lactation. Milk proteins change in direction of evolution towards increase from beginning to end of lactation, and low lactose content. The study of the links between the components of the blood and those of the milk revealed that there is a significant positive correlation between the triglycerides and the milk fats, also between the glycemia and the lactose.

**Conclusion:** Changes in biochemical parameters of blood and milk in lactating cows can be used as biological indicators nutritional status.

**Key words:** Biochemical components, milk, blood, lactation, dairy cows.

\* DEGHNOUCHE Kahramen , Email : dkahramen@yahoo.com.ph



## INTRODUCTION

Le lait et les produits laitiers occupent une place prépondérante dans la ration alimentaire des Algériens. L'Algérie est parmi les grands pays importateurs de ces derniers, à l'échelle mondiale [1]. Par conséquent, le développement de l'élevage, a toujours constitué une priorité pour ce pays [2]. L'élevage bovin a toujours été et continue d'être la ressource préférentielle et principale du lait [3]. Cependant, les caractéristiques biochimiques et physicochimiques du lait de vache dépendent d'une variété de facteurs et qui influencent sur l'aptitude à la transformation fromagère, et donc sur la rentabilité des exploitations bovines et l'économie agricole. Ce travail consiste en une analyse de quelques paramètres biochimiques du sang et du lait. Dans le but de déterminer d'une part l'influence du stade de la lactation sur la composition du lait et du sang, et d'autre part d'étudier la corrélation entre la composition du lait et celle du sang en nutriments qui sont des précurseurs de la synthèse du lait. Pour en sortir avec des recommandations qui contribueraient à l'amélioration ou la correction de la composition du lait à partir de l'amélioration de l'alimentation des vaches.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 1. Les animaux

L'étude a porté sur un effectif composé de 125 vaches, cliniquement saines, de races importées : prim 'Holstein, multipares, d'âge compris entre 04 et 07 ans. Les pâturages constituent l'essentiel de l'alimentation complétés par le foin (2,5 à 3 kg/v/j). L'ensilage d'orge en vert et la luzerne sont distribués selon la disponibilité. Le concentré est distribué aux vaches taries ainsi que les vaches en lactation. Par ailleurs de la paille est distribuée pratiquement durant toute l'année. La ration est distribuée en deux repas par jour. Cependant sa composition est variable selon le stade physiologique, sauf pour l'aliment grossier qui est distribué pour toutes les vaches quel que soit leur stade physiologique. La traite est mécanique 2 fois/jour à un intervalle de 12 heures. L'abreuvement est collectif. La reproduction est effectuée essentiellement par saillie naturelle et parfois par insémination artificielle suite à l'observation des chaleurs.

## 2. Prélèvements

### 2.1. Prélèvements de sang

Les prélèvements sanguins ont été réalisés sur des vaches cliniquement saines en début de lactation (60 premiers jours) et en fin de lactation (60 derniers jours) par ponction de la veine jugulaire le matin avant la prise alimentaire. Le sang a été collecté dans des tubes sous vides. La centrifugation est à 3000tr/min, pendant 10 minutes, les plasmas collectés sont conservés à -20°C jusqu'à leurs analyses. Les paramètres biochimiques (Cholestérol, Triglycérides, et Glycémie) ont été analysés par automate RXL Max DIMANSION.

### 2.2. Prélèvements de lait

Les échantillons de lait ont été prélevés aseptiquement selon les recommandations de Mialot [4]. Le lait a été recueilli individuellement en même temps que les prélèvements sanguins. La quantité de chaque échantillon individuel est de 0,5 à 1l. Une fois les récoltes de lait effectuées, celles-ci sont transportées immédiatement dans des conditions isothermes vers le laboratoire d'analyses spécialisé dans le contrôle laitier.

Les dosages biochimiques ont porté sur les teneurs en matières grasses, en protéines et en lactose qui ont été déterminés par l'analyseur LactoStar de type GERBER, automate d'analyse du lait.

### 3. Analyses statistiques des données

La saisie et l'analyse statistique des données ont été réalisées en utilisant l'analyse de variance des écarts entre les moyennes à l'aide du logiciel (IBM SPSS Statistiques 20) en utilisant le test t (test student), les comparaisons entre les groupes et les différences ont été considérées comme significatives lorsque  $P < 0.05$ .

## RÉSULTATS

Les tableaux ci-dessous, regroupent les valeurs moyennes et les corrélations des métabolites sanguins et du lait ainsi que quelques données bibliographiques rapportées par différents auteurs pour ces paramètres, nous avons procédé à la comparaison des valeurs moyennes d'un même paramètre dans les deux stades physiologiques (début et fin de lactation).

### 1. Variations de la glycémie, de la triglycéridémie et de la cholestérolémie.

Les résultats obtenus montrent que les valeurs moyennes de la glycémie et de la triglycéridémie chez les vaches en fin de lactation sont supérieures à celles obtenues en début de lactation. Par ailleurs l'étude statistique a révélé une variation significative de ces deux paramètres entre les deux stades physiologique ( $p < 0.05$ )

.Toutefois une évolution inverse a été notée pour les concentrations sanguines en cholestérol mais elle est non significative (Tableau 1).

Tableau 1 : variations de la glycémie, de la triglycéridémie, et de la cholestérolémie en fonction du stade de lactation. (il faut mettre des virgules la place des points)

Métabolites sanguins	Stade de lactation		Valeurs usuelles
	Début lactation	Fin lactation	
Glycémie (g/l)	0,43± 0,04 <sup>a</sup>	0,57± 0,08 <sup>b</sup>	0,30- 0,54 [5] 0,56-0,73 [6]
Triglycéride (g/l)	0,05 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,11± 0,09 <sup>b</sup>	0,15-0,45 [7] 0,15-0,45 [8]
Cholestérol (g/l)	0,76 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,60± 0,12 <sup>a</sup>	0,5-1,5 [7] 0,77-1,70 [9]

<sup>a, b</sup> Les moyennes sur une même ligne suivies de lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ).

### 2. Variations du lactose, des protéines, et de la matière grasse du lait de vaches en début et en fin de lactation.

Relativement aux teneurs du lait en lactose et en protéines nous observons que les valeurs moyennes de ces derniers augmentent en fin de lactation contrairement aux taux de la matière grasse qui tendent à la diminution pendant cette phase. L'étude statistique a révélé un effet significatif du stade de lactation sur les variations du lactose et des matières grasses du lait (Tableau 2).

Tableau 2 : valeurs moyennes du lactose, des protéines, et de la matière grasse du lait des vaches en début et en fin de lactation

Métabolites du lait	Stade de lactation		Valeurs usuelles
	Début lactation	Fin lactation	
Lactose (g/l)	35,41± 8,42 <sup>a</sup>	38,50 ± 5,91 <sup>a</sup>	50 [7] 48-50 [10]
Protéines (g/l)	31,16 ± 5,38 <sup>a</sup>	33,66 ± 4,79 <sup>a</sup>	36 [10] 31-34 [11]
Matières grasses (g/l)	33,66 ± 3,20 <sup>a</sup>	27± 1,67 <sup>b</sup>	35-42 [11] 37 [12]

<sup>a, b</sup> Les moyennes sur une même ligne suivies de lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ).

### Etude des corrélations entre les composants du lait et leurs précurseurs sanguins

L'étude statistique a révélé une forte corrélation entre les triglycérides du sang et la matière grasse du lait ( $r=0,89$   $p<0,01$ ), et également entre la glycémie et le lactose ( $r=0,80$   $p<0,01$ ) (Tableau 3).

Tableau 03 : Corrélations entre les paramètres biochimiques du sang et du lait.

Paramètres	Coefficient de corrélation (r)	P value
TG (g/L) / MG (g/L)	0,89	0,0001
Lact (g/L) / Glyc (g/L)	0,80	0,001
Chol (g/L) / MG (g/L)	-0,10	0,728
Gly (g/L) /MG (g/L)	0,004	0,99

### DISCUSSION

Les valeurs de la glycémie obtenues dans la présente étude sont significativement élevées chez les vaches en fin de lactation par comparaison à celles qui sont en début. Cette observation pourrait être attribuée à la composition de la ration de base distribuée pour les deux groupes ou on a noté que la composition du concentré distribué aux vaches en fin de lactation est variée (orge, maïs, et son de blé). Les rations riches en concentrés conduisent à des mélanges d'AGV riches en acide propénoïque (C3), ce dernier va être métabolisé dans le foie où va avoir lieu la néoglucogénèse. Il est le principal précurseur du glucose [13]. L'apport énergétique est de loin le facteur alimentaire le plus critique ayant un impact sur la santé, la lactation et la reproduction des animaux. Les paramètres utiles dans l'évaluation du statut énergétique sont le glucose, le bêta-hydroxybutyrate (BHB), les acides gras libres (AGL), les triglycérides et le cholestérol. La valeur du

glucose sérique peut renseigner sur l'apport énergétique de la ration, principalement sur la quantité de précurseurs du glucose produits par la biomasse ruminale.

Une valeur basse du glucose implique un bilan énergétique négatif, par contre, une valeur élevée du glucose est un indicateur d'une acidose du rumen [14].

Notons qu'à la différence des monogastriques, le glucose provient chez les ruminants en majeure partie de la néoglucogénèse hépatique et non de l'absorption directe de ce glucose par le tube digestif [15]. Par ailleurs lorsque l'on compare avec les normes physiologiques de Payne *et al* [5] et Michel [6], qui sont respectivement entre (0,30 et 0,54) g/l et (0,56-0,73) g/l, nous constatons que les valeurs moyennes obtenues pour la glycémie chez les vaches dans les deux stades physiologiques sont comprises dans ces intervalles. Le faible taux de glycémie observé en début de la lactation, pourrait être attribué à la mobilisation du glucose pour la synthèse du lactose du lait [16-17].

Les valeurs moyennes des triglycérides obtenues chez les vaches en fin de lactation sont supérieures à celles observées en début de lactation mais restent inférieures à celles décrites par Burgere-Picoux [8]. La diminution des triglycérides en début de lactation pourrait être due à une augmentation de leur mobilisation par la glande mammaire. Notons que la matière grasse du lait est fréquemment quantifiée par le taux butyrique. Elle se compose pour 98 % de triglycérides, le reste étant représenté par des phospholipides participant à la structure lipoprotéique de la membrane des globules gras [18]. Les triglycérides d'origine hépatique sont récupérés et hydrolysés par une lipoprotéine lipase au niveau mammaire et permettent la synthèse par la suite d'acides gras [19].

La diminution de la triglycéridémie pourrait être due également à l'augmentation de la résistance tissulaire à l'action de l'insuline pendant la gestation [20], rappelant que la tendance à la baisse des triglycérides et du cholestérol total en début de lactation a été également signalée par Marcos *et al.* [21], chez les vaches laitières et est expliquée par l'accroissement de leur besoins en énergie pendant cette phase. Par ailleurs dans leur étude Chorfi et Gérard [14] ont rapporté que la mesure des acides gras libre et des triglycérides donne une bonne estimation du bilan énergétique et elle est fortement corrélée à celle de la lipomobilisation.

Les valeurs plasmatiques moyennes du cholestérol chez les vaches en début et en fin de lactation au regard des données bibliographiques, sont situées dans les intervalles proposées par les deux auteurs Rosenberger (0,5-1,5 g/l) [7], et Fontaine (0,77-1,70 g/l) [22]. Ce qui pourrait indiquer la

couverture de la ration distribuée des besoins énergétiques des vaches en lactation. Les taux de cholestérol sérique sont modifiés par différents facteurs : la composition de la ration alimentaire, l'âge, le sexe, la race, la saison, la gestation, la lactation et les maladies du foie et des voies biliaires [23].

Relativement aux teneurs du lait en lactose, l'étude statistique n'a révélé aucun effet significatif du stade de lactation sur ce paramètre mais, lorsqu'on compare ces valeurs moyennes, avec les données bibliographiques, elles semblent être situées en dessous des normes citées par Holden et Coulon [10], qui sont comprises entre 48 et 50g/l. Cette faible valeur pourrait être expliquée par une diminution du taux du glucose sanguin. D'après Zhao [24], la glande mammaire ne peut pas synthétiser son propre glucose à partir d'autres précurseurs et elle est donc dépendante d'un apport sanguin en cet élément.

La vache laitière en début de lactation présente un déficit énergétique qui peut parfois être d'une telle importance qu'il entraîne des troubles de santé. L'étude de Fayolle [9], a révélé l'influence négative majeure de la concentration cellulaire du lait en prouvant que la présence d'une mammite, reflétée par une hausse de la concentration cellulaire, est associée à une chute de la teneur en lactose. Ce dernier a également rapporté l'impact de la parité sur la teneur du lait en cet élément. Un profil type d'individus associant une glycémie basse et un taux de lactose diminué est mis en évidence ce qui corrobore nos résultats. Ce profil évoquant un déséquilibre énergétique se retrouve notamment chez les vaches de race Holstein, reconnues fortement productrices de lait. Cette étude a également montré un lien entre une teneur en lactose faible et une baisse du taux protéique (TP), une hausse du taux butyreux (TB) ou une hausse de la concentration sanguine et du lait en betahydroxybutyrate (BHB) ; autant de situations suggèrent un déficit énergétique. Ainsi, pris individuellement, la concentration en lactose ne permet pas de conclure quant au statut métabolique de l'animal.

Mais, en l'intégrant dans l'analyse d'autres variations de paramètres reconnues tels que BHB, TP et TB. Un taux de lactose faible peut être un élément supplémentaire en faveur d'un bilan énergétique négatif.

La lecture des résultats (tableau 2), montre une teneur moyenne en protéine plus élevée chez les vaches en fin de lactation par rapport à celles en début de lactation (différence non significative, elles sont statistiquement comparables). Toutefois, ces valeurs sont comprises dans les intervalles citées par Wolter [11]. Chethouna [25], a rapporté que la teneur protéique, varie en fonction des stades de lactation. Les deux premiers mois de lactation étant caractérisés par une diminution de ce composant dans le lait. Dans notre étude cette diminution est statistiquement non significative.

La teneur en matière grasse est significativement supérieure chez les vaches en début de lactation comparativement à celles en fin de lactation ce qui est en accord avec la bibliographie. Selon Belhadi [26], les teneurs du lait en matières grasses évoluent de façon inverse à la quantité de lait produite.

Labioui *et al* [27], rapportent que la variabilité du taux de matière grasse dépend de plusieurs facteurs tels que les conditions climatiques, le stade de lactation et l'alimentation. Pollott [28], a rapporté que le taux de sécrétion des lipides est le plus variable au cours de la lactation, et est positivement corrélé à celui des protéines.

Par ailleurs on a décrit que la concentration en matière grasse augmente au cours de la traite tandis que la teneur en protéine et en lactose diminuent de (4,8%) en début de traite à (4,5%) en fin de traite pour le lactose) [29]. Dans leur étude, RICO *et al.* [30], ont montré que le taux protéique et la teneur en lactose décroissent légèrement au cours de la traite.

De fortes corrélations significatives ont été obtenues entre les triglycérides du sang avec la matière grasse du lait, et la glycémie avec le lactose.

Xiao et Cant [31], ont rapporté que la synthèse de lactose est liée à la concentration cellulaire en glucose. Une relation est décrite entre la glycémie et la synthèse du lactose. En cas de hausse des apports alimentaires en glucose, l'augmentation de la glycémie sera accompagnée d'une plus forte utilisation mammaire de ce dernier [32].

Nos résultats ont permis de mettre en évidence une corrélation négative entre les teneurs sériques en cholestérol et la teneur du lait en matières grasses, toutefois elle n'est pas significative ( $r = -0,10$   $p > 0,01$ , en plus sa valeur est négligeable non indicatrice d'un phénomène particulier).

Doulkin et Helman [33] ont décrit que les vaches à plus grand rendement en lait ont une teneur en cholestérol sérique inférieure à celle des vaches moins bonnes laitières.

Aucune corrélation entre la glycémie et la matière grasse du lait n'a été mise en évidence dans la présente étude ( $r = 0,004$   $p > 0,01$ ).

La concentration du glucose décroît à la 2ème semaine après le vêlage puis augmente à la 3ème semaine et se maintient à la 4ème semaine chez les vaches en situation physiologique.

Le glucose intervient dans la dégradation des glycérides. Le manque de glucose entraîne une accumulation des triglycérides dans le foie. Ce qui pourrait diminuer l'approvisionnement de la mamelle en triglycéride pour la synthèse de la matière grasse du lait [34].

## CONCLUSION

Les modifications des paramètres biochimiques du sang et du lait chez les vaches laitières pendant un stade physiologique très important de leurs vies productrices, qui est la lactation (début et fin de lactation) ont confirmé que certains paramètres des métabolismes énergétique, et protéique, peuvent être utilisés comme indicateurs biologiques afin d'évaluer l'état nutritionnel des vaches, de surveiller leur statut métabolique, et de prédire précocement d'éventuels troubles métaboliques. En effet, le principal facteur souvent incriminé dans la variation de la concentration des métabolites sanguins et également de la qualité du lait est l'alimentation. La présente étude a confirmé la relation entre certains composants des deux liquides par conséquent nous recommandons d'améliorer la ration alimentaire des vache laitière, par la supplémentation, ce qui augmente les apports nutritifs et de ce fait la valeur nutritionnelle et la qualité du lait, nous recommandons également de procéder au rationnement en fonction du stade physiologique de la vache, d'encourager et de pratiquer les cultures fourragères, car ce que la vache consomme, c'est le lien au terroir, c'est ce qui assure la spécificité du produit final.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. **Amellal R, (1995)**. La filière lait en Algérie. Entre l'objectif de la sécurité alimentaire et la réalité de la dépendance. Les agricultures maghrébines à l'aube de l'an 2000. Options Méditerranéennes, Série B, Etudes et Recherches, n°14, 229-238.
- [2]. **Abbas K (2011)** Rôle des herbages dans l'intégration de l'élevage bovin laitier dans les systèmes pluviaux polyculture-élevage des zones semi-arides de moyenne montagne algérienne », Rencontre Recherche Ruminants. Paris, France..  
<http://www.journees3r.fr/spip.php?article3266>
- [3]. **Senoussi A, Haïli L, Maïz H. (2010)**. Situation de l'élevage bovin laitier dans la région de guerrara (Sahara Septentrional Algérien). *Livestock Research for Rural Development* 22(12). <https://bu.univ-ouargla.dz/production%20scientifique/prof/snoussi/C.%20LRRD.pdf>
- [4]. **Mialot J.P, (1983)**. – Technique de prélèvement de lait pour examen bactériologique. *Rec.Méd. vét.*, 159 (11), 1057–1058.
- [5]. **Payne J M, Sally M, Manston R, et Foulks M. (1970)**. The use of a metabolic profile test in dairy herds. *Vet. Rec.*, 87. 150-158.
- [6]. **Michel M G, (1977)**. Profils métaboliques en médecine vétérinaire et en médecine humaine. Les profils métaboliques chez les bovins. *Rev. Med. Vét.*, 128,6, 878-885p.
- [7]. **Rosenberger G, (1979)**. Examen clinique des bovins. Edit. Du point vétérinaire, 526P.
- [8]. **Brugere-Picoux J, (1984)**. Baisse de la disponibilité en glucose. La dépêche vétérinaire supplément technique,(46), pp 9-21.
- [9]. **Fayolle L, (2015)**. Le lactose, indicateur de déficit énergétique chez la vache laitière? Étude réalisée auprès de 162 élevages en Rhône-Alpes Auvergne. Thèse d'Etat de Doctorat Vétérinaire. Université Claude-Bernard - Lyon I. 140 pages.
- [10]. **Hoden A et Coulon J.B. (1991)**. Maîtrise de la composition du lait. Influence des facteurs nutritionnels sur la quantité et les taux de matières grasses et protéiques. *INRA Prod. Anim.*, 4 (5), 361-367.
- [11]. **Wolter R. (1997)**. Alimentation de la vache laitière. 3ème édition, édition France agricole, 263 p.
- [12]. **Perreau JM, (2014)**. Conduire son troupeau de vaches laitières. Editions France Agricole, Paris, 403p.
- [13]. **Enjalbert F, (1994)**. Biosynthèse des constituants du lait chez la vache, *Rec. Med. Vet.*, 170 (6/7), 353-358.
- [14]. **Chorfi Y, Girard V, (2005)**. Le profil métabolique chez la chèvre. CRAAQ, Colloque sur la chèvre. L'innovation, un outil de croissance!  
<https://www.agrireseau.net/documents?r=colloque+sur+la+chevre+2005>.
- [15]. **LE Bars T, (1997)**. Le défaut de base légale en droit judiciaire privé, th. Caen, 1991, Paris, LGDJ, 1997.
- [16]. **Hatfield PG, Head JR, Fitzgerald W A, Hallford J AM, (1999)**. Effects of level of energy intake and energy demand on growth hormone, insulin and metabolites in Targhee and Suffolk ewes. *J. Anim. Sci.* 77, 2757–2765.
- [17]. **Boudebza A, (2015)**. Etude de la relation entre les paramètres Sanguins et les performances de reproduction Chez la brebis. Thèse de doctorat en médecine vétérinaire. Option : Biochimie Constantine. 216p.
- [18]. **Hanzen C, (2010)**. Lait et production laitière. Polycopiée. 42p.
- [19]. **Bruss M.L.** Chapter 4: Lipids and Ketones. In: KANEKO J.J., HARVEY J.W., BRUSS M.L., (2008). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals, Sixth Edition*. Oxford : Elsevier Inc. Academic Press, pp. 81-115.
- [20]. **Yokus B, Cakir DU, Kurt, D. (2006)**. Effects of seasonal and physiological variations on the serum chemistry, vitamins and thyroid hormone concentrations in sheep. *J.Vet. Med. A: Physiol. Pathol. Clin. Med.* 53, 271–276.
- [21]. **Marcos, E., Mazur, A., Cardot, P., Rayssinguier, Y., (1990)**. The effects of pregnancy and lactation on serum lipid and apolipoprotein B and A-I levels in dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 64, 133-138.

- [22]. Fontaine, M. (1987). *Vadé-mécum du vétérinaire. 15ème édit Vigot-Paris*, 1642p.
- [23]. Ozpinar A, Firat A, Akin G. (1995). The plasma cholesterol levels of ewes during prepartal and postpartal periods. *Hayvancılık Aras, tırma Derg*; 5: 32–34.
- [24]. Zhao FQ, (2014). Biology of Glucose Transport in the Mammary Gland *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 19(1), 3-17.
- [25]. Chethouna F, (2011). Etude des caractéristiques physico-chimiques, biochimiques et la qualité microbiologiques du lait camelin pasteurisé, en comparaison avec le lait camelin cru, Université Kasdi Merbah Ouargla, Thèse de Magister en biologie, 67 p.
- [26]. Belhadi N, (2011). Effets des facteurs d'élevage sur la production et la qualité du lait de vache en régions montagneuses. Mémoire de magister en agronomie, spécialité: productions animales: option: alimentation animale et produits animaux, 83p.
- [27]. Labiouiel H, Moualdi L, Benzakour A, El Yachioui M, Berny ELH ; Ouhssine M, (2009). Étude physicochimique et microbiologique de laits crus. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 148, 7-16.
- [28]. Pollott G E. (2004). Deconstructing milk yield and composition during lactation using biologically based lactation models *J. Dairy Sci.*, 87, 2375-2387.
- [29]. Nielsen T.S., Straarup E.M., Vestergaard M., Sejrsen K, (2006). Effect of silage type and concentrate level on conjugated linoleic acids, trans-C18:1 isomers and fat content in milk from dairy cows. *Reprod. Nutr. Dev.*, 46, 699-712.
- [30]. Rico D.E., Marshall E.R., Choi J., Kaylegian K.E., Dechow C.D., Harvatine K.J. (2014). Within-milking variation in milk composition and fatty acid profile of Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 97, 4259-4268.
- [31]. Xiao CT, et Cant J P. (2005). Relationship between glucose transport and metabolism in isolated bovine mammary epithelial cells *J. Dairy Sci.*, 88, 2794-2805.
- [32]. Rigout S, Lemosquet S, Van Eys J E, Blum JW, Rulquin H. (2002). Duodenal glucose increases glucose fluxes and lactose synthesis in grass silage-fed dairy cows *J. Dairy Sci.*, 85, 595-606.
- [33]. Doulkin A, Helman S (1934). Quelques données sur la teneur du sang des vaches laitières en cholestérol et en phosphatides. *Le Lait*, INRA Editions, 1934, 14 (138), pp.797-808.
- [34]. Ali A, Derar R, Hussein H (2006). Seasonal variation of the ovarian follicular dynamics and luteal functions of sheep in the subtropics. *Theriogenology* 66, 463–469.

## ANALYSE MORPHOMETRIQUE OVARIENNE ET UTÉRINE ET PROFIL ENDOCRINIEN SUIVANT LA RÉCEPTIVITÉ SEXUELLE *POST COÏTUM* CHEZ LA LAPINE DE POPULATION LOCALE

BOUMAHDY MERAD Zoubeïda<sup>1</sup>, TARZAALI Dalila<sup>1</sup>

1. Laboratoire des Biotechnologies Liées à la Reproduction Animale, Institut des Sciences Vétérinaires, Université Saad Dahleb, Blida 1, B.P. 270, route de Soumaa, Blida, Algérie .

*Reçu le 09/07/2019, Révisé le 16/12/2019, Accepté le 22/12/2019*

### Résumé

**Description du sujet :** La réceptivité (R) sexuelle est relativement corrélée aux nombres de follicules pré ovulatoires sur les ovaires de lapine et donc au taux d'œstradiol plasmatique. Les lapines réceptives expriment une supériorité dans la fréquence d'ovulation, le taux de fécondation et la viabilité embryonnaire.

**Objectifs :** Etude comparative des caractéristiques morphométriques des ovaires, des cornes utérines et du dosage plasmatique du 17 $\beta$  œstradiol (E2) et de la Progesterone (P4) des lapines de population locales (*Oryctolagus cuniculus*) en fonction de leur réceptivité sexuelle et des stades *post coitum* (p.c).

**Méthodes :** A partir d'un total de 100 lapines, 60 lapines sont considérées en fonction du résultat du test de présentation au male et ont été réparties en trois lots de 20 lapines. Lot 1 : n=20 lapines réceptives (R+), les lots 2 et 3 (n=40) lapines non réceptives (R-) et ayant subi une saillie assistée (R- + SA). La moitié d'entre elles 20 ont reçu une injection de GnRH (lapines traitées). Elles ont été abattues à raison de 2 lapines/lot de 0 à 14h p.c. Sur les ovaires et cornes utérines une étude morphométrique a été réalisée. Un dosage plasmatique d'E2 et P4 a été effectué.

**Résultats :** Les lapines R+ et R- non traitées par la GnRH ont un nombre de follicules préovulatoires plus élevé que les R- traitées. Les lapines R+ ovulent plus fréquemment que les R- non traitées (60vs30%). Les R-GnRH ont un diamètre des follicules antraux plus élevé (722 $\mu$ m vs 567, 604). Il en est de même pour les corps de Call et Exner (3,99 vs 2,81, 3,20). Les R-GnRH ont un taux élevé d'E2 (311pg/ml vs 188,163).

**Conclusion :** Les lapines réceptives ovulent plus fréquemment que les lapines non réceptives ayant subi une saillie assistée (R-SA) non traitées. L'originalité de ce travail a été de démontrer les retards d'ovulation des R- pouvant expliquer des défauts de fécondation et/ou de mortalité embryonnaire totale.

**Mots clés :** Morphométrie; Ovaire; Utérus; Réceptivité; Lapine; Follicules; GnRH.

## OVARIAN AND UTERINE MORPHOMETRIC ANALYSIS AND ENDOCRINE PROFILE ACCORDING TO SEXUAL RECEPTIVITY *POST COITUM* IN THE RABBIT OF LOCAL POPULATION

### Abstract

**Description of the subject:** Sexual receptivity (R) is relatively correlated with the number of preovulatory follicles on the rabbit's ovaries and therefore with the plasma estradiol level. Receptive rabbits express superiority in ovulation frequency, fertilization rate and embryonic viability.

**Objective:** Comparative study of the morphometric characteristics of the ovaries, uterine horns and the plasma 17 $\beta$  œstradiol (E2) and Progesterone (E2 and P4) of rabbits of local population (*Oryctolagus cuniculus*) according to their sexual receptivity and stages *post coitum* (p.c).

**Methods:** From a total of 100 female rabbits, 60 rabbits were considered according to the result of the presentation test to the male and were divided into three lots of 20 rabbits. Lot 1: n= 20 rabbits R<sup>+</sup>, lots 2 and 3(n=40) non receptive rabbits (R<sup>-</sup>) and having undergone an assisted mating(R<sup>-</sup> + AM). Half of them, however, received GnRH injection (treated rabbits). All rabbits were slaughtered at 2 rabbits / lot from 0 to 14h p. On the ovaries and uterine horns a morphometric study was carried out. A plasma assay of E2 and P4 was performed.

**Results:** R<sup>+</sup> and R<sup>-</sup> rabbits untreated with GnRH had a higher number of pre-ovulatory follicles than the R- treated. R<sup>+</sup> ovulate more frequently than untreated R<sup>-</sup>(60vs30%). R-GnRH have a greater diameter of antral follicles (722 $\mu$ m vs 567, 604), as well as Call Exner bodies (3.99 vs 2.81, 3.20). □R-GnRH had a high E2 level (311pg / ml vs 188,163).

**Conclusion:** Receptive rabbits ovulate more frequently than untreated R- +AM. The originality of this work has been to demonstrate the ovulation delays of R- that may explain fertilization defects and / or total embryonic mortality.

**Key Words:** Morphometry; Ovary; Uterus; Receptivity; Female rabbit; Follicles; GnRH.

\*Auteur correspondant: BOUMAHDY-MERAD Zoubeïda, E-mail : zoubidaboumahdi@yahoo.fr

## INTRODUCTION

Le cycle œstral chez la lapine est dépourvu de chaleurs régulières au cours desquelles l'ovulation a lieu spontanément celle-ci nécessite l'intervention d'un stimulus (accouplement) on parle alors d'ovulation provoquée [1]. On a longtemps supposé que la lapine est en œstrus permanent. Cependant, il a été mis en évidence sur des lapines nullipares, des périodes alternées d'acceptation de l'accouplement (œstrus) et de refus du mâle (diœstrus). Pour ces deux états, on utilise respectivement aussi les termes de lapine réceptive ou non réceptive [2]. Une femelle est définie comme «réceptive» lorsqu'elle accepte l'accouplement, comme l'indique sa position de lordose en présence d'un mâle [2 ; 3]. Au niveau physiologique, la réceptivité sexuelle est relativement corrélée à la présence de follicules pré ovulatoires sur les ovaires de lapine [4] et donc à la concentration d'œstradiol plasmatique [5]. La production d'œstrogène n'agit que sur le comportement sexuel de la lapine et l'ovulation ne survient donc qu'en présence de stimuli extérieurs, principalement l'accouplement dans les conditions naturelles [1]. Theau-Clément, a montré que la productivité des femelles réceptives est trois fois plus grande que celle des femelles allaitantes et non-réceptives. Ce résultat, est la conséquence de la supériorité chez les lapines réceptives, de la fréquence et de l'intensité de l'ovulation, du taux de fécondation et de la viabilité embryonnaire. L'appareil reproducteur de la lapine a été largement étudié sous certains aspects, par exemple pour déterminer les mécanismes d'action hormonaux en raison du fait que les lapines présentent une ovulation provoquée [6]. Jusqu'à présent, les caractéristiques morphométriques des ovaires et de l'utérus en relation avec la réceptivité n'ont pas été étudiées. L'objectif de ce travail, est d'effectuer une analyse comparative des caractéristiques morphométriques des ovaires et des cornes utérines et du dosage plasmatique d'E2 et P4 en fonction de la réceptivité sexuelle de la lapine locale au moment de l'accouplement et du stade 0 -14h *post coitum*.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Animaux et protocole expérimental

L'objectif de ce travail est une étude comparative, des caractéristiques morphométriques des ovaires et des cornes utérines et du taux plasmatique du 17 $\beta$ -œstradiol et de la progestérone dans trois lots de lapines de population locale algérienne (Fig. 1): réceptive (R<sup>+</sup>), non réceptive (R<sup>-</sup>) et non réceptive suivie d'une injection de GnRH (R<sup>-</sup> + GnRH), dans les 14 heures suivant l'accouplement. L'expérimentation s'est déroulée au sein du clapier de la station expérimentale de l'Université de Blida. Un total de 100 femelles nullipares âgées de 4,5 à 5 mois de poids homogène (1,800 kg  $\pm$  300g) et 5 mâles âgés de 7 mois ont été utilisés. Les animaux (mâles et femelles) étaient nourris *ad libitum*. La femelle est introduite pour la première fois dans la cage d'un premier mâle pendant une durée de 3 min. Si elle accepte l'accouplement, elle adopte une position de lordose, (train arrière relevé et périnée dégage), elle est donc considérée réceptive (R<sup>+</sup>). Si elle refuse l'accouplement avec le premier mâle, elle est présentée le même jour à un deuxième mâle et si elle accepte alors l'accouplement, elle est considérée réceptive. Si la femelle refuse l'accouplement avec les deux mâles le même jour, elle est présentée le lendemain. Si elle persiste dans son refus elle est considérée comme non réceptive (R<sup>-</sup>). On procède alors à la saillie assistée. Dans notre expérimentation les lapines non réceptives ayant refusé les deux mâles pendant deux jours successifs sont au nombre de 40. Il faut absolument surveiller *in visu* le déroulement de la saillie pour s'assurer que la saillie est positive car elle se fait de manière très rapide 30 à 40s. Toutes les lapines non-réceptives ont subi une saillie assistée. Elles sont alors réparties en 2 lots : La moitié a reçu une injection de 0,2 ml de GnRH (Gonadoréline), par voie intramusculaire au niveau du râble. L'autre moitié ne reçoit pas d'injection (lot témoin). Toutes ces observations nous ont permis de sélectionner 60 lapines réparties en fonction du résultat du test de présentation au mâle. Lot 1 (n=20) : Lapines réceptives (R<sup>+</sup> après un seul jour de test). Lot 2 (n=20) : Lapines non réceptives (R<sup>-</sup> après deux jours de test) ayant subi une saillie assistée. Lot 3 (n=20) : Lapines non réceptives (R<sup>-</sup> après deux jours de test) ayant subi une saillie assistée suivie d'une injection de 0,2 ml de GnRH.



Sur les lapines des 3 lots, des prélèvements sanguins ont été effectués au niveau de la veine marginale de l'oreille, à des intervalles de temps *post coïtum* bien définis (0h, 2h, 6h, 8h, 10h, 10h30, 11h, 12h, 13h et 14h). Pour chaque intervalle de temps *post coïtum*, le sang a été prélevé dans des tubes héparinés sur 2 lapines. Après centrifugation (3000 tours pendant 10 minutes), le plasma est stocké à une température de  $-20^{\circ}\text{C}$ . Immédiatement

après les prélèvements, les lapines ont été sacrifiées. Les ovaires ( $n=120$ ) sont alors prélevés ainsi que l'ensemble des cornes utérines ( $n=60$ ). À l'aide d'une loupe binoculaire et d'un appareil photo numérique, nous avons réalisé : Une étude macroscopique des ovaires et des cornes utérines et une étude microscopique des ovaires des 3 lots à différents stades *post coïtum*.



Figure 1: Lapine de population locale (*Oryctolagus cuniculus*)

Dès leur exérèse les ovaires sont maintenus dans des conditions d'osmolarité et de température proche de celles *in vivo* selon la méthode décrite par Lorenzo et al. [7]. Ils sont placés dans une solution tampon phosphate de PBS (*Phosphate Buffered Saline*), et maintenus à  $38^{\circ}\text{C}$ . Pour chaque femelle, des mesures sur les ovaires droits et gauches ont été effectuées : Le poids (g), la longueur (cm) et diamètre (mm) des ovaires. Le dénombrement de tous les follicules existants à l'aide d'une loupe binoculaire : Les follicules pré ovulatoires ( $\varnothing > 1\text{mm}$ ), les corps jaunes jeunes avec stigma turgescent, les follicules hémorragiques ( $\varnothing > 1\text{mm}$ ), le poids (g) de l'ensemble des cornes utérines après les avoir débarrassé de leur graisse. Les 2 cornes sont ensuite séparées au niveau des cervix puis pesées. La longueur (cm) des cornes à l'aide d'un pied à coulisse. Le périmètre (cm) des cornes, à l'aide d'un fil qui entoure la corne, la longueur du fil donne le diamètre de la corne. Tous les ovaires et les cornes utérines sont fixés dans une solution de formaldéhyde à 10% pour la réalisation ultérieure des coupes histologiques.

Les populations folliculaires ont été quantifiées de manière comparative entre les lapines réceptives et les non-réceptives ayant reçu ou non un traitement hormonal à 0h, 2h, 6h, 8h, 10h, 10h30, 11h, 12h, 13h et 14h *post coïtum* et ont été mesurés les : Follicules primaires, secondaires, tertiaires (jeunes antraux),

pré ovulatoires, atrésiques et follicules rompus. Sur les coupes d'ovaires, le diamètre des follicules antraux, le diamètre ovocytaire et l'épaisseur de la zone pellucide, ont été mesurés au moyen d'un micromètre oculaire. Le diamètre des follicules et des ovocytes a été déterminé par deux mesures perpendiculaires en prenant comme limites : pour le follicule, la membrane basale et pour l'ovocyte, la zone pellucide d'une part, et la membrane cytoplasmique d'autre part. La différence entre les deux types de mesures a permis de calculer l'épaisseur de la zone pellucide. Chaque mesure a été réalisée au grossissement le plus élevé possible, c'est-à-dire  $\times 400$  pour les follicules inférieurs à  $300\ \mu\text{m}$ ,  $\times 100$  pour les follicules de  $300$  à  $1000\ \mu\text{m}$  et  $\times 40$  pour les follicules de plus de  $1000\ \mu\text{m}$ . Après avoir effectué les mesures du diamètre folliculaire, ovocytaire et épaisseur de la zone pellucide des follicules antraux, sur ces mêmes follicules.

## 2. Analyse statistique

Le poids des lapines au moment de la présentation a été analysé au moyen d'une analyse de variance en prenant l'effet fixé du lot (3 niveaux : lots 1, 2 et 3). L'étude morphométrique des ovaires, le dénombrement des différentes populations folliculaires, le nombre de corps jaunes, le poids, la longueur et le périmètre des cornes utérines, le nombre de follicules des différentes populations folliculaires,

la taille des follicules antraux et ses composants, le dénombrement des corps de Call et Exner, et la concentration plasmatique de  $17\beta$ -oestradiol et de progestérone ont été étudiés au moyen d'une analyse de variance prenant en compte l'effet fixé du lot (3 niveaux : lots 1, 2 et 3), du stade *post coïtum* (10 niveaux : 0h, 2h, 6h, 8h, 10h, 10h30, 11h, 12h, 13h, et 14h) ainsi que l'interaction lot x stade. La fréquence d'ovulation a été analysée selon le même modèle d'analyse en considérant que l'ovulation suit une loi de Bernoulli (variable 0-1).

## RÉSULTATS

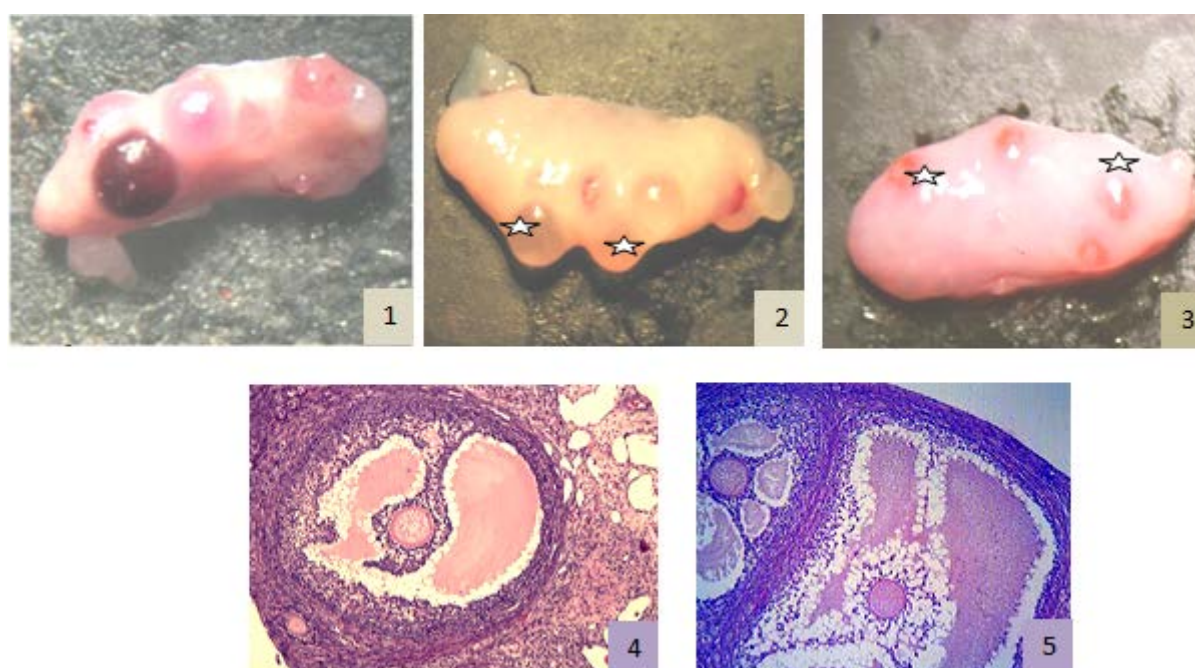


Figure 2: Ovaries of rabbit : 1. Follicle hemorrhagic (vesicle black) ; 2. Follicle pre-ovulatory (asterisks) ; 3. Young yellow bodies or ovulation points (asterisks) ; 4. Follicle pre-ovulatory and 5. Ovulatory follicle. Hematoxylin & eosin stain. Magnification  $\times 400$

L'étude morphométrique a été réalisée sur 60 lapines. Les résultats sont indiqués dans le tableau 1

Le poids des ovaires, le nombre de follicules hémorragiques ne varie ni en fonction de la réceptivité ni en fonction des stades *p.c.* La longueur des ovaires ne varie pas en fonction de la réceptivité et des stades *post coïtum*. La réceptivité sexuelle de la lapine n'influence pas significativement la largeur des ovaires.

Au moment de la présentation, les lapines pesaient en moyenne  $2,028 \pm 0,125$  kg. Leur poids varie de 1,979 à 2,094 kg. Les lapines du lot 1 ( $R^+$ ) sont significativement plus lourdes que celles des lots 2 ( $R^-$ ) (+4%,  $p < 0,05$ ) et lot 3 ( $R^- + \text{GnRH}$ ) (5% ;  $p < 0,05$ ).

La figure 2 présente l'aspect macroscopique des ovaires de lapines présentant de nombreux grands follicules préovulatoires et hémorragiques (vésicules noires) de diamètre  $>$  à 1mm et des corps jaunes jeunes avec stigma turgescent correspondant aux points d'ovulation

Par contre, elle varie significativement en fonction des stades *post coïtum*. En effet, les ovaires à 0h *p.c.* étaient plus larges comparés à ceux des femelles sacrifiées à 12h *p.c.* (+50%;  $p < 0,05$ ) d'une part, et à ceux des femelles sacrifiées à 13h *p.c.* (48%;  $p < 0,05$ ) d'autre part. L'analyse de variance a mis en évidence une interaction significative entre le lot et le stade sur la largeur des ovaires. En effet, la largeur des ovaires des lapines  $R^- \text{GnRH}$  augmente à partir de 10h *p.c.* (Fig. 3).

Tableau 1: Etude morphométrique des ovaires, dénombrement des différentes populations folliculaires, fréquence de l'ovulation en fonction des 3 lots et des stades *post coïtum* ; Moyennes arithmétiques et résultats du test de Bonferonni.

	Ovaires				Nombre de follicules		Ovulation
	Effectif	Poids (g)	Longueur (mm)	Largeur (mm)	Préovulatoires	Hémor <sup>(1)</sup>	Fréquence d'ovulation (%)
Moyenne générale	60	0.275	10.7	2.8	3.4	0.5	43.3
Lot		NS	NS	NS	$p < 0.05$	NS	$p < 0.05$
(R <sup>+</sup> )	20	0.280	11.0	3.2	5.1 <sup>a</sup>	0.8	60.0 <sup>a</sup>
(R <sup>-</sup> )	20	0.254	10.3	2.7	3.7 <sup>a</sup>	0.6	30.0 <sup>b</sup>
(R <sup>-</sup> + GnRH)	20	0.292	10.7	2.6	1.6 <sup>b</sup>	0.1	40.0 <sup>ab</sup>
Stade <i>p.c.</i>		NS	NS	$p < 0.05$	$p < 0.05$	NS	$p < 0.05$
0h	6	0.275	11.8	4.2 <sup>a</sup>	6.2 <sup>a</sup>	0.8	0.0 <sup>a</sup>
2h	6	0.243	8.7	2.6 <sup>ab</sup>	4.2 <sup>ab</sup>	0.0	0.0 <sup>a</sup>
6h	6	0.292	11.4	3.3 <sup>ab</sup>	6.3 <sup>a</sup>	0.8	0.0 <sup>a</sup>
8h	6	0.250	11.3	3.0 <sup>ab</sup>	5.3 <sup>ab</sup>	0.0	0.0 <sup>a</sup>
10h	6	0.238	11.2	2.4 <sup>ab</sup>	2.7 <sup>ab</sup>	0.5	66.7 <sup>b</sup>
10h30	6	0.297	10.2	3.0 <sup>ab</sup>	3.7 <sup>ab</sup>	0.5	50.0 <sup>ab</sup>
11h	6	0.327	11.3	2.8 <sup>ab</sup>	2.2 <sup>ab</sup>	1.7	83.3 <sup>b</sup>
12h	6	0.253	10.4	2.1 <sup>b</sup>	1.3 <sup>b</sup>	0.0	83.3 <sup>b</sup>
13h	6	0.267	9.8	2.2 <sup>b</sup>	1.8 <sup>ab</sup>	0.2	50.0 <sup>ab</sup>
14h	6	0.308	10.6	2.5 <sup>ab</sup>	0.8 <sup>b</sup>	0.0	100 <sup>b</sup>
Lot*stade <sup>(2)</sup>		NS	NS	$p = 0.068$	$p = 0.020$	NS	NS

(1) Follicule hémorragique (2) Interaction lot \* stade

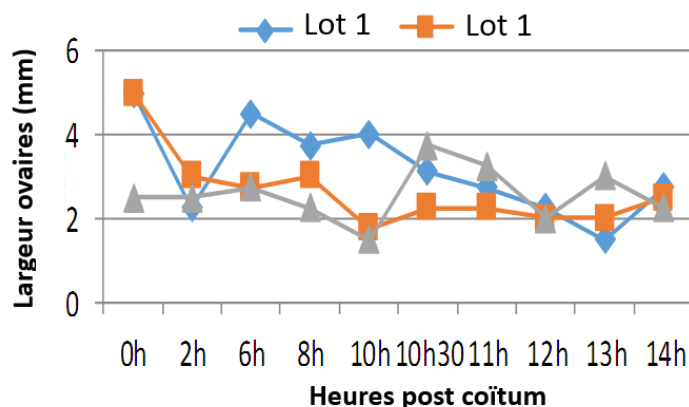


Figure 3: Largeur des ovaires des lapines dans la phase *post coïtum*

### 1. Dénombrement des follicules et fréquence d'ovulation

Il est noté que le nombre de follicules préovulatoires et la fréquence d'ovulation varient significativement en fonction de la réceptivité (Fig. 4). En effet, les lapines R<sup>+</sup> et R<sup>-</sup> non traitées ont un nombre de follicules pré ovulatoires plus élevé que les R<sup>-</sup> traitées (respectivement +68% et +27%,  $P < 0,05$ ). Concernant la fréquence d'ovulation les lapines R<sup>+</sup> ovulent plus fréquemment que les R<sup>-</sup> non traitées (60 vs 30%), le résultat étant intermédiaire pour les R<sup>-</sup> traitées (Fig. 5). Le nombre de follicules pré ovulatoires varie significativement en fonction du stade ( $p < 0,05$ ). A partir de 12 h *p.c.*, le nombre de

follicules préovulatoires diminue généralement et à 14h *p.c.*, il chute de manière drastique. Le lot et le stade *post coïtum* interagissent sur le nombre des follicules préovulatoires ( $p = 0,020$ ). En revanche le nombre de follicules préovulatoires diminue significativement à partir de 12hp.c. Cependant il ya une interaction lot stade : les lapines qui ont reçu de la GnRH (lot 3) n'ont pas de follicules pré ovulatoires de 0 à 2hp.c. En effet, le délai est trop court pour voir les effets de la GnRH sur la croissance folliculaire. Après 12h *p.c.*, seules les lapines R<sup>+</sup> (lot 1) ont une réserve de follicules préovulatoires alors qu'elles ont toutes ovulé (Fig. 6).

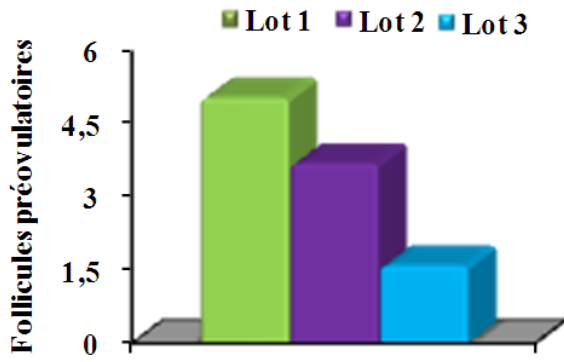


Figure 4: Nombre de follicules pré ovulatoires en fonction de la réceptivité

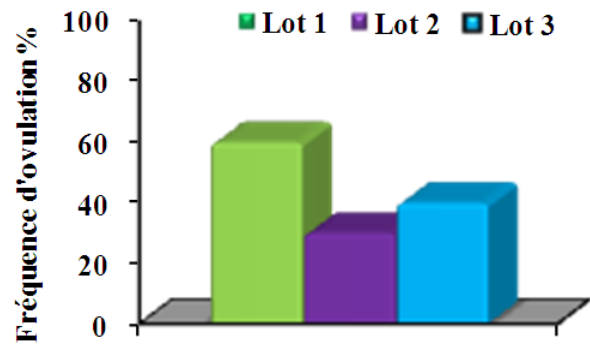


Figure 5: Fréquence d'ovulation en fonction de la réceptivité

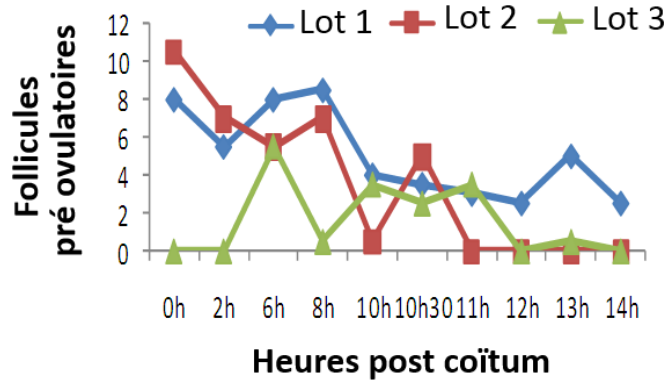


Figure 6: Follicules pré ovulatoires en fonction des stages *post coïtum*

Concernant la fréquence d'ovulation, ici il s'agit de fréquences cumulées (Fig. 7), aucune lapine n'a ovulé de 0 à 8 h *p.c.*, mais à partir de 10h, 100% des R+ ont ovulé. Par contre, pour les lapines R- nous observons encore des ovulations de 10 à 14h*p.c.*, l'ovulation est donc

retardée chez les R-. Peut-être aurions-nous observé des ovulations si nous avions abattu des lapines plus tardivement. On note cependant une très légère amélioration de la fréquence d'ovulation sur les R- GnRH.

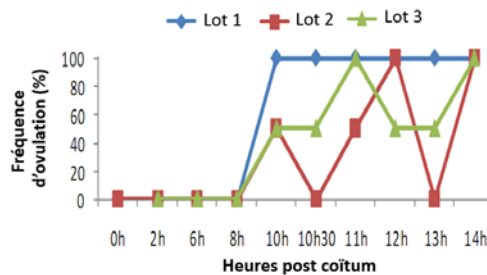


Figure 7: Fréquence d'ovulation en fonction des stades *post coïtum*

**2. Etude morphométrique des cornes utérines**

Le poids des cornes utérines varie significativement en fonction de la réceptivité

des lapines (Fig. 8). En effet, il est plus élevé chez les lapines (R+) comparé aux deux autres lots 27%;  $p < 0,05$ ).

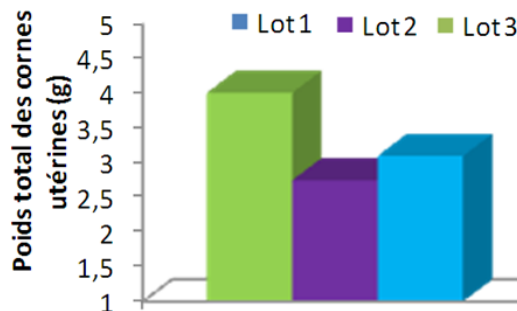


Figure 8 : Poids total des cornes utérines des lapines des 3 lots

Le poids des cornes utérines n'est pas influencé par le stade *p.c.* Ni la longueur des cornes ni leur périmètre ne sont influencés par

la réceptivité ou le stade physiologique des lapines dans les 14 h suivant l'accouplement (Tableau 2).

Tableau 2: Morphométrie des cornes utérines

	Effectif	Poids (g)	Longueur (mm)	Périmètre (mm)
Moyenne générale	60	3.28	7.20	1.34
Lot		$p < 0.05$	NS	NS
1 (R <sup>+</sup> )	20	4.01 <sup>a</sup>	7.53	1.40
2 (R <sup>-</sup> )	20	2.75 <sup>b</sup>	6.71	1.33
3 (R <sup>-</sup> + GnRH)	20	3.08 <sup>b</sup>	7.35	1.30
Stade <i>p.c.</i>		NS	NS	NS
0h	6	3.54	8.18	1.36
2h	6	2.51	7.70	1.03
6h	6	3.20	8.34	1.24
8h	6	3.26	6.89	1.32
10h	6	2.57	6.93	1.23
10h30	6	4.56	6.07	1.68
11h	6	3.40	6.16	1.62
12h	6	3.47	7.58	1.23
13h	6	2.71	6.72	1.22
14h	6	3.58	7.40	1.47
Lot*stade <sup>(1)</sup>		NS	NS	NS

(1) Interaction lot \* stade

### 3. Dénombrement des différentes populations folliculaires dans la phase *post coïtum*

Le nombre de follicules primaires est significativement plus faible chez les femelles réceptives que chez les non réceptives traitées ou pas avec du GnRH (respectivement 18,1 vs 24,0 et 22,2) (Tableau. 3).

Le stade *post coïtum* influence significativement leur nombre. En effet, à 13h et 14h *p.c.* il est généralement plus élevé qu'à des stades plus précoces. Cependant, le lot interagit avec le stade.

Tableau 3: Dénombrement folliculaires dans la phase *post coïtum*

	Follicules						
	Effectif	Primaires	Secondaires	Tertiaires	Préovulatoires	Atrésiques	Rompus
Moyenne générale	60	21.4	22.5	8.7	1.7	1.3	1.8
Lot		$p < 0.05$	$p < 0.05$	NS	NS	NS	NS
1 R <sup>+</sup>	20	18.1 <sup>a</sup>	19.1 <sup>a</sup>	9.3	1.8	0.8	2.5
2 R <sup>-</sup>	20	22.2 <sup>b</sup>	26.2 <sup>b</sup>	8.8	2.0	1.9	1.1
3 R <sup>-</sup> + GnRH	20	24.0 <sup>b</sup>	22.3 <sup>ab</sup>	8.2	1.4	1.3	1.9
Stade <i>p.c.</i>	NS	$p < 0.05$	NS	NS	$p < 0.05$	NS	$p < 0.05$
0h	6	18.3 <sup>bc</sup>	22.3	11.2	1.8 <sup>ab</sup>	1.3	0.0 <sup>a</sup>
2h	6	21.7 <sup>abc</sup>	24.3	8.0	2.5 <sup>ab</sup>	1.3	0.0 <sup>a</sup>
6h	6	20.8 <sup>bc</sup>	24.0	7.7	3.0 <sup>a</sup>	0.7	0.0 <sup>a</sup>
8h	6	19.5 <sup>bc</sup>	20.2	6.7	1.8 <sup>ab</sup>	1.7	0.0 <sup>a</sup>
10h	6	17.0 <sup>c</sup>	23.7	9.5	1.5 <sup>ab</sup>	2.2	1.5 <sup>ab</sup>
10h30	6	22.7 <sup>abc</sup>	19.0	7.7	1.7 <sup>ab</sup>	0.8	2.5 <sup>ab</sup>
11h	6	18.0 <sup>c</sup>	18.0	7.0	2.0 <sup>ab</sup>	1.7	3.0 <sup>ab</sup>
12h	6	21.5 <sup>abc</sup>	18.3	9.2	1.5 <sup>ab</sup>	1.0	3.5 <sup>ab</sup>
13h	6	25.8 <sup>a</sup>	27.8	11.0	1.2 <sup>ab</sup>	1.8	2.3 <sup>ab</sup>
14h	6	28.8 <sup>a</sup>	27.5	9.5	0.2 <sup>b</sup>	0.3	5.2 <sup>b</sup>
Lot*stade <sup>(1)</sup>		$p < 0.001$	NS	NS	NS	NS	NS

En effet, la figure 9, montre que ce sont surtout les lapines (R<sup>-</sup>) non traitées avec du GnRH qui

ont une augmentation importante du nombre de follicules primaires à 13h p.c.

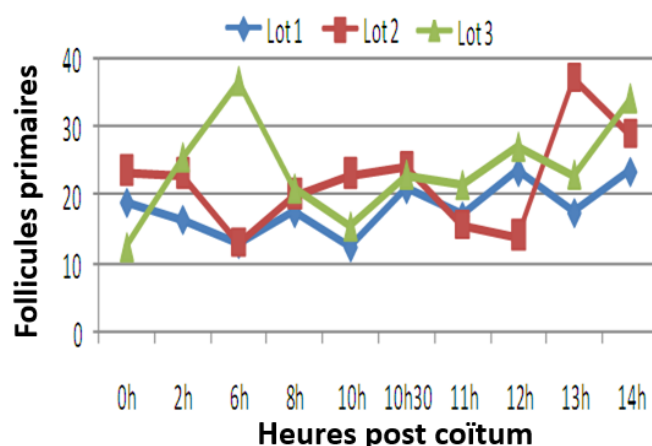


Figure 9: Nombre moyen de follicules primaires des lapines dans la phase *post coïtum*

Le nombre de follicules secondaires est significativement plus élevé chez les lapines (R<sup>-</sup>) que chez les femelles (R<sup>+</sup>) (respectivement 26,2 vs 19,1), il est intermédiaire chez les

lapines R<sup>-</sup> traitées avec du GnRH (22,3) (Fig. 10). Le stade *post coïtum* n'influence pas le nombre de follicules secondaires.

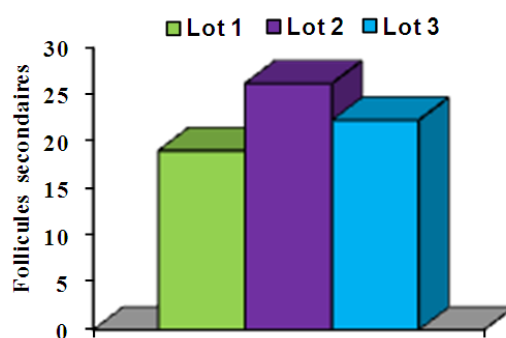


Figure 10: Nombre moyen des follicules secondaires des lapines des 3 lots.

Le nombre de follicules tertiaires ne varie significativement ni en fonction de l'expression de la réceptivité des lapines (traitées ou non), ni en fonction du stade physiologique p.c. Le nombre de follicules atrésiques des lapines est plus important chez les lapines (R<sup>-</sup>) (respectivement 0,8, 1,9 et 1,3). Néanmoins, cette différence n'est pas

significative. Dans la phase *post coïtum* (Fig. 11), le nombre de follicules atrésiques ne varie pas significativement. Chez les lapines R<sup>+</sup>, le nombre moyen de follicules atrésiques est peu variable (entre 0 et 2,5), alors qu'il est beaucoup plus variable chez les non réceptives traitées ou non au GnRH (R<sup>-</sup> + GnRH) ou (R<sup>-</sup>).

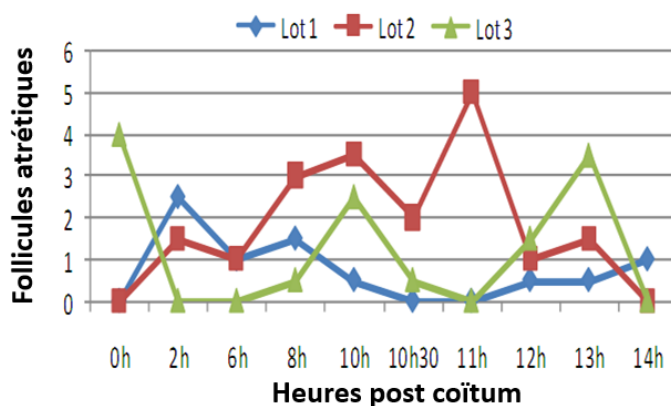


Figure 11 : Nombre moyen de follicules atrésiques des lapines dans la phase *post coïtum*

Enfin, le nombre de follicules rompus est plus élevé chez les (R<sup>+</sup>), cependant, la différence n'est pas significative. Par contre, le nombre de follicules rompus diffère significativement en fonction du stade *p.c.* En effet, aucune ovulation n'est constatée dans les 8 premières heures, les premières sont observées à 10h *p.c.*,

le nombre de follicules rompus, augmente généralement pour atteindre un maximum à 14h *p.c.* (5,2), nous notons que l'augmentation du nombre de follicules rompus, est beaucoup plus régulière sur les lapines (R<sup>+</sup>). L'aspect histologique des follicules atrophiques, corps des Call et Exner et follicules rompus est illustré sur la figure 12.

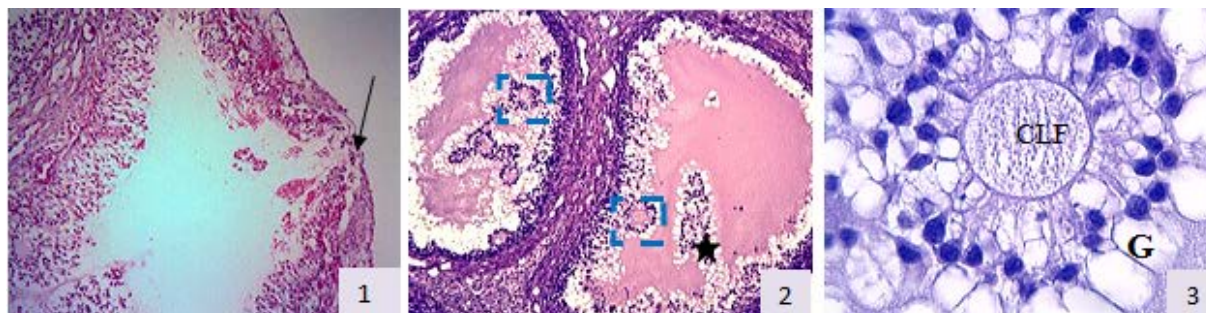


Figure 12: Coupes d'ovaire de lapine. 1 : Follicule rompu. (Flèche) indiquant le point d'ovulation. 2. Follicules atrophiques. (astérisques) indiquant dégénérescence de la granulosa et présence de cellules pycnotiques. Corps de Call et Exner (dans les carrés) et 3: Corps de Call et Exner (couronne de cellules de la granulosa (G) (Grossissement  $\times 400$ ) disposées autour d'une cavité pleine d'un liquide semblable au liquide folliculaire (CLF) (Coloration hématoxyline & éosine)

#### 4. Etude morphométrique des follicules antraux dans la phase post coïtum

Le diamètre des follicules antraux diffère significativement en fonction de la réceptivité et du stade physiologique des lapines. En effet, le diamètre des follicules antraux des femelles ayant subi une saillie assistée et traitées avec la GnRH est significativement plus élevé comparé (respectivement 567, 604 vs 722 $\mu$ m) aux lots 1 et 2 (+19% ;  $p < 0,001$ ). Le diamètre des follicules antraux des ovaires à 2h, 8h, 12h et 14h *p.c.* est significativement supérieur comparé à celui de 0h *p.c.* (+24%) et à celui de 13h *p.c.* (+23%).

Le diamètre des ovocytes ne diffère pas significativement en fonction du lot et en fonction du stade *p.c.* En effet, le diamètre des ovocytes des lapines des 3 lots, dans la phase *p.c.* est très proche, il ne varie que de 92  $\mu$ m à 103  $\mu$ m de diamètre. De même, l'épaisseur de la zone pellucide autour des ovocytes ne varie pas en fonction du lot. Cependant, l'épaisseur de la zone pellucide est faible en particulier à 0h et 8h *p.c.* (15  $\mu$ m) augmente en particulier à partir de 10h30 *p.c.* et ne diffère plus significativement par la suite (Tableau 4).

Le nombre de corps de Call et Exner est significativement influencé par le lot et le stade *post coïtum*. En effet, le nombre de corps de Call et Exner ne varie pas significativement en fonction de la réceptivité, cependant, il est important chez les lapines R<sup>-</sup> traitées au GnRH (respectivement 2, 81, 3, 20 vs 3,99, + 30%,  $p < 0,001$ ).

Le lot et le stade *p.c.* interagissent sur le nombre de corps de Call et Exner  $p < 0,001$ . En effet, on remarque chez les seules lapines (R<sup>-</sup>) traitées au GnRH que le nombre de Call et Exner est supérieur dans les heures qui suivent l'accouplement (de 0 à 2h *p.c.*) (Fig. 13).

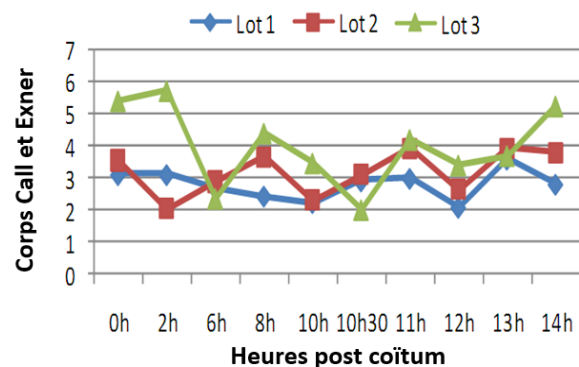


Figure 13 : Nombre de Call et Exner dans les follicules des lapines dans la phase *post coïtum*

Tableau 4: Morphométrie des follicules antraux dans la phase *post coïtum*

	Effectif	Diamètre Follicules ( $\mu\text{m}$ )	Diamètre ovocyte ( $\mu\text{m}$ )	Epaisseur zone pellucide ( $\mu\text{m}$ )	Nombre corps Call Exner
Moyenne générale	422	640	99	17	3.32
$R^2$		0.142	0.054	0.088	0.208
Lot		$p<0.001$	NS	NS	$p<0.001$
1 R <sup>+</sup>	156	567 <sup>a</sup>	99	17	2.81 <sup>a</sup>
2 R <sup>-</sup>	123	604 <sup>a</sup>	97	17	3.20 <sup>a</sup>
3 R <sup>-</sup> + GnRH	143	722 <sup>b</sup>	99	18	3.99 <sup>b</sup>
Stade <i>p.c.</i>		$p=0.092$	NS	$p=0.098$	$p<0.001$
0h	50	532 <sup>a</sup>	101	15 <sup>a</sup>	4.03 <sup>a</sup>
2h	45	714 <sup>b</sup>	101	18 <sup>ac</sup>	3.64 <sup>a</sup>
6h	43	608 <sup>ab</sup>	103	17 <sup>ac</sup>	2.64 <sup>bc</sup>
8h	43	718 <sup>b</sup>	101	15 <sup>a</sup>	3.51 <sup>ac</sup>
10h	38	595 <sup>ab</sup>	96	13 <sup>b</sup>	2.68 <sup>c</sup>
10h30	34	630 <sup>ab</sup>	92	20 <sup>c</sup>	3.70 <sup>a</sup>
11h	29	606 <sup>ab</sup>	94	16 <sup>abc</sup>	2.72 <sup>c</sup>
12h	57	669 <sup>b</sup>	101	19 <sup>ac</sup>	3.74 <sup>a</sup>
13h	42	542 <sup>a</sup>	97	18 <sup>ac</sup>	3.95 <sup>a</sup>
14h	41	700 <sup>b</sup>	99	19 <sup>ac</sup>	2.67 <sup>c</sup>
Lot*stade		$p=0.052$	NS	NS	$p<0.001$

### 5. Dosages hormonaux

La concentration plasmatique de 17 $\beta$ -œstradiol est en moyenne de 221pg/ml, elle est significativement influencée par la réceptivité. En effet, les lapines non réceptives traitées au GnRH présentent une concentration plasmatique en 17 $\beta$ -œstradiol plus élevée en particulier avec les lapines réceptives (+48% ;  $p<0,05$ ) et ceci pratiquement tout au long de la période observée (0h à 14h *p.c.*).

La concentration plasmatique en progestérone (moyenne : 1,25 ng/ml), ne varie pas significativement en fonction de la réceptivité et/ ou du traitement de GnRH. Nous remarquons qu'entre 0h et 8h *p.c.*, son taux moyen était de 2,12 ng/ml. Il subit une chute drastique au moment de l'ovulation (10h *p.c.*) : 0,69 ng/ml (Tableau 5).

Tableau 5: Concentrations plasmatiques de 17 $\beta$  oestradiol et de la progesterone

	Effectif	17 $\beta$ -œstradiol (pg/ml)	Progestérone (ng/ml)
Moyenne générale	60	221	1.25
Lot		$p<0.05$	NS
1 (R <sup>+</sup> )	20	163 <sup>a</sup>	1.14
2 (R <sup>-</sup> )	20	188 <sup>ab</sup>	1.23
3 (R <sup>-</sup> + GnRH)	20	311 <sup>b</sup>	1.36
Stade <i>p.c.</i>		NS	$p<0.005$
0h	6	244	2.10 <sup>ab</sup>
2h	6	229	2.02 <sup>abc</sup>
6h	6	228	2.79 <sup>a</sup>
8h	6	205	1.57 <sup>abcd</sup>
10h	6	210	0.69 <sup>d</sup>
10h30	6	256	0.96 <sup>bcd</sup>
11h	6	199	0.74 <sup>cd</sup>
12h	6	200	0.59 <sup>d</sup>
13h	6	233	0.38 <sup>d</sup>
14h	6	203	0.63 <sup>d</sup>
Lot*stade <sup>(1)</sup>		NS	NS



## DISCUSSION

### 1. Influence de la réceptivité et du traitement de GnRH des lapines non-réceptives sur les caractéristiques ovariennes et utérines et la sécrétion d'œstradiol et de progestérone

Nous constatons que les femelles ayant une vulve rouge et turgescente ont accepté l'accouplement dès leur première présentation au mâle, elles étaient réceptives (lot 1). En revanche, les femelles des lots 2 et 3, avec une vulve pâle et non turgescente ont refusé l'accouplement pendant deux jours consécutifs de présentation, elles étaient non réceptives. Nos résultats sont en accord avec les données de la littérature. En effet, plusieurs auteurs ont montré que la réceptivité est maximale (90%) quand la couleur de la vulve est rouge et minimale quand elle est pâle. Olas et Oygbad, ainsi que Iles et al. [8; 9] ont assigné à chaque femelle une faible ou haute réceptivité selon la couleur de la vulve et sa turgescence. En effet, les femelles avec une vulve pâle ou violette mais non turgescente sont peu réceptives et celles à vulve rose, rouge ou violette et turgescente sont hautement réceptives. De plus, Diaz et al. [10] ont montré des défauts de fécondation chez les femelles avec une vulve blanche ou pâle. Malgré le caractère subjectif de cette estimation, en insémination artificielle, l'appréciation de la couleur de la vulve est parfois utilisée afin d'estimer la réceptivité des femelles [11].

Dans notre expérience, au moment de la présentation des lapines au mâle, le poids des femelles réceptives était significativement plus élevé que celui des femelles non réceptives traitées ou non avec la GnRH. Il existe très peu de résultats bibliographiques concernant la relation entre la réceptivité sexuelle et le poids des lapines et notamment chez la lapine de population locale algérienne. Cependant, une étude récente sur des lapines primipares, a montré que le poids des lapines locales réceptives ne diffère pas de celui de lapines non réceptives [12]. Sur des lapines nullipares de type génétique différent Hulot et al. ainsi que Mattaraia et al. [13 ; 14], ont montré que les femelles réceptives étaient plus lourdes que les non réceptives.

Dans nos conditions expérimentales, chez des lapines nullipares le poids et la taille des ovaires des femelles réceptives ne diffère pas de ceux des femelles non réceptives traitées ou non à la GnRH.

Le poids des ovaires des lapines était en moyenne de 0,28 g, comparable à celui enregistré par Belabbas et al. [15], chez des femelles de la même population et du même âge et similaire aux résultats enregistrés par Mattaraia et al. [14], qui ont montré que le poids des ovaires des femelles ne diffère pas selon leur réceptivité (0,24 et 0,20g ;  $p > 0,05$ ).

Les femelles réceptives ont un nombre plus élevé de follicules pré ovulatoires comparé aux non réceptives traitées ou non avec du GnRH (5,1 vs 3,7 et 1,6). Lefevre et Caillol [16], ont montré que la moyenne du nombre de follicules pré ovulatoires est significativement plus élevée chez les femelles réceptives ( $2,4 \pm 0,8$ ) que les femelles non réceptives ( $0,3 \pm 0,2$ ). Kermabon et al. [4], ont mis en évidence que l'expression de la réceptivité sexuelle de la lapine est corrélée à la présence d'un nombre élevé de follicules à la surface de l'ovaire mesuré aux jours 1, 4 et 11 de lactation. Comparé aux non réceptives, les femelles réceptives présentent un plus grand nombre de follicules ( $9,81 \pm 0,35$  vs  $8,32 \pm 0,56$ ). L'augmentation de la croissance folliculaire et le nombre de follicules pré ovulatoires et par conséquent la réceptivité de la femelle est améliorée par la PMSG qui est couramment utilisée chez la lapine allaitante [17]. Le pourcentage de lapines réceptives ayant ovulé est le double (60%) comparé aux femelles non réceptives et non traitées au GnRH (30 %). Le traitement des lapines au GnRH a légèrement amélioré leur fréquence d'ovulation (40%), cependant, la différence n'est pas significative. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Theau-Clément et al. [18], qui en induisant l'ovulation dans 3 lots de femelles Angora avec 25UI ou 50UI d'hCG ou 0,8µg de GnRH, ont montré que le pourcentage de femelles qui ovulent est significativement amélioré par rapport à un lot témoin n'ayant subi qu'une saillie assistée. Le traitement hormonal a donc amélioré significativement la fréquence d'ovulation des lapines (86% contre 28%). Chez les lapines de chair Theau-Clément et al. [19], ont montré que plus de 95% des femelles réceptives au mâle ovulent après une saillie naturelle ou à la suite d'une injection de GnRH. Alors que sur le lapin Angora [18], toutes les femelles saillies étaient réceptives, les défauts d'ovulation restent inexplicables. Il est cependant peu probable qu'ils soient liés à un manque de follicules mûrs dans l'ovaire puisqu'après traitement hormonal (GnRH ou hCG) les taux d'ovulation sont normaux.

Le poids des cornes utérines varie en fonction de la réceptivité des lapines, tandis que ni la longueur des cornes, ni leur périmètre ne sont influencés par la réceptivité. Nous n'avons trouvé dans la littérature aucune étude qui nous renseigne sur les caractéristiques des cornes utérines en fonction de la réceptivité. Seule, une étude récente, effectuée sur des lapines New Zélandaises pesant en moyenne 2 Kg et dont la couleur de la vulve était rose pâle (femelle non réceptive). Aragón et al. [20], ont montré que la longueur des cornes utérines était égale à 8,2 cm, donc proche de nos mesures sur les femelles non réceptives qui était de 6,7 cm.

L'étude microscopique a permis de dénombrer les différentes populations folliculaires dans la phase *post coitum*. Dans nos conditions expérimentales, le nombre de follicules primaires est significativement plus faible chez les femelles réceptives que chez les non réceptives traitées ou pas avec du GnRH (respectivement 18,1 vs 24,0 et 22,2). Le nombre de follicules secondaires est significativement plus élevé chez les lapines R<sup>-</sup> que chez les femelles R<sup>+</sup> (respectivement 26,2 vs 19,1), il est intermédiaire chez les lapines R<sup>-</sup> traitées avec du GnRH (22,3). Ni le nombre de follicules tertiaires, ni le nombre de follicules pré ovulatoires, atrésiques ne varie significativement pas en fonction de l'expression de la réceptivité sexuelle. Cette approche est originale, car à notre connaissance aucune étude n'a quantifié les différentes populations folliculaires chez la lapine de population locale algérienne ou autre type génétique, en fonction de la réceptivité sexuelle. Cependant, Zitný et al. [21], ont observé que le nombre de follicules primaires, secondaires, tertiaires et préovulatoires étaient (respectivement 84,8 ; 10 ; 3,9 et 1,3) et Hutt et al. [22], sur des ovaires de lapines âgées de 12 semaines ont obtenu (respectivement, 71, 72, 11 et 6).

Le nombre de follicules rompus, correspondant au nombre de corps jaunes observé macroscopiquement, est plus élevé chez les lapines R<sup>+</sup>, comparé aux femelles R<sup>-</sup> traitées ou non à la GnRH (2,5 vs 1,9 et 1,1), cependant la différence n'est pas significative. Il est en effet difficile d'évaluer exactement leur nombre sur les coupes histologiques, il est plus facile de les compter directement sur les ovaires à la loupe (présentent un stigma rouge et turgescents).

L'écart entre les valeurs des deux techniques obtenues dans nos conditions est de +26 % en faveur de la technique macroscopique.

Le diamètre des follicules antraux était significativement élevé chez les femelles R<sup>-</sup> et traitées avec la GnRH comparé aux femelles R<sup>-</sup> non traitées et R<sup>+</sup> (respectivement 722 vs 604 et 567). Le diamètre des ovocytes et l'épaisseur de la zone pellucide ne diffèrent pas significativement en fonction de la réceptivité des lapines des 3 lots étudiés. La littérature ne nous renseigne pas sur la relation entre la réceptivité sexuelle et le diamètre des follicules, des ovocytes ou de l'épaisseur de la zone pellucide. Nos résultats montrent que la moyenne du diamètre des follicules antraux est égale à 640µm. Cette valeur est proche de celle obtenue par Zitný et al. [21], qui est de 682 µm mais inférieure à celle obtenue par Kranzfelder et al. [23], qui considèrent que les follicules pré ovulatoires sont ceux dont le diamètre se situe entre 800 à 900µm. Pour Hulot et Mariana. [24], les diamètres de 800 et 951µm respectivement, sont caractéristiques du stade pré ovulatoire. Le diamètre des ovocytes est en moyenne égal à 99µm pour Zitný et al. [21].

Dans notre expérience, le nombre de corps de Call et Exner ne varie pas significativement en fonction de la réceptivité, cependant il est important chez les lapines R<sup>-</sup> traitées au GnRH (respectivement 2,81, 3,20 vs 3,99). Dans la bibliographie, aucune étude n'a été réalisée sur le dénombrement des corps de Call et Exner, seule leur morphologie a été décrite par plusieurs auteurs [25].

De manière surprenante, la concentration plasmatique de 17β-œstradiol ne diffère pas significativement selon que les lapines sont réceptives ou non réceptives (respectivement 163 et 188 pg/ml). On remarque cependant, que les non réceptives traitées avec la GnRH ont des niveaux plus élevés que les non réceptives non traitées (311 vs 188 pg/ml). La littérature, nous renseigne peu sur le dosage de 17β-œstradiol plasmatique chez les lapines nullipares aux stades *post coitum* en fonction de leur réceptivité sexuelle. Sur des lapines multipares, Ubilla et Rebollar [26], obtiennent un niveau de 17β-œstradiol plus élevé chez les lapines réceptives par rapport à celles de moyenne ou faible réceptivité (15,2±0,13 pg/ml vs 11,4±0,10 pg/ml et 11,5±0,12 pg/ml). Cependant, sur des lapines nullipares de population locale algérienne.

Mazouzi-Hadid et al. [12], ont observé des taux plasmatiques de 17 $\beta$ -œstradiol significativement supérieurs chez les réceptives que chez les non-réceptives (respectivement 21,04 vs 16,42 pg/ml).

Les niveaux significativement plus élevés de 17 $\beta$ -œstradiol chez les lapines R<sup>+</sup> traitées avec la GnRH, par rapport aux réceptives (respectivement 311 vs 163 pg/ml) pourraient être dus à l'effet de la GnRH sur la sécrétion de FSH et donc à une croissance folliculaire plus élevée dans la phase pré ovulatoire. L'œstradiol ne semble jouer aucun rôle majeur dans la détermination de la réceptivité chez la lapine. Sa concentration sérique au sein des femelles réceptives et non réceptives ne semble pas liée au phénomène de réceptivité [27].

Les concentrations plasmatiques moyennes de progestérone sont plus élevées chez les femelles non-réceptives traitées avec la GnRH par rapport aux femelles non réceptives non traitées et les femelles réceptives (respectivement 1,36 vs 1,23 et 1,14), cependant, la différence n'est pas significative. De la même manière, les résultats rapportés sur des lapines réceptives locales [27]. La progestérone ne varie pas significativement en fonction de la réceptivité 0,3842  $\pm$  0,197 ng/ml pour les lapines (R<sup>+</sup>) et 0,6827  $\pm$  0,254 ng/ml pour (R<sup>-</sup>). Sur des coupes histologiques, Terranova et al. [28], ont noté que le jeune corps jaune formé est pauvrement luteinisé à 10h *p.c* produisant ainsi une quantité limitée en progestérone.

## **2. Influence du stade post coïtum sur les caractéristiques de l'ovaire et des cornes utérines, des populations folliculaires et la sécrétion d'œstradiol et de progestérone**

Le nombre de follicules pré ovulatoires est significativement plus élevé à 6h *p.c.* qu'à 12 ou 14h *p.c.* (respectivement 6,3 vs 1,3 et 0,8). Cette réduction du nombre de follicules pré ovulatoire dans la période *post coïtum* est vraisemblablement liée à l'éclatement des follicules observés à partir de 10h *p.c.* Aucune ovulation n'a été constatée au cours des huit premières heures *post coïtum*. Les corps jaunes ont été observés à partir de 10h *p.c.* Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature. En effet, l'ovulation chez la lapine est observée généralement entre 10 à 12h après l'accouplement. De leur part, Bonhoff, et Adams [29], ont observé des ovulations à 16h chez les lapines traitées à des doses de 5 et 10UI hCG et 0,2ml GnRH ce qui est en accord avec les résultats de Boumahdi-Merad et al. [30].

Il est vraisemblable que ces différentes conclusions soient le fait de l'utilisation de lapines de type génétique et/ ou de conduite d'élevage différents.

Le diamètre des follicules à 8h *p.c.* est égal à 718  $\mu$ m et comparable aux résultats de Hulot et Mariana [24], Ces auteurs expliquent qu'à 8h *p.c.*, le noyau de l'ovocyte est au stade anaphase - télophase de la première division de maturation où l'ovocyte a expulsé son premier globule polaire. Par ailleurs, on a noté que dans les ovaires des femelles traitées 14h *p.c.* avec la GnRH, la taille des follicules est égale à 722 $\mu$ m, nos résultats sont comparables à ceux de Kranzfelder et al. [23]. Les œstrogènes ont une activité morphogénique sur les ovaires et l'utérus [31], donc leur augmentation en concentration induit une augmentation de la prolifération cellulaire dans le tissu reproducteur. Cela a été confirmé par des études dans lesquelles il a été montré qu'au début du stade de reproduction de la jeune femelle, les dimensions des organes génitaux augmentent, principalement au stade de transition avant la puberté, en relation avec le poids vif de la femelle [32 ; 33].

## **Conclusion**

Le nombre de follicules pré ovulatoires évalué macroscopiquement a varié en fonction de la réceptivité et des stades *post coïtum*. Cependant, il ne varie pas entre les trois lots expérimentaux lorsqu'il est évalué microscopiquement (sur les coupes histologiques). L'observation des coupes histologiques a révélé une grande variabilité du nombre des *follicules primaires* et *secondaires* en fonction de la réceptivité sexuelle. Par contre, ni le nombre de *follicules tertiaires, pré ovulatoires et atrésiques* ne varie en fonction de la réceptivité. Les résultats obtenus concernant les diamètres des *follicules antraux* montrent que le traitement avec la GnRH a amélioré le diamètre de ces derniers. Cependant, le diamètre des *ovocytes* et l'*épaisseur* de la *zone pellucide* n'ont pas été influencés par la réceptivité sexuelle ou le traitement hormonal. Par contre, le nombre des corps de Call Exner était plus élevé chez les femelles traitées avec la GnRH comparé à celui des femelles non traitées. Par ailleurs, le traitement à la GnRH a augmenté la concentration moyenne de 17 $\beta$ -œstradiol plasmatique chez les femelles non réceptives durant toute la période *post coïtale* (0 à 14h).

Il n'a pas été constaté un rapport évident entre le taux de  $17\beta$  œstradiol et la réceptivité sexuelle chez la lapine. Dans notre étude l'œstradiol ne semble jouer aucun rôle majeur dans la détermination de la réceptivité chez la lapine. Sa concentration sérique au sein des femelles réceptives et non réceptives ne semble pas liée au phénomène de réceptivité. Ces résultats originaux restent à vérifier sur un effectif plus important.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. **Salissard. (2013)**. La lapine, une espèce à ovulation provoquée. Mécanismes et dysfonctionnement associé : la pseudo-gestation. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 102 p.
- [2]. **Theau-Clement M. (2008)**. Facteurs de réussite de l'insémination chez la lapine et méthodes d'induction de l'oestrus. INRA Productions Animales 21 (3), pp221-230.
- [3]. **Lebas F. (2016)**. Biologie du lapin [en ligne]. Disponible sur :<http://www.cuniculture.info/Docs/Biologie/biologie-07-3.htm#1>.
- [4]. **Kermabon A.Y., Belair L., Theau-Clement M., Salesse R. & Djiane, J. (1994)**. Effects of anoestrus and bromocryptine treatment on the expression of prolactin and LH receptors in the rabbit ovary during lactation. Journal of reproduction and fertility, 102(1), 131-138.
- [5]. **Rebollar P. G., Ubilla E., Alvarino J.M. R., Illera J. C. & Silvan G. (1992)**. Effect of degree of sexual receptivity on post-partum plasma oestradiol and ovulatory response in rabbits. Revista Española de Fisiología, 48(1), 13-18.
- [6]. **Anzaldúa S.R., Camacho-Arroyo I., Reyna-Neyra A., Pérez-Martínez M. & Cerbón M. (2007)**. Regional differences in expression of progesterone receptor in oviduct and uterus of rabbit during early pregnancy. Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol., 147, 685-690.
- [7]. **Lorenzo P.L., Rebollar P.G., Illera M.J., Illera J.C., Illera M. & Alvarino J.M.R. (1996)**. Characterization of rabbit follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*". Arch.Zootec. V.45, 25 - 35.
- [8]. **Ola S. & Oygbade M.O. (2012)**. Buck effect on rabbit oestrous: vulva colour, vaginal lumen cells and ovarian follicle populations. World Rabbit Sc; 20: 71-79.
- [9]. **Ilès I., Boukhari S., Belabbes R., Boulbina I., Zenia S. & Ain Baaziz H. (2013)**. Relations entre les caractéristiques externes de la vulve et le comportement sexuel chez la lapine domestique Algérienne; Livestock Research for Rural Development 25 (8).
- [10]. **Diaz P., Rodriguez J.M., Gosalvez L.F. & Roman M.R. (1988)**. Cyclic ovarian activity in *post partum* rabbits. J. Appl. Rabbit. Res. V.10, 122-125.
- [11]. **Vicente J.S., Lavara R., Lavara F., Marco-Jiménez F. & Viudes-de-Castro M.P. (2008)**. Rabbit reproductive performance after insemination with busserelin acetate extender. Livestock Science V.115, (2008), 153-157.
- [12]. **Mazouzi Hadid F., Theau-Clément, M. & Berchiche M. (2011)**. Sécrétion de  $17\beta$ -oestradiol au moment de la saillie chez la lapine en fonction de la réceptivité et de la saison. 14<sup>ème</sup> journées de la Recherche Cunicole. Le Mans.
- [13]. **Hulot F., Mariana J.C. et Lebas F. (1982)**. L'établissement de la puberté chez la lapine (folliculogénèse et ovulation). Effet du rationnement alimentaire. Reprod. Nutr. Dev. V. 22, 439-453.
- [14]. **Mattaraia V.G.M., Bianospino E., Fernandes S., Vasconcelos J.L.M., Moura A.S.A.M.T. (2005)**. Reproductive responses of rabbit does to a supplemental lighting program Livest. Prod. Sc, V. 94, (2005), 179-187.
- [15]. **Belabbas R., AinBaziz H., Ilès I., Zenia S., Boumahdi Z., Boulbina I. & Temim S. (2011)**. Etude de la prolificité et de ses principales composantes biologiques chez la lapine de population locale algérienne (*Oryctolagus cuniculus*). Livestock Research for Rural Development. V.23 n° 3.
- [16]. **Lefevre & Caillol, (1978)**. Relationship of oestrus behaviour with follicular growth and sex steroid concentration in the follicular fluid in the domestic rabbit. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. V. 18 n°6, 143-144.
- [17]. **Theau-Clément M. (2001)**. Etude de quelques facteurs de contrôle de l'interaction entre la lactation et la reproduction chez la lapine conduite en insémination artificielle, Thèse de doctorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, Toulouse, 103p.
- [18]. **Theau-Clément M., Thebault R.G., Bolet G. & De Rochambeau H. (1991)**. La reproduction du lapin Angora de souche française: ovulation chez la femelle, production de semence chez le mâle. Reprod.Nutr.Dev.V. 31, 667-673.
- [19]. **Theau-Clément M., Bolet G., Roustan A. et Mercier P. (1990)**. Comparaison de différents modes d'induction de l'ovulation chez les lapines multipares en relation avec leur stade physiologique et la réceptivité au moment de la mise à la reproduction". 5<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche Cunicole. Paris (France), communication n° 7.

- [20]. **Aragón H. J., Suárez S.J. & Pérez-Martínez M. (2010).** Morphometric characteristics of female reproductive organs of New Zealand rabbits with different body weight in peripuberal period of transition. *Vet. Mex.*, 41(3):211-8, 2010.
- [21]. **Zitný J., Massányi P., Trakovická A., Rafaj J. & Toman R. (2004).** Quantification of the ovarian follicular growth in rabbits. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* V.48, 37-40.
- [22]. **Hutt K.J., McLaughlin E.A. & Holland, M.K. (2006).** Primordial follicle activation and follicular development in the juvenile rabbit ovary. *Cell. Tissue. Research.* V.326, 809–822.
- [23]. **Kranzfelder D., Korr H., Mestwerdt W. & Maurer-Schultze B. (1984).** Follicle growth in the ovary of the rabbit after ovulation-inducing application of human chorionic gonadotropin. *Cell.Tissue. Res.* V. 238, 611-620.
- [24]. **Hulot F. & Mariana J.C. (1985).** Effet du génotype, de l'âge et de la saison sur les follicules préovulatoires de la lapine 8 heures après la saillie. *Reprod. Nutr. Dev.* V. 25, 17-32.
- [25]. **Lee V.H., Britt J.H. & Dunbar B.S. (1996).** Localization of laminin proteins during early follicular development in pig and rabbit ovaries. *J Reprod Fertil* V.108 115–122.
- [26]. **Ubilla I. & Rebollar P.G. (1994).** A study on the evolution of sexual receptivity and plasma oestradiol17 beta levels throughout the lactation period, in rabbits. *Cahiers Options Méditerranéennes.*V.8, CIHEAM-IAMZ. 377-381.
- [27]. **Boudhen M.A. (2016).** Profil endocrinien de la lapine suivant la réceptivité sexuelle Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Magistère en Sciences vétérinaires Option : Physiologie, Pharmacodynamie et Thérapeutique.Université des frères Mentouri, Constantine.81p.
- [28]. **Terranova P.F., Saidapur S.K. & Greenwald G. S. (1980).** *In-vitro* steroidogenesis of newly formed corpora lutea and the non-luteal ovary in the rat, rabbit, hamster and guinea-pig. *J.Endocr.*V.84, 101-108.
- [29]. **Bonhoff A.J. & Adams C.E. (1985).** Relationship of hormonally induced developmental changes in preovulatory follicles of the rabbit. *Lab. Anim.* V.19, 27-31.
- [30]. **Boumahdi-Merad Z., Belabbas R., Theau-Clément M., Berbar A. & Kaidi, R. (2011).** Etude des modifications histologiques ovariennes après l'accouplement en fonction de la réceptivité sexuelle chez les lapines de population locale. IV èmes Journées Vétérinaires. Université Saad DAhlab Blida. 28 & 29 Novembre 2011.
- [31]. **Bai W., Oliveros-Saunders B., Wang Q., Acevedo-Duncan M. & Nicosia S.V. (2000).** Estrogen stimulation of ovarian surface epithelial cell proliferation. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 36(10):657-66.
- [32]. **Aragón H. J., Suárez S. J. & Pérez-Martínez M. (2010).** Morphometric characteristics of female reproductive organs of New Zealand rabbits with different body weight in peripuberal period of transition. *Vet. Mex.*, 41(3):211-8,
- [33]. **Aragón-Hernández J., Flores-Pérez F.I; Hallal-Calleros C. & Pérez-Martínez M. (2013).** Macroscopic Morphometric Analysis of Genital Organs of Rabbit does with Differing Parturitions at 24 Hours Post-weaning *Int. J. Morphol.*, 31(3):991-996.

## CHARACTERIZATION OF POSTHARVEST PHYSIOLOGY OF THERMISED DATES (*PHOENIX DACTYLIFERA* L.), PACKED UNDER A MODIFIED ATMOSPHERE (MAP).

MAROUF ARIBI Mohamed <sup>1\*</sup> and KHALI Mustapha <sup>3,2</sup>

1. Department of Biotechnology, Laboratory of Biotechnology and Plant Productions, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Blida 1, B.P 270 Road of Soumâa-Blida, Algeria.
2. Department of Biotechnology, Laboratory for the Protection and Valorisation of Agrobiological Resources, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Blida 1, B.P 270 Road of Soumâa-Blida, Algeria
3. General Manager of the Technical Center for Agri-Food Industry (CTIAA), Ibn Khaldoun Street Boumerdès B.P 71A, Algeria.

Reçu le 09/07/2019, Révisé le 10/09/2019, Accepté le 08/10/2019

### Abstract

**Description of the subject:** The quality of the fruit is largely determined by growing conditions, a link must be made between this initial quality, linked to the agronomic conditions, and the preservation of this quality, linked to the harvest and the techniques of conservation or maturation applied thereafter. This study therefore focuses on the physiological characterization of the date stored under MAP after harvest and in the course of conservation.

**Objective:** The effect of PET packaging on the postharvest physiology of Deglet-Nour Dates (*Phoenix dactylifera* L.) during storage was studied under different storage conditions (22°C ±1°C and 75-80% RH, 10°C ±2°C and 85-90% RH).

**Methods:** The experimental setup consists of a box with internal dimensions of 7.5×15.00×7.5 cm. It is made of PET film thickness 0.0025 mm. The modified atmosphere inside the box is generated by the exchange between the product and the outside through the film. The dates are packaged in batches of 350g ±5g. The date samples were divided into two groups of batches with six samples each, corresponding to the storage period (0, 1, 2, 3, 4 and 5 months) before to be tested for the first at room temperature (22°C ±1°C) with a relative humidity of 75% to 80% and the second at low temperature of 10°C ±2°C with a relative humidity of 85% to 90%.

**Results:** We found that PET packaging to limit respiratory intensity during storage. The O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> concentration of the samples stored under PET (at 22°C ±1°C) after harvesting at the Tamar stage experienced a sharp decrease in oxygen (from 20.25% to 12.86%). Likewise, the PET film packaging limited the degassed CO<sub>2</sub> concentration after seven hours of storage compared to the control sample. After harvest, dates showed a typical respiration of non-climacteric fruit (less than 5 mmoles O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) and low ethylene production thus with very low metabolic activities.

**Conclusion:** The combination of thermization-packaging and cold storage (10°C ±2°C) is a storage method that ensures an optimal physiological criterion for dates by limiting their respiratory activity. Deglet-Nour dates so packaged in PET packaging, pre feel excellent storage ability beyond the five months tested.

**Keywords:** Post-harvest, Cold storage, Respiratory activity, PET packaging, Thermization.

### CARACTÉRISATION DE LA PHYSIOLOGIE POST-RÉCOLTE DES DATES THERMISÉES (*PHOENIX DACTYLIFERA* L.), EMBALLÉES SOUS UNE ATMOSPHERE MODIFIÉE (MAP)

#### Résumé

**Description du sujet :** La qualité du fruit est largement déterminée par les conditions de croissance, un lien doit être établi entre cette qualité initiale, liée aux conditions agronomiques, et la préservation de cette qualité. Cette étude se concentre donc sur la caractérisation physiologique de la datte stockée sous MAP après récolte et en cours de conservation.

**Objectifs :** L'effet des emballages en PET sur la physiologie post-récolte des dattes Deglet-Nour (*Phoenix dactylifera* L.) pendant le stockage a été étudié dans différentes conditions de stockage.

**Méthodes :** Le montage expérimental consiste à des boîtes fabriquées en PET. L'atmosphère modifiée à l'intérieur de la boîte est générée par l'échange entre le produit et l'extérieur à travers le film. Les dattes sont emballées par lots de 350 g ±5 g. Les échantillons de dattes ont été divisés en deux groupes de lots de six échantillons correspondant chacun à la période de stockage (0, 1, 2, 3, 4 et 5 mois) avant d'être testés en premier lieu à température ambiante (22°C ± 1°C) avec une humidité relative de 75% à 80% et la seconde à basse température de 10°C ± 2°C avec une humidité relative de 85% à 90%.

**Résultats :** Les emballages en PET limitaient l'intensité respiratoire pendant le stockage. La concentration en oxygène et en CO<sub>2</sub> des échantillons stockés sous PET (à 22°C ±1°C) après la récolte au stade Tamar a connu une forte diminution de l'oxygène (de 20,25% à 12,86%). De même, les emballages en film PET ont limité la concentration en CO<sub>2</sub> dégazé après sept heures de stockage par rapport à l'échantillon témoin. Après la récolte, les dattes montraient une respiration typique des fruits non climatériques (moins de 5 mmol O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) et une faible production d'éthylène, donc avec une activité métabolique très faible.

**Conclusion :** La combinaison de la thermisation-conditionnement et de la conservation au froid (10°C ±2°C), est une méthode de conservation qui assure un critère physiologique optimal pour les dattes et offrent une excellente capacité de stockage au-delà des cinq mois testés.

**Mots clés :** Poste récolte, Conservation au froid, Activité respiratoire, Film PET, Thermisation.

\* Auteur correspondant: MAROUF ARIBI Mohamed, E-mail: mar-bio-tp@live.fr

## INTRODUCTION

Deglet-Nour is the commercial variety that occupies most of the international date trade [1, 2, 3, 4]. For Algeria, it represents 60% of the dates produced, that is to say 40% of the total revenue of agricultural exports [5]. The economic and commercial importance of this fruit is paramount. The knowledge of the physiology of the date is necessary to be able to better control the maturation, and thus to recommend the best conditions of storage.

The shelf life of fruits and vegetables can be extended by modifying the surrounding atmosphere of these products in the packaging (Modified Atmosphere Packaging, MAP) or in controlled atmosphere storage chambers (Controlled Atmosphere Storage, CAS). Fresh produce is only found under MAP because the composition of the MAP atmosphere tends to be longer to change with the respiratory activity and microbiological activity of the fruit [6, 7, 8]. In addition, the permeability of the gas packaging film also modifies the composition [9].

The three main gases used are CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> and O<sub>2</sub>, alone or in combination [10]. Other gases have been successful such as CO, SO<sub>2</sub>, NO, He, H<sub>2</sub>, Ar, etc. For these gases their applications have been very limited due to regulations (health hazards) and organoleptic and technical problems associated with them [11]. N<sub>2</sub> is a gas with no antimicrobial activity but its main role is to substitute for O<sub>2</sub> in MAP [12]. In the absence of O<sub>2</sub>, only strict or facultative anaerobic microorganisms can develop [12]. In addition, it is responsible for several alteration reactions such as oxidation, acceleration of ripening of fruits and vegetables [8]. The principle of modified atmospheres is based on the use of a specific gas mixture with determined concentrations of CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, and N<sub>2</sub>, which play a definite role in the physiology of living products, which are plants and also in fungal attacks. Varoquaux and Nguyen-The [13], give a very simple definition: a modified atmosphere is simply a conservation atmosphere whose composition is different from that of air and can result for living tissues from a balance between respiratory exchanges of plant product and gaseous diffusion through a semipermeable membrane.

Some fresh vegetable products and especially products of 4th and 5th ranges have been the subject of many works for their conservation in so-called "modified" atmospheres (also called MAP=Modified Atmosphere Packaging) or "controlled" atmospheres (also called CAP=controlled atmosphere packaging [14, 15, 13].

This work has led to tremendous progress in the development of biodegradable and edible packaging [16, 17, 18, 19], and many theoretical models to predict respiration rates of fresh products as a function of CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> concentration have been proposed [20, 21, 22, 23].

This bibliographic prolixity contrasts with the virtual absence of work on the application of MAPs or CAPs to dates, which do not seem to have yet - at this stage-attracted this interest. The rare studies on packaging and dates. Glasner *et al.* and Awad [24, 25], have focused on increasing maturation of dates in diets and not as post-harvest conservation atmospheres.

In the literature, the use of modified or controlled atmospheres for plant products is often associated with low temperature storage. All of these studies, although combining various percentages of CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub>, provided by different modified atmospheres, have for the most part shown positive effects [26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33].

The use of innovative packaging technologies (modified atmosphere packaging, active and intelligent packaging) for dates is on a relatively limited basis as compared to some other fruits [34]. However, potential exists to expand these technologies to dates and date products to further improve their shelf life and nutritional quality [34]. The effects of MAP in maintaining quality and extending shelf life of fresh and dried dates as well as some date products have been reported in the literature [34]. Packaging protects dates from physical damage, moisture absorption or loss and insect reinfestation during subsequent storage and handling steps [34].

Losses during harvesting and postharvest handling and marketing are high in most producing countries due to incidence of physical, physiological, and pathological disorders and to insect infestation [36]. Many different types of polymer films are available for use in MAP with a wide range of CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> permeabilities [37]. In addition, many models have been developed to predict equilibrium package atmospheres for passive MAP [22, 38]. However, none of these models can fully account for the variability in product respiration rates that may occur due to variation in holding temperature, product age, interactions with atmosphere composition, product biology, and effects of handling [22]. Plastics with high barrier to oxygen are polyethylene terephthalate (PET), Nylon 6 (0% RH), Nylon MXD6, ethylene vinyl alcohol (EVOH), polyvinyl alcohol (PVOH), etc. [39]. The response of different fruits and vegetables to atmosphere modification varies considerably and therefore the response of each commodity must be determined [40].

The proposed alternative is a physical treatment - dry cure - at 55°C for 20 min as a disinsectisation treatment, associated with a modified PET atmosphere packaging and to follow their simple or combined actions on the respiration of the date (*Phoenix dactylifera* L.) over a period of five months of cold storage (10°C) and at room temperature (22°C). The combination of heat loss is reported [23, 41].

According to Khali [41], on different thermal scales tested, the thermization at 55°C/20 min, showed a significant reduction in the infestation of dates (destruction of eggs and larvae of *Ectomyelois ceratoniae* Zellers), in more of a more positive influence on the main quality criteria of the date and a better preservation of organoleptic and sensory characteristics.

## MATERIALS AND METHODS

### 1. Plant material

The Deglet Nour variety dates, coming from the Tolga palm grove (Wilaya of Biskra-Algeria), were harvested on different regimes at the end of October (at Tamar stage), then transported and kept in cold rooms at 4°C. The dates are sorted and separated from their branches and the infested or crushed dates are eliminated.

### 2. Thermization

The thermization is carried out for 20 minutes in a ventilated oven set at 55°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). A not-thermised control batch is constituted. Dates (Thermised or Not) are divided into homogeneous batches in plastic trays.

### 3. AM creation methods

The Modified Atmosphere within the plastic packages can be created actively or passively or by a combination of both. In our case of the passive method, the modified atmosphere is created by a dynamic in which product respiration and gas exchange occur through the packaging. In a closed package containing dates, the atmosphere is naturally modified as a result of oxygen consumption and carbon dioxide production. Optionally, a stationary concentration deemed optimal can be established in the case where the flow of gas through the package compensates exactly the breathing of the product.

### 4. The properties of the film packaging for modified atmosphere

Modified Atmospheres or MAPs are ensured by the use of Polyethylene Terephthalate Polyester (PET). Control lots are packaged in a macroperforated non-sealed film and are considered unpackaged (Table 1).

Table 1: Physical characteristics of the films used. Source: © Goodfellow (2008 – 2019) [90].

	Permeability to Oxygen at 25°C $\times 10^{-13} \text{ cm}^3 \cdot \text{cm} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$	Permeability to Carbon Dioxide at 25°C $\times 10^{-13} \text{ cm}^3 \cdot \text{cm} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$	Permeability to Water at 25°C $\times 10^{-13} \text{ cm}^3 \cdot \text{cm} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$	Permeability to Nitrogen at 25°C $\times 10^{-13} \text{ cm}^3 \cdot \text{cm} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$	Thickness $\mu\text{m}$
Polyethylene terephthalate Polyester film	0.03	0.2	100	0.004	2.5
Macro-perforated film	Control	Air	>100	Air	-

Polymeric compounds are the main materials for flexible package structures used for MAP but they can also be applied to a rigid or semi-rigid packaging solution such as a lidding on a tray [42]. Low-density polyethylene (LDPE), linear low-density polyethylene (LLDPE), high-density polyethylene (HDPE), polypropylene (PP), polyvinyl chloride (PVC), polyester, i.e. polyethylene terephthalate (PET), polyvinylidene chloride (PVDC), polyamide (Nylon) are some of the plastic films used in MAP [43]. Characteristics of the film that can affect atmosphere modification and must be carefully selected are film permeability to O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> and water vapor, film thickness, package surface area and free volume inside the package [44]. Polyesters are formed by a condensation reaction that is very similar to the reaction used to make polyamide or nylons [45].

PET polyester is the most common thermoplastic polyester and is often called just “polyester” [45]. PET exists both as an amorphous (transparent) and as a semicrystalline (opaque and white) thermoplastic material [45]. The semicrystalline PET has good strength, ductility, stiffness and hardness [45].

### 5. Mounting experimental boxes

The control batches are packaged in experimental boxes made of polyethylene terephthalate polyester film (PET). The experimental setup consists of a box with internal dimensions of 7.5×15.00 × 7.5 cm. It is made of PET film thickness 0.0025 mm. The modified atmosphere inside the box is generated by the exchange between the product and the outside through the film.



The manufacture of the experimental boxes had to ensure their tightness. The lid placed and fixed on the box is provided with a foam rubber. The tightness of the boxes was verified by measuring the concentration of air inside the box after 5 and 24 hours. The boxes were considered watertight knowing that the variation in indoor air concentrations was less than 0.5%.

**6. Achieving homogeneous batches**

Before proceeding to the distribution of samples in homogeneous batches, dates go through a period of "thermal equilibrium rest" [46]. The dates are mixed manually carefully and carefully, several times in order to obtain homogeneous batches from an appearance point of view (color, caliber), then arranged in a uniform layer of small thickness.

The dates freed from impurities and dust, were placed in clean trays at a rate of 350g ±5 g each and kept in a freezing chamber (-18°C) in order to block the ripening process.

**7. Constitution of experimental batches and storage**

The dates are packaged in batches of 350g ±5g. The date samples were divided into two groups of batches with six samples each, corresponding to the storage period (0, 1, 2, 3, 4 and 5 months) before to be tested for the first at room temperature (22°C ±1°C) with a relative humidity of 75% to 80% and the second at low temperature of 10°C ±2°C with a relative humidity of 85 % to 90%. The experimental batches are thus constituted (Fig. 1.).

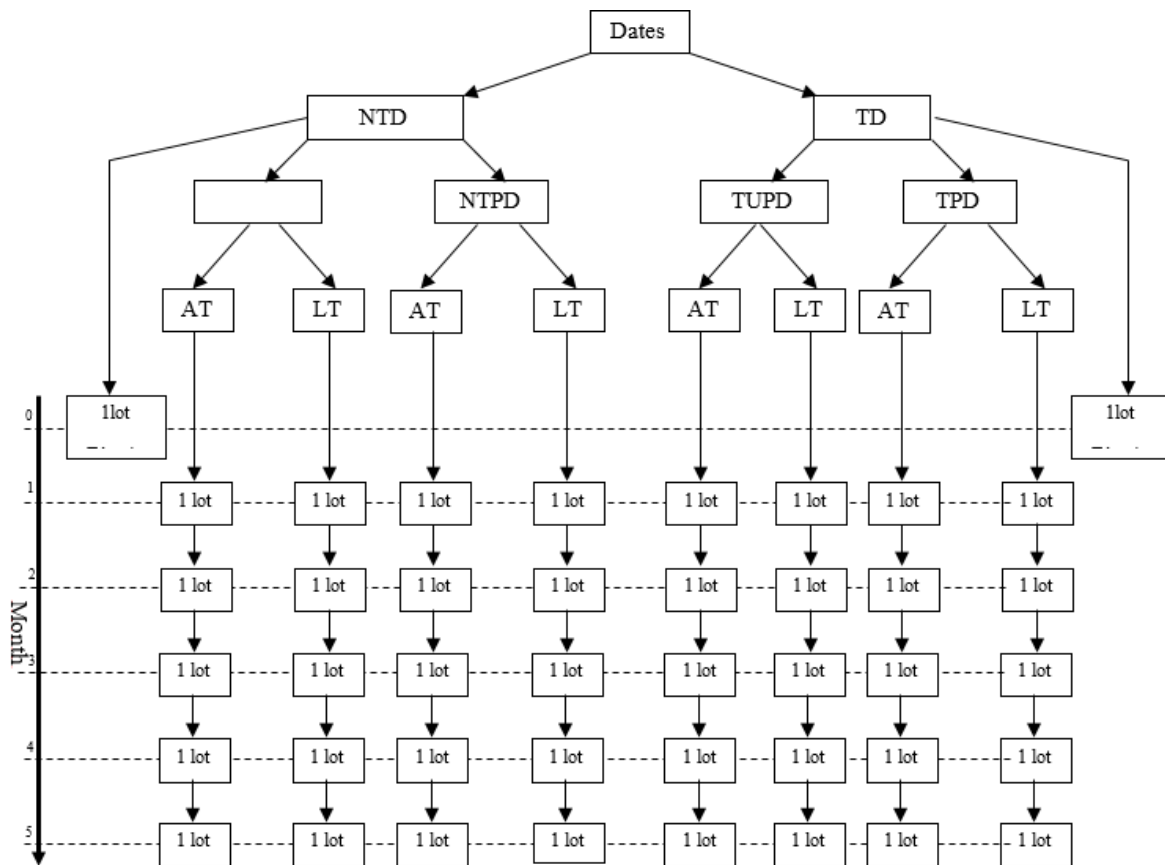


Figure 1: Diagram of constitution of the experimental batches. Reproduced with permission of Khali [41]. (NTD: Not Thermised Dates, TD: Thermised Dates, NTUPD: Not Thermised Unpacked Dates, NTPD: Non Thermised packed Dates, TUPD : ThermisedUnpacked Dates, TPD : Thermised packed Dates, AT: Ambient Temperature, LT: Low Temperature).

**8. Respiratory intensity**

The intensity of the dates is determined by placing the fruit in hermetically sealed jars. The evolution of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> concentrations is monitored after one hour of closure. For this, the volumes of gas are taken from the atmosphere of the jars through a septum and assayed by the gas analyzer.

The concentrations obtained (in O<sub>2</sub> or in CO<sub>2</sub>) are expressed in ppm. The evolution of the concentration of the gas considered (O<sub>2</sub> or CO<sub>2</sub>) in the packaging is followed in time.

The respiratory intensity, expressed as  $\mu\text{g}$  of gas per gram of fruit per hour (or in ml of gas per kg of fruit per hour), is evaluated using the following equations [47]:

$$\text{RI O}_2 = \frac{\text{Quantity consumed O}_2 (\%) \times \text{Volume of fruit (ml)} \times 273 \times 1000}{\text{Time (H)} \times [273 + \text{measured temperature } (^{\circ}\text{C})] \times 22.4 \times \text{Weight} \times 100}$$

RI O<sub>2</sub> is also expressed in  $\text{mmol O}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

$$\text{RI CO}_2 = \frac{\text{Quantity of degassed CO}_2 (\%) \times \text{Volume of fruit (ml)} \times 273 \times 1000}{\text{Time (H)} \times [273 + \text{measured temperature } (^{\circ}\text{C})] \times 22.4 \times \text{Weight} \times 100}$$

As before, the RIco<sub>2</sub> is expressed in  $\text{mmol CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

### 9. Gas dosing instrument

The control of the gas concentrations inside the experimental boxes was carried out using an OXYBABY® 6.0 gas analyzer from the German manufacturer WITTGAS.

OXYBABY® 6.0 is an alternative solution to fixed table analyzers for food packaging and welding. It provides all the benefits of the most modern technologies quickly and easily by option [89]. For example: bluetooth wireless communication and integrated barcode reader. The rapid control in all places makes it possible to guarantee a constant quality of your products (HACCP) for the benefit of your relations with your customers. Internal pressure information in the package via pressure indication. The dosage of ethylene emitted; 1 ml of air extracted from the hermetically sealed jars, where the dates to be studied were placed, was injected into a gas chromatograph (gas phase), equipped with suitable columns for the ethylene dosages. The temperature of the thermo conductivity detector was 150°C and that of the oven 35°C [48].

## RESULTS AND DISCUSSION

### 1. Change in O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> concentration after harvest at Tamar stage

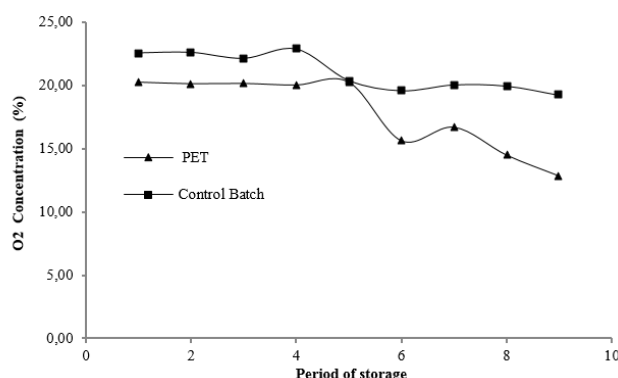
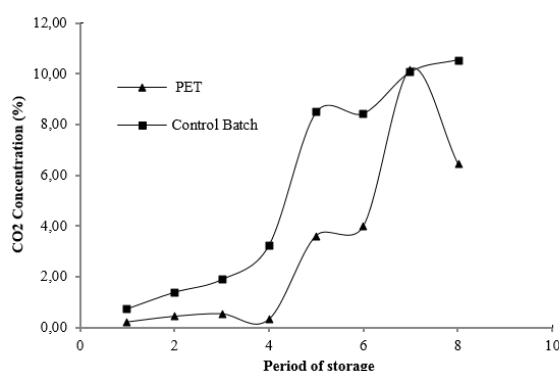


Figure 2: CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> consumption of dates as a function of time at 22°C ±1°C and 75-80% RH.

### 2. Physiological evolution of the date (*Phoenix dactylifera* L.) in conservation according to its post-harvest stage

The previous results allow characterizing the initial quality of the fruits according to their stage of

harvest. It is now a question of following the evolution of these different batches of dates in order to appreciate their ability to ripen and their conservation potential in non-binding conditions

For both samples studied during storage at room temperature (22°C ±1°C and 75-80% RH), we found a slight decrease (from 22.53% to 19.22%) in the mean concentration of oxygen from the dates fruit sample (fig 2.). In contrast to fruit samples of dates stored in packaging (PET film), there was a sharp decrease in the average oxygen concentration (from 20.25% to 12.86%) (Fig. 2.). In addition, a strong increase (from 0.75% to 10.54%) in the average CO<sub>2</sub> concentration of the date fruit sample, and a slight increase (from 0.23 to 6.45) in the Fruit sample of dates stored in packaging (PET film). Indeed, as soon as the oxygen concentration was first measured after 45 minutes of storage under PET film, the packaging slightly limited the oxygen consumption of date fruits compared to the control sample (20.25% for date sample stored under PET film versus 22.53% for control sample). Date fruits from the control sample had the highest oxygen consumption (22.83%). Similarly, the PET film packaging limited the degassed CO<sub>2</sub> concentration after seven hours of storage compared to the control sample (0.55% for date sample stored under PET film versus 1.90% for control sample). The concentration of oxygen and CO<sub>2</sub> of date fruits stored under PET film was always lower than that of the control during storage.

(storage at  $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  and at 75-80% RH) and to be able to characterize the final quality of ripe fruits.

### 3. Speed of evolution of dates (*Phoenix dactylifera L.*) in post-harvest

Dates show typical non-climacteric fruit respiration after harvest (Fig. 3).

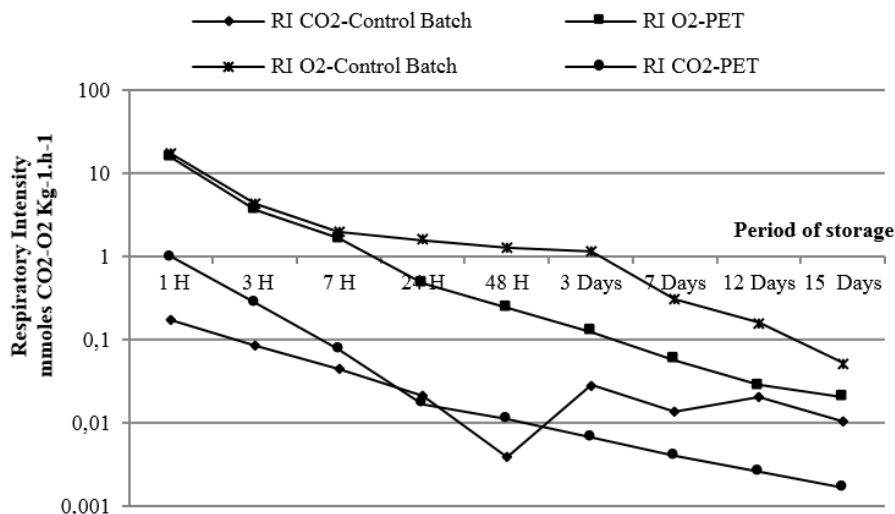


Figure 3: Respiratory intensity from dates observed in post-harvest

For the nine samples studied, we observed a decrease in the respiratory intensity of the fruits during storage at room temperature ( $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  and 75-80% RH) for both batches of dates (control and stored under PET film). Indeed, from the first day of storage, with the control test, the oxygen consumption of the dates fruits is slightly higher compared to the batch stored under PET, (after 3 hours of storage  $4.34 \text{ mmoles O}_2.\text{Kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$  for the control group against  $3.62 \text{ mmoles O}_2.\text{Kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ), (after 7 hours of storage  $2.01 \text{ mmoles O}_2.\text{Kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$  for the control group against  $1.66 \text{ mmoles O}_2.\text{Kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ), (after 24H storage  $1.58 \text{ mmoles O}_2.\text{Kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$  for the control group against  $0.48 \text{ mmoles O}_2.\text{Kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) The fruits of the control had the highest consumption ( $4.34 \text{ mmoles O}_2.\text{Kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) during this period of conservation.

The climacteric character or not of the date is not decided in the literature. Indeed, some authors [49, 50, 51] confirmed that the date is a climacteric fruit by the observation of an ethylene production.

In contrast to other authors consider that the date is non-climacteric [3].

Nevertheless, the date has a weak respiration which decreases with the decrease of its water content during the maturation. For dates stored at  $20^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  production is less than  $25 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$  at the Khalal stage, and less than  $5 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$  at the Routab and Tamar stages [52]. The same authors found under the same storage conditions ethylene production values of less than  $0.5 \mu\text{l.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$  at the Khalal stage, and less than  $0.1 \mu\text{l.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$  at the Routab and Tamar stages.

They do not evolve at the same rate according to the preservation time, the more the conservation is late, the more the respiratory peak is diminished. Thus, the respiratory activity of the date samples studied takes place during the first two days after harvest for the fruits harvested at the "Tamar" stage.

According to the tropical and subtropical fruit classification reported by Paull & Duarte and Gross *et al.* [53, 54], dates are non-climacteric fruits, with a very low respiration rate and low ethylene production, and therefore with very low metabolic activity. The respiratory intensity of date fruits stored under PET film was always lower than that of the control during storage, and decreased significantly during the last storage periods (after 7 days storage  $0.057 \text{ mmole O}_2.\text{Kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , and  $0.02 \text{ mmole O}_2.\text{Kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$  after 15 days of storage). The PET film has greatly limited fruit oxygen consumption of dates (*Phoenix dactylifera L.*), which helps extend the shelf life of fruits after harvest.

The characteristics of films that constitute a barrier to gases are of great importance. Indeed, by forming a thin film layer surrounding the fruit, the coatings modify the inner atmosphere by reducing the gas permeability of the skin of the fruit [55, 56]. This results in an increase in the carbon dioxide content and a decrease in the oxygen content within the fruit [57, 58].

Nevertheless, when the internal  $\text{CO}_2$  content of the fruit is high, a fermentation may occur which risks giving the fruit a poor organoleptic quality, detrimental to the commercial level [59, 58, 91].

Decreasing the respiration of fruit allows to extend their storage period post-harvest. This is often achieved by combining a decrease in temperature with an increase in relative humidity [60].

It has been recommended for storing fresh fruit, a temperature of 15°C, a relative humidity of 80-90% to ensure a good sensory state for about three weeks [61]. The low temperatures showed their effectiveness in preserving the quality of the dates (reduction of the loss of color, flavor, texture...), as well as the alteration by the fungal microflora and the infestations by the insects [3].

#### 4. Evolution of the O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> concentration (*Phoenix dactylifera* L.) packed under MAP (by passive channel) during conservation

##### 4.1. Variation in O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> concentration during storage

For the three lots studied in Test I, we found a decrease in the oxygen concentration of the inner atmosphere of the PET packaging of the not thermised - packed: NTP and Thermised - packed: TP batches during storage. at room temperature (22°C ±1°C and 75-80% RH) (Fig. 4).

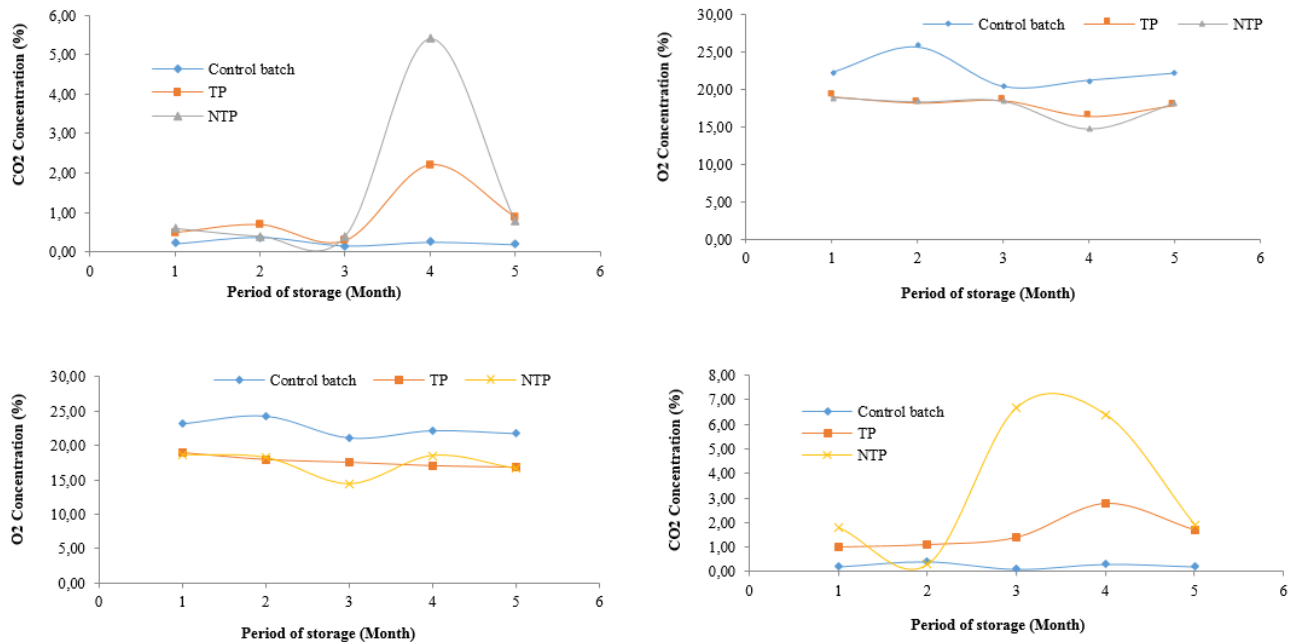


Figure 4: Evolution of the O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> concentration of dates stored at room temperature 22°C ±1°C / 75-80% RH (Test I-at the bottom of the image) and at low temperature 10°C ±2°C / 85-90% RH (Test II-at the top of the image) as a function of time.

Indeed, from the first month of treatment, with the test I at room temperature 22°C ±1°C and at 75-80% RH, the packaging has strongly limited the oxygen concentration of the date fruits compared to the batch control (23.20% for the control group versus 19% for the TP lot and 18.60% for the NTP lot), ie a decrease rate of 22.38% for the TP lot and 22.40% for the NTP lot. The third month of storage of the NTP batch shows the lowest oxygen concentration estimated at 20.47% (14.40% against 21.15% for the control batch). And it is also the fifth month of storage of the lot TP with a decrease of 21% (16,90% against 21,78% for the control batch). At two months of storage, date fruits in the control group had the highest concentration of oxygen (24.30%). In contrast to the control group, the oxygen concentration of MAP packed fruit dates in the batch lots Not thermised - packed: NTP and Thermised - packed: TP was always lower than that of the control batch during storage.

During retention of dates fruit stored at room temperature at 22°C ±1°C and 75-80% RH, we found that the CO<sub>2</sub> concentration is greatly increased compared to the control group from the third month lots Not thermised - packed: NTP and Thermised - packed: TP (respectively 6.4% and 1.4% against 0.10% for the control group) with a rate of increase of 40% Thermised - packed: TP and 570% for the batch Not thermised - packed: NTP. These packages have increased the CO<sub>2</sub> concentration of the indoor atmosphere of the PET packaging of date fruits compared to the control batch from the first month of storage (Fig. 4). During the conservation period, we found a stable CO<sub>2</sub> concentration between the first month and the third month. In the fifth month of storage, fruit of lots of dates Not thermised - packed: NTP Thermised - packed: TP had a decrease of CO<sub>2</sub> concentration 6.4% respectively 1.9% and 2.8% at 1.7%.

In addition, the CO<sub>2</sub> concentration of the date fruits in the control group increased slightly in the second and fourth months of the storage period (0.40% and 0.30%, respectively), while the date fruits of the batches thermised - packed: NTP and Thermised - packed: TP strongly increase their concentration over time.

In test II at low temperature at 10°C ±2°C and 85-90% RH, the PET packaging applied to date fruits also showed stable CO<sub>2</sub> concentration during the first three months of storage indoor atmosphere for all samples. In fact, after four months of storage, the CO<sub>2</sub> concentration of the indoor atmosphere of the PET packaging of date fruits is increased by 120% (TP) compared to the control batch (Fig. 4).

In the fifth month of storage, the concentration of CO<sub>2</sub> in the inner atmosphere of the PET packaging of the batch (TP) and (NTP) decreases sharply (is respectively 0.9% and 0.8% against 0.19% for the sample batch). As for the internal atmosphere of the lot (NTP), the figure shows that their CO<sub>2</sub> concentration is faster than the batch of the fourth month of conservation (respectively 2.2% and 5.4%). Then the CO<sub>2</sub> concentration of the indoor atmosphere of the batch (TP) and (NTP) decreases (0.9% and 0.8% respectively in the fifth month of storage).

During storage of dates fruit stored at low temperature at 10 ±2 °C and 85-90% RH, we found that the oxygen concentration of the indoor atmosphere is greatly reduced throughout the storage period compared to the control batch, and after the first month in lots (NTP) and (TP) (respectively 18.8% and 18.9% against 22.16% for the control group) with a decrease rate of 14.71% Thermised - packed: TP and 15.16% for batch batch Not thermised - packed: NTP. These packages reduced the concentration of CO<sub>2</sub> in the inner atmosphere of the PET packaging compared to the control batch from the first month of storage (Fig. 4.).

During the storage period, we found a stability of the CO<sub>2</sub> concentration of the indoor atmosphere of the PET package of the lot (NTP) and (TP) between the first month and the third month. In the fourth month of conservation, batches of date fruits Not thermised - packed: NTP and Thermised - packed: TP showed a decrease in the CO<sub>2</sub> concentration of the indoor atmosphere of PET packaging (respectively from 18.4% to 16.4%, and 18.3% to 14.6%). In addition, the CO<sub>2</sub> concentration of the indoor atmosphere of the PET packaging of the control batch increased slightly in the second month of the storage period (a rate of increase 15.75%).

#### 4.2. Respiratory intensity

The measurement of the respiratory intensity makes it possible to show in many fruits a significant increase of the respiration at the beginning of the maturation. This sudden rise has been called a climacteric crisis. After this phenomenon, the ripening of the fruit is followed by senescence. According to our results of the two tests I and II, the application of the PET packaging inhibits the appearance of this crisis in our storage conditions (at low temperature 10°C ±2°C and at 85-90% RH and at temperature ambient 22°C ±1°C and 75-80% RH). This will extend the shelf life of date fruits by a few months longer than untreated fruit.

We found that all tested packages (TP) and (NTP) at room and low temperature limited the oxygen consumption of date fruits (Fig 5.).

Packaged date fruits did not show a respiratory peak, which is not the case for control batches of both trials. Indeed, for the control batches of tests I and II, the dates suffered this crisis in the first month of storage (respectively 7.81E<sup>-03</sup> mmoles O<sub>2</sub> Kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> and 7.46E<sup>-03</sup> mmoles O<sub>2</sub> Kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>).

From tests I and II, the oxygen consumption of all the date fruits (NT) and (NTP) of test I decreased rapidly after the first month of storage 6,40E<sup>-03</sup> mmoles O<sub>2</sub> Kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (NT), 6.26E<sup>-03</sup> mmoles O<sub>2</sub> Kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (NTP), against 7.81E<sup>-03</sup> mmoles O<sub>2</sub> Kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> for control group. Similarly, the oxygen consumption of all dates (NT) and (NTP) fruits of test II decreased rapidly after the first month of storage 6.36E<sup>-03</sup> mmoles O<sub>2</sub> Kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (NT), 6.33E<sup>-03</sup> mmoles O<sub>2</sub> Kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (NTP), against 7.46E<sup>-03</sup> mmoles O<sub>2</sub> Kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> for control group. Then, a strong decrease was observed until the third month of storage for date fruits (NTP) of the test I 9,70E<sup>-04</sup> mmoles O<sub>2</sub> Kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> against 2,37E<sup>-03</sup> mmoles O<sub>2</sub> Kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (a decrease rate of 59.07%). In addition, we notice a stabilization of the respiratory intensity during the last two months of storage for date fruits (NT) and (NTP) (Fig 5.). As for the control date fruits of tests I and II, we found that their respiratory intensity was higher compared to the other batches treated during the five months of storage. Subsequently, until the end of the experiment, this growth experienced a stability of the respiratory intensity. In addition, we note a higher oxygen consumption for the batch of control date fruits than for the other experimental batches (NT) and (NTP), in all batches during storage.

We conclude that PET packaging can limit the oxygen consumption of date fruits under different conditions (at low temperature at 10°C ±2°C and at 85-90% RH and at room temperature at 22°C ±1°C and 75-80% RH), as well as different storage periods of the date fruit.

The packages have limited the respiratory intensity of date fruits, which extends the shelf life of post-harvest date fruits. These PET packages are of great interest for long-distance transport, especially if they are used in combination with other techniques, such as refrigeration (storage at low temperature  $10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  and at  $85\% \text{RH}$ ). We found from tests I and II that the release of  $\text{CO}_2$  from the date fruits (NT) and (NTP) of test I increased after the first month of storage  $3.37 \times 10^{-4} \text{mmoles O}_2 \text{ Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (NT),  $6.06 \times 10^{-4} \text{mmoles O}_2 \text{ Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (NTP), against  $6.73 \times 10^{-5} \text{mmoles O}_2 \text{ Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  for control batch. Similarly, the respiratory intensity of  $\text{CO}_2$  released from all date (NT) and (NTP) fruits of Trial II was greater than that of the control group after the first

month of storage  $1.68 \times 10^{-4} \text{mmoles O}_2 \text{ Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (NT),  $2.02 \times 10^{-4} \text{mmoles O}_2 \text{ Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (NTP), against  $7.07 \times 10^{-5} \text{mmoles O}_2 \text{ Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  for control group. Then, a strong decrease was observed until the fourth month of storage for dates fruits (NTP) of test I  $5.39 \times 10^{-4} \text{mmoles O}_2 \text{ Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  against  $7.52 \times 10^{-4} \text{mmoles O}_2 \text{ Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  to the third month (a decrease rate of 28%). In addition, we note a stabilization of the respiratory intensity of  $\text{CO}_2$  during the last month of storage for date's fruits (NT) and (NTP) of tests I and II (Fig. 5.). Indeed, for the control batches of tests I and II, the dates experienced a stability of the respiratory intensity of the  $\text{CO}_2$  throughout the period of conservation.

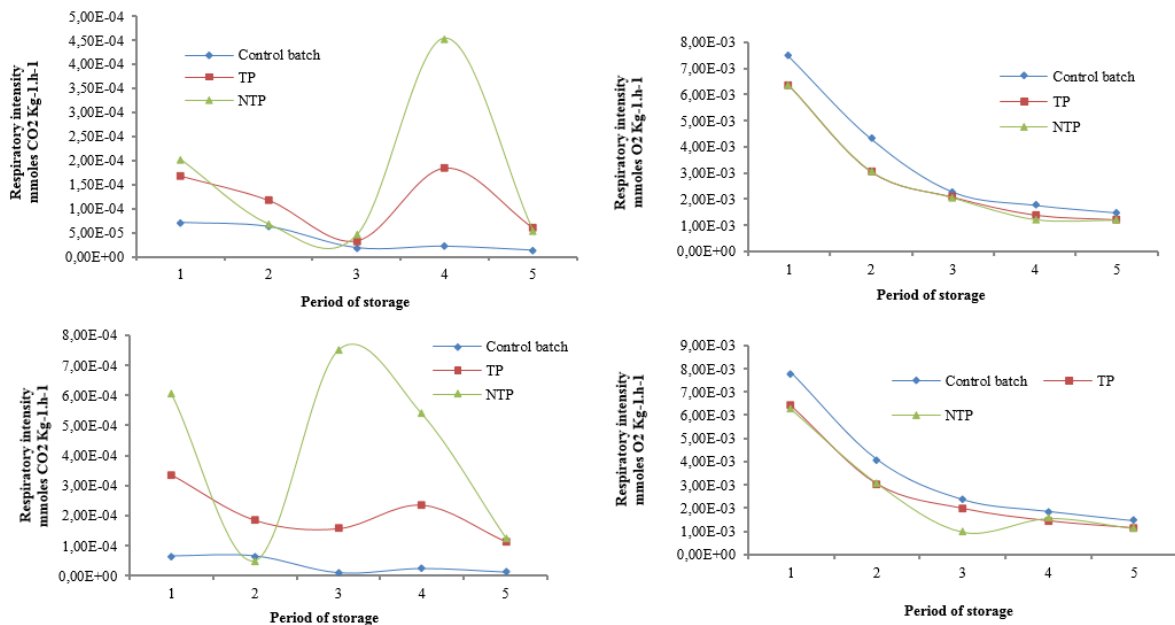


Figure 5:  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$  consumption rate (Respiratory intensity) of date fruits as a function of time at room temperature  $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  and  $75\text{-}80\% \text{RH}$  (Test I- at the bottom of the image) and at low temperature  $10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  and  $85\text{-}90\% \text{RH}$  (Test II- at the top of the image).

The use of MAP can result in reduction of respiratory activity, retardation of softening and ripening and restraint of pathogens and reduced incidence of various physiological disorders [92]. Temperature is an extremely important factor during packaging design due to its effect on the physiology of the product [42]. One of the main responses to stress is protein dysfunction, disrupting cellular homeostasis, known as heat shock proteins [42]. The production of these proteins is triggered by conditions like oxidative stress, low temperatures and fruit ripening [42]. Exposure of sensitive products to low storage temperatures may have beneficial effect on shelf life and preserve quality but there are some limitations [42]. If these limits are exceeded may lead to chilling injury [62].

Respiration rates of fruits and vegetables are affected by many environmental factors [63]. In cases where this leads to negative effects on plant tissue it is defined as stress [63]. During the storage of fruits and vegetables effects of low temperatures, reduction in oxygen ( $\text{O}_2$ ) concentration and increase in carbon dioxide ( $\text{CO}_2$ ) concentration in the storage atmosphere are utilized to extend the storage life of produce [63]. However, maintaining an adequate energy status is required to prevent browning or senescence of harvested fruits and vegetables [64, 95, 65, 66, 67]. It is well established that lowering of  $\text{O}_2$  concentrations during controlled atmosphere storage reduces respiration rates and energy supply and that severe limitations of  $\text{O}_2$  induce fermentative (anaerobic) respiration and metabolism in stored produce [63].

The net yield of ATP during anaerobic respiration is only 2 moles of ATP of hexose sugar compared with 36 moles of ATP per mole of hexose in aerobic respiration. Hence, energy status may be insufficient and provoke storage disorders [67].

Rygg [68], Suggested inert gas or vacuum packing for storage of high-moisture dates. Mohsen *et al.* [69], Noted that vacuum packaging is a useful technique for reducing darkening of the date for long-term storage [70]. Mutlak and Mann [71], reported that browning can be inhibited at low oxygen potentials. CA (5, 10, or 20 kPa CO<sub>2</sub>) at 8 °C extended storage period and maintained quality of fully mature 'Bahri' date fruit [72]. The quality of fruit stored under 20 kPa CO<sub>2</sub> was maintained for up to 26 weeks compared to 17 weeks for fruit held under 5 and 10 kPa CO<sub>2</sub> and only 7 weeks for fruit kept in normal air [70].

A 20 kPa CO<sub>2</sub> maintained acceptable levels of fruit soluble solids, total sugar, total tannins, and caffeoylshikimic acid [70].

Dehghan-Shoar *et al.* [73], Compared the effects of MAP under high CO<sub>2</sub> on the quality of Sayer dates fruits with low temperature storage and freezing. The results showed that MAP with 85% CO<sub>2</sub> + 3% O<sub>2</sub> and 75% CO<sub>2</sub> + 12% O<sub>2</sub> maintained the best quality of dates with no physiological disorder, and off-odor and off-flavor throughout the 150-day storage. Dates were shown to be resistant to high CO<sub>2</sub> as well as low CO<sub>2</sub>, which is probably due to the low respiration rate. Aleid *et al.* [74], compared dates packed in MAP in varying CO<sub>2</sub> concentrations with dates packed in paperboard carton (control). MAP in high CO<sub>2</sub> (up to 20%) retarded date ripening and maintained the quality and firmness of dates better than the control. Hunter color of dates values were stable in MAP samples, especially to day 9, though decreased at day 18 and day 27 but were still significantly higher than the control. High CO<sub>2</sub> MAP has also shown to be effective in eliminating insects in stored dates [73].

Al-Redhaiman [75], also reported that storage under high CO<sub>2</sub> atmosphere extended the shelf life of Barhi date fruits. Shelf life of Barhi dates stored at 0°C was 26 weeks under 20% CO<sub>2</sub>, 17 weeks under 5% and 10% CO<sub>2</sub>, and about 7 weeks under normal air condition [34]. Storage under high CO<sub>2</sub> was shown to reduce decay and weight loss, while maintaining color, firmness, sensory quality, soluble solids, total sugar content, and total tannins, which are the principal antioxidants in dates.

In addition, high CO<sub>2</sub> atmosphere was shown to delay the degradation of caffeoyl-shikimic acid, which is one of the major phenolic compounds in dates [34].

Achour [76], studied the effect of MAP in combination with vacuum on Deglet Nour dates and dates stuffed with almond paste. Dates were packaged in amorphous PET wrap (APET) and the package was injected with 10 or 15% of a gas mixture of 20% CO<sub>2</sub> + 80% N<sub>2</sub> and stored at 20, 30, and 40°C. The results showed that both vacuum and MAP reduced dehydration of dates. Shelf life of fresh dates packaged in APET with modified atmosphere stored at 20 °C was increased to 9 months from 3.8 months in normal air conditions [34].

The respiration rate of dates is very low: <5 mg CO<sub>2</sub> kg/hr at 20°C (68 °F) at the Khalal stage, and <2 mg/kg/hr at the Rutab and Tamar stages [77]. Ethylene production of dates is also very low: <0.1 µl/kg/hr at Khalal stage and none at Rutab and Tamar stages [78]. Dates beyond Kimri and Khalal stages are not sensitive to chilling injury [77]. Yahia [79], reported that dates may require postharvest ripening if picked early. Soft and semi-dry cultivars need to be dehydrated to eliminate excess moisture if they will not be consumed immediately [77]. Hydration is used to soften the texture of hard-type cultivars [77].

Kaderand Hussein [52], suggested that dates should not be mixed with onions, garlic, potatoes, apples, or other commodities with strong odors that can be adsorbed by the dates.

Date fruit quality loss resulting from pathological and physiological deterioration increases with increasing moisture content and storage temperature [78]. Storing dates at low temperatures is the most important way of maintaining quality: because it minimizes loss of color, flavor, and textural quality; delays development of sugar spotting, incidence of molds and yeasts, and insect infestation; and prevents development of syrupiness (due to conversion of sucrose into reducing sugars) and souring of excessively moist dates [77]. Khalal dates should be stored at 0°C and 85–95% RH to reduce water loss, delay ripening to the Rutab stage, and maintain their textural and flavor quality [52]. In order to reduce moisture loss and improve shelf life, packaging in moisture-barrier plastic bags or use of plastic liner in the box is helpful [77].

Optimal temperature for Tamar dates is 0 °C for 6–12 months, depending on cultivar (semi-soft dates, like Deglet Nour and Halawy, have longer storage-life than soft dates, like Medjool and Barhee) [77]. For extended storage, the use of temperatures below the highest freezing temperature of –15.7°C is recommended. Dates with 20% or lower moisture can be kept at –18 °C for more than one year, at 0 °C for one year, at 4 °C for 8 months, or at 20 °C for one month; RH should be kept at 65–75% for all cases [52].

There is a continuing trend toward increased precision in temperature and RH management to provide the optimum environment for fresh produce during cooling, storage, and transport; precision temperature control and management tools, including time–temperature monitors, are becoming more common in cooling/storage facilities and during transportation and shipping [80].

Dates are non-climacteric with relatively low respiration rate: <25 ml/kg/hr for Khalal stage dates, and <5ml CO<sub>2</sub>/kg/hr for Rutab and Tamar stage dates kept at 20°C [36]. The respiration rates increase with higher moisture content and temperatures. Ethylene production rate of dates is also very low at 20 °C, i.e., <0.5 µl/kg/hr for Khalal stage, and <0.1 µl/kg/hr for Rutab and Tamar stage dates [79].

Serrano [81], studied some physicochemical parameters related to ripening and their relationship with ethylene in dates (cv. Negros), which were harvested and classified into sixteen ripening stages according to their color, ranging from yellow-greenish to dark brown. Fruit firmness decreased through the different ripening stages, while the ripening index, expressed as the relation between soluble solids and acidity, increased; the greatest loss of fruit firmness correlated with the greatest increases in both polygalacturonase and βgalactosidase activities [36]. In early ripening stages, a small peak in ethylene production was detected, followed by a peak in respiration rate; with the plant hormone ethylene being responsible for changes in color, fruit firmness, total solids content and acidity [36].

Regarding response to ethylene, it has been reported that there was no effect of exposing Khalal stage yellow Barhee dates to 100 ppm ethylene for up to 48 hours at 20°C and 85–90% relative humidity [36].

However, Khalal stage dates may respond to ethylene action at higher temperatures (30–35 °C), which are more optimal for their ripening. Rutab and Tamar stage dates are not influenced by exposure to ethylene but can readily absorb the aroma of other products [36]. Thus, dates should not be stored with garlic, onion, potato, or other commodities with strong odor [52].

Heat treatment of dates at 60–70°C for 2 hours killed 100% of both the figmoth and the saw-toothed beetle, but resulted in a shiny appearance or glazing of the fruit [82]. Exposing dates to temperatures of 65–80°C for 30 min to 4 hours at high humidity controls insects [78]; however, this approach is not always very efficient for controlling insects in dates with high moisture content because high temperatures for prolonged periods may cause darkening and the appearance of a dull colour and loss of flavor [35].

Rafaeli et al. [87], described an effective, short-duration and inexpensive method using postharvest heating container. They found that the optimum temperature regime for maximum escape of beetles from the fruit was 55°C for 2.5 hours attained at a rate of 1.8°C/min.

Heated air at 50–55°C for 2–4 hours (from the time the fruit temperature reaches 50°C or higher) is effective for insect disinfestation [88], but the use of higher temperatures is not recommended because it makes the color of the dates darker Elhadi et al. [35]. Forced hot air is recommended to obtain faster and more uniform heating of the dates [35]. Cooling the dates to the desired storage temperature (0°C) soon after completion of the heat treatment reduces the intensity of color darkening [35]. Hussein et al. [84], reported that boiling water is more efficient in controlling insect infestation of dates than exposure to hot air at 70 °C. However, very hot water also increases sugar loss that can reach up to 20% [35].

Dates are very resistant to low temperature, and thus can significantly reduce insect infestation [78, 3]. Fig-moth larva could live for 85 days at 2–6 °C, but storage at 0°C can result in total mortality of the larva of the fig-moth and adult of the grain beetle after 15 and 27 days, respectively [82]. Thus, packed fumigated dates could be kept free of infestation at 4 °C for as long as 1 year [82]. Freezing at –18 °C or lower for at least 48 hr (from the time when the fruit temperature reaches –18°C or lower) is enough to kill all life stages of stored products insects [35].



Packing infested dates in polyethylene bags with 80–90% vacuum resulted in 100% mortality after two days [82]. A 4-hour exposure at 2.8% O<sub>2</sub> in N<sub>2</sub> at 26 °C resulted in over 80% of the initial nitidulid beetles populations to emigrate from the infested dried dates [93, 94]. Al-Azab [85], used a mixture of modified atmosphere (65% CO<sub>2</sub>, 15% N<sub>2</sub> and 20% O<sub>2</sub>) and found that an exposure for 24 hours at 34 °C and 65% relative humidity cause 100% mortality against the adults of *E. cautella*. El-Mohandes [86], found that 100% mortality was achieved after 36-hour exposure at CO<sub>2</sub> concentrations of 75% at 25°C and 55% relative humidity for the adults of *Oryzaephilus surinamensis* and *Tribolium confusum*. Moreover, application of CO<sub>2</sub> at concentrations of 75% with half dose of PH<sub>3</sub> at 28 ±2°C and 60 ±5% relative humidity caused 100% mortality, of both tested insects, after 6 hours of exposure [35].

## CONCLUSION

Preserving the quality of the date from harvest to consumption poses major problems for national operators. Good conservation depends on both the condition of the fruit at harvest and the conditions of storage.

The control of the quality of the dates is largely conditioned by the homogeneity of their degree of maturity. The harvest period at the Tamar stage is an important factor as the Deglet-Nour date is a staggered mature fruit. To reduce the heterogeneity of the fruit batches used in our studies, we selected the most homogeneous fruits possible from the point of view of color and general external appearance. At the industrial level, an artificial maturation, which remains to be studied (heat input, humidification, etc.) would be wise to increase the homogeneity of the fruits.

Thermization, heat treatment is proposed as an alternative to fumigation. It is based on the use of heat to destroy the worm of the date -Myelois- at its different biological stages, including eggs and larvae.

## REFERENCES

- [1]. Ashraf, Z., and Hamidi-Esfahani, Z. (2011). Date and Date Processing: A Review. *FoodReviews International* 27, 101-133.
- [2]. Elleuch, M., Besbes, S., Roiseux, O., Blecker, C., Deroanne, C., Drira, N.-E., and Attia, H. (2008). Date flesh: Chemical composition and characteristics of the dietary fibre. *Food Chemistry* 111, 676-682.
- [3]. Yahia, E. M., and Kader, A. A. (2011). Date (*Phoenix dactylifera* L.). In "Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits." (E. M. Yahia, ed.), Vol. Volume 3: cocona to mango, 41- 79. Woodhead Publishing Series in Food Science, Mexico.
- [4]. Zaid, A., and Arias Jiménez, E. (1999). Date palm cultivation. In "FAO Plant Production and Protection Paper", Vol. 156-Rev. 1, 309. FAO, Rome.
- [5]. Anonymous. (2015). Filiere dates: Waiting for the label. In "The Evening of Algeria", Vol. 074, pp. 6, Sidi M'Hamed, Algiers.
- [6]. Erkmén, O. (2012). Modified-Atmosphere Storage of Foods. In "Progress in Food Preservation" (R. Bhat, A. K. Alias and G. Paliyath, eds.), pp. 49-64. John Wiley & Sons, Oxford.
- [7]. Gorris, L. G. M., and Peppelenbos, H. W. (1999). Modified-Atmosphere Packaging of Produce. In "Handbook of Food Preservation" (M. S. Rahman, ed.), Vol. Second Edition, 316-329. CRC press, Boca Raton.
- [8]. Ooraikul, B. (2003). Modified atmosphere packaging (MAP). In "Food preservation techniques" (P. Zeuthen and L. Bugh-Sørensen, eds.), 338-355. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
- [9]. Sandhya (2010). Modified atmosphere packaging of fresh produce: current status and future needs. *LWT-Food Science and Technology* 43, 381-392.
- [10]. O'Beirne, D. (2010). Controlled and Modified Atmosphere Packaging of Food Products. In "Innovation in food engineering: new techniques and products" (M. L. Passos and C.P. Ribeiro, eds.), 467-479. CRC Press, Boca Raton.
- [11]. Church, N. (1994). Developments in modified-atmosphere packaging and related technologies. *Trends in Food Science & Technology* 5, 345-352.
- [12]. Belbahi. (2015). Study and modeling of a heat treatment followed by a conditioning (temperature, wa and CO<sub>2</sub>) for the control of the fungal flora of alteration of dates with intermediate humidity. PhD Thesis Prepared within the Graduate School of Process Sciences - Food Sciences and the UMR-Qualisud Research Unit, CIRAD Montpellier, 27.
- [13]. Varoquaux P. et Nguyen-The C. (1993). Les atmosphères modifiées de la quatrième gamme : technologie alimentaire, les hautes pressions. Ed IFN Dossier. 90.
- [14]. Kader A.A. (1986). Biochemical and physiological basis for effects of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. An overview outstanding symposia in food science and technology. *Food Techn.*, May, 99-105.
- [15]. Kader A.A. 1992. Postharvest biology and technology : an over view, in : Kader A.A. Postharvest technology of horticultural crops (2nded. Universty of California division of agriculture and natural resources, Oakland, California, Etats Unis, 15-20.
- [16]. Brody, A.L. (1996). Integrating Aseptic and Modified Atmosphere Packaging to Fulfill a Vision to Tomorrow. *Food Tech.* April 1996, 56-66.
- [17]. Damarli E., Gun H., Bulbul S. et Oechsle P. (1998). An Alternative method instead of methyl bromide for insect disinfestations of dried figs: controlled atmosphere. *Acta Hort.* 480, 209-214.

- [18]. **Bell C.H., Conyers S.T. et Liewellin B.E. (1997).** The use of on-site generated atmospheres to treat grain in bins or floor stores. In: Donahaye E.J., Navarro S. et Varnava A. (Eds). Processing of the International Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products. Cyprus, April, 1996, Princo Ltd, Nicosia, Cyprus, 263-271.
- [19]. **Bell C.H. (2000).** Fumigation in the 21st century. *Crop Protection*, 19, 563-569.
- Hasegawa S., Smolensky D.C. and Maier V.P. 1972. Hydrolytic enzymes in dates and their application in the softening of tough dates and sugar wall dates. *Date Grower's Institute*, 29, 6-8.
- [20]. **Hasegawa S., Smolensky D.C. and Maier V.P. 1972.** Hydrolytic enzymes in dates and their application in the softening of tough dates and sugar wall dates. *Date Grower's Institute*, 29, 6-8.
- [21]. **Lee D.S., Hagggar P.E., Lee J, and Yam K.M. (1991).** Model for fresh produce respiration in modified atmosphere based on principles of enzyme kinetics. *J. of Food Science*, 56 (6), 1580-1585.
- [22]. **Fonseca, S.C., F.A.R. Oliveira, and J.K. Brecht. (2002).** Modelling respiration rate of fresh fruits and vegetables for modified atmosphere packages: A review. *J. Food Eng.* 52(2), 99-119.
- [23]. **Murray R., Lucangeli C., Polenta G. and Budde C. (2007).** Combined pre-storage heat treatment and controlled atmosphere storage reduced internal breakdown of Flavorcrest peach. *Postharvest Biol. Technol.*, 44, 116-121.
- [24]. **Glasner B., Botes A., Zaid A. and Emmens J. (1999).** Date harvesting, packing house management and marketing aspects. In: Zaid. And Arias E.J. (Eds), *Date palm cultivation*, 177-198 (FAO plant production and protection paper n°. 156).
- [25]. **Awad M. (2006).** Increasing the rate of date palm fruit (*Phoenix dactylifera L.*) cv. Helali by preharvest and postharvest treatments. *Postharvest Biol. Technol.*, doi : 10.1016/j.postharvbio.2006.08.006.
- [26]. **Meir S., Akerman M., Fuchs Y. and Zauberman G. (1995).** Further studied on the controlled atmosphere storage of avocados. *Postharvest Biol. Technol.*, 5, pp: 323-330.
- [27]. **Nguyen T.B.T., Kesta S. and Van Doorn W.G. (2004).** Effect of modified atmosphere packaging on chilling-induced peel browning banana. *Postharvest Biol. Technol.*, 31, 313-317.
- [28]. **Choehom R., Kesta S. and Van Doorn W.G. (2004).** Senescent spotting of banana peel is inhibited by modified atmosphere packaging. *Postharvest Biol. Technol.*, 31, 167-175.
- [29]. **Hertog M.L.A.T.M., Nicholson S.E. and Jeffery P.B. (2004).** The effect of modified atmosphere on the rate of firmness change of Hayward kiwifruit. *Postharvest Biol. Technol.*, 31, 251-261.
- [30]. **Gomez P.A. and Artés F. (2005).** Improved keeping quality of minimally fresh processed celery sticks by modified atmosphere packaging. *LWT*, 38, 323-329.
- [31]. **Escalona V.H., Aguayo E. and Artés F. (2006).** Modified atmosphere packaging improved quality of kohlrabi stems. *LWT- Food Sci. Technol.*, (Available on line 30 march 2006).
- [32]. **Serrano M., Martinez-Romero M., Guillén F., Castillo S. and Valero D (2006).** Maintenance of broccoli quality and functional properties during cold storage as affected by modified atmosphere packaging. *Postharvest Biol. Technol.*, 39(1), 61-68.
- [33]. **Shen Q., Kong F. and Wang Q. (2006).** Effect of modified atmosphere packaging on the browning and lignification of bamboo shoots. *J. Food Engineering*, 77, 348-354.
- [34]. **Vanee Chonhenchob, Koushik Saha, Sher Paul Singh, and Muhammad Siddiq. (2014).** *Packaging Technologies for Dates and Date Products.* Postharvest Science, Processing Technology and Health Benefits, Edited by Muhammad Siddiq, edition wiley Blackwell, 144, 145-148-149.
- [35]. **Elhadi M. Yahia, Maria Gloria Lobo, and Adel A. Kader. (2014).** *Harvesting and Postharvest Technology of Dates.* Postharvest Science, Processing Technology and Health Benefits, Edited by Muhammad Siddiq, edition wiley Blackwell, 120.
- [36]. **Maria Gloria Lobo, Elhadi M. Yahia, and Adel A. Kader. (2014).** *Biology and Postharvest Physiology of Date Fruit.* Postharvest Science, Processing Technology and Health Benefits, Edited by Muhammad Siddiq, Edition wiley Blackwell, 58, 74-75.
- [37]. **Al-Ati, T. and J.H. Hotchkiss. (2002).** Application of packaging and modified atmosphere to fresh-cut fruits and vegetables. In: O. Lamikanra (Ed.), *Fresh-Cut Fruits and Vegetables Science, Technology and Market*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 305-338.
- [38]. **Tanner, D.J., A.C. Cleland, L.U. Oparab, and T.R. Robertson. (2002).** A generalised mathematical modelling methodology for design of horticultural food packages exposed to refrigerated conditions: Part 1, formulation. *Intl. J. Refrig.* 25 (1):33-42.
- [39]. **Robertson GL, editor. 2005.** *Food Packaging Principles and Practice.* Boca Raton, FL: CRC Press. 568p.
- [40]. **Charles F. Forney, James P. Mattheis, and Elizabeth A. Baldwin. (2009).** *Effects on Flavor. Modified and Controlled Atmospheres for the Storage, Transportation, and Packaging of Horticultural Commodities* Edited by Elhadi M. Yahia, 2009, 137.
- [41]. **Khali, M. (2008).** Effects of simple and combined treatments on the biology and biochemistry of the date being conserved; Ph.D. thesis in Food Science and Nutrition, Higher National Agronomic School, El Harrach, Algiers, Algeria, 5.
- [42]. **Ioannis Arvanitoyannis, Achilleas Bouletis, Dimitrios Ntinionas. (2014).** Application of Modified Atmosphere Packaging on Quality of Selected Vegetables, 2- 4.
- [43]. **Mangaraj S, Goswami TK, Mahajan PV. (2009).** Applications of plastic films for modified atmosphere packaging of fruits and vegetables: a review. *Food Eng Rev* 1(2), 133-158.
- [44]. **Caleb JO, Mahajan VP, Al-Said AF, Opara LU. (2013)** Modified atmosphere packaging technology of fresh and fresh-cut produce and the microbial consequences-a review. *Food Bioprocess Technol* 6, 303-329.

- [45]. **Laurence W. McKeen. (2012).** Film properties of plastics and elastomers, Third Edition, 91,108.
- [46]. **Myhara R.M., Al Alawi A., Karkalas J. and Taylor M.S. (2000).** Sensory and textural changes in maturing omani dates. *J. Sci. Food and Agric.*, 80, 115- 125.
- [47]. **Thai Thi. (2000).** Effect of different coatings on the characteristics of the fresh storage of mango. Master of Science Thesis, 34-35.
- [48]. **Esplà J.V., Del Rio M.A; and Ferry M. (1999).** Production d'éthylène et respiration de la datte de palmiers d'Elche en Espagne. *Fruits*, 54, 183-190.
- [49]. **Afshari-Jouybari, H., Farahnaky, A., and Moosavi-Nasab, S. (2013).** The Use of Acetic Acid, Sodium Chloride Solutions, and Incubation to Accelerate the Ripening of 'Mazafati' Date. *International Journal of Fruit Science* 14, 95-106.
- [50]. **Farahnaky, A., and Afshari-Jouybari, H. (2011).** Physicochemical changes in Mazafati date fruits incubated in hot acetic acid for accelerated ripening to prevent diseases and decay. *Scientia Horticulturae* 127, 313-317.
- [51]. **Saleem, S. A., Baloch, A. K., Baloch, M. K., Baloch, W. A., and Ghaffoor, A. (2005).** Accelerated ripening of Dhakki dates by artificial means: ripening by acetic acid and sodium chloride. *Journal of Food Engineering* 70, 61-66.
- [52]. **Kader, A. A., and Hussein, A. M. (2009).** Harvesting and postharvest handling of dates. In "Project on the Development of Sustainable Date Palm Production Systems in the GCC countries of the Arabian Peninsula" (ICARDA, ed.), pp 15, Aleppo, Syria.
- [53]. **Paull RE, Duarte O (2011).** Postharvest Technology. In: *Tropical Fruits*, Vol 1. Wallingford, UK: CAB Intl. 101–22.
- [54]. **Gross K, Wang CY Saltveit M. (2002).** The Commercial Storage of Fruits, Vegetables and Florist and Nursery Crops. *Agriculture Handbook* 66. Beltsville, MD: USDA. 672.
- [55]. **Banks N. H. (1984a).** Some effects of Tal-prolong coating on ripening bananas. *J. Exp. Botany*, 35(150), 127-137.
- [56]. **Olorunda. A. O. and AWORH O. C. (1984).** Effects of Tal-prolong, a surface-coating agent, on the shelf life and quality attributes of plantain. *J. Sci. Food Agric.*, 325 : 573-578.
- [57]. **Drake S. R , FELLMANN J. K. and NELSON J. W. (1987).** Postharvest use of sucrose polyesters for extending the shelf-life of stored 'Golden Delicious' apples. *J. Food Sci.*, 52(5), 1283-1285.
- [58]. **Mainnheim C. H. and SOFFER T. (1996).** Permeability of different wax coatings and their effect on citrus fruit quality. *J. Agri. Food Chem.*, 44 : 919-923.
- [59]. **Dhalla R and Hanson S. W. (1988).** Effect of permeable coating on the storage life of fruits. II. Pro-long treatment of mangoes (*Mangifera indica* L. cv. Julie). *Inter. J. Food Technol.*, 23(1), 107-112.
- [60]. **Drummond, L., and Sun, D.-W. (2010).** Effects of Chilling and Freezing on Safety and Quality of Food Products. In "Processing Effects on Safety and Quality of Foods" (E. Ortega-Rivas, ed.), pp. 295. CRC Press, Boca Raton.
- [61]. **Duarte, O., and Molina, L. (2011).** Cocona (*Solanum sessiliflorum* Dunal). In "Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits: Fundamental Issues" (E.M. Yahia, ed.), Vol. 3, 1-8. Woodhead Publishing, Philadelphia, USA.
- [62]. **Aghdama MS, Sevillano L, Flores FB, Bodbodak S. (2013)** Heat shock proteins as biochemical markers for postharvest chilling stress in fruits and vegetables. *Sci Hortic* 160:54–64.
- [63]. **N. A. Michael Eskin, Ernst Hoehn .(2013).** Fruits and Vegetables. *Biochemistry of Foods*, Third Edition 2013, Edited by N. A. Michael Eskin and Fereidoon Shahidi, 50.
- [64]. **Saquet, A.A., Streif, J., Bangerth, F. (2000).** Changes in ATP, ADP and pyridine nucleotide levels related to the incidence of physiological disorders in 'Conference' pears and 'Jonagold' apples during controlled atmosphere storage. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 75, 243-249.
- [65]. **Xuan, H., Streif, J., Saquet, A., Romheld, V., Bangerth, F. (2005).** Application of boron with calcium affects respiration and the ATP/ADP ratio in 'Conference' pears during controlled atmosphere storage. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 80, 633-637.
- [66]. **Song, L.L., Jiang, Y.M., Gao, H.Y., Li, C.T., Liu, H., You, Y.L., Sun, J. (2006).** Effects of adenosine triphosphate on browning and quality of harvested litchi fruit. *Am. J. Food Technol.* 1, 173-178.
- [67]. **Jiang, Y., Jiang, Y., Qu, H., Duan, X., Luo, Y., Jang, W. (2007).** Energy aspects in ripening and senescence of harvested horticultural crops. *Stewart Postharvest Rev.* 2, 1-5.
- [68]. **Rygg, G.L. (1975).** Date development, handling, and packing in United States, USDA Agricultural Handbook No. 482, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Washington DC, 56.
- [69]. **Mohsen, A., S.B. Amara, N.B. Salem, A. Jebali, and M. Hamdi. (2003).** Effect of vacuum and modified atmosphere packaging on Deglet Nour date storage in Tunisia. *Fruits (Paris)* 58: 205–212.
- [70]. **Judy A. Johnson, Elhadi M. Yahia, and David G. Brandl. (2009).** Dried Fruits and Tree Nuts. Modified and Controlled Atmospheres for the Storage, Transportation, and Packaging of Horticultural Commodities, Edited by Elhadi M. Yahia, 2009, 520.
- [71]. **Mutlak, H.H. and J. Mann. (1984).** Darkening of dates: Control by microwave heating. *Date Palm Journal* 3, 303–316.
- [72]. **Al-Redhaiman, K.N. (2005).** Chemical changes during storage of 'Barhi' dates under controlled atmosphere conditions. *HortScience* 40, 1413–1415.
- [73]. **Dehghan-Shoar Z, Hamidi-Esfahani Z, Abbasi S. (2010).** Effect of temperature and modified atmosphere on quality preservation of Sayer date fruits (*Phoenix dactylifera* L.). *J Food Process Preserv* 34, 323–34.
- [74]. **Aleid SM, Barber AR, Rettke M, Leo A, Alsenaien WA, Sallam AA. (2012).** Utilization of modified atmosphere packaging to extend the shelf life of Khalas fresh dates. *Int J Food Sci Technol* 47, 1518–25.

- [75]. **Al-Redhaiman KN. (2004).** Modified atmosphere improves storage ability, controls decay, and maintains quality and antioxidant contents of Barhi date fruits. *J Food Agric Env* 2, 25–32.
- [76]. **Achour M, Amara SB, Salem NB, Jebali A, Hamdi M. (2003).** Effect of vacuum and modified atmosphere packaging on Deglet Nour date storage in Tunisia. *Fruits* 58, 205–2.
- [77]. **Muhammad Siddiq, Ibrahim Greiby. (2014).** Overview of Date Fruit Production, Postharvest handling, Processing, and Nutrition. *Postharvest Science, Processing Technology and Health Benefits*, Edited by Muhammad Siddiq, edition wiley Blackwell, 13-14.
- [78]. **Yahia EM. (2004a).** Date. In: Gross KC, Wang CY, Saltveit M, editors. *The Commercial Storage of Fruits Vegetables and Florist and Nursery Stocks*. Agriculture Handbook # 66. Beltsville, Maryland, USDA. 672.
- [79]. **Yahia EM. (2004b).** Date. In: Gross K, Wang CY Saltveit M, editors. *The Commercial Storage of Fruits, Vegetables and Florist and Nursery Crops*. Agriculture Handbook 66. Beltsville, MD: USDA, 3.
- [80]. **Kader AA. 2003.** A perspective on postharvest horticulture (1978–2003). *HortSci* 38: 1004–08.
- [81]. **Serrano M, Pretel M T, Botella MA, Amoros A. (2001).** Physicochemical changes during date ripening related to ethylene production. *Food Sci Technol Int* 7:31–6.
- [82]. **Hussain AA. (1974).** Date palms and dates with their pests in Iraq. Ministry of Higher education and scientific research, University of Baghdad, Baghdad, Iraq.
- [83]. **Elhadi M. Yahia, Maria Gloria Lobo, and Adel A. Kader. (2014).** Harvesting and Postharvest Technology of Dates. *Postharvest Science, Processing Technology and Health Benefits*, Edited by Muhammad Siddiq, edition wiley Blackwell, 127-128.
- [84]. **Hussein F, Souial GF, Khalifa AS, Gaefar SI, Mousa IA. (1989).** Nutritional value of some Egyptian soft date cultivars (protein and amino acids), Proc Second Symp Date Palm, Alahsa, Saudi Arabia, 3–6 March 1986.
- [85]. **Al-Azab AM. (2007).** Alternative approaches to methyl bromide for controlling *Ephesia cautella* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). MSc Thesis, Arid Land Agriculture Department. King Faisal University, Alahsa, Saudi Arabia, 1–23.
- [86]. **El-Mohandes, M. (2009).** Modified atmospheres and/or phosphine fumigation for controlling postharvest dates pests. Report, regional experts group meeting on applications of methyl bromide alternatives in dates sector. United Nations Environment Program, Regional Office for West Asia. 13–16 December, Al-Khobar, Saudi Arabia, 18–9.
- [87]. **Rafaeli A, Kostukovsky M, Carmeli D. (2006).** Successful disinfestations of sap-beetle contaminations from organically grown dates using heat treatment: A case study. *Phytoparasitica* 34: 204–12.
- [88]. **Navarro S. (2006).** Postharvest treatment of dates. *Stewart Postharvest Rev* 2: 1–10.
- [89]. **WITT-OXYBABY® 6.0 (2019).** product information. Gas analyzer. <https://www.wittgas.com/fr/recherche.html?q=OXYBABY%C2%AE+6.0+&id=133&L=2>
- [90]. © **Goodfellow** \_ product information. Films ; 2008 – 2019. <https://www.goodfellow.com/fr/>.
- [91]. **Ketsa S. and Prabhasavat T. (1992).** Effect of skin coating on shelf life and quality of ‘Nang Klangwan’ mangoes. *Acta Horticulturae*, 321(2), 764-770.
- [92]. **Caleb JO, Opara LU, Witthuhn RC. (2012)** Modified atmosphere packaging of pomegranate fruit and arils: a review. *Food Bioprocess Technol* 5, 15–30.
- [93]. **Navarro S, Donahaye E, Rindner M, Azrieli A. (1998a).** Disinfestations of nitidulid beetles from dried fruits by modified atmospheres. *Proc Annual Int Res Conf Methyl Bromide Alternatives and Emission Reductions*. December, Orlando, FL. 681–3.
- [94]. **Navarro S, Donahaye E, Rindner M, Azrieli A, Aksoy U, Fergusson L, Hepaksoy S. (1998b).** Storage of dried fruits under controlled atmospheres for quality preservation and control of nitidulid beetles. *Acta Hort* 480: 221–6.
- [95]. **Saquet, A.A., Sttreif, J., Bangerth, F. (2003).** Energy metabolism and membrane lipid alterations in relation to brown heart development in ‘Conference’ pears during delayed controlled atmosphere storage. *Postharvest Biol. Technol.* 30, 123-132.

## ESSAI DE VALORISATION DE LA DATTE MECH-DEGLA PAR SA SUBSTITUTION AU SUCRE BLANC DANS LA FORMULATION D'UN BISCUIT

YEFSAH-IDRES Aicha <sup>1,3\*</sup>, BENRIMA Atika<sup>1</sup>, HAMMOUCHI Khoudir<sup>2</sup> et BENNAZOUG Yasmina<sup>3</sup>

1. Université de Blida1, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département Agro-alimentaire, B.P. 270, route de Soumaa, Blida, Algérie
2. Entreprise de Cevital agro-industrie, nouveau quai port de Bejaia, Superviseur principal, hammouchi-khoudir@hotmail.com. Algérie.
3. USTHB / FSB, Laboratoire de Biochimie & Remodelage de la Matrice Extracellulaire. ybenaz01@hotmail.com. Alger, Algérie.

*Reçu le 11/08/2019, Révisé le 14/11/2019, Accepté le 04/12/2019*

### Résumé

**Description du sujet.** Mech-Degla est l'un de nos produits du terroir ayant une grande valeur nutritive et énergétique qui est peu valorisé. Sa valorisation souligne un manque accru sur toute sa chaîne de valeur.

**Objectifs.** Le but de cette étude est de substituer partiellement ou totalement la poudre de dattes au sucre blanc dans un essai de formulation d'un biscuit.

**Méthodes.** Les propriétés chimiques et rhéologiques de la farine de blé et de la poudre de dattes ainsi que le test organoleptique des biscuits sont déterminés.

**Résultats.** Avec la poudre de dattes Mech-Degla, nous avons pu formuler un produit fini de qualité avec un taux de substitution de 75% répondant aux normes et aux exigences nutritionnelles.

**Conclusion.** La poudre de dattes présente un bon potentiel dans la formulation des biscuits.

**Mots clés :** Dattes sèches ; valorisation ; poudre de dattes ; test de dégustation ; Mech-Degla ; sucre ; biscuit.

## ATTEMPT TO VALORIZE THE DATE MECH-DEGLA BY SUBSTITUTION TO WHITE SUGAR IN THE FORMULATION OF A BISCUIT

### Abstract

**Description of the subject.** Mech-Degla is one of our local products with high-energy value too little valorization. Its valuation underscores an increased lack throughout its entire value chain.

**Objective.** The purpose of this study is to substitute partially or totally date powder to white sugar in a biscuit formulation test.

**Methods.** The chemical and rheological properties of the wheat flour and the powder of dates, as well as the organoleptic test of the biscuits are determined.

**Results.** The Mech-Degla date powder has enabled us to formulate a quality-finished product with a 75% substitution rate meeting the standards and nutritional requirements

**Conclusion.** The date's powder has good potential in the formulation of biscuits

**Keywords :** Dry dates; valuation; powder of dates; tasting test; Mech-Degla; sugar; biscuit.

\* Auteur correspondant : YEFSAH-IDRES Aicha, E-mail : yefsah\_aicha@yahoo.fr

## INTRODUCTION

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*) est l'arbre fruitier le plus apprécié par les populations des oasis. Les dattes constituent un excellent aliment, de grande valeur énergétique avec un effet physiologique et thérapeutique avéré sur le corps humain sans équivalent [1, 2]. Outre la prédominance des sucres notamment les polysaccharides dotés de propriétés anti tumorales [3], ces fruits possèdent une teneur appréciable en certains acides aminés, dont deux sont essentiels (valine et leucine, avec des concentrations allant jusqu'à 78 et 100 mg/100 g de masse sèche) et des vertus biologiques très intéressantes liées à la présence de fibres comme le  $\beta$ -D-glucane [4] indispensables au tractus digestif. Le fruit de dattes constitue aussi une bonne source d'antioxydants naturels (polyphénols) qui sont impliqués dans la protection contre les maladies dégénératives et neuro-dégénératives [5, 6,7]. Par ailleurs, ces substances sont dotées d'un effet protecteur contre les radicaux libres incriminés dans le stress oxydatif et le phénomène de vieillissement cellulaire. Les travaux de Saafi [8] ont démontré que l'extrait de fruit de dattes est en mesure de restaurer les dommages oxydatifs induits par le diméthoate dans le foie des rats, en inhibant la peroxydation lipidique. L'Algérie est un pays traditionnellement producteur de dattes. Selon les dernières statistiques, sa production mondiale s'élève à plus de 710 000 tonnes occupant une superficie de 170 000 hectares [9] plaçant ainsi l'Algérie au cinquième rang des pays producteurs de dattes, dont 30 à 50% sont des dattes communes à faibles valeurs marchandes pour la plupart destinées à l'alimentation du bétail. Le palmier dattier constitue en effet, dans certaines zones du Sahara, dans les zones Sud des oasis algériennes, la principale production économique et le principal moyen de fixation des populations [10]. Le patrimoine phoenicicole national est représenté par la wilaya de Biskra (83,6%) suivie d'Adrar (22%), d'El-Oued et d'Ouargla de 21 et 15% respectivement. Le secteur phoenicicole, malgré les richesses qu'il procure dans les zones désertiques, accuse un retard organisationnel et technologique. La transformation technologique de dattes communes est considérée comme une approche qui permet d'obtenir de nouvelles gammes d'assortiments et de formulations

alimentaires dotées de praticités et de fonctionnalités en harmonie avec les exigences des consommateurs. En raison de l'absence d'une industrie de transformation, les dattes sont soit perdues, soit vendues à des bas prix ou orientées vers l'alimentation de bétail [11]. La valorisation des dattes communes Mech-Degla (MD) et analogues a fait l'objet de travaux scientifiques comme la transformation de ces dattes en vinaigre par culture de *Saccharomyces uvarum* sur un extrait de datte, en margarine [12], en sirop [13]. Tout récemment, une gelée entièrement naturelle a été développée par association d'un sirop de dattes à partir des dattes secondaires et d'une suspension à base de la partie blanche de l'écorce d'oranges et du jus de citron [14]. MD présente en effet, une texture farineuse et une consistance sèche ce qui lui confère une bonne aptitude à la conservation, notamment sous vide pour plus de 12 mois, la rendant ainsi très appréciée des consommateurs [15]. L'étude menée par Oulamara [16] a montré que l'incorporation de 5% de farine de dattes en panification permet l'obtention d'un pain de meilleure qualité, de saveur plus agréable, ayant une croûte de couleur dorée et une mie bien aérée. Si nous tenons compte de sa richesse en sucres [17], ces dattes communes, peuvent remplacer le sucre blanc raffiné du commerce et leur valorisation pourrait représenter une forte valeur ajoutée sur l'impact socio-économique [18]. Pour ces raisons, cette étude nous permet d'utiliser de la poudre de dattes comme substituant au sucre blanc raffiné du commerce dans la formulation de biscuits au beurre accepté par les consommateurs. Le développement de ce type de produit contribuerait, d'une part, à la valorisation des dattes MD de faible valeur marchande en un produit fini de qualité nutritionnelle avérée sur le corps humain, et d'autre part, à la diversification du marché local, le maintien de la culture de ces variétés et la sauvegarde du patrimoine de la palmeraie algérienne.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Matériel végétal

La farine utilisée pour l'élaboration des biscuits au beurre, est une farine de blé tendre commerciale couramment utilisée en pâtisserie. Cette dernière est mise auparavant au repos,

pour maturation, pendant deux semaines. Le temps de repos préconisé pour une farine avant son utilisation est de deux semaines [19].

Les dattes utilisées dans cette étude sont de la variété sèche Mech-Degla (MD), achetées chez un marchand de dattes dans la ville de Tichy. Ces dernières ont été récoltées au stade de maturité physiologique «Tamar» à Biskra, tel que défini par la nomenclature [20]. Elle est de couleur beige clair teintée d'un marron peu prononcé. Cette variété MD est choisie sur la base de sa consistance sèche, sa texture fibreuse [21] et sa faible teneur en eau ce qui nous donne un fruit qui se détériore plus lentement, ainsi que pour son prix d'achat modéré vu qu'elle est classée parmi les dattes communes, comparativement à la datte « noble » Deglet-Nour. De plus, sa texture farineuse la rend plus adaptée au séchage, au broyage et également à la conservation. Afin de sauvegarder la qualité initiale, ces dattes sont stockées au réfrigérateur jusqu'aux analyses, à une température de 4-7°C environ, pour ralentir sa respiration et les changements biochimiques qui peuvent survenir [22].

## 2. Obtention de la poudre de dattes par séchage et broyage

La poudre (farine) de dattes MD, a été obtenue par triage manuelle pour éliminer les déchets. En effets, les dattes sont dénoyautées et brossées à sec, concassées grossièrement en fragments de longueur de 3 à 8 mm. Le procédé de préparation de la farine (poudre) de ces dattes, exige des dattes dures et cassantes ou susceptibles de le

devenir après séchage. Par ailleurs, la cinétique de séchage de la pulpe, exigeant que les petits morceaux de datte découpés, soient étalés sur un papier d'aluminium, est réalisé à deux températures  $50 \pm 5^\circ\text{C}$  et  $70 \pm 5^\circ\text{C}$ , dans une étuve, de marque Memmert type A013, jusqu'à poids constant. Ces derniers, sont soumis à une dessiccation jusqu'à une humidité résiduelle inférieure à 5%. L'évolution de la teneur en eau au cours du séchage, aux mêmes températures, est déterminée à intervalle de temps régulier d'une heure pour déterminer ensuite l'évolution de cette vitesse de séchage en fonction du temps correspondant à la dérivée de l'évolution de l'humidité résiduelle (X) à un intervalle de temps (dt) en fonction du temps (t).

Cette étape est suivie d'une opération de broyage à froid afin d'éviter que la matière hygroscopique et sucrée devienne pâteuse et de chauffer l'appareil utilisé (mixeur). Le broyage, consiste à diminuer la taille des particules des dattes et augmenter ainsi la surface d'échange entre le solide pulvérulent et le milieu extérieur. Les dattes MD broyées, subissent des tamisages à travers un tamis d'ouverture de maille de 180µm et les poudres de dattes obtenues sont stockées dans des boîtes hermétiques jusqu'aux analyses. A la fin de cette opération, les rendements de la farine des dattes en pulpe fraîche (Rd) et en pulpe sèche (Rs) ainsi que celui de la farine de blé tendre sont déterminés selon les formules suivantes :

$$\text{- Rendement en pulpe fraîche (Rd)} \quad \text{Rd} = \frac{\text{Masse des dattes dénoyautées}}{\text{Masse des dattes entières mise en oeuvre}} \times 100$$

$$\text{- Rendement en pulpe sèche (Rs)} \quad \text{Rs} = \frac{\text{Masse des dattes dénoyautées séchées}}{\text{Masse initial des dattes dénoyautées}} \times 100$$

$$\text{- Rendement en farine (Rf)} \quad \text{Rf} = \frac{\text{Masse de la farine obtenue}}{\text{Masse des dattes entières mises en oeuvre}} \times 100$$

## 3. Procédure analytique

### 3.1. Caractérisation biochimique de la datte fraîche MD, de la poudre de Dattes et de la farine de blé tendre.

La détermination de la teneur en eau (NF V 05-108, 1970) des céréales et des dattes est une

opération capitale pour l'intérêt technologique, analytique, commercial et réglementaire. Cette teneur en eau de la datte MD est déterminée par une méthode analogue à celle des dattes fraîches. Elle est déterminée sur une prise d'essai ( $5 \pm 0,001\text{g}$ ).

Cette dernière a subi une dessiccation à 100°C pendant une heure dans une étuve isotherme de marque Chopin multicellulaire à chauffage électrique réglable [23]. Cette dernière est réalisée selon la méthode citée par Dawson et Aten [24]. La détermination de la teneur en eau de la farine de blé tendre est réalisée selon la norme Française (NF ISO 712) avec une température de séchage de 130°C pendant 90 minutes [25]. La teneur en solides solubles (°Brix) (NF V05-109, 1970) est aussi déterminée dans 10 à 20 g des dattes découpées en petits morceaux. Fondamentalement, le °Brix (%) est calibré en fonction du nombre de grammes de sucre de canne contenus dans une solution de 100 grammes. Le taux de résidu sec soluble est déterminé par un réfractomètre du type abbé. Pour permettre le classement des farines, le taux de cendres et la teneur en sucre sont réalisés sur la farine de blé et celle de la datte MD. Le taux de cendres [25], dans le cas de la farine de blé consiste en une incinération à  $900 \pm 25^\circ\text{C}$ , pendant deux heures d'une prise d'essai de  $5 \pm 0,001$  g (NF V 03. 720) [26]. Pour la farine de dattes, l'incinération de la prise d'essai de  $3 \pm 0,001$ g, est réalisée à une température de  $550 \pm 10^\circ\text{C}$  pendant deux heures [27]. Le taux de cendres est le rapport entre la masse de cendres et la masse de la prise d'essai (exprimé par rapport à la matière fraîche). La teneur en sucres est déterminée selon la méthode de Dubois [28] en présence de phénol (5%) et d'acide sulfurique concentré. Il se forme alors un complexe jaune-orange dont l'intensité est proportionnelle à la concentration des sucres à une longueur d'onde de 490 nm pendant 30 mn. La concentration en sucres est déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage de 120 µg de glucose conformément à la méthode décrite par l'OAIC [29].

### 3.2. Caractérisation technologiques de la farine de blé et celle de la datte Mech degla

Le taux d'affleurement est déterminé pour la farine de blé et pour la farine de dattes MD, sur une prise d'essai de 100g de farine selon la méthode de plansichter « Buhler » [25]. L'appréciation de la quantité et de la qualité du gluten de la farine du blé tendre repose sur son insolubilité dans l'eau chargée de sels et sur la propriété qu'il possède de s'agglomérer lorsqu'il

est malaxé sous un courant d'eau qui élimine les autres constituants.

La masse plastique et pesée à l'état humide (NA.735.1991, ISO 55 31), [30] pur et après dessiccation (NA, 736.1991, ISO 6646). Au cours de l'extraction il convient de noter l'aspect et la plasticité du gluten. L'indice de chute (IC) de la farine de blé est obtenu après gélatinisation rapide d'une suspension aqueuse de mouture intégrale ou de farine de céréales dans un bain d'eau bouillante et mesure de la liquéfaction par l'alpha-amylase de l'empois d'amidon contenu dans l'échantillon conformément à la méthode décrite par Barr et al. [31] et à la norme (NF V 03-703) de 1995). L'indice de chute de Hagberg s'exprime en secondes. Il globalise la durée d'agitation de la préparation (60 secondes) et celle de la chute de l'agitateur [25]. Toutes les mesures ont été répétées trois fois. Les caractéristiques de la farine pour l'indice de chute (IC) sont données par les normes suivantes. *IC < 180 s : forte activité amylasique (farine hyper-amylasée), 180 s < IC < 280 s : activité amylasique normale, IC > 280 s : faible activité amylasique (farine hypo-amylasée)*

### 3.3. Analyses alvéographiques de la farine de blé

Le principal intérêt de déterminer les caractéristiques alvéographiques (l'alvéographe) est de prédire l'aptitude d'un blé ou d'une farine (force boulangère, les propriétés rhéologiques et la teneur en eau constante) à être utilisée dans la fabrication de produits destinés à la cuisson. Le principe de la mesure de l'alvéographe Chopin repose sur l'étude du comportement d'un échantillon de pâte, formé à partir d'un mélange de farine et d'eau salée lors de sa déformation sous l'effet d'un déplacement d'air à débit constant (ISO 5530/4) de septembre 1992. L'évolution de la pression dans la bulle est mesurée et reportée sous forme de courbe, appelée alvéogramme [25]. Par ailleurs, l'alvéogramme est caractérisé par cinq paramètres principaux à savoir, la hauteur P, qui correspond à la pression maximale, l'indice d'élasticité Ie, l'indice de gonflement G, est une expression de volume de la bulle ( $G = \text{racine carrée du volume de la bulle en cm}^3$ ). Il se détermine par correspondance avec la longueur L de la courbe ( $G = 2,26 \times \text{racines carrée de L}$ ),



Le rapport P/L ou ratio de configuration de la courbe nous renseigne sur l'équilibre entre la ténacité et l'extensibilité de la pâte et la surface de l'alvéogramme. Quant à la force boulangère W, elle s'exprime en  $10^{-4}$  Joules rapporté à un gramme de pâte à cinq unités près.

### **3.4. Essai d'élaboration d'un biscuit au beurre en substituant, partiellement et totalement, le sucre blanc par la poudre ou farine de dattes.**

Cette partie est réalisée à l'unité de production de SIDI AICH, qui fait partie de la filiale « Mes Moulins de la Soummam ». L'étude de l'effet de la substitution du sucre blanc par la poudre de dattes sur les caractéristiques technologiques de la pâte (alvéographiques et du gluten) et sur les caractéristiques organoleptiques des biscuits est scindée en deux étapes :

#### **- Détermination de l'effet du taux d'incorporation de la poudre de dattes MD sur**

#### **les caractéristiques alvéographiques et du gluten de la pâte**

La détermination de l'effet du taux d'incorporation de la poudre de dattes sur les caractéristiques alvéographiques et du gluten de la pâte est réalisée par la méthode issue de la norme (ISO 5530/4) de septembre 1992 avec une modification dans la quantité d'eau salée ajoutée, uniquement pour les échantillons contenant la farine (poudre) de dattes, pendant la préparation de la pâte dans l'alvéographe. La quantité d'eau rajoutée est déterminée expérimentalement pour chaque taux d'incorporation. Le taux d'incorporation et les quantités correspondantes en poudre de dattes et en farine de blé tendre sont donnés dans le tableau 1. Les caractéristiques alvéographiques analysées sont les mêmes que précédemment. Les teneurs en gluten sec, gluten humide et la capacité d'hydratation sont également déterminées.

Tableau 1 : Proportions des farines de blé et de dattes utilisées pour la détermination des caractéristiques alvéographiques et du gluten.

Taux d'incorporation	Quantité (Alvéographe)		Quantité (Gluten)	
	Farine de blé (g)	Farine de dattes (g)	Farine de blé (g)	Farine de dattes (g)
0%	250	0	10	0
9,1%	227,09	22,91	9,10	0,9
16,7%	208,01	41,99	8,33	1,67
23,1%	191,88	58,11	7,69	2,31
28,7%	178,08	71,91	7,13	2,87

#### **-Détermination de l'effet de substitution du sucre blanc par la poudre de dattes sur les caractéristiques organoleptiques d'un biscuit au beurre.**

La poudre de dattes utilisée est tamisée par le biais d'un tamis dont les ouvertures de mailles sont de 180 micromètres, et cela afin d'avoir la même granulométrie que celle de la farine de blé conformément à la recette du biscuit au beurre élaborée par Duncan Manley [32].

#### **-Détermination de la meilleure formulation du biscuit au beurre (Évaluation sensorielle et gustative)**

Afin de déterminer la meilleure formulation expérimentale possible de ce biscuit, des tests d'appréciation sont réalisés par un panel de 31 dégustateurs non entraînés et n'ayant aucune notion préalable sur le produit à déguster. Cinq essais de formulation de biscuit sont réalisés. Le Biscuit A, (Témoin) avec un taux de substitution de 0%, les biscuits B, C, et D, avec des taux de substitution de 25%, 50%, 75% et 100% respectivement.

Le tableau 2 illustre les différentes proportions de sucre, de poudre de dattes ainsi que les autres ingrédients utilisés dans l'élaboration de ces biscuits au beurre. A ce niveau, certains critères comme l'état de surface du biscuit ; sa forme ; son aspect d'apparence (Fissuration) ; son goût ; son arrière-goût ; sa saveur ; son odeur ; sa couleur extérieure et sa dureté sont adoptés. Une évaluation sensorielle pour connaître les proportions de farine de dattes et de sucre de table du commerce permettent d'avoir un biscuit présentant les meilleures caractéristiques organoleptiques. Pour ce faire, un test de classement qui consiste à ranger, sur une caractéristique spécifiée, des échantillons de biscuits ainsi formulés, présentés simultanément aux dégustateurs, par ordre d'intensité croissante ou décroissante selon la méthode de Depled [33].

Tableau 2 : Proportions des différents ingrédients des biscuits au beurre élaborés avec différents taux de substitution.

Formulations	Biscuit A (Témoin)	Biscuit B	Biscuit C	Biscuit D	Biscuit E
Taux de substitution (%)	0	25	50	75	100
Farine de blé (g)	100	100	100	100	100
Beurre (g)	49,70	49,70	49,70	49,70	49,70
Jaune d'œuf (g)	3,79	3,79	3,79	3,79	3,79
Bicarbonate d'ammonium (g)	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
Soude (g)	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17
Sel (g)	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76
Sucre (g)	31,82	23,87	15,91	7,95	0
Farine de datte (g)	0	10,09	20,19	30,29	40,38

#### 4. Traitement et analyse des données

Les résultats obtenus sont analysés en triplicata. Les valeurs des paramètres analysés sont exprimées en moyenne affectée de leur écart type et en pourcentage. L'analyse statistique descriptive est réalisée à l'aide du logiciel Microsoft® Excel (version 2013).

L'évaluation des différents biscuits ainsi formulés a été faite au niveau du département d'agronomie de l'USD de Blida 1 (Laboratoire de chimie), dans des conditions favorables (lumière uniforme, absence d'odeur particulière, température et hygrométrie constantes) auprès de 31 étudiants de l'USD de Blida 1, dans la matinée pour obtenir la meilleure sensibilité des dégustateurs. Il leur a été demandé d'effectuer un classement de préférence par ordre croissant pour les cinq échantillons préparés (la notation 1 correspond à l'échantillon le plus apprécié et 5 correspond à l'échantillon le moins apprécié). Chaque dégustateur doit se rincer la bouche après chaque dégustation et noter leur classement sur un bulletin.

## RÉSULTATS

### 1. Caractéristiques physico-chimiques de la datte MD

Les caractéristiques physico-chimiques de la datte MD sont exposées dans le tableau 3. L'humidité, paramètre essentiel pour l'obtention des farines à partir des dattes, représente  $12,07 \pm 0,02$  %. Par contre la valeur du Taux de solides solubles (TSS) de la datte analysée est de  $71,5 \pm 0,29$  %.

Tableau 3 : Caractérisation physico-chimiques de la datte « Mech-Degla »

Paramètres	Teneur en eau (%)	TSS (Taux de solides solubles) (%)
Mech-degla	$12,07 \pm 0,02$	$71,50 \pm 0,29$

## 2. Obtention de la farine de dattes

### 2.1. Cinétique de séchage de la pulpe de dattes

La figure 1, illustre l'évolution de l'humidité résiduelle (X), exprimée par rapport à la matière fraîche, en fonction du temps au cours du séchage aux températures 50 et 70 °C.

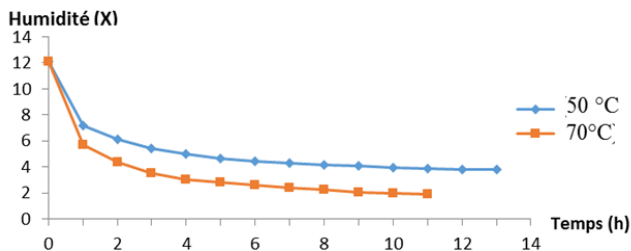


Figure 1: Evolution de l'humidité résiduelle (X) des dattes au cours du séchage en fonction du temps.

Nous avons noté que la courbe (Fig. 2) de variation de la vitesse de séchage en fonction du temps,  $-dX/dt = f(t)$  est d'autant plus grande que la pente de la courbe est importante. L'analyse de cette figure, permet de mettre en évidence trois phases distinctes : **Phase 1** : (0 - 1,45 h) linéaire, présente une vitesse moyenne de séchage de l'ordre de 2,98 et 3,82 % /h respectivement pour les températures 50 et 70°C. Les humidités résiduelles atteintes à la fin de cette première phase, où la majeure partie de l'eau libre est éliminée, sont de l'ordre de 7,15 % (50°C) et 5,69 % (70°C). **Phase 2** : (1,45 - 4,50 h) présente une vitesse moyenne au séchage à 50°C et de 1,45 - 4,50 h au séchage à 70°C. La variation des vitesses de séchage dans cette phase, comparée à la première phase, est faible et les vitesses moyennes de séchage sont de l'ordre de 0,48 et 0,58%/h. **Phase 3** : (4,50 - 13h) présente une vitesse moyenne au séchage à 50°C de 4,50 -11h au séchage à 70°C. Dans cette phase, les vitesses de séchage sont très faibles et pratiquement constantes, elles sont de l'ordre de 0,13 et de 0,12 %/h respectivement pour les températures 50 et 70°C.

### 2.2. Calcul des rendements

Le rendement en pulpes est déterminé à partir de 1 kg de dattes fraîches. La masse de la pulpe fraîche est de 0,826 kg, soit un rendement (Rd) de 82,6%.

La courbe (Fig.1) nous montre la diminution de l'humidité résiduelle en fonction du temps. Elle est plus faible dans le cas du séchage à 50°C qu'à 70°C. Les humidités résiduelles atteintes à la fin de ce processus sont respectivement de 3,48% à 13h et 1,93% à 11h.

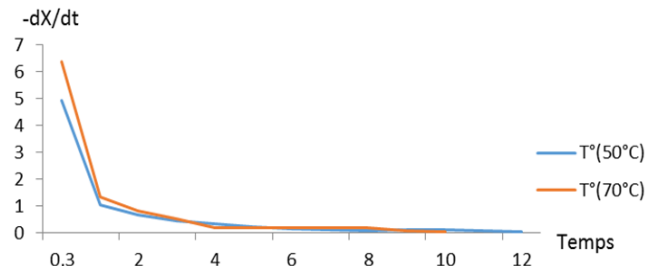


Figure 2: Variation de la vitesse de séchage ( $-dX/dt$ ) des dattes en fonction de temps.

Les rendements en pulpe séchée sont respectivement de l'ordre de 90,97 et 90,2 % pour les températures 50°C et 70°C, ce qui correspond à des taux d'élimination d'eau de 9,03 et 9,80 % respectivement. Par ailleurs, le rendement en farine de dattes par kg de dattes fraîches entières mises en œuvre obtenu est respectivement de 0,714 et 0,71 kg de la farine pour les dattes séchées à 50°C et à 70 °C. Pour ces dernières, les rendements respectifs en farine de dattes Rf sont de 71,4 et 71%.

### 3. Evolution des paramètres physico-chimiques et technologiques de la farine de blé et de la poudre de dattes MD

Le tableau 4 récapitule l'ensemble des paramètres physico-chimiques et technologiques de la farine de blé. L'humidité de la farine de blé correspondant à  $14,31 \pm 0,09$  %. Cette teneur en eau est conforme à la norme algérienne préconisée (13,5 -14,5%). Le taux de cendres de cette farine ( $0,58 \pm 0,05$ %), est dans l'intervalle du seuil fixé par les normes algériennes (0,6%). Nos échantillons renferment en moyenne  $21,25 \pm 0,55$  % de gluten humide. Le gluten sec, quant à lui, représente en moyenne  $7,95 \pm 0,22$  %. Ce résultat se rapproche des normes algériennes qui préconisent un taux de gluten sec compris entre 5 et 7%. La capacité d'hydratation (CH%), qui représente le pourcentage d'eau contenue dans le gluten de cette farine est de 62,57% conformément à la méthode approuvée par Lecoq [27].

Les résultats obtenus par l'alvéographe Chopin, (Tableau. 6), indiquent que la force boulangère ( $w = 184$ ) de la farine analysée est supérieure à celle des farines destinées à la biscuiterie ( $NA : 90 < W < 110$ ). Le rapport de configuration P/L, dépasse légèrement les valeurs 0,3 à 0,4. Le seuil maximal du gonflement G des farines destinées à la biscuiterie, préconisé par les

normes algériennes, est de 23. La farine analysée, présente un gonflement (G) de 20,2 et un taux d'affleurement de ( $4,83 \pm 0,21\%$ ) conforme aux normes de l'entreprise. Cette dernière préconise un taux d'affleurement ne dépassant pas 5%. L'industrie biscuitière exige un taux d'affleurement très faible selon Godon et Willem [34].

Tableau 4 : Paramètres physico-chimiques et technologiques de la farine de blé

Critères d'analyse	Résultats	Normes recommandées
Humidité (%)	$14,31 \pm 0,09$	13,5 - 14,5% (NA)
Cendre (%)	$0,58 \pm 0,05$	0,60 - 0,70% (NA)
Taux d'affleurement (%)	$4,83 \pm 0,21$	Inférieur à 5% (NE)
Paramètres alvéographiques	W : 184	$90 < W < 110$ (NA)
	P : 70	-
	P/L : 0,65	$0,40 < P/L < 0,45$ (NA)
	G : 20,2	23 (NA)
Teneur en gluten (%)	GH (MS): $21,25 \pm 0,55$	-
	GS (MS): $7,95 \pm 0,22$	GS (MS) = 5,00 à 7,00 % (NA)
	CH : 62,57	$62\% < CH < 65\%$ (Lecoq, 1965).
Indice de chute (S)	$246 \pm 0,88$	$180 s < IC < 280s$ (NF)
NA= Normes Algériennes      NF= normes Françaises      NE = Normes Européenne		

#### 4. Paramètres physico-chimiques et technologiques de la farine de dattes (FDS)

Les paramètres physico-chimiques et technologiques de la farine de dattes (FDS) sont récapitulés dans le tableau 5. Les teneurs en eau, en sucres et en cendres moyennes ainsi que le rapport « r » de la poudre) de dattes obtenue par séchage (FDS) à 70 °C et à 50°C (Tableau 5)

sont respectivement de l'ordre de  $2,00 \pm 0,18$  et  $3,78 \pm 0,3\%$ , de  $73,33 \pm 0,73$  et  $78,80 \pm 0,72\%$ , de  $3,40 \pm 0,3$  et  $5,21 \pm 0,28\%$  et 36,66 et 20,84. Par ailleurs, les taux d'affleurement des farines de dattes, obtenus par séchage aux températures suscitées, sont relativement très élevés comparés à la farine de blé.

Tableau 5 : Evolution des paramètres physico-chimiques et technologiques de la poudre de datte

Paramètres	FDS à 70°C	FDS à 50°C
Humidité %	$2,00 \pm 0,18$ (MF)	$3,78 \pm 0,3$ (MF)
Sucre %	$73,33 \pm 0,73$ (MF)	$78,80 \pm 0,72$ (MF)
Indice r	36,66	20,84
Cendres %	$3,40 \pm 0,3$	$5,21 \pm 0,28$
Taux d'affleurement (T180)	$43,67 \pm 0,06$	$45,59 \pm 0,14$

MF= matière fraîche ; FDS= farines de dattes séchées ; indice r = teneur en sucre/teneur en eau

#### 5.

##### *Essai d'élaboration d'un biscuit au beurre en substituant, partiellement et totalement, le sucre blanc par la poudre de dattes*

##### *5.1. L'effet du taux d'incorporation de la poudre de dattes sur les caractéristiques alvéographiques et du gluten de la pâte*

L'évolution des caractéristiques alvéographiques et celle du gluten de la pâte aux différents taux d'incorporation de la farine de dattes sont consignés respectivement dans les tableaux 6 et 7. Les taux d'incorporation étudiés sont 0%, 9,16%, 16,76%, 23,24%, 28,72%.

Les résultats (Tableau 6), montrent l'absence de corrélation entre les différentes caractéristiques alvéographiques et le taux d'incorporation de la poudre de dattes. Les taux de gonflement (G) pour tous les taux d'incorporation, sont conformes aux normes algériennes ( $G < 23$ ). Par contre, la force boulangère W et le rapport P/L ne sont pas, pour tous les taux d'incorporation, dans les limites souhaitées ( $90 < W < 110$  NA) et ( $0,40 < P/L < 0,45$ ). Le tableau suivant montre l'évolution des caractéristiques du gluten en fonction de taux d'incorporation

Nos résultats (Tableau 7) montrent que la teneur en gluten est incluse dans les limites des normes algériennes.

En effet, les taux d'incorporation 16,76% et 23,24%, montrent une teneur comprise dans les seuils d'une farine biscuitière. Pour le taux d'incorporation 28,72%, les valeurs du gluten trouvées sont inférieures aux normes existantes ( $5,0\% < GS < 7,0\%$ ) pour le taux d'incorporation 28,72%. Concernant les capacités d'hydratation (CH) du gluten, les variations sont faibles, elles sont semblables, comparés à la farine témoin (taux d'incorporation 0 %). Compte tenu de ces observations, nous avons noté que la teneur en gluten sec (GS), exprimée en %, du mélange des farines est inversement proportionnelle aux taux d'incorporation (Tableau 7).

Tableau 6 : Evolution des caractéristiques alvéographiques de la pâte en fonction du taux d'incorporation.

Taux d'incorporation	caractéristiques alvéographiques					
	P	L	G	W	P/L	Ie (%)
0%	69	86	20.6	185	0.80	48.2
9.16%	44	110	23.3	114	0.4	37.9
16.76%	41	69	18.5	83	0.59	38.7
23.24%	40	20	10	36	2	0.00
28.72%	32	30	12.2	28	1.07	0.00

G : Indice de gonflement (cm<sup>3</sup>), P/L : Rapport de configuration (ténacité/extensibilité), W:Travail de déformation (J), Ie : Indice d'élasticité.

Tableau 7 : Evolution des caractéristiques du gluten de la pâte et de la capacité d'hydratation en fonction de taux d'incorporation

Taux d'incorporation	Taux du gluten et la capacité d'hydratation		
	GH	GS	CH
0%	21.25 ± 0.55	7.95 ± 0.22	62.57
9.16%	16.64 ± 0.21	6.20 ± 0.10	62.71
16.76%	13.27 ± 0.04	4.89 ± 0.03	63.14
23.24%	12.10 ± 0.37	4.83 ± 0.05	61.92
28.72%	3.14 ± 0.1	1.22 ± 0.06	60.89

GH: gluten humide ; GS : gluten sec; CH: capacité d'hydratation

## 5.2

### *. Effet de substitution du sucre blanc par la poudre de dattes sur les caractéristiques organoleptiques et physiques d'un biscuit au beurre.*

Les figures suivantes nous renseignent sur l'ensemble des appréciations des 31 panélistes respectivement pour les critères état de surface, forme, fissuration, saveur, goût, arrière-goût,

odeur, couleur extérieur et la dureté. Les Biscuit de l'échantillon A et B présentent un état de surface le plus apprécié (Fig. 5). L'évaluation de la forme et de la fissuration est représentée par les figures 6 et 7. Il a été observé que les biscuits de l'échantillon A sont les mieux appréciés par nos 31 panélistes. La saveur de l'échantillon D est jugée la meilleure (Fig. 8).

Pour le goût et l'arrière-goût et l'odeur, les biscuits de l'échantillon D sont les meilleurs (Fig. 9 ; 10 et 11). Les biscuits A, sont ont une couleur extérieure la plus appréciées (Fig. 12).

Pour la dureté, l'échantillon D est le plus apprécié (Fig.13). Pour l'appréciation globale, l'échantillon D est celui qui présente les meilleures caractéristiques (Fig. 14).

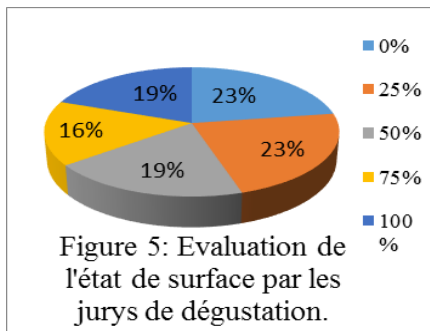


Figure 5: Evaluation de l'état de surface par les jurys de dégustation.

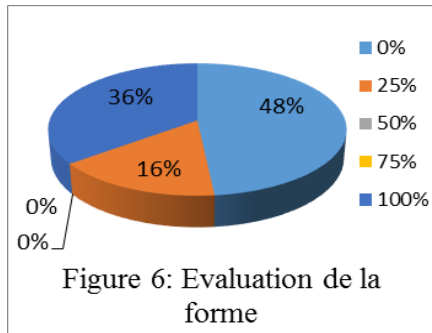


Figure 6: Evaluation de la forme

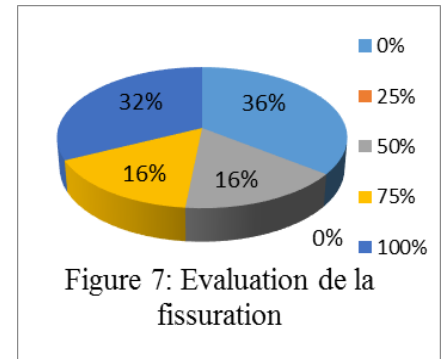


Figure 7: Evaluation de la fissuration

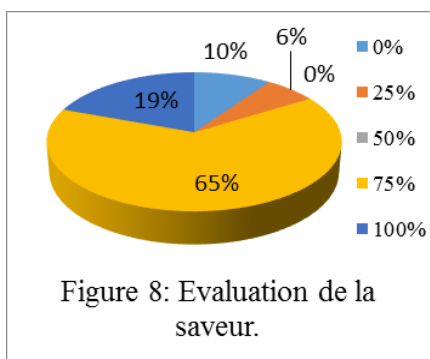


Figure 8: Evaluation de la saveur.

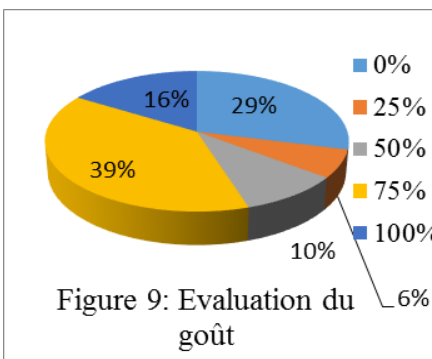


Figure 9: Evaluation du goût

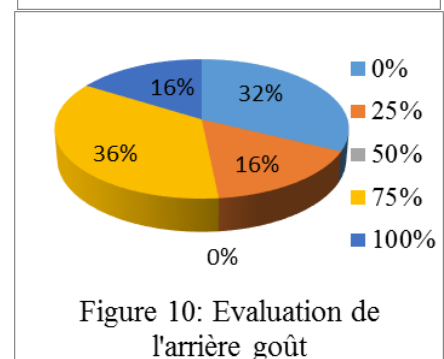


Figure 10: Evaluation de l'arrière goût

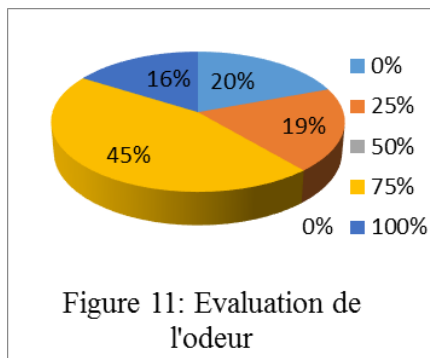


Figure 11: Evaluation de l'odeur

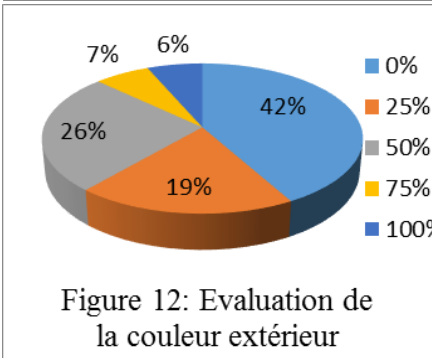


Figure 12: Evaluation de la couleur extérieur

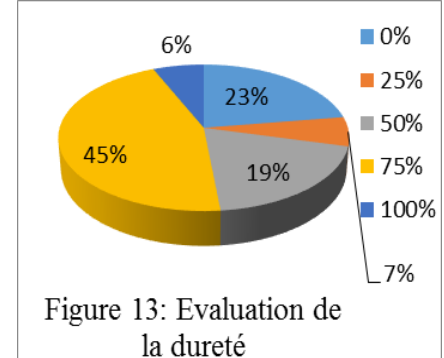


Figure 13: Evaluation de la dureté

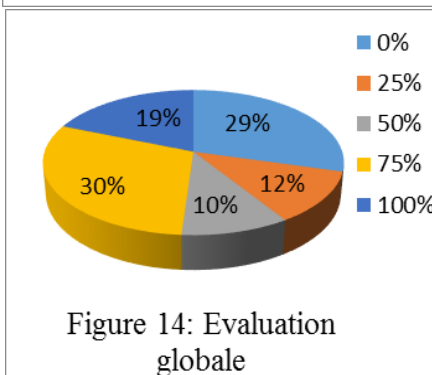


Figure 14: Evaluation globale

La structure et l'apparence des cinq biscuits ainsi formulés aux différents taux de substitutions sont représentées par la figure 15.

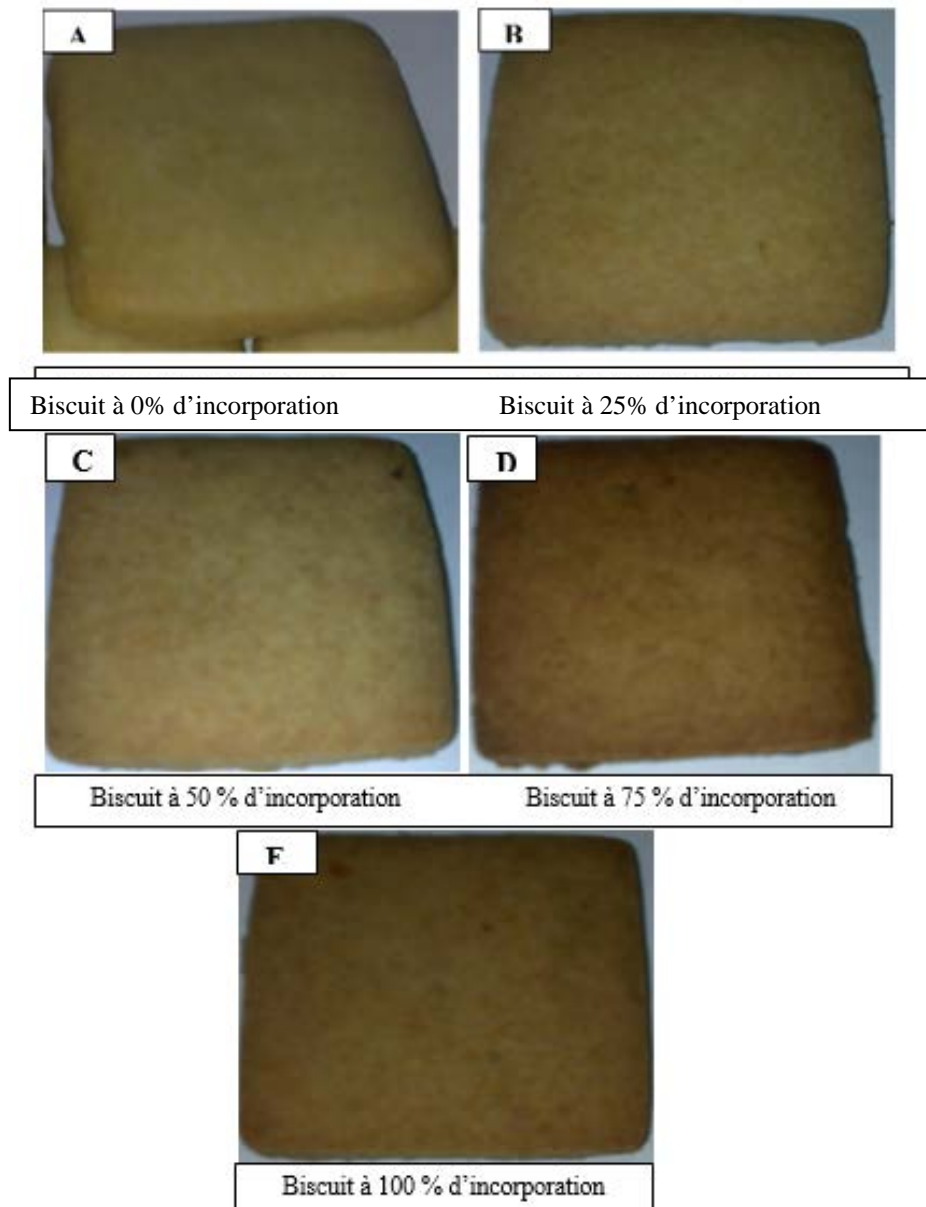
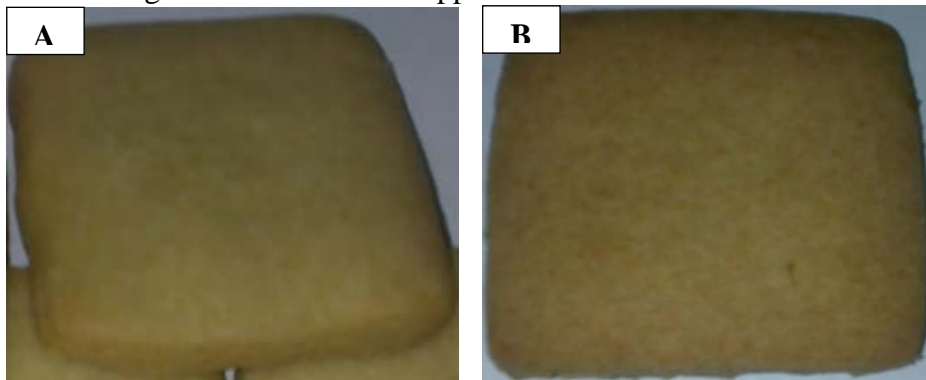


Figure 15 : Structure et apparence des biscuits élaborés



## DISCUSSION

La phoeniciculture constitue une bio ressource patrimoniale de l'Algérie. Les dattes, y compris les variétés sèches commune MD, sont un véritable concentré de calories avec plus de 50% de sucres par rapport à la matière sèche [35]. Selon les statistiques du ministère de l'agriculture (2001), ces variétés dites commune peuvent dépasser les 30% de la production. Elles restent non utilisées et pourraient être récupérées, valorisées et transformées. La valorisation technique de ces dattes devrait mettre à la disposition du consommateur, un produit fini de qualité avec de nouvelles fonctionnalités assurant ainsi la création d'emplois et améliorer les revenus des producteurs travaillant dans ces milieux aux climats difficiles. MD est une variété qui a l'aptitude d'être transformée en poudre par séchage. Compte tenu de sa richesse en sucres, ces dattes peuvent remplacer avantageusement le sucre blanc raffiné et leur valorisation pourrait représenter une forte valeur ajoutée sur l'impact socio-économique. Les résultats de la caractérisation de la matière première (dattes fraîches) ont permis de mettre en évidence sa conformité, du point de vue physico-chimique. En effet, la teneur en eau (humidité) est un paramètre essentiel pour l'obtention des farines ou poudres à partir des dattes, puisque le broyage ne peut se faire qu'en présence d'une faible teneur en eau [36]. Le taux d'humidité enregistré (12.07 %) est proche des résultats rapportés par Belguedj [15], par Benamara *et al.* [12] et par Chibane *et al.* [37] pour la même variété MD. Ces derniers notent des teneurs comprises entre 13 et 15% respectivement. En effet, cette teneur en eau des dattes fraîches dépend de la fréquence et du volume des irrigations au stade khalal, de l'humidité relative de l'atmosphère, du moment de la récolte et du lieu d'entreposage après récolte [38]. Nos résultats sont aussi en accord avec ceux notés par Al-houti *et al.* [39] pour les variétés saoudiennes Birhi et Safri. La faible teneur en eau de la datte MD protège le fruit contre le développement de microorganismes ce qui favorise sa longue durée de conservation. En outre, nous avons trouvé que l'indice de qualité « r », permettant d'estimer le degré de stabilité microbiologique, technologique et biochimique du fruit, est supérieur à 3,5.

Cette dernière est jugée sèche et stable [40]. Le taux de solides solubles (TSS) de la datte analysée, traduit la richesse de ce fruit en matières solubles, composées principalement par le glucose, le fructose et le saccharose. Ce résultat est compatible avec celui avancé par Bousdira [41]. Par ailleurs, l'obtention de la farine de dattes est passée par une cinétique de séchage de la pulpe. Ce résultat très élevé (71,50 %) fait de la datte un fruit unique. L'évolution de l'humidité résiduelle au cours du séchage aux températures 50 et 70 °C est semblable à celle obtenue dans le cas de séchage des produits biologiques [42]. Cette variation de la vitesse de séchage est d'autant plus grande que la pente de la courbe  $-dX/dt = f(t)$  est importante. Nous avons noté que la majeure partie de l'eau libre est éliminée au niveau de la première phase jusqu'à atteindre des humidités résiduelles de l'ordre de 7,15 % (50°C) et 5,69 % (70°C). Nous avons aussi noté qu'à la troisième phase, les vitesses de séchage sont très faibles et pratiquement constantes, ce qui peut s'expliquer par le fait que le séchage a atteint la fraction d'eau difficile à éliminer, correspondant à l'eau liée. Ce séchage, a pour rôle d'abaisser le potentiel de croissance des microorganismes et les réactions chimiques indésirables (brunissement enzymatique), donc la prolongation de la durée de vie du produit [43].

Les rendements en pulpe fraîche dépassent légèrement les 82%. Ces résultats sont en accord avec ceux d'Oulamara [23] et Acourene et Tama [44], qui sont respectivement de 81%, 79,45% et de 82,45%. Pour ce qui est des rendements en pulpe séchée, nos résultats sont respectivement de l'ordre de 90,97 et 90,2 % pour les températures 50°C et 70°C, ce qui correspond à des taux d'élimination d'eau respective de 9,03 et 9,80 %. Les rendements respectifs en farine de dattes sont de 71,4 % à 50°C et 71% à 70°C. Nos résultats sont en accord avec ceux d'Oulamara [23] qui ont noté un rendement en farine des dattes MD de 73.10%. Nous avons remarqué que ces rendements sont importants, ils contribuent avantageusement pour la transformation artisanale ou industrielle des dattes de moindre qualité commerciale en tant qu'aliment énergisant grâce à sa teneur élevée en sucres et à sa teneur appréciable en certains acides aminés,



dont deux essentiels (valine et leucine, avec des concentrations allant jusqu'à 78 et 100 mg/100 g de masse sèche) [2].

L'évolution des paramètres physico-chimiques et technologiques de la farine de blé et de la poudre de dattes, ont donné une humidité conforme à la norme algérienne (13,5-14,5%) pour la farine de blé. Cette humidité est prise en considération au cours de l'élaboration du biscuit [45]. La détermination de l'humidité est importante puisqu'elle conditionne d'une part la précision des divers résultats analytiques rapportés à la matière sèche et d'autre part celle de la mise en œuvre des tests technologiques tel l'essai de la panification [45]. Pour ce qui est de la farine de dattes, nous avons cherché sciemment à atteindre un taux faible d'humidité. En effet ce dernier est favorable d'une part, aux différentes manipulations de la farine dans la biscuiterie, et d'autre part à la conservation. Du fait de l'hygroscopicité de cette farine, il est préconisé de la stocker à l'abri de l'air (humidité). Le taux de cendres de cette farine de blé, est proche du seuil fixé par les normes algériennes (0,6%). En effet, il nous renseigne sur la teneur globale en minéraux de chaque farine [36]. Pour ce qui est du taux cendres des farines de dattes séchées à 70°C et à 50 °C, ils sont respectivement de l'ordre de  $3,40 \pm 0,3$  et  $5,21 \pm 0,28$  %. Nos résultats se rapprochent de ceux rapportés par Lecoq [25], (2,33 et 2,46 %) pour la farine de dattes obtenue par séchage à 50 °C de la variété sèche Degla-Beïda. La teneur en sucre de la farine de dattes séchée à 70°C et à 50°C sont respectivement de  $73,33 \pm 0,73$  et  $78,80 \pm 0,72$  %. Ce résultat est conforme aux travaux de Nahili [36] et ceux de Demirba [46] rapportant une teneur en sucre comprise entre 73 et 85%, pour les farine de dattes MD et degla beida. Par ailleurs, de nombreux auteurs, dont Sawaya *et al.* [47], s'accordent sur le fait que la teneur en sucres des dattes varie en fonction de la variété considérée, du climat, du stade de maturation et de la méthode utilisée. Les normes Algériennes préconisent pour les paramètres rhéologiques des taux de gluten sec compris entre 5 et 7%. Un gluten est considéré comme moyen d'estimation de la qualité de la pâte. Les farines usuelles ont des teneurs de l'ordre de 27 à 37%.

Les farines provenant de blé très fort peuvent présenter des teneurs allant jusqu'à 45% alors que des pourcentages inférieurs à 25% signalent une farine faible (farine pour biscuit par exemple). Par contre la capacité d'hydratation est conforme aux normes. Le même résultat a été observé par Khali *et al.* [48] lors de l'élaboration d'un pain en lui incorporant des noyaux de dattes. L'évolution des paramètres alvéographiques ont montré une force boulangère W supérieure à celle des farines destinées à la biscuiterie ( $90 < W < 110$ ) et, en conséquence, conviendraient plutôt à la panification. Cependant, il est techniquement possible de réduire l'effet de cette force en utilisant soit de l'amidon de maïs, soit un coupage avec une farine très faible. Nous pouvons aussi corriger et réduire le rapport de configuration (P/L) en utilisant des farines très extensibles c'est-à-dire des farines présentant des P/L faibles. En effet, ce rapport de ténacité au gonflement, représente l'équilibre entre la ténacité et l'extensibilité des pâtes formées [49]. Nos résultats ont aussi démontrés que le taux de gonflement (G) est conforme aux normes algériennes et aux farines destinées à la biscuiterie. Par ailleurs, le comportement des farines au cours de leur transformation, notamment la vitesse d'hydratation dépend du taux d'affleurement [50]. Le résultat obtenu ( $4,83 \pm 0,21$ %) est conforme aux normes de l'entreprise qui préconise un taux d'affleurement ne dépassant pas 5%. Ceux de la farine de dattes obtenue par séchage aux températures suscitées sont relativement très élevés. Nous avons opté pour la farine de dattes obtenue par séchage à 50°C, car cette dernière étant plus claire (blanche) que l'autre, obtenue au séchage 70°C. Après caractérisation de la poudre de dattes et de la farine du blé tendre, nous avons étudié, dans un premier temps, l'effet du taux d'incorporation de la poudre de dattes sur les caractéristiques alvéographiques et celles du gluten de la pâte à biscuit avant d'entamer la préparation des biscuits au beurre, proprement dite, et la détermination des caractéristiques organoleptiques de ces derniers. Nos résultats n'ont montré aucune corrélation entre les différentes caractéristiques alvéographiques et le taux d'incorporation de la farine de dattes.

Nous avons constaté, qu'au fur et à mesure de l'augmentation du taux d'incorporation de la poudre de dattes dans la farine de blé, l'extraction du gluten devient plus difficile (s'agrège difficilement), il devient moins élastique, cassant et sa couleur s'assombrie. Il faut préciser que la quantité d'eau salée rajoutée, étant différente pour chaque coupage, est inversement proportionnelle au taux d'incorporation de la poudre de dattes. Notons aussi, que la variation de la température lors de la manipulation joue un rôle important. Néanmoins, les indices de gonflement G, qui nous renseigne sur l'extensibilité de la pâte, et permettent d'apprécier l'aptitude de celle-ci à retenir le gaz carbonique lors de la fermentation [51], sont conformes aux normes algériennes ( $G < 23$ ) et françaises [20 - 24] cm<sup>3</sup> de panification [52] pour tous les taux d'incorporation. Nos résultats ont montré aussi un rapport de configuration P/L qui varie entre [0,4 - 2]. Hormis le coupage qui corespond au taux d'incorporation 23,24%, tous les autres répondent aux exigences de panification algériennes [53], (0,45 - 0,65), françaises (0,5 - 0,7) [52] et de l'association Italienne du commerce des céréales pour une farine supérieure de panification (0,8 - 1,2) ainsi qu'une farine courante de panification (0,7 à 1,2) [54]. Nos résultats sont aussi en accord avec les travaux rapportés par Ait Kaddour *et al.* [55], qui ont également noté un ( $0,44 < P/L < 1,2$ ). Le travail W, permet de déterminer la force boulangère d'une farine. Les travaux de Calvel [56] ont démontré, que si ce paramètre a de l'importance, sa signification reste limitée si on ne tient pas compte des autres caractéristiques alvéographiques. Les valeurs obtenues pour les taux d'incorporation 0 % (témoin), 9,16% et 16,76% sont proches des exigences algériennes de la panification (130– 180) [53], et de l'association Italienne du commerce des céréales (140– 170) pour une farine courante de panification [54]. Le gluten humide quant à lui, représente les protéines insolubles dans l'eau. Grâce à son extensibilité et son élasticité, le gluten confère à la pâte ses caractéristiques rhéologiques.

Pour les taux d'incorporation 0% et 9,16%, la teneur en gluten n'est pas conforme aux normes algériennes, toutefois pour les taux d'incorporation 16,76% et 23,24% la teneur en gluten demeure dans les seuils d'une farine biscuitière [27]. Pour le taux d'incorporation 28,72% les valeurs du gluten trouvées sont inférieures aux normes existantes ( $5,0\% < GS < 7,0\%$ ). La capacité d'hydratation aux différents taux d'incorporation se rapproche du témoin (62,57%). Les caractéristiques organoleptiques et physiques du biscuit au beurre élaboré par la substitution du sucre blanc raffiné du commerce par la poudre de dattes à différents pourcentages, ont montré que les deux biscuits formulés A (0%) et B% (25%) de farine de datte) respectivement présentent un état de surface le plus apprécié par les 31 panélistes (jurys de dégustation) et représente un score de 33% chacun. Pour l'état de surface, la fissuration et le critère couleur extérieure, l'échantillon A, est le plus apprécié. Par ailleurs, la couleur peut varier selon le pourcentage de l'incorporation de la farine de datte car cette dernière peut l'influencer en la rendant sombre. Nous avons aussi noté que l'échantillon D présente la meilleure saveur, le meilleur goût, une bonne appréciation pour l'arrière-goût (somme des rangs la plus faible), une bonne odeur et la dureté la plus appréciée avec un score de de 65%, de 75 % et 45% respectivement. Au vu de tous ces résultats, il paraît clairement que la substitution du sucre blanc raffiné par la poudre de dattes induit des changements dans la majorité des caractéristiques sensorielles du biscuit. Tenant compte des propriétés sensorielles analysées pour les différents échantillons, nous avons retenu l'échantillon D comme étant celui qui présente les meilleures caractéristiques avec un taux de substitution de 75%.

## CONCLUSION

La transformation est une nouvelle approche préconisée pour aboutir à de nouvelles formulations alimentaires dotées de praticité et de fonctionnalités en harmonie avec les exigences des normes en vigueur et des consommateurs.

La poudre de dattes MD, étant donné sa richesse en sucre, peut remplacer le sucre blanc raffiné et sa valorisation pourrait représenter une forte valeur ajoutée sur l'impact socio-économique et améliorer ainsi la santé des consommateurs.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. **Rahmani A.H., Aly S.M., Ali H., Babiker A.Y., Srikar S. & Khan A.A. (2014).** Therapeutic effects of date fruits (*Phoenix dactylifera*) in the prevention of diseases via modulation of anti-inflammatory, anti-oxidant and anti-tumour activity. *Int J Clin Exp Med*, 7(3): p.483-491.
- [2]. **Benamara S., Djouab, A., Boukhiar, A., Iguergaziz, N. & Benamara, D. J. (2017).** Fruit du dattier (*Phoenix dactylifera* L.) : Fruit ordinaire ou alimentsanté. *Phytothérapie, hytothérapie*, (16 S1), S184-S190.
- [3]. **Vannuci L., Krizan J., Sima P., Stakheev D., Caja F., Rajsiglova L., Horak V. & Saieh M. (2013).** Immunostimulatory properties and antitumor activities of glucans (review). *Int J Oncol*, 43: p. 357–364.
- [4]. **Vayalil P.K. (2002).** Antioxidant and antimutagenic properties of aqueous extract of date fruit (*Phoenix dactylifera* L. Areaceae). *J Agric Food Chem*, 50: p. 610–617.
- [5]. **Pincemail J., Degrune F., Voussure S., Malherbe C., Paquot N. & Jean-Olivier Defraigne J.O. (2007).** Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition clinique et métabolisme*, 21(2), p. 66 -75.
- [6]. **Biglari F., Al-Karkhi A.F.M. & Easa A.M. (2008).** Antioxidant Activity and Phenolic Content of Various Date Palm (*Phoenix dactylifera*) Fruits from Iran. *Food Chemistry*, 107, p. 1636-1641.
- [7]. **Vayalil P.K. (2012).** Date fruits (*Phoenix dactylifera* Linn): An emerging medicinal food. *Critical reviews in food and nutrition*, 52, p. 249-271.
- [8]. **Saafi E.B. (2011).** Protective effect of date palm fruit extracts (*Phoenix dactylifera* L.) on dimethoate induced oxidative stress in rat liver. *Exp Toxicol Pathol* 63, p. 433– 441.
- [9]. **FAO, (2013).** FAOSTAT statistical database (disponible à l'adresse : faostat.fao.org).
- [10]. **Djennane A. (1990).** Constat de situation dans des zones Sud des oasis algériennes. In : Dollé V, Toutain G (eds) Les systèmes agricoles oasiens. CIHEAM, Montpellier, pp. 29–40. (Options méditerranéennes : série A. Séminaires méditerranéens, no 11).
- [11]. **Saouli N. (2005).** Le potentiel phoenicicole algérien. Journée d'étude sur la transformation des produits du palmier, I.T.D.A.S. Biskra.
- [12]. **Benamara S., Gougam H., Amellal H., Djouab A., Benahmed A. & Noui Y. (2008).** Some technologic proprieties of common date (*Phoenix dactylifera* L.) fruits. *Am J Food Technol*, 3, p. 79– 88.
- [13]. **Chandrasekaran M. & Bahkali A.H. (2013).** Valorization of date palm (*Phoenix dactylifera*) fruit processing by-products and wastes using bioprocess technology. *Review. Saudi J Biol Sci*, 20: p.105–120.
- [14]. **Benali S., Benamara S., Bigan M. & Madani K. (2015).** Feasibility study of date (*Phoenix dactylifera* L.) fruit syrup-based natural jelly using central composite design. *J Food Sci Technol*, 52, p. 4975– 4984.
- [15]. **Belguedj M., 2002.** Les ressources génétiques du palmier dattier. Caractérisation des cultivars de dattiers dans les palmeraies du Sud-est Algérien., *Revue Dossiers Document Débats n°1 INRAA, Alger*, 289 p.
- [16]. **Oulamara H. (2001).** Incorporation de farine de dattes en panification, thèse de magistère, université de constantine. 126p.
- [17]. **Elarem A.G., Flamini G., Emna B.S., Issaoui M., Zeyene N., Ferchichi A., Hammami M., Helal Ahmed N. & Achour L. (2011).** Chemical and aroma volatile compositions of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruits at three maturation stages. *Food Chem*, (127), p.1744-1754.
- [18]. **Ben Ismaïl H., Djendoubi N., Kodia A., Ben Hassine D. & Ben Slama M. (2013).** Physicochemical characterization and sensory profile of 7 principal Tunisian date cultivars. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 25 (5), p. 331-341.
- [19]. **Moulinier A. & Brette C. (1995).** Contrôle de la qualité des céréales et des produits protéagineux. Ed. ONIC, Paris, 249P.
- [20]. **Hannachi S., Khitri D., Benkhalfa A. & Brac de Perrière R.A. (1998).** Inventaire varietal de la palmeraie algerienne. CDARS/URZA, Publishers, Alger, 225 p.
- [21]. **Buelguedj M. (1996).** Caractéristiques des cultivars de dattiers du sud-est du Sahara algérien. Vol I. Conception et réalisation : Filière « cultures pérennes » de l'ITDAS, 67 p.
- [22]. **Maskan M. (2002).** Effect of processing on hydration kinetics of three wheat products of the same variety. *Journal of Food Engineering*, 54, p. 81-88.

- [23]. **Oulamara H. (2001)**. Incorporation de farine de dattes en panification, thèse de magistère université de constantine. 126p.
- [24]. **Dawson V. H. W., & Aten A. (1963)**. Récolte et conditionnement des dattes. *Collection FAO*, cahier (72), 397 p.
- [25]. **Moulinier A. & Brette C. (1995)**. Contrôle de la qualité des céréales et des produits protéagineux. Ed. ONIC, Paris, 249P.
- [26]. **Godon B. & Loisel W. (1997)**. Guide pratiques d'analyses dans les industries des céréales, Lavoisier, PARIS, pp. 12 R 18.
- [27]. **Lecoq R. (1965)**. Manuel d'analyse alimentaire et d'expertises usuelles. Tome I. Ed. DOIN, DEREN et CIE, p. 241-251.
- [28]. Dubois M., Gilles K., Hamilton J.K., Rebers P.A. & Smith F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Smith Anal. Chem*, 28 (3), 350-356.
- [29]. AOAC. (2005). Official method of analysis of the Association of official Analytical Chemist. Washington DC, 18th Ed. *Method* 935.14 and 992.24.
- [30]. **Reymond C. (1980)**. La boulangerie moderne, Editions Eyrolles, 1980. 190p.
- [31]. **Barr C., Beau M.F., Belly J.M., Bocquet A., Bris V., Delplancke D., Fisher J., Foucher C., Gabillard M., Hoffmann D., Kern F., Leblanc M.P., Lebras A., Lebrun J., Mahaut B. & Martin G. (2001)**. Contrôle de la qualité des céréales et protéagineux. *Guide pratique*. Editions ITCF. Nancy, France, 268 p.
- [32]. **Duncan M., (2001)**. Biscuit cracker and cookie recipes for the food industry. Edition CRC. washington, DC. 189 p.
- [33]. **Depledt F. (1998)**. Evaluation sensorielle : manuel méthodologique. Paris : *Techniques et Documentation- lavoisier*, pp. 33- 45.
- [34]. **Godon G., Willem C., (1991)**. Les industries de première transformation des céréales. Ed : Techniques et documentation, Lavoisier. Paris. 656 p.
- [35]. **Benahmed Djilali et al., 2010**. Analyse des aptitudes technologiques de poudres de dattes (Phoenix-dactylifera.l) améliorées par la spiruline : étude des propriétés rhéologiques, nutritionnelles et antibactériennes. Thèse de doctorat, Université de Boumerdès - M'hamed Bougara. 119 p.
- [36]. **Nahili N. (2006)**. Valorisation de quelques variétés de dattes. Mémoire d'ingénieur d'état en agronomie spécialité sciences alimentaires, université Saad Dahlab-Blida, 71p.
- [37]. **Chibane H., Benamara s., Noui Y. & Djouab A.** Some Physicochemical and Morphological Characterizations of Three Varieties of Algerian Common Dates. *European Journal of Scientific Research*, 18 (1), pp.134-140.
- [38]. **Matallah S. (1970)**. Contribution à la valorisation de la datte algérienne. *Thèse d'ingénieur Agronome*, INA, EL-Harrach, 121p.
- [39]. **Al- Hooti S.N., Sidhu J.S., Al-Saqer J.M. & Al-Othman A. (2002)**. Chemical composition and quality of date syrup as affected by pectinase/cellulase treatment. **79(2)**, P. 215-220.
- [40]. **Harrak H. & Mohameb Boujnah M. (2012)**. Valorisation technologique des dattes au Maroc. Ed INRA. 160p.
- [41]. **Bousdira k. (2007)**. Contribution à la connaissance de la biodiversité du palmier dattier pour une meilleure gestion et une valorisation de la biomasse : Caractérisation morphologique et biochimique des dattes des cultivars les plus connus de la région de M'zab, classification et évaluation de la qualité. Thèse de magistère, Université M'hammed Bouguerra, Boumerdès, 157p.
- [42]. **(Daudin J. & Bimbenet J. (1982)** Détermination expérimentale du comportement des produits solides lors du séchage par rntreînement. *Ind.Aliment. Agric*, **99** (4), p. 227-235.
- [43]. **Gowen A.A., Abu-Ghannam N., Frias J. & Oliveira J. (2008)**. Modeling dehydration and rehydration of cooked soybeans subjected to combined microwave-hot-air drying. *Innovative FoodScience & Emerging Technologies*, 9, p. 129-137.
- [44]. **Açourene S. & Tama M. (1997)**. Caractérisation physicochimique des principaux cultivars de datte de la région des Zibans. *Recherche Agronomique*, N° 1. Ed. INRAA, Alger, P. 59- 66.
- [45]. **Calvel R. (1984)**. La boulangerie moderne. Editions EYROLLES, 10ème Edition, Paris, 460 p.
- [46]. **Demirbas A. (2017)**. Utilization of date biomass waste and date seed as bio-fuels source. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, **39(8)**, p. 754- 760.
- [47]. **Sawaya W.N., Khalil J.K., Safi W.M. & Al-Shalat A. (1983)**. Physical and Chemical Characterization of Three Saudi Date Cultivars at Various Stages of development. *Can. Ins. Food Sci. Technol. J*, **16** (2), p. 87-93.

- [48]. **Khalil K.E., Abd-El-Bari M.S., Hafiz N.E. & Ahmed E.Y. (2002).** Production, evaluation and utilization of date syrup Concentrate (Dibis). *Egypt. J. Food Sci*, **30**(2), p. 179- 203.
- [50]. **Colas A., Godon B. & Wilim C. (1991).** Définition de la qualité des farines pour différentes utilisations In : Les industries de première transformation des céréales. Tec et Doc, Lavoisier. 679 P.
- [51]. **Feuillet P. (2000).** Le grain de blé. Editions INRA. Paris, France, 308 p.
- [52]. **SAKR N. & HAJJ MOUSSA E. (2007).** Comparaison de la qualité des blés libanais à celle des variétés importées de l'étranger et destinées à la préparation du pain libanais. *Lebanese Science Journal* 8, p. 87-103.
- [53]. **Guinet R., Godon B. (1994).** La panification française. *Sciences et Techniques Agroalimentaires*. Paris, FRA : Lavoisier, 521 p.
- [54]. **J.O.R.A. (1991).** Décret executif N° 91/572 du 31 décembre relatif à la farine de panification au pain.
- [55]. **Borasio E. (1997).** Proceedings of the Grano Italia Symposium. *Bologna*. P. 59-61.
- [56]. **Ait Kaddour A., Barron C., Robert P. & Cuq B., 2008.** Physico-chemical description of bread dough mixing using two-dimensional near-infrared correlation spectroscopy and moving-window two-dimensional correlation spectroscopy. *Journal of Cereal Science* 48, pp.10-19.
- [57]. **Calvel R. (1980).** La boulangerie moderne. EYROLLES, 9ème Edition, Paris. 459 P.

## MORPHOLOGICAL AND END-USE QUALITY CHARACTERISATION OF TUNISIAN DURUM WHEAT

BABAY Elyes<sup>1\*</sup>, MNASRI Sameh<sup>1</sup>, KHAMASSI Khalil<sup>2</sup>, ICHRAK ouriri<sup>1</sup> and HANANA Mohsen<sup>3</sup>

1. University of Carthage, Agricultural Applied Biotechnology Laboratory (LR16INRAT06), National Gene Bank of Tunisia, Boulevard Leader Yasser Arafat 1080, Cherguia 1, Tunis, Tunisia
2. University of Carthage, Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie (INRAT), Field Crop Laboratory (LR16INRAT02), Rue Hédi Karray, PC 1004, Menzah 1, Tunis, Tunisia.
3. University of Carthage, Extremophile Plants Laboratory, Centre of Biotechnology of Borj-Cedria, BP 901, 2050 Hammam-Lif, Tunisia

*Reçu le 16/06/2019, Révisé le 06/09/2019, Accepté le 16/09/2019*

### Abstract

**Description of the subject:** The enhancement of wheat species requires the good knowledge of its genetic variability and technological quality.

**Objective :** The main objective of this work was to study genetic diversity in different genotypes of durum wheat using morphological traits and technological qualities parameters.

**Methods:** Twenty-eight Tunisian landraces and ameliorated varieties of durum wheat grown in the same environment, and evaluated for their variability in forty traits (linked to technological qualities, phenological periods, morphological traits and protein content). We measured Gluten strength of durum wheat genotypes with SDS-sedimentation (SDSS) volume and mixograph parameters

**Results :** N accumulation and N use efficiency was positively correlated with vegetative biomass and therefore with protein content. PCA (Principal Component Analysis) and HC (hierarchical clustering) clearly separated the landraces from modern cultivars. Cultivars are higher yielding, quicker growing, have better gluten strength and less protein content than landraces. The two highest yellow index values were observed in the modern varieties "Grécale" and "Om Rabii".

**Conclusion :** As a result, together, some local accessions and ameliorate varieties form an interesting resource of favourable glutenin subunits and alleles linked to yellow colour that could be very useful in breeding activities for improving durum wheat quality.

**Keywords:** Durum wheat, Genetic diversity, Gluten strength, Protein content, yellow index.

## CARACTÉRISATION MORPHOLOGIQUE ET DE LA QUALITÉ TECHNOLOGIQUE DU BLÉ DUR TUNISIEN

### Résumé

**Description du sujet :** La valorisation des espèces de blé nécessite une bonne connaissance de sa variabilité génétique et de sa qualité technologique.

**Objectifs :** L'objectif principal de ce travail est d'étudier la diversité génétique de différents génotypes de blé dur en utilisant des caractères morphologiques et les paramètres de la qualité technologique

**Méthodes :** Vingt-huit variétés locales et améliorées de blé dur tunisiennes cultivées dans le même environnement et évaluées leurs variabilités par quarante caractères (Tel que la qualité technologique, la période phénologique, traits morphologiques et la teneur en protéines). Nous avons mesuré la force du gluten, le volume de sédimentation SDS (SDSS) et les paramètres du mixographe de différents génotypes de blé dur

**Résultats :** L'accumulation et l'utilisation efficace de N est positivement corrélées avec la biomasse végétative et par la suite avec la teneur en protéines. La PCA (analyse en composantes principales) et le HC (regroupement hiérarchique) ont clairement séparé les variétés locales des cultivars modernes. Les cultivars ont un rendement plus élevé, une croissance plus rapide, une meilleure résistance au gluten et une faible teneur en protéines par rapport aux variétés locales. Les indices de jaunes les plus élevés ont été observés dans les deux variétés améliorées «Grécale» et «Om Rabii».

**Conclusion :** En conséquence, certaines génotypes locales et améliorées, ensemble, forment une ressource intéressante de sous-unités de protéines de gluténine et d'allèles, intéressants, liés à la couleur jaune qui pourraient être utiles pour les activités de sélection et d'amélioration de la qualité du blé dur.

**Mots clés :** Blé dur, Diversité génétique, Force de gluten, Teneur en protéines, Indice de jaune

\* Auteur correspondant : BABAY Elyes, E-mail: e.babay@yahoo.fr

## INTRODUCTION

Durum wheat (*Triticum turgidum ssp. durum*) is a very important crop for the human diet, particularly in the Mediterranean basin where about 75% of the world's durum grain is produced [1]. Local varieties, which have been developed through a combination of natural and farmer selections [2] for some useful traits, can contribute significantly to the improvement of new cultivars and broaden their genetic base. Therefore, local varieties form a very valuable part of the genetic heritage because they cover most of the intra-specific genetic diversity of the species [3]. The activity of wheat breeders has been focused on selecting varieties with high production. Nevertheless, much remains to be done to improve the technical quality and study its genetic variation to determine the selection markers [4, 5]. Breeding programs depend on knowledge of the main characteristics, the system that controls their genetic heritage and environmental factors influencing their expression. However, the analysis of the variability of phenotypic and phenological characteristics and the study of their correlations with a particular characteristic is essential in order to develop breeding and selection programs for desirable traits [6]. Therefore, it is important to study the relationships between characteristics and understand the genetic association between the different parameters, as this can help improve the efficiency of selection.

A combination of SDS-sedimentation test, mixograph parameters, and protein content have been found to be good predictors of cooked pasta quality [7, 8]. Due to their reliability, these tests of quality are used in durum wheat improvement programs [5].

Little information is available regarding genetic variation in Tunisian durum wheat varieties. The main objective of this work was to study genetic diversity in landraces and cultivars of durum wheat using morphological and phenological traits and quality parameters. This information will be useful for improving techniques for sampling wheat genetic variation, which could increase the efficiency of germplasm conservation. The second objective was to analyze the relationships between traits, especially the technological quality parameters.

## MATERIEL AND METHODS

### 1. Plant material

Twenty-eight varieties of durum wheat cultivated in farmlands in Tunisia were used in this study. The genotypes were sown and grown under rain fed conditions in the experimental station of the Biotechnology Canter of Borj-Cedria (Tunisia). All genotypes were sown in a block, during the seasons (2016-2017 and 2017-2018). Data for forty basic morphological, phenological and quality characteristics were used in this study (Table 1). The basic morphological data has been compiled from standardized codes of the International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV).

### 2. Quality and morphological assessment

#### 2.1. Experiment 1

A sample of grain (50 g) was cleaned and used for the determination of quality. Protein content, on a 14% moisture basis, was estimated by near-infrared reflectance (NIR) analysis using a Technical Infralyzer 300. Gluten strength was estimated by the SDS-sedimentation (SDSS) test according to Dick and Quick [7]. The yellow colour index was examined from grain flour by means of a reflectance colorimeter (CR-300, Konica-MinoltaTM) equipped with a filter tri-stimulate system. The measured parameters of semolina colour index were  $b^*$ (yellow colour),  $L^*$ (brightness) and  $a^*$ (red colour).

#### 2.2. Experiment 2

Fifteen varieties from the two genetic pools of the first collection (Experiment 1) were sown for the second year, in a randomized complete block design with two replicates per genotype, during the season 2017-2018 in order to further study the technological quality and to better understand the relationships between morphological, phenological and quality traits. We used a Mixograph of 10 g whole wheat meal [10] in order to study pasta rheological properties (Table 2): mixing development time (MT), maximum peak height (MH), height at 3 min after peak (H3), and resistance to breakdown (BDR) (percentage difference between MH and H3).

### 3. Statistical analysis

The morphological variability was analyzed using Principal Component Analysis (PCA) and hierarchical clustering. The Pearson correlation coefficients ( $\alpha = 0.05$ , standard PCA without rotation of axes) were calculated

by using the software XLSTAT 7.5.2. Differences between mean values were analyzed using the Duncan method for multiple comparisons. Pearson correlation coefficients were calculated to determine the relationships between the mean values of the test results.

Table 1: Pedigrees and origins of varieties [9]

Landraces	Pedigree	Origin / Year
Agili	Landrace	Tunisia, 1925
Aouadhi	Landrace	North Africa
Aouija	Landrace	North Tunisia, 1909
Arbi	Landrace	Tunisia
Baidha	Landrace	Tunisia
Bidi	Landrace	North Africa, 1908
Biskri	Landrace	Algeria, 1909
Chili	Landrace	France, 1932
Derbessi	Landrace	Tunisia, 1909
Frigui	Landrace	Tunisia
Hmira	Landrace	Tunisia, 1893
Jenah-Khotifa	Landrace	Tunisia, 1915
Mahmoudi	Landrace	Tunisia, 1893
Ouard Bled	Landrace	Tunisia
Richi	Landrace	Tunisia, 1908/1909
Sbèi	Landrace	Tunisia, 1908
Souri	Landrace	Tunisia, 1915
Swabaa-Algia	Landrace	Tunisia, 1909
Grécale	S2/WB881//Plinio/F22	Italy, 2004
Inrat69	Mahmoudi/Kyperounda	Tunisia, 1969
Iride	Altar 84/Ionio	Italy, 1996
Karim	Jori“S”/Anhinga“S”//Flamingo“S”	CIMMYT-Mexico, 1980
Khlar	Chen/Altar 84	CIMMYT-Mexico, 1992
Maéstrale	Iride/Svevo	Italy, 2004
Nasr	GoVZ512/Cit//Ruff/Fg/3/Pin/Gre//Trob	ICARDA-Syria, 2002
Om Rabii	Jori C69/ Hau	ICARDA-Syria, 1996
Razzek	Dmx69-331/Karim	INRAT-Tunisia, 1987
Saragolla	Iride/LineaPSB 0114	Italy, 2004
Grécale	S2/WB881//Plinio/F22	Italy, 2004

Table 2: Morphological, phenological and quality characteristics used to describe wheat varieties

Morphologic traits				Phenological and quality traits
Stem and Leaf	spike	Lower glume	Grain	
Growth habit	Glaucoisity	Shape (spikelet in mid-third of ear)	Shape	Heading period
Frequency of Recurved Flag Leaves	Distribution of awns	Shape of shoulder	Length of brush hair in dorsal view	Flowering period
Glaucoisity of sheath	Length in relation to ear	Shoulder width	Coloration with phenol (4h)	Heading time



Flag leaf: glaucosity of blade (lower side)	Awn: colour	Length of beak	Coloration with phenol (72h)	Vegetative period
Anthocyanin coloration	Ear: hairiness of margin of first rachis segment	Shape of beak		Grain filling period
Flag leaf area	Ear: colour (at maturity)	Hairiness on external surface		Protein content %
Glaucosity of neck	Ear: shape in profile	Anthocyanin coloration of flowers		SDS-sedimentation (mm)
Straw: pith in cross section	Ear: density			Yellow berry
Twist of neck of the ear	Awns layout			Semolina: yellow index
Height (stem, ear and awns)	Spike length without beard			

## RESULTS

### 1. Morphological diversity

The majority of the varieties have white ears (64%), 25% have lightly colored ears and only 11% have a strongly colored ear. Most varieties (89.3%) have a long beard and 50% have a compact ear. Sapegin and Baransky [11] noted that the varieties with compact ear have shown resistance to leaf rust. This characteristic is controlled by two recessive genes, *sc1* and *sc2* [12].

The dendrogram of similarity by Pearson correlation coefficient clearly separates the modern cultivars from landraces. The hierarchical clustering (HC) of the 28 varieties, as defined by the matrix of the forty characteristics, is presented in Figure 1. Analysis of the similarity dendrogram indicates that the cleavage at 24% similarity defines two main groups, I and II, containing 18 and 9 varieties, respectively. One variety (Jenah-Khotifa) remains outside the groups because it is morphologically very different from all the others (Fig. 1).

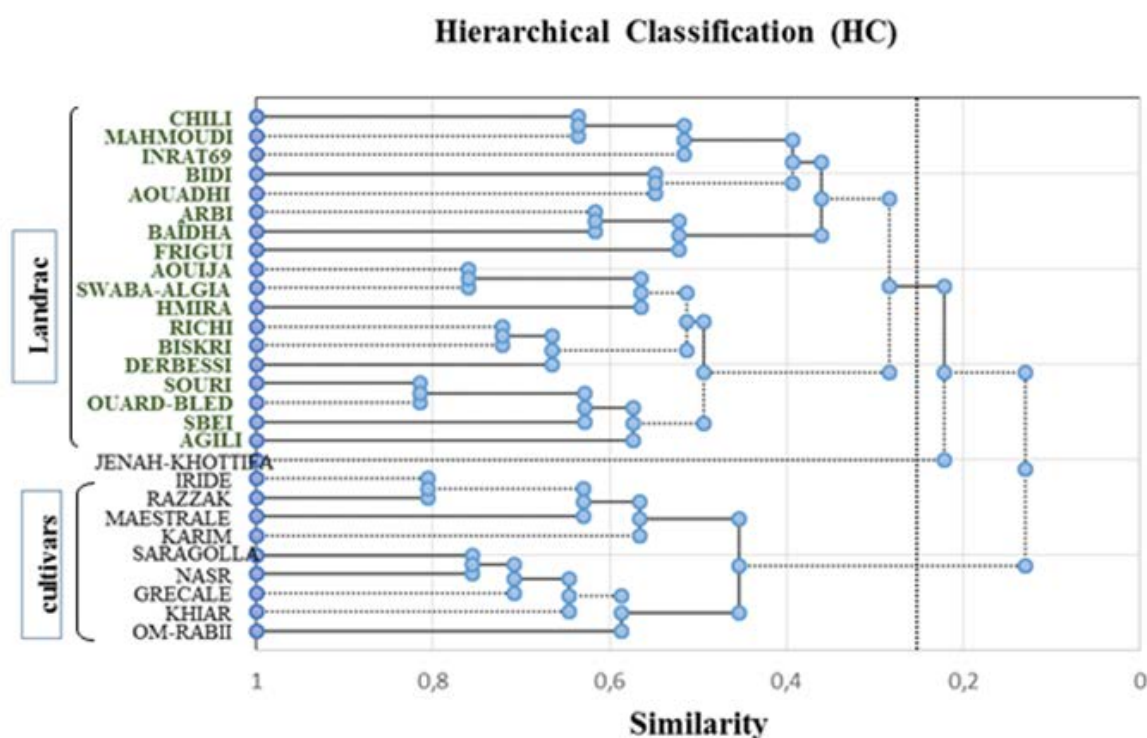


Figure 1 : Hierarchical classification of durum wheat varieties (Similarity Dendrogram)

The first two PCA axes accounted for 34.1% of the total variability expressed by morphological, phenological and quality traits. The first component accounts for 25.4% of the total variation. It is determined mainly by phenological traits, vegetative characteristics (plant length and flag leaf area) and some quality parameters. The second, which accounts for 8.74% of the total variation, is

strongly correlated to ear shape and colour. The correlated variability of genotypes shown by axis 1 reveals two groups (Fig. 2). The modern cultivars were separated from the old cultivars, forming two distinct groups. The modern cultivars are more productive, quicker growing and have lower grain protein content than the landraces.

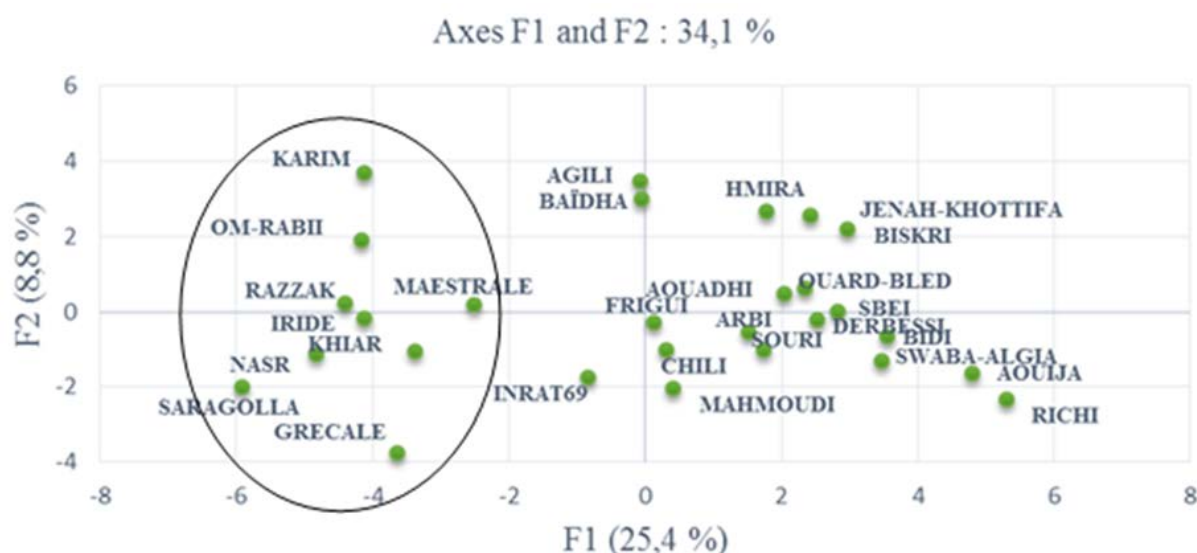


Figure 2 : Principal component analysis (PCA) of morphological, phenological and end-use quality data to classify twenty eight Tunisian landraces and ameliorate cultivars of durum wheat.

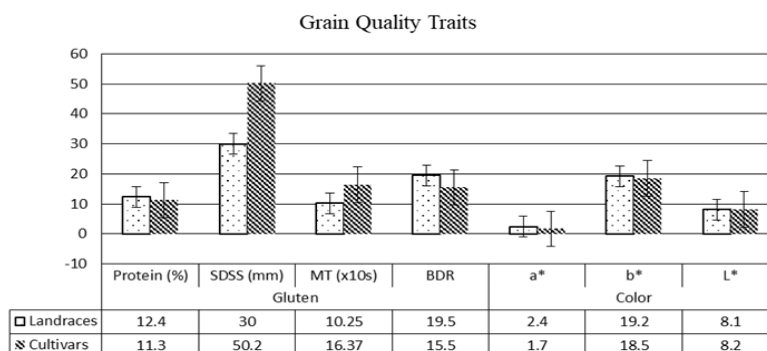
## 2. Technological Quality

### 2.1. Yellow colour

Colorimetric determinations of semolina are often used by breeders as tools to select varieties with a strong yellow colour [13]. The semolina colour parameter  $b^*$  (indices of yellow colour index) ranged from 13.9 for 'Karim' to 20.9 for 'Grécale', with an average of 18.8. Although the average yellow index ( $b^*$ ) in landraces was slightly larger than that of the improved varieties, we note that the two highest  $b^*$  values were obtained for the modern varieties Grécale and Om rabii (Fig.

3). No significant correlations were detected between the colour index and others characteristics studied, although the colorimetric values ( $a$ ,  $b^*$ ,  $L$ ) had significant correlations between them. The brightness index ( $L$ ) had negative correlations with ( $b^*$ ) and brown index ( $a$ ) of -0.75 and -0.66, respectively, and there was a positive correlation between  $a$  and  $b^*$  of 0.33. The yellow pigment content (YPC) in grains and the yellow colour of milling products are considered as complex and heritable traits controlled by several genomic regions [14].

Figure 3 : Means values of end-use quality tests of durum wheat landraces and cultivars. SDSS: Sodium Dodecyl Sulphate Sedimentation, MT: Mixing Time, BDR: Breakdown Resistance,  $b^*$ : yellow colour,  $L^*$ : brightness,  $a^*$ : red colour.



## 2.2. Protein content

Landraces had higher protein contents than the high yielding cultivars, same results were obtained by Rodriguez-Quijano *et al.* [15]. Overall mean protein content for landraces and high yielding cultivars were 12.4% and 11.3%, respectively (Fig. 3). Daaloul *et al.* [16] also obtained the same result with some Tunisian cultivars. However, the range of protein variation is slightly differed, all cultivars were

grown under the same conditions. These results confirm the limited genotypic effect on protein content. In fact, the protein content is highly influenced by environmental conditions and fertilizer (N) [17]. Landraces have a higher vegetative biomass than high yielding varieties (semi-dwarf). Therefore, Flag leaf area and plant length were positively correlated with grain protein content (Fig. 4).

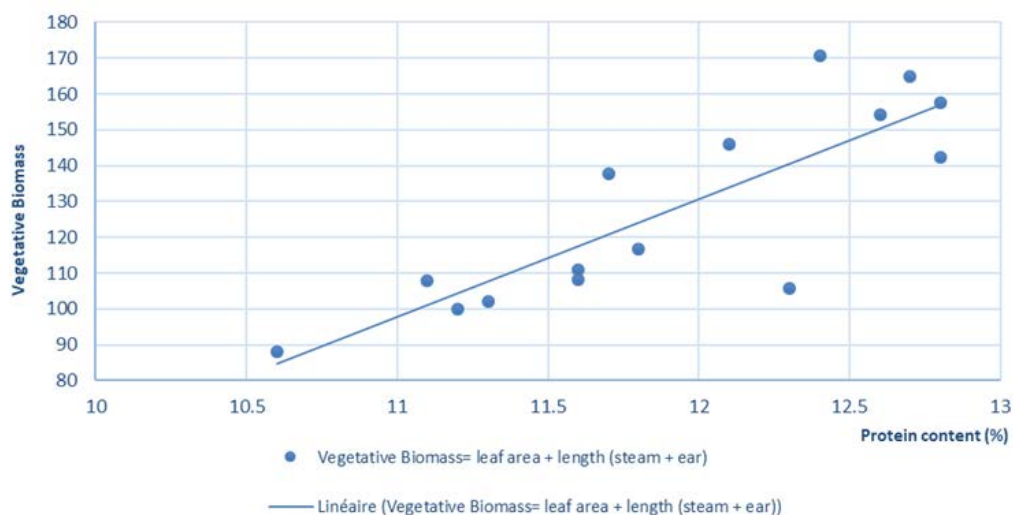


Figure 4 : Correlation between protein content (%) and vegetative biomass (Flag leaf area (cm<sup>2</sup>) and plant length (cm))

## 2.3. Gluten strength

Gluten strength of durum wheat is measured by SDS-sedimentation (SDSS) volume and mixograph parameters (Mixing Time (MT) and Breakdown Resistance (BDR)). A strong positive correlation between MT SDSS and was observed (0.69). Overall means of SDS-sedimentation for landraces and high-yielding cultivars and they were 30.0 mm and 50.2 mm, respectively. For the landraces and high-yielding varieties, respectively, 'Baïdha' and 'Saragolla' had the highest values of SDSS and MT and the lowest values of BDR. Mean values of MT were 102.5 s and 163.7 s for landraces and high-yielding cultivars, respectively. Modern varieties had better mixograph profiles and SDSS volumes than the landraces (Fig. 3). This genotypic variation in gluten strength is probably due to the endosperm storage protein allelic composition [18].

## DISCUSSION

The analysis of genetic similarity based on morphological, phenological and quality characteristics, showed that modern cultivars were genetically very similar to each another and very different to the landraces. Some correlations between technological quality parameters and others traits were identified. Despite the fact that most modern cultivars are related by pedigree to the landraces, several agro-morphological parameters are different from those observed in the landraces. Old varieties are taller, have lower yield, are slower growing, have less gluten strength and contain more grain protein than modern cultivars. Simpson *et al.* [19] reported that, for wheat at mid grain filling, leaves (i.e. leaf laminae and sheaths) contributed 40%, glumes 23%, stems 23% and roots 16% of the daily accumulation of grain N. In wheat, nitrogen (N) salvaged from the leaves accounts for up to 90% of the total grain N content [20]. Nitrogen (N) supply increases flag leaf area by increasing cell number.

The accumulation of grain protein depends on the accumulation and partitioning of reduced N accumulated during the vegetative growth stage and the relative contributions of nitrate assimilation and N redistribution during grain development for both low and high nitrogen supply [21]. However, the nitrogen accumulation ability of landraces is much higher than that of the high-yielding varieties. The high N accumulation of landraces was closely related to their higher biomass. The higher growth potential, and hence, the greater ability for N accumulation in landraces may be a valuable trait in breeding programs aiming to further improve N use efficiency [22].

Landraces retain a wide genetic diversity of morphological and quality characteristics that have been mostly lost in modern varieties. They are a natural reservoir of alleles that are could be used to enhance and diversify gluten characteristics in durum wheat breeding programs. Modern cultivars had greater yields, lower protein contents and higher gluten strength than the landraces. The higher growth potential and hence the greater N accumulation ability of landraces may be a valuable trait in breeding programs aiming to further improve N use efficiency and, therefore, increase the protein content. Furthermore, ‘Grécale’ and ‘Om rabii’ can be used by breeders to improve the yellow colour index and “Saragolla” and “Iride” can be used to improve gluten strength.

## CONCLUSION

Landraces retain a wide genetic diversity of morphological and quality characteristics that have been mostly lost in modern varieties. They are a natural reservoir of alleles, which could be used to diversify and enhance gluten characteristics in durum wheat breeding programs. Modern cultivars had greater yields, lower protein contents, and higher gluten strength than the landraces. The higher growth potential and hence the greater N accumulation ability of landraces may be a valuable trait in breeding programs aiming to further improve N use efficiency and, therefore, increase the protein content. Furthermore, the varieties ‘Grécale’, ‘Om rabii’, “Saragolla” and “Iride” can be used by breeders to improve the yellow colour index and gluten strength. The national gene bank in Tunisia contains a very large collection of indigenous durum wheat genotypes.

A more in-depth qualitative, agromorphological and proteomic study of this larger collection may reveal interesting results on other genotypes that may contribute in the wheat improvement programs in Tunisia.

## REFERENCES

- [1]. **Impiglia, A., Nachi, M.M., Cubero, J.I. and Martín, L.M. (1998).** Variation for high molecular weight (HMW) glutenin subunits in a world collection of durum wheat landraces. In: Jaradat AA (ed) *Triticeae III*. Science Publishers, Inc, Enfield, NH, USA, 245-252.
- [2]. **Belay, G., Tesemma, T., Bechere, E. and Mitiku, D. (1995).** Natural and human selection for purple-grain tetraploid wheats in the Ethiopian highlands. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 42:387-391.
- [3]. **Zou, Z.T. and Yang, W.Y. (1995).** Development of wheat germplasm research in *Sichuan* province. *Crop Genetic Resources*, 2:19-20.
- [4]. **Shukla, S., Bhargava, A., Chatterjee, A., Srivastava, A. and Singh, S.P. (2006).** Genotypic variability in vegetable amaranth (*Amaranthus tricolor* L) for foliage yield and its contributing traits over successive cuttings and years. *Euphytica*, 151:103-110. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-9134-3>
- [5]. **Babay, E., Hanana, M., Mzid, R., Amara, S.H., Carrilo, J.M. and Rodriguez-Quijano, M. (2015).** Influence of Allelic Prolamins Variation and Localities on Durum Wheat Quality. *Journal of Cereal Science*, 63:27-34. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.01.008>
- [6]. **Mary, S.S. and Gopalan, A. (2006).** Dissection of genetic attributes yield traits of fodder cowpea in F3 and F4. *Journal of applied sciences research*, 2:805-808.
- [7]. **Dick, J.W. and Quick, J.S. (1983).** A modified screening test for rapid estimation of gluten strength in early generation durum wheat breeding lines. *Cereal Chemistry*, 60:315-318.

- [8]. **Dick, J.W. and Youngs, V.L. (1988).** Evaluation of durum wheat, semolina and pasta in the United States. In: Fabriani G, Lintas C (ed) Durum: Chemistry and Technology. AACC, St Paul, MN, pp. 237–248.
- [9]. **Deghaïs, M., Kouki, M., Gharbi, M. S. and El Felah, M. (2007).** Les Variétés de céréales cultivées en Tunisie, National Imprimerie of Edition (Eds), Tunisia, p. 445.
- [10]. **Finney, K.F. and Shogren, M.D. (1972).** A ten-gram mixograph for determining and predicting functional properties of wheat flours. Baker's digest, 46:32-47.
- [11]. **Sapegin, A.A. and Baransky, D.I. (1922).** Hybridological analysis of correlated wheat traits. II. Proc. Odessa Agric. Plant Breeding Station, 7:19-26.
- [12]. **Goncharov, N.P. (1997).** Comparative genetic study of tetraploid forms of common wheat without D genome. Russian Journal of Genetics, 33:549-552.
- [13]. **Roncallo, P.F., Cervigini, G.L., Jensen, C., Miranda, R., Carrera, A.D., Helguera, M. and Echenique, V. (2012).** Qtls analysis of main and epistatic effect for flour colour traits in durum wheat. Euphytica, 185:77-92.
- [14]. **Clarke, F.R., Clarke, J.M., Mccaig, T.N., Knox, R.E. and Depauw, R.M. (2006).** Inheritance of yellow pigment concentration in seven durum wheat crosses. Canadian Journal of Plant Science, 133-141. <https://doi.org/10.4141/P05-083>.
- [15]. **Rodriguez-Quijano, M., Vazquez, J.F. and Carillo, J.M. (1990).** Variation of high molecular weight glutenin subunits in Spanish landraces of *Triticum aestivum ssp. vulgare* and *ssp. spelta*. Journal of Genetics and Breeding, 44:121-126.
- [16]. **Daaloul-Bouacha, O., Nouaigui, S. and Rezgui, S. (2014).** Effects of N and K fertilizers on durum wheat quality in different environments. Journal of Cereal Science, 59:9-14. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.11.003>
- [17]. **Shewry, P.P. (2009).** Wheat. Journal of Experimental Botany, 60(6):1537-1553 <https://doi.org/10.1093/jxb/erp058>.
- [18]. **Sissons, M.J., Ames, N.P., Hare, R.A. and Clarke, J.M. (2005).** Relationship between glutenin subunit composition and gluten strength measurements in durum wheat. Journal of the Science of Food and Agriculture, 85:2445-2452.
- [19]. **Simpson, R.J., Lambers, H. and Dalling, M.J. (1983).** Nitrogen redistribution during grain growth in wheat. IV. Development of a quantitative model of the translocation of nitrogen to the grain. Plant Physiology, 71:7–14.
- [20]. **Kichey, T., Hirel, B., Heumez, E., Dubois, F. and Le Gouis, J. (2007).** In winter wheat (*Triticum aestivum* L.), post-anthesis nitrogen uptake and remobilisation to the grain correlates with agronomic traits and nitrogen physiological markers. Field Crops Research, 30:22-32.
- [21]. **Kumari, S. (2011).** Yield response of unicum wheat (*triticum aestivum* l.) to early and late application of nitrogen: Flag leaf development and senescence. Journal of Agricultural Science, 3:170-182.
- [22]. **Chen, F. and MI, G. (2012).** Comparison of nitrogen accumulation and nitrogen utilization efficiency between elite inbred lines and the landraces of maize. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science, 62:565-569.

## CHARACTERIZATION OF 7 *VICIA* L. TAXA FROM ALGERIA BASED ON EVIDENCE FROM MORPHOLOGY AND ECOGEOGRAPHY

BECHKRI Sakina<sup>1,2\*</sup>, BOUTEKRABT Lynda<sup>2</sup> et KHELIFI Douadi<sup>1,3</sup>

1. Laboratoire de Génétique Biochimie et biotechnologie Végétale. Université Frères Mentouri Constantine 1.
2. Agence Thématique de Recherche en Biotechnologie et Sciences Agroalimentaires (ATRBSA). Constantine
3. Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie (ENSB). Constantine

Reçu le 28/08/2019, Révisé le 13/10/2019, Accepté le 19/10/2019

### Abstract

**Description of the subject:** The genetic diversity of a vetch collection collected in Algeria was assessed by the variation of 78 plant morphological characters and 5 ecogeographic parameters of the collection stations. 37 accessions belonging to 7 taxa of the genus *Vicia* L. were the subject of this study

**Objective:** Characterize the accessions using two different markers and then correlate their results. In parallel, the results are used in the taxonomy and phylogeny of the populations studied

**Methods:** the hierarchical classification in clusters using a Euclidean distance matrix based on a UPGMA - principal component analysis - the Mantel test used to correlate the matrices of ecogeography and morphology

**Results:** Cluster analysis showed clear separation among accessions from their plant morphology but significant differences at subspecies level were observed regarding the results of investigated morphological traits. Important diversity in leaflet consistence, calyx hairness, stem form, leaflet abaxial hair density, leaflet hair elevation, seed colour, spongy inside legume and peduncle length was found in most accessions of the collection. The dendrogram obtained with ecogeographic parameters did not indicate clear division among accessions. A distribution map of each taxa was produced and data obtained can be used as a guide for future collecting missions.

**Conclusion:** inter and intraspecific differences were obtained by the morphological descriptors. The collected ecogeographic data can be used as a guide for future collection missions. Other markers should be used for the phylogeny of the collection.

**Keywords:** Algeria; diversity; ecogeography; morphology; *Vicia* L.

## CARACTERISATION DE 7 TAXA DE *VICIA* L. COLLECTÉS EN ALGÉRIE, SUR LA BASE DE LA MORPHOLOGIE ET DE L'ÉCOGÉOGRAPHIE

### Résumé

**Description du sujet :** La diversité génétique d'une collection de vesce collectée en Algérie a été évaluée par la variation de 78 caractères morphologiques et 5 paramètres écogéographiques des stations de collecte. 37 accessions appartenant à 7 taxa du genre *Vicia* L. ont fait l'objet de la présente étude

**Objectifs :** Caractériser les accessions en utilisant deux marqueurs différents puis corrélés leurs résultats. En parallèle, les résultats sont exploités dans la taxonomie et la phylogénie des populations étudiées

**Méthodes :** la classification hiérarchique en clusters en utilisant une matrice de distances Euclidiennes basée sur une UPGMA - une analyse en composantes principales - le test de Mantel pour corrélés les matrices de l'écogéographie et la morphologie

**Résultats :** L'analyse en clusters a montré une nette séparation entre les accessions sur la base de leur morphologie mais des différences significatives entre les sous-espèces ont été observées. Une diversité importante dans la consistance des folioles, la pilosité du calice, la forme de la tige, la densité des poils abaxiaux des folioles, l'élevation des poils des folioles, la couleur des graines, la spongiosité à l'intérieur des gousses et la longueur du pédoncule a été observée dans la plupart des accessions de la collection. Le dendrogramme obtenu avec les paramètres écogéographiques n'a pas indiqué de séparation claire entre les accessions. Une carte de distribution de chaque taxon a été produite

**Conclusion :** Des différences inter et intraspécifiques ont été obtenues par les descripteurs morphologiques. Les données écogéographiques collectées peuvent être utilisées comme guide pour les futures missions de collecte. D'autres marqueurs doivent être exploités pour la phylogénie de la collection.

**Mots clés:** Algérie; diversité; écogéographie; morphologie; *Vicia* L.

\*Auteur correspondant: BECHKRISakina, E-mail: s.bechkri@gmail.com

## INTRODUCTION

The taxonomy and nomenclature of *Vicia* species are very confused. The number of species recognized in the genus has varied significantly from about 150 accepted by [1] up to about 210 used by [2], which indicates differences in species delimitation and ranking in the genus, depending on the species concept and the criteria used for their delimitation. [3] pointed out that there had been 20 major classifications of the group since Linnaeus. These problems have, at least partially, resulted from the publication of national or regional floristic accounts, but also because of the conflicting results produced by morphological, cytological and molecular investigations [2]; [4]. Many characters vary considerably within the genus, but few prove useful for infrageneric grouping like characters of the morphology of the inflorescence, the flower, the leaf, the pod and the seed. Several not greatly different classifications were proposed for the genus on the basis of the above-mentioned character differentiations [2]. The genus has been subdivided into four sections (Ervum, Cracca, Vicia, Faba) by [5]. [1] has subdivided the genus into two subgenera (*Vicilla*, *Vicia*) which can be distinguished using stipule nectary, peduncle length, style type, keel shape, legume and canavanine. Subgenera *Vicilla* and *Vicia* have been further subdivided into 17 and 5 sections, respectively. The subgenus *Vicia* sensu [3] contains 9 sections including section Hypechusa composed of 14 species (incl. *V. lutea*) and section Narbonensis which comprises 7 species (incl. *V. narbonensis*). [6] indicated that *Narbonensis* should be considered a well-separated section which may be related to section *Vicia*. Moreover, [7] showed that *V. faba* clustered in the *Narbonensis* group with good support and treated the group as section Narbonensis. Section Hypechusa (subgenus *Vicia*) is based on the genus Hypechusa created by [8] who separated into it six *Vicia* species. Hypechusa is also treated as section by [1] and [3]. *V. lutea* was treated in a separate series Luteae B. Fedtch. by [9] and [10]. The isozyme evidence provides further support to this treatment, even suggesting sectional status for Luteae. According to [11], *V. lutea* differs distinctly from the other Hypechusa species by showing no cross-hybridization of genomic DNAs.

[12] placed *V. lutea* separately from a clade of series Hypechusa. The subgenus name Cracca (Dum.) Gams was rejected by [1] because it was published later than the subgenera proposed by [13]: *Vicilla*, *Ervoidea* and *Pseudoervoidea*. [14] has applied Cracca Peterm. as a correct name of the subgenus (published in 1847: Deutchl. Fl., 152). Section Cracca sensu [1] belongs to Subgenus *Vicilla* and is composed of 40 species including *V. monantha*, *V. tenuifolia*, *V. leucantha*.

In the case of the *Vicia* species, only a relatively minor proportion of the genepool is currently conserved and therefore available for utilization. There is a clear requirement for further study of the genepool, accurately targeted conservation (particularly seed collection), along with characterization and evaluation of the currently unavailable elements of the gene pool. The first step towards more efficient conservation is to undertake an ecogeographic study [15]. The distribution maps will be used to formulate conservation policy and specifically in the planning of future *ex situ* collecting missions.

In Algeria, the genus *Vicia* L. comprises 26 species according to the key used by [16] in the unique flora covering the entire country. Using the relative length of the flower, the presence or the absence of the peduncle and the number of flowers by inflorescence, the authors divided the genus into three series where *V. narbonensis* and *V. lutea* belong to the serie 1, *V. monantha* and *V. tenuifolia* are grouped in the serie 2 and *V. leucantha* belong to the serie 3. Since [16], no work has been undertaken to study the genus in Algeria. As the characterization of plant genetic resources is the first step towards improving their use and as effective exploitation of any crop germplasm must be preceded by efficient and comprehensive conservation of the gene pool, whether *ex situ* or *in situ*, the purpose of the present work was to study the diversity of *Vicia* L. taxa from Algeria on both an inter and intraspecific levels and evaluate species groupings and relationships in the genus. The paper describes variation of 78 morphological traits and 5 ecogeographic parameters among 7 *Vicia* taxa belonging to sections Hypechusa, Narbonensis and Cracca to improve the resolution of phylogenetic relationships and to assess the usefulness of plant morphology as diagnostic characters to discriminate vetch species and sections.

**MATERIAL AND METHODS**

**1. Plant material and taxa identification**

Thirty-seven populations of *Vicia* L. collected from their natural habitats in various bioclimatic conditions of north Algeria are used in the current study. Origins and field information are given in Table I. Localities of the studies taxa were shown in Figure I. Individual plants were randomly collected in each sampling site. Pods were shelled and the dry seeds were poured in

to separate paper bags at room temperature and the bags sealed tightly until their utilization. As the only taxonomic study of the whole genus *Vicia* in Algeria was undertaken by [16], the present study relies on their taxonomy. Taxonomic identification of accessions was verified by the morphology of plants grown from seeds. Germination and growing were carried out according to the same approach adopted in our previous study [17].

Table 1.Passport information and taxonomic identification of accessions investigated

Species	Subspecies	Code	Date of collection	Province /Locality/Origin	Latitude	Longitude	Altitude (m)	
<i>V. lutea</i> L.		1	28.5.14	Skikda Ramdane Djamel	N36°45.977'	E006°53.432'	42	
		4	22.5.14	Constantine University	N36°20.387'	E006°37.177'	604	
		58	27.5.14	Constantine Didouche Mourad	N36°30.025'	E006°40.058'	448	
		82	28.5.14	Guelma	N36°28.361'	E007°21.280'	223	
		62	1st.6.14	Skikda Azzaba	N36°43.531'	E007°04.708'	110	
		63	1st.6.14	Skikda Ain Cherchar	N36°44.366'	E007°14.176'	52	
		79	1st.6.14	El Tarf Ben M'hidi	N36°46.402'	E007°53.600'	11	
		87	30.5.14	Jijel El Milia	N36°46.668'	E006°13.551'	28	
		90	1st.6.14	Annaba	N36°49.980'	E007°34.092'	24	
			3	2.6.14	Oum El BouaghiSigus	N36°04.485'	E006°48.867'	822
			12	5.6.14	Relizane	N35°43.689'	E000°24.265'	105
	26		28.5.15	Guelma	N36°14.816'	E007°03.045'	757	
	27		2.6.14	Oum El Bouaghi	N35°51.459'	E007°06.377'	887	
	40		28.5.14	Guelma	N36°16.276'	E007°05.751'	711	
	44		6.6.14	Tlemcen	N34°52.088'	W001°11.698'	843	
	45		3.6.14	Bordj Bou Areridj	N36°04.070'	E004°41.899'	923	
	49		28.5.14	Constantine Ain Abid	N36°13.543'	E006°55.782'	847	
	60		2.6.14	Khenchla	N35°33.685'	E007°02.177'	860	
	74		14.6.14	Tébessa	N35°15.936'	E007°30.306'	1078	
	77		26.5.14	Batna Ain Touta	N35°17.632'	E005°49.035'	683	
	78		20.5.14	Constantine El Coudiat	N36°21.787'	E006°36.418'	633	
	84		10.6.14	Constantine INATAA	N36°19.002'	E006°34.626'	586	
	98		14.6.14	Tébessa Chria	N35°16.328'	E007°44.359'	1087	
	29		2.6.14	Oum El BouaghiSigus	N36°04.485'	E006°48.867'	822	
	<i>V. monanthasspinerea</i> (M.B.) Maire		18	3.6.14	Bordj Bou Areridj Ain taghrouit	N36°07.741'	E005°03.364'	934
		46	3.6.14	Bordj Bou Areridj El Achir	N36°04.017'	E004°40.525'	944	
		91	14.6.14	Khenchla	N35°15.704'	E007°20.957'	1222	
		101	14.6.14	Khenchla	N35°15.807'	E007°28.934'	1077	
	<i>V. narbonensis</i> L.		23	30.5.14	Constantine HammaBouziane (Chaabet El Medhbouh)	N36°26.391'	E006°33.282'	425
			30	30.5.14	Mila Messaoud Boudjriou	N36°29.748'	E006°25.530'	325
34			27.4.14	Constantine Didouche Mourad	N36°29.216'	E006°38.731'	434	
55			27.5.14	Constantine Didouche Mourad	N36°30.023'	E006°40.051'	443	
		81	22.5.14	Constantine University	N36°20.387'	E006°37.177'	604	
		56	6.6.14	Ain Temouchent	N35°16.476'	W001°13.800'	276	
		89	6.6.14	Sidi Bel Abbès Sidi Khaled	N35°06.59'	W000°44.238'	543	
<i>V. leucantha</i> Biv.	-	100	10.6.14	Ain Temouchent Ain Tolba	N35°14.721'	W001°17.054'	222	
			Constantine INATAA	N36°19.002'	E006°34.626'	586		



Figure1.Geographical origin of the 37 Algerian populations studied



## 2. Morphological analyses

The variation of 78 morphological characters with two to five states was analyzed (Table 2) on 111 individuals using the same approach explained by [17].

Table 2. Morphological characters used for cladistic analysis

	Symbol	Character name	Character state				
Stem	S.B	Stem branching	0- unbranched	1 - in the upper part	2 - from the base		
	S.H	Stem height	0 - small (up to 40cm)	1 - high (over 40cm)			
	S.F	Stem Form	0- slender	1 - rigid			
	SEC	Stem edgescolor	0- green	1 - purple			
	SP	Stem pubescence	0- glabrous	1 - sparse	2 - dense		
	SHE	Stem hairerelevation	0- ascending	1 - adpressed	2 - curled		
	SHL	Stem hairlength	0- short	1 - long			
	SNC	Stem nodecolour	0 - green	1 - purple			
Leaflets	LPL	Leaflets pairs per leaf	0- 1-3 pairs	1 - more than 3 pairs			
	LRS <sub>h</sub>	Leaflets relative shape	0- all of same shape	1 - different shapes			
	LRS	Leaflets relative size	0- all of same size	1 - larger at leaf base			
	LC	Leafletconsistence	0- thin	1 - normal	2 - fleshy		
	LAC	Leafletabaxialcolour	0- pale	1 - same as adaxial			
	LLP	Lowerleaflets position	0- at base of rachis	1 - higher			
	LS	Leafletshape	0- lineal	1 - elliptical	2 - obovate	3 - ovate	
	LBP	Leafletbroadest point	0- at apex	1 - in middle	2 - at base		
	LAS	Leaflet apex shape	0- acute	1 - obtuse	2 - truncate	3 - emarginate	
	LAD	Leaflet apex dentate	0 - not	1 - two teeth	2 - more than two		
	LB	Leaflet base	0- rounded	1 - acute			
	LM	Leafletmargin	0 - entire	1 - dentate	2 - undulate		
	LMH	Leafletmarginhairness	0- glabrous	1 - ciliate			
	LHE	Leaflethairelevation	0 - ascending	1 - adpressed			
LAHD	Leafletabaxialhairdensity	0 - glabrous	1 - sparse	2 - dense			
Stipules	SS	Stipule size	0- small (shorter than 6 mm)		1 - large (longer than 6 mm)		
	SS <sub>h</sub>	Stipule shape	0- lanceolate	1 - semi-hastatte	2 - semi-sagittatte	3 - ovate	
	SNS	Stipule nectariferous spot	0 - absent	1 - dark	2 - pale		
	SE	Stipule edge	0- entire	1 - dentate	2 - 2 - 3-partite		
	Spa	Stipules of the pair	0 - identical	1 - different			
Tendrill	TP	Tendrillpresence	0- absent	1 - present	2 - in some leaves		
	TB	Tendrillbranching	0- not branched	1 - branched			
	TL	Tendrilllength	0- short	1 - long			
	THD	Tendrillhairdensity	0- glabrous	1 - sparse	2 - dense		
Flower	NFI	Number of flowers per inflorescence	0- one	1 - 1 - 4	2 - 5 or more		
	FL	Flower length	0 - up to 0.8(0.9) cm	1 - 2.5 cm	2 - over 2.5 cm		
	PcL	Pedicelllength	0- shorter than calyx	1 - equal or longer than calyx			
	PL	Pedunclelength	0- absent	1 - very short	2 - up to as long as leaf	3 - longer than leaf	
	SCP	Standard colour pattern	0 - absent	1 - differently coloured spot	2 - differently coloured veins	3 - differently coloured back	4 - darker
	SC	Standard colour	0 - white	1 - yellow	2 - purple (bluish)		
	SP	Standard pubescence	0- glabrous	1 - pubescent at back			
	SAS <sub>h</sub>	Standard apex shape	0- stronglyemarginate	1 - slightlyemarginate			
	WCP	Wing colour pattern	0- absent	1 - tip differently coloured	2 - differently coloured veins		
	WC	Wing colour	0- white	1 - yellow	2 - purple		
	WL	Wing length	0- ¼ shorter than standard	1 - little shorter than standard	2 - longer than standard		
	KC	Keelcolour	0- white	1 - yellow	2 - purple		
	KCP	Keelcolour pattern	0- absent	1 - dark tip	2 - much darker		
	KL	Keellength	0- shorter than wings	1 - equal or longer than wings			
	CBS <sub>h</sub>	Calyx base shape	0 - not gibbous	1 - slightly gibbous	2 - strongly gibbous		
	CMS <sub>h</sub>	Calyxmouthshape	0- straight	1 - slightly oblique	2 - strongly oblique		
	CH	Calyxhairness	0- glabrous	1 - clayx teeth only		2 - general coverage	
	CHD	Calyxhairdensity	0- sparse	1 - dense			
	CC	Calyxcolour	0- green	1 - purple at base	2 - teeth purple	3 - purple	4 - dark at base
	CTL	Calyxteethlength	0- equal	1 - unequal			
	CUTL	Calyxupperteethlength	0- longer than tube	1 - shorter than tube			
	CLTL	Calyxlowerteethlength	0- longer than tube	1 - shorter than tube			
CUTSh	Calyxupperteethshape	0- triangular	1 - lanceolate	2 - subulate			
CLTSh	Calyxlowerteethshape	0- triangular	1 - lanceolate	2 - subulate			

	Symbol	Character name	Character state			
<b>Legume</b>	LSh	Legumeshape	0 - linear	1 - lanceolate	2 - rhomboid	3 - oblong
	LCS	Legume cross-section	0- rounded	1 - slightly compressed		2 - compressed
	LP	Legume position	0- erect	1 - horizontal	2 - hanging	
	LSt	Legumestipitate	0 - not	1 - stipitate		
	Lpu	Legume pubescence	0- glabrous	1 - entire coverage	2 - only on sutures	
	LSf	Legume surface	0- smooth	1 - slightly ridged with veins	2 - strongly ridged with veins	
	LT	Legumetorulose	0 - not	1 - torulose		
	LC	Legumecolour	0- black	1 - brown	2 - yellowish brown	3 - yellow
	LSC	Legume suture curvature	0- suture parallel	1 - sutures unparallel		
	LSH	Legume suture hairness	0- glabrous	1 - hairy	2 - ciliate	
	LBe	Legumebeak	0- absent	1 - short	2 - long	
	LBSH	Legumebeakshape	0- straight	1 - curved up	2 - curved down	
<b>Seed</b>	SNL	Seednumber per legume	0 - 2	1 - 3 - 4	2 - over 5	
	Ssha	Seedshape	0- spherical	1 - cubical	2 - elliptical	
	SCS	Seed cross-section	0- uncompressed	1 - compressed		
	Ssu	Seed surface	0- smooth	1 - wrinkled		
	Sco	Seedcolour	0- black	1 - brown	2 - red-brown	3 - yellowish
	SCM	Seedcolourmottling	0- absent	1 - present		
	HL	Hilumlength	0 - long(70 - 80%)	1 - intermediate(20 - 40%)	2 - short(less than 20%)	
	HC	Hilumcolour	0 - pale	1 - seedcolour	2 - dark	
	LSI	Legumespongyinside	0 - not	1 - spongy		
	SSz	Seed Size	0 - 3-5(6) mm	1 - over 6 mm		

### 3. Ecogeographic parameters and climatic data corrections

A Global Positioning Systems (GPSGARMIN eTrex® model 30) was used to collect coordinates of sites investigated. Each sampling site was characterized by the five ecological factors (table 3) of Mediterranean climate as

described in [17]. Data of reference stations did not reflect the point of view ecogeographical actual bioclimatic conditions. For this reason, we have made correction of climate data based on extrapolations for different altitudinal point as reported by [17].

Table 3 Climatic characteristics of reference stations (2004-2014)

Reference station	Latitude	Longitude	Alt. (m)	P (mm)	m (°C)	M (°C)
Jijel (airport)	36°48 N	05°53 E	8	1066.1	6.8	31.5
Skikda	36°53 N	06°54 E	2	829	8.8	29
Annaba	36°50 N	07°48 E	3	684.4	6.7	31.5
Relizane	35°44 N	00°32E	95	352.5	5.3	38.6
Constantine	36°17 N	06°37 E	693	486.6	2.2	35.2
Bordj Bou Areridj	36°04 N	04°46 E	928	392.9	1.7	36.4
Khenchla	35°28 N	07°05 E	983	520.8	1.8	34.9
Oum El Bouaghi	35°52 N	07°07 E	889	410.4	1.1	35
Tlemcen (Zenata)	35°01 N	01°28 W	246	359.8	6.2	33.9
Tébessa	35°25 N	08°07 E	821	382.6	1.7	35.6
Batna	35°45 N	06°19 E	822	346.8	0.1	36.4
Guelma	36°28 N	07°28 E	227	622.3	4.5	36.4
Mila*	36°27 N	06°16 E	437	742	4.4	31.5
Ain Temouchent*	35°17 N	01°08 W	235	485	6.8	30.2
El Tarf Ben M'hidi*	36°46 N	07°54 E	6	707	7.1	31.2

Alt altitude, P annual rainfall, M and m are the of the average maximum temperature of the hottest month and the average of the minimum of the coldest month, respectively \* Data from "Climate data org"

### 4. Calculation of the bioclimatic coefficient of Emberger (1955) and definition of the bioclimate

The pluviothermic Emberger quotient (Q2) is determined by the combination of three major climate factors. This quotient easy to interpret: the more Q2 values are larger and more stations are wet. Calculation details are reported in [17].

### 5. Data analyses

Cluster analysis of morphological characters and ecogeographic parameters were performed with Euclidean Distances Matrix based on the UPGMA. In the other side, a PCA was undertaken to clarify correlation between morphological characters and to identify characters which contribute the most in accessions distinction.

These analyses were carried out with Data analysis software (STATISTICA version 6.1 program). Finally, to display a possible correlation between morphological characters and ecogeographic parameters, a Mantel test [18] based on Pearson's correlation was used (XLSTAT Pearson edition, version 2014.5.03). The p-value was calculated from the distribution of  $r(AB)$  using 10000 permutations.

## RESULTS

### 1. Cluster analysis based on morphological characters

The dendrogram illustrated in Figure 2 shows the relationships between taxa, based on the variation in morphological characters. At a distance of 7.71, the dendrogram can be divided into 2 major clusters (I and II).

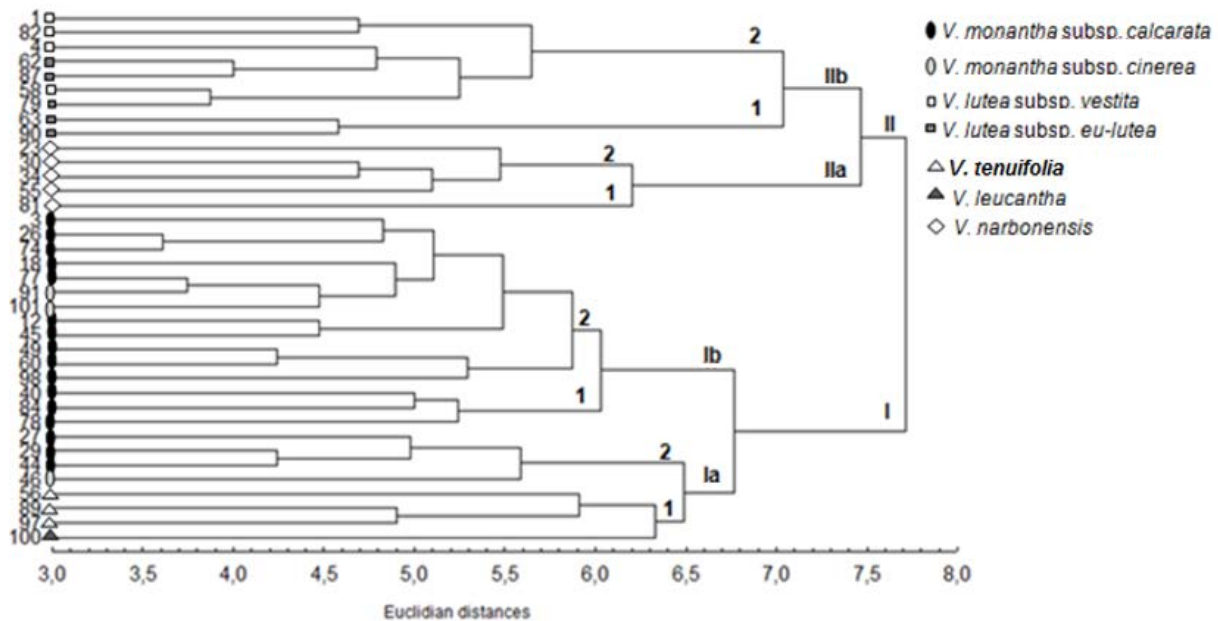


Figure 2. Dendrogram generated using UPGMA cluster analysis based on morphological diversity of 37 *Vicia L.* accessions

#### 1.1. Interspecific polymorphism

The similarity matrix of all pairs of studied populations (Fig. 3) shows variability within and between accessions. The low distance value indicates high level of homology in the variation pattern of the morphological characters. Accessions 26 and 74 appears to be a sister taxa of *V. monantha* subsp. *calcarata*. This clade is strongly supported by the lowest distance ( $d=3.61$ ). Differences between the two accessions concern only 13 characters on 78 used (SP-SHL-LB-LHE-TP-TL-THD-NFI-SCP-WCP-CBSh-CMSh-SNL).

The higher distance ( $d=9.59$ ) is observed between 97 (*V. tenuifolia*) and 34 (*V. narbonensis*) which are different by 41 characters (SB-SEC-SP-LPL-LRSh-LRS-LC-LLP-LS-LAS-LB-LM-LHE-LAHD-SS-NFI-PL-WCP-WC-KC-CBSh-CMSh-CH-CC-CTL-CLTSh-LCS-LP-Lpu-LT-LC-LSH-LB-LBSh-SNL-Ssha-SCS-Ssu-SCM-HL-SSz).

#### 1.2. Intraspecific variability

For each species, a distance matrix is obtained and used to construct the dendrogram between accessions of the same species (data not shown). The results of the dendrograms are used in the discussion.

### 2. Principal Component Analysis based on morphological data

Six characters (LAC-LBP-LAD-TB-WL-LBSh) were excluded from PCA as they are homologous between all accessions. The remaining 72 characters were used for the analysis. Two-dimensional (2D) plot was obtained using the first two PCs. The morphological characters which strongly contributed to the formation of PC1 are LC, CH, SF, LAHD, LHE, Sco, LSI and PL. Those which most contribute to the formation of PC2 are LSf, SCM, HL, LPL, LLP and LRSh. In the other side, characters which have a low loading in accessions distinction are SNL, NFI, FL, SB for PC1 and LSI, CC, PcL, SP and LC for PC2.

The strongest positive correlation ( $r = 1.00$ ) was found between SP and PcLand also between SCM and LPL. The strongest negative one ( $r = -0.89$ ) was obtained between LPL and LRSh, SCM and LRSH ( $p < 0.05$ ).

In parallel, the projection of individuals (accessions) was done using the observation with the sum of the squared cosinus  $\geq 0.00$ . The results are shown in figure 5.

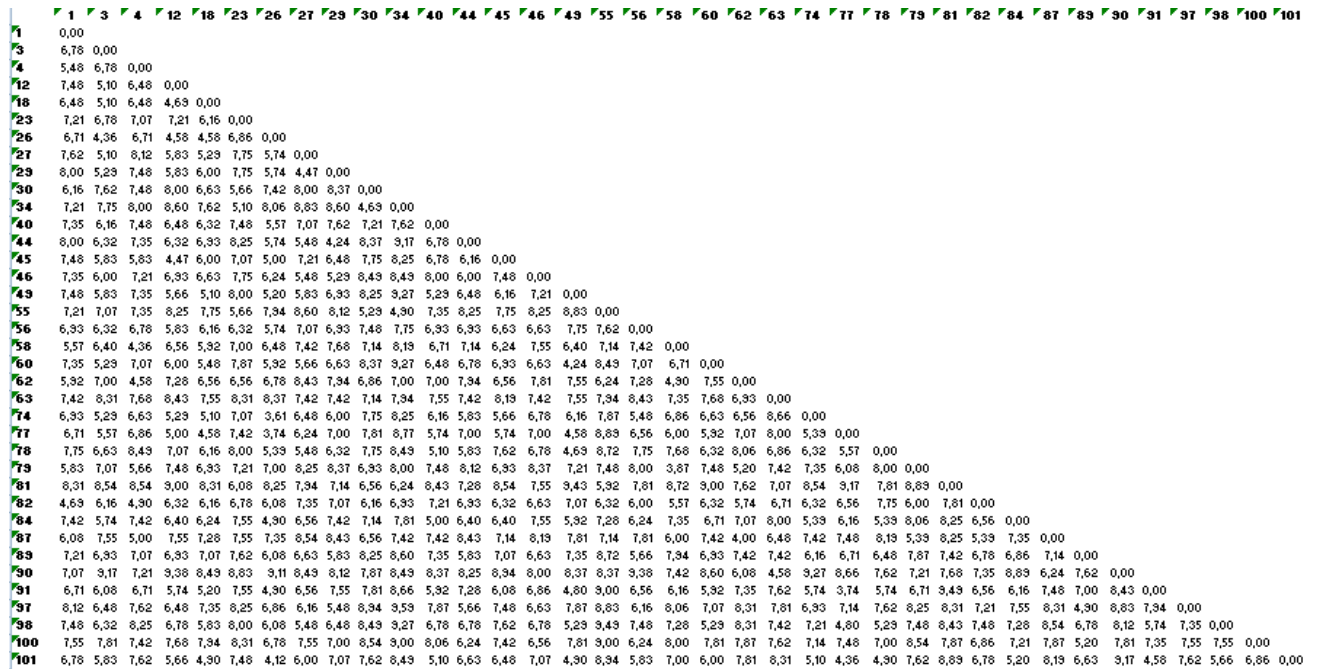


Figure 3. Similarity matrix of morphological characters

Figure 4. Principal Component Analysis of 72 morphological characters

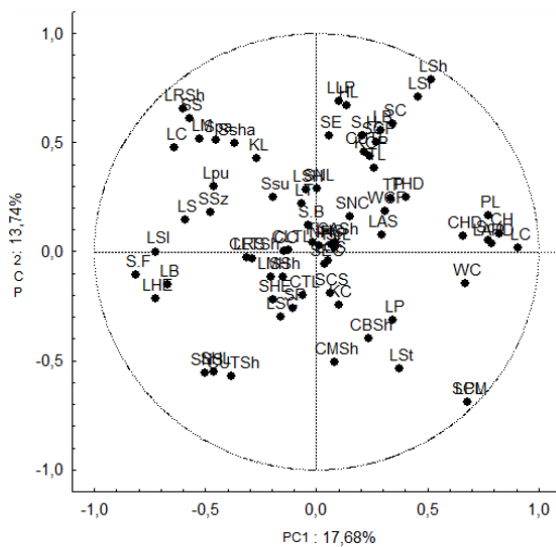
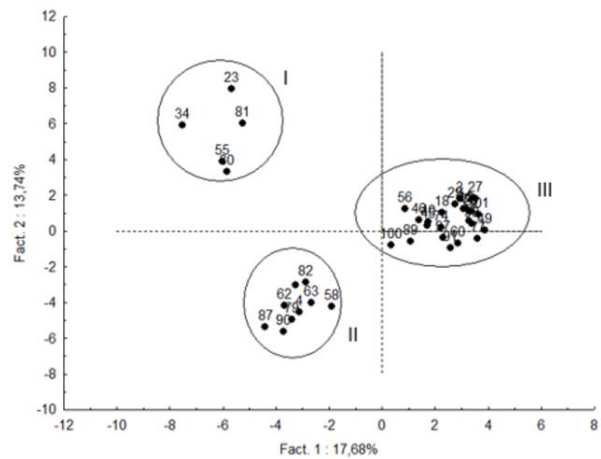


Figure 5. Principal Component Analysis of studied populations



3. Ecogeographic parameters

3.1. Data correction and bioclimate definition

The results of correction of the pluviometric and temperature data and calculation of Q2 were used to define the bioclimate of each site using

Emberger climagramm. All results are shown in table 4. The large difference between taxa in the range of GPS coordinates from which they were collected is reported in table 1.

Table 4. Corrected data of climatic characteristics and calculation of Emberger quotient of sampling sites investigated

Code	Alt. (m)	K	P (mm)	m (°C)	M (°C)	Q2	Bioclimate
1	42	1,0386	860,99	8,64	28,72	147,07	LH - warm winter
4	604	0,9268	450,98	2,55	35,82	46,49	HSA - cool winter
58	448	0,7986	388,59	3,18	36,91	39,52	MSA -temperate winter
82	223	1,0025	611,62	4,51	36,52	65,54	SH - mild winter
62	110	1,1042	701,16	8,36	28,24	120,97	SH - warm winter
63	52	1,0482	868,95	8,6	28,65	148,65	LH - warm winter
79	11	1,0056	710,93	7,08	31,16	101,27	SH - warm winter
87	28	1,0150	1082,09	6,72	31,36	150,63	LH - mild winter
90	24	1,0245	701,16	6,61	31,35	97,21	SH - mild winter
3	822	0,9346	383,56	1,36	35,46	38,58	MSA - cool winter
12	105	1,0113	356,48	5,26	38,53	36,75	LSA - mild winter
26	755	1,3393	833,44	2,38	32,80	93,97	SH - cool winter
27	887	0,9980	409,57	1,108	35,014	41,43	MSA -cool winter
40	711	1,3111	815,89	2,56	32,80	92,54	SH - cool winter
44	843	2,3274	837,39	3,81	29,72	110,85	LH - temperate winter
45	923	0,9949	390,89	1,72	36,43	38,63	MSA -cool winter
49	847	1,1265	548,15	1,58	34,12	57,78	HSA- cool winter
60	860	0,9055	471,58	2,29	35,76	48,33	HSA- cool winter
74	1078	1,2686	485,36	0,67	33,80	50,25	HSA -cold winter
77	683	0,8396	291,17	0,65	37,37	27,20	HA -cold winter
78	633	0,9506	462,56	2,44	35,62	47,82	HSA - cool winter
84	586	0,9120	466,85	2,62	35,94	48,06	HSA- cool winter
98	1087	1,2780	488,96	0,63	33,73	50,67	HSA- cold winter
29	822	0,9346	383,56	1,36	35,46	38,58	MSA - cool winter
18	934	1,0061	395,29	1,67	36,35	39,10	MSA - cool winter
46	944	1,0162	399,26	1,63	36,28	39,52	MSA - cool winter
91	1222	1,1835	616,36	0,84	33,22	65,29	SH - cold winter
101	1077	1,0721	558,35	1,42	34,24	58,35	HSA- cool winter
23	425	0,7796	379,35	2,62	35,94	39,05	MSA - cool winter
30	325	0,9396	697,18	4,84	32,28	87,15	SH - mild winter
34	434	0,7870	382,95	3,23	37,01	38,88	MSA- temperate winter
55	443	0,7944	386,55	3,2	36,95	39,28	MSA- temperate winter
81	604	0,9268	450,98	2,55	35,82	46,49	HSA- cool winter
56	276	1,0338	501,38	6,63	29,91	73,87	SH - mild winter
89	543	1,0725	402,29	2,52	35,52	41,81	MSA - cool winter
97	222	1,0107	490,13	6,85	30,29	71,72	SH - mild winter
100	586	0,912	466,85	2,62	35,94	48,06	HSA- cool winter

K correction factor, Alt altitude, P annual rainfall, M and m the average maximum temperature of the hottest month and the average of the minimum of the coldest month, respectively, Q2 Emberger coefficient, SH subhumid, LH Less Humid, HSA Higher Semiarid, HA Higher arid, MSA Means semiarid, LSA Less semiarid

### 3.2. Cluster analysis based on ecogeographic data

The dendrogram illustrated in Figure 6 shows the relationships between taxa, based on the variation in ecogeographic parameters. At the distance of 754.84, the dendrogram can be divided into two major clusters (I and II). The distances matrix of all pairs of studied accessions (Figure 7) shows that the higher distance (d=1284) is obtained between 91 (*V. monantha* subsp. *cinerea*, Khenchla) and 87 (*V. lutea* subsp. *eu-lutea*, Jijel-El Milia) when the

lower distance (d=5) is observed between samples 55 (*V. narbonensis*, Constantine-DidoucheMourad) and 58 (*V. lutea* subsp. *vestita*, Jijel-El Milia).

### 4. Correlation between morphology and ecogeography

This test showed that the two matrices are not correlated ( $r = -0.022$ ,  $p = 0.576 = 57.61\%$ ,  $\alpha = 0.05 = 5\%$ ).

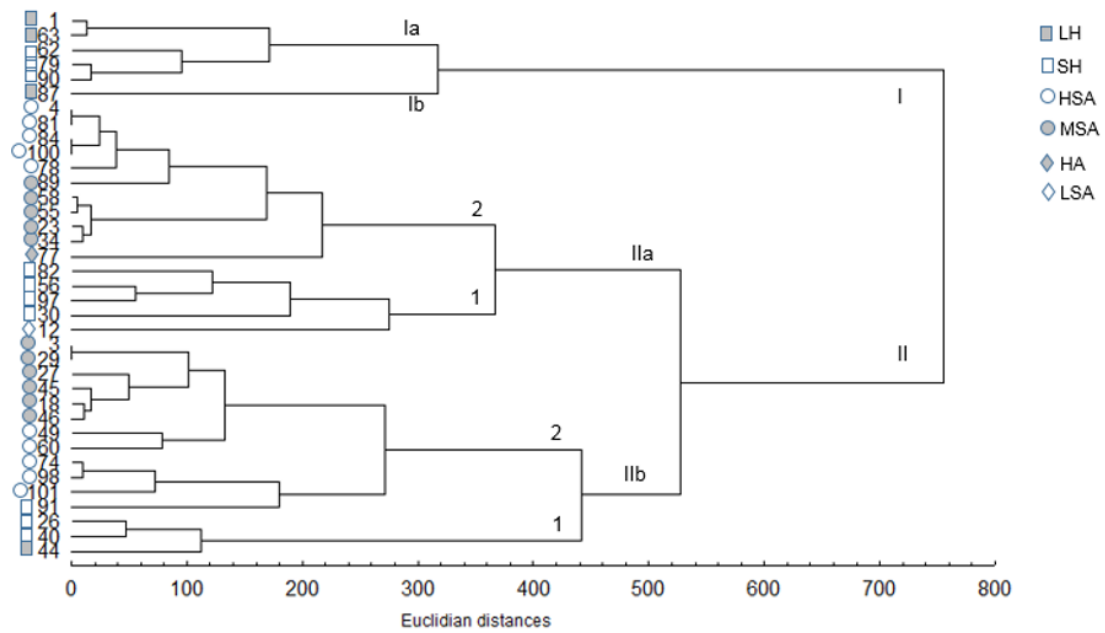


Figure6. Dendrogram generated using UPGMA cluster analysis based on ecogeographic diversity of 37 *Vicia. L.* accessions

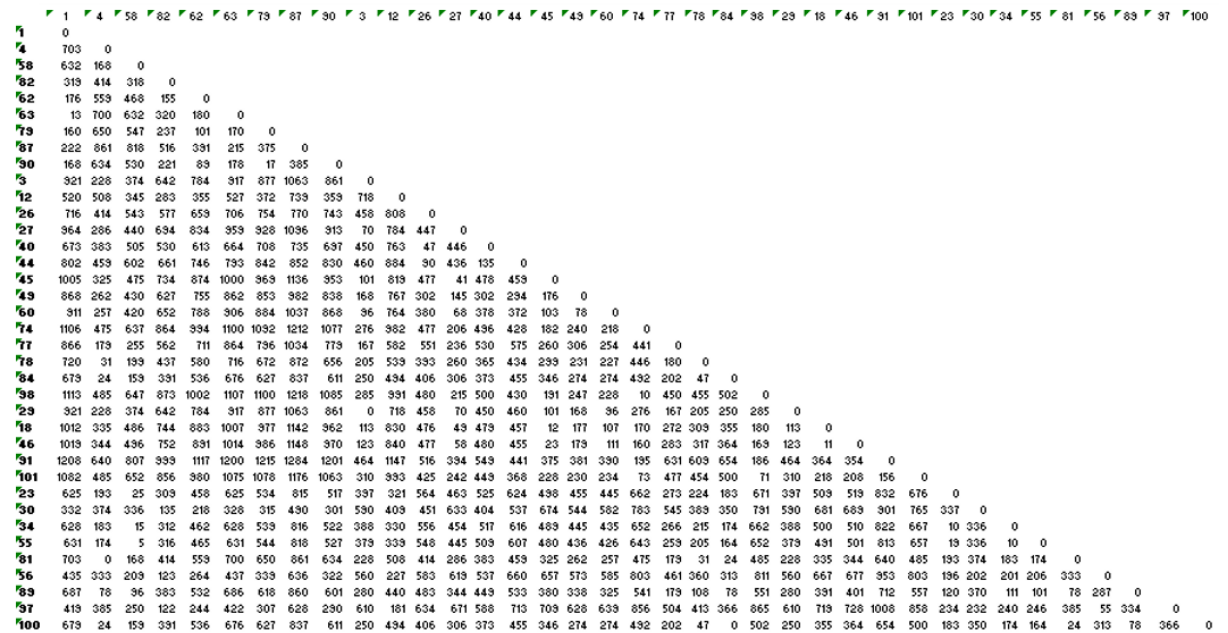


Figure 7. Similarity matrix of ecogeographic parameters

**DISCUSSION**

**Morphological characters**

Majority of the morphological characters used in different cladistic studies are binary, usually only some characters included have three or more states. In our morphological multistate matrix, 33 out of 78 characters used have two states and 45 of remaining many state characters are polymorphic. When the multistate characters were coded into presence/absence form, the need to code polymorphic states as new characters disappeared [19].

Our results have demonstrated that using morphological traits alone produce a stable grouping. The morphological resemblances which led [16] to place populations in the same species are correlated with the data of the 78 morphological traits used in our study. Indeed, accessions of the same taxon present a high homology level in morphological characters demonstrated by a low distance in the similarity matrix and by the dendrogram which places them in the same group.

Cluster analysis of morphological traits revealed two basic monophyletic groups, differing only in the relative position of some accessions in subclusters: I) populations of *V. monantha* in one subcluster linked to two other species (*V. tenuifolia* and *V. leucantha*) belonging to section Cracca of the subgenus *Vicilla* (sensu Kupicha) together with four accessions of *V. monantha*; II) all accessions of *V. narbonensis* (section Narbonensis) in one subcluster linked with samples of *V. lutea* (section Hypechusa) in a second subcluster. These results concord with those of [20] which found that species of section Hypechusa were unexpectedly nested within the NSC (subgenus *Vicia*) and section Cracca (subgenus *Vicilla*), respectively.

### Sections Narbonensis and Hypechusa (cluster II)

All populations of *V. narbonensis* belong to the same subcluster (IIa). [16] have use 6 characters to rank samples in this species. Also, the utilization of the 78 characters of current study places them in the same subcluster. This observation shows that there are accessions which appear to belong to the same species on the basis of few characters while they have a lot of common characteristics. In parallel, a high distance can be obtained between accessions in this species as in the case of 30 and 81 showing morphological differences between accessions of *V. narbonensis*. This result can be explained by the fact that the key used by [16] did not consider the infraspecific level for this species while several others keys distinguished five or seven varieties. However, the distinction of each variety is based on characters that are difficult to discern in the field [21]. The subcluster IIb is composed of all accessions of *V. lutea*. These observations show that there is an overlap between accessions of *V. lutea* subspecies. Indeed, [16] used the color of flower to distinguish the two subspecies, but the utilization of characters of the present study shows a close relationship between the taxa when it is difficult to determine distinct groups which could be individually identified as *eu-lutea* or as *vestita*. [22] reported that subspecies have been established within species showing significant intra-specific variation. This is consistent with our results where differences at subspecies level can be observed between samples of *V. lutea* subsp. *eu-lutea* as in the case of 62 and 87.

The two populations differ by 8 flower and 5 legume traits, when the remaining characters were identical.

According to [16], *V. narbonensis* belongs to the same serie of *V. lutea* (serie 1). Also, in the present study, they are grouped in the same cluster and have a lot of common characteristics. In the other side, these two species, belonging to subgenus *Vicia*, section Narbonensis (*V. narbonensis*) and section Hypechusa (*V. lutea*) differ significantly from each other. Morphological differences are reflected in their placement in different subsections. The UPGMA results join the classifications of [1] and [3] who place *V. narbonensis* and *V. lutea* in the same sub-genus (*Vicia*). The apparition of the two sub-clusters (IIa and IIb) also joins these two authors who place the two species in different sections and series (*V. lutea* in the section Hypechusa, serie Hypechusa and *V. narbonensis* in the section Faba by Kupicha and section Narbonensis, serie Narbonensis by Maxted). Our results concord with those of [11] which showed the species of sections Hypechusa as sister to the clade of section Narbonensis. Moreover, in our study, the seed morphology confirms this division, since samples belonging to the two species can have identical seed characters: compressed seed cross-section, smooth seed surface, brown seed color, seed presenting color mottling, hilum length (20-40%), pale hilum, spongy legume inside and seed size 3-6mm. The section Hypechusa reported to be monophyletic based on several works [6]. A closer relationship between the NSC and section Hypechusa has been deduced by [20]. Our data revealed that subgenus *Vicia* is a well-separated subgenus and agreed with the traditional results based on morphology reported by [23] and with results on phylogenetic analyses [6]; [7]

### Section Cracca (cluster I)

The results of the analysis of the section Cracca indicate that the species fall into two distinct groups. However, the division between these two groups is not as distinct as between section Hypechusa and section Narbonensis.

Species of section Cracca sensu Kupicha belong all to one group. Fifteen accessions of *V. monantha* are classified in the same subcluster (Ib). But, there are no clear groups defined as *cinerea* or as *calcarata* showing an overlap between the morphology of these subspecies.

An example can be given for samples 77 (*calcarata*) and 91(*cinerea*) distant by 3.74 which have 64 common characters when the key of [16] distinguish between the two subspecies by only two characters (flower size and legume size). Accessions belonging to the same subspecies present also differences. Samples 26 and 74 belonging to *V. monantha* subsp. *calcarata* are a good example in this case. In another side, the cluster II regroup samples of *V. monantha* (subsp. *calcarata* and subsp. *cinerea*) belonging to the series 2 together with the three accessions of *V. tenuifolia* (serie 2) and the unique accession of *V. leucantha* (serie 3). The subcluster Ia comprises populations of *V. tenuifolia*, *V. leucantha* and four populations of *V. monantha* showing also an overlap in morphological traits between these four accessions and the samples of *V. leucantha* and *V. tenuifolia*. The key of [16] classifies *V. tenuifolia* and *V. monantha* in the same series. They also have a lot of common characters according to the results of the present study. The unique accession of *V. leucantha* is classified by [16] in the series 3, when it has a lot of common characteristics with the samples of the serie 2. The species belonging to the cluster I are classified by [1] in the sub-genus *Vicilla*, section *Cracca*. Thus, the three species attributed to the section *Cracca* appear in a well-supported monophyletic group in the present work. *V. tenuifolia* and *V. leucantha*, form a subgroup of closely related species that revealed extensive homologous polymorphism with shared characters without any differentiation by species-specific traits. Seed morphology confirmed this division because both *V. tenuifolia* and *V. leucantha* can have similar characteristics, such as SB, SH, SF, SP, SHE, SHL; LPL, LRSh, LC, LAC, LS, LBP, LAS, LAD, LM, LMH, LHE, LAHD, SS, SSh, SNS, Spa, TP, TB, TL, THD, PcL, PL, SP, SASH, WC, WL, KC, KCP, KL, CH, CHD, CTL, LSh, LCS, LP, LSt, LSf, LT, LC, LSC, LBe, LBSh, SNL and all seed characters. However, both species also have different characteristics, such as SEC, SNC, LRS, LLP, SE, NFI, FL, SC, WCP, CBSH, CMSH, CC, CUTL, CLTL, CUTSh, CLTSh, Lpu, LSH. The largest section in the subgenus *Vicilla*, section *Cracca* (as interpreted by Kupicha), appears paraphyletic. In the present analysis, *V. leucantha*, the species transferred by [5] to his section *Ervum*, is in the same clade with the remaining *Cracca* species.

In spite of this, our analysis of the morphological characters supports Kupicha's placement of *V. leucantha* in section *Cracca* as was also done by [24]. These results join those of [7] in his study of phylogenetics of *Vicia* based on morphological data.

### Principal Component Analysis

Among morphological characters which contribute the most in accessions separation, three are quantitative (PL, HL, LPL) and the majority is qualitative (LC-CHD-SF-LAHD-LHE-SC-LSI-LS-SCM...). Those which contribute least to samples separation are both qualitative (SB-CC-LSI-SP) and quantitative (SNL-NFI-FL-PL). As quantitative characters are essential at this taxonomic level, several quantitative characters were included in the present study according to recommendations of [25]. In the other side, there are many qualitative characters like color of seeds and hilum color, which usually are not used for taxonomy, but are important for cultivar identification. Information on the variability of these hereditary characteristic in populations from different geographical regions can also be useful for curators and collectors. Our data show that the qualitative variables allowed a clear separation of *Vicia* taxa and are good diagnostic taxonomic characters for the accessions. The same findings were reported by [26] in their study on several *Vicia* taxa in Southern Brazil where they underline a clear samples separation by corolla color, pod and seed color and pod constriction. Concerning characters that strongly contribute to the separation of the accessions, the range of variation does show overlap at subspecies level. PCA shows that morphological characters which strongly contribute in accessions distinction concern characters of leaflets, flower, stem, pod and seed showing the importance of each part of the plant in accession distinction. According to [24], *Vicia* species present considerable variations in almost every trait, but particularly in leaflet morphology. Our results show that, effectively, among characters which strongly contribute to samples distinction, six (LC, LAHD, LHE, LPL, LLP, LRSh) concern leaflets traits. In the present study, leaf and stem characters were measured at the first productive node. Leaflets were also measured at the lower part of the stems, so that heterophylly, an indicator of the difference in leaf shape at the bottom and the top of the plant, which has been used by [27].



The results of PCA show that there is a strong positive correlation between characters of the same part of the plant like standard pubescence and pedicel length or between characters which belong to different parts like seed color mottling and leaflets per leaf. In parallel, traits of the same plant part can have a strong negative correlation as in the case of leaflets relative shape and leaflets per leaf. In our results, no differences were observed for leaflet abaxial color, leaflet broadest point, leaflet apex dentate, tendril branching, wing length and legume beak shape. These characters are identical between the 37 *Vicia* populations and cannot be used for taxa identification. Morphological characters used in the present work allow good separation among accessions at species levels as shown by the use of the observation with the sum of the squared cosines (Figure 4) which determines three distinct groups which could be individually identified when no groups at subspecies level were generated. The first group includes all accessions of *V. narbonensis*. The second one contains samples of *V. lutea*. The third group includes all accessions of subgenus *Vicilla* section *Cracca* (*V. monantha*, *V. tenuifolia* and *V. leucantha*) showing even an overlap among these three taxa.

#### **Ecogeographic diversity**

The results of the ecogeographic survey elucidate each taxon geographic and ecological location, and thus which areas could most profitably be targeted for future collecting missions. The use of GPS in the present study is supported by the recommendations of [28]. According to [29], in the Mediterranean region, there is a need for more collection in Algeria, Egypt and Yemen.

The wide geographic ranges found in the present work should be taken into account both in conservation programs and in the genetic improvement of this economically important wild *Vicia* species as suggested by [30]. The UPGMA results show that accessions with high morphology differences and belonging to different taxa can have an identical bioclimate and close altitudes. On the other hand, the groups may comprise accessions from similar latitudes and climates. The same findings were reported by [31]. The dendrogram obtained with ecogeographic parameters did not indicate clear division among accessions based on their geographical locations, indicating that the association

between genetic similarity and geographical distance was less significant as it was reported by [32]

Considering all stations of the current work, the studied samples of *Vicia* L. occur from 11 to 1222m. Algeria has all the Mediterranean bioclimates from the perhumid in the north to the perarid in the south for the bioclimatic levels and from the cold to the hot for their temperature variants. Sites investigated belong to 6 different bioclimates (SH, SAS, SAM, SA, AS, SAI) and are characterized by cool, wild, warm or temperate winter with a minimum average temperature ranged from 0.63 to 8.64°C.

Samples of *V. narbonensis* were collected from sites receiving between 382.95 and 697.18 mm of precipitations and belonging to bioclimates characterized by cool or mild winter. This is consistent with findings of [28] who reported that taxa belonging to the *V. narbonensis* complex occur over a wide range of altitudes, from sea level to 3200m. According to [33], *V. narbonensis* shows adaptation in areas receiving 250–300 mm annual rainfall with low winter temperatures. Accessions belonging to *V. monantha* occur until 1222m and at these altitudes they require some frost tolerance as the temperatures can drop to 0.63°C. It is interesting to mention that it is from  $m = 1$  and not  $m = 0$ , as the risk of frost become important. The patterns described above are not necessarily a true indication of the preferred altitude of each taxon but may reflect the number of collections that occurred at each altitude.

#### **CONCLUSION**

The present study is the first attempt to analyze phonetic relationships among some Algerian species of genus *Vicia* using cladistic analysis of 78 morphological characters and 5 ecogeographic parameters. Sections *Narbonensis* (*V. narbonensis*) and *Hypechusa* (*V. lutea*) were considered a separate group, while section *Cracca* was the most heterogeneous section. Significant differences at subspecies level were observed regarding the results of investigated morphological traits. Several studies have mapped the distributions of the *Vicia* species. Their results must be used in conjunction with those described in this study to provide further information on the ecogeography of *Vicia* species. To clarify the position of species, collections need to be made in Algeria and grown for further identification in the same location.

## REFERENCES

- [1]. Kupicha, F.K. (1976). The infrageneric structure of *Vicia*. *Notes Roy. Bot. Gard. Edinburgh*. **34** : 287–326.
- [2]. Hanelt, P. and Mettin, D. (1989). Biosystematics of the genus *Vicia* L. (*Leguminosae*). *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **20**: 199–223.
- [3]. Maxted, N. (1993a). A phenetic investigation of *Vicia* L. subgenus *Vicia* (*Leguminosae*, *Vicieae*). *Bot. J. Linn. Soc.* **111**: 155–182.
- [4]. Maxted, N., Callimassia, M.A., Bennett, M.D. (1991b). Cytotaxonomic studies of eastern Mediterranean *Vicia* species (*Leguminosae*). *Plant Systematics and Evolution*. **177**: 221.
- [5]. Ball, P.W. (1968). *Vicia* L. In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. (eds.) *Flora Europaea*, vol. 2, *Rosaceae* to *Umbelliferae*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 129–136.
- [6]. Potokina, E., Tomooka, N., Vaughan, D.A., Alexandrova, T., Xu, R.Q. (1999). Phylogeny of *Vicia* subgenus *Vicia* (*Fabaceae*) based on analysis of RAPDs and RFLP of PCR-amplified chloroplast genes. *Genet Res. Crop Evol.* **46**: 149–161
- [7]. Leht, M. (2009). Phylogenetics of *Vicia* (*Fabaceae*) based on morphological data. *Feddes Repertorium*. **120**: 7–8: 379–393
- [8]. Alefeld, F. (1860). *Hypechusa*, nov. gen. *Viciearum*, “*Osterreich. Bot. Zeitschr.* **19**: 165–166.
- [9]. Fedtchenko, B.A. (1948). *Vicia* L. In: Shishkin BK, Bobrov EG. (eds.) *Flora of the USSR* 13. Moscow, pp. 406–475.
- [10]. Radzhi, A.D. (1970). *Conspectus systematis specierum Caucasicarum Generis Vicia* L. Pp. 228–240 in: Tzvelev, N. N. (ed.), *Novit. Syst. Plant. Vascul.*, vol. 7. Nauka, Leningrad. (In Russian).
- [11]. Jaaska, V. and Leht, M. (2007). Phylogenetic relationships between and within sections *Hypechusa*, *Narbonensis* and *Peregrinae* of genus *Vicia* (*Fabaceae*) based on evidence from isozymes and morphology. *CEJB*. **2**(1): 137–155
- [12]. Caputo, P., Frediani, M., Venora, G., Ravalli, C., Ambrosio, M., Cremonini, R. (2006). Nuclear DNA contents, rDNAs, and karyotype evolution in subgenus *Vicia*: III. The heterogeneous section *Hypechusa*. *Protoplasma*. **228**: 167–177
- [13]. Rouy, M.G. (1899). « *Hieraciotheca Gallica Et Hispanica* » (auctoribus C. Arvet-Touvet et G. Gautier), *Bulletin de la Société Botanique de France*. **46**(3) : 193–203
- [14]. Tzvelev, N. (1989). *Vicia* L. In: Fedorov AA, ed. *Flora Partis Europaeae USSR*, vol. 6. Leningrad: Nauka, 127–147. (In Russian).
- [15]. Maxted, N., Ford-Lloyd, B.V., Hawkes, J.G. (1996). Complementary conservation strategies. In N. Maxted, B.V. Ford-Lloyd and J.G. Hawkes (Eds.), *Plant genetic conservation: the in situ approach*, Chapman and Hall, London and New York, pp. 20–57.
- [16]. Quézel, P. and Santa, S. (1962). *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions méridionales*. Tome 1. Editions du centre national de la recherche scientifique. Paris, pp. 524–531
- [17]. Bechkri, S and Khelifi, D. (2016). Variation in *Vicia sativa* s.l from Algeria based on morphological characters and ecogeographic parameters. *Genetic Resources and Crop Evolution*. **64**: 815–832.
- [18]. Mantel, N. (1967). Adaptation of Karber's method for estimating the exponential parameter from quantal data, and its relationship to birth, death, and branching processes. *Biometrics*. **23**: 739–746.
- [19]. Leht, M. and Jaaska, V. (2002). Cladistic and phenetic analysis of relationships in *Vicia* subgenus *Vicia* (*Fabaceae*) by morphology and isozymes. *Pl. Syst. Evol.* **232**: 237–260.
- [20]. Shiran, B., Kiani, S., Sehgal, D., Hafizi, A., Hassan, T., Chaudhary, M., Raina, S.N. (2014). Internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA resolving complex taxonomic history in the genus *Vicia* L. *Genet Resour Crop Evol.* **61**: 909–925
- [21]. Maxted, N. (1990). IBPGR Final Report- An herbarium based ecogeographic study of *Vicia* subgenus *Vicia*. IBPGR, Rome, Italy.
- [22]. Tzvelev, N. (1980). *Systema specierum generis Vicia* L. in parte *Europaea URSS. Novitates Systematicae Plantarum Vascularium*. **17**: 200–208 (In Russian).
- [23]. Diklik, N. (1972b). *Vicia* L. – Pp. 315 – 355 in: Josifović M. (ed.), *Flore SR Srbije* 4. – Beograd: Srpska Akad. Nauka i Umetnosti
- [24]. Davis, P.H. and Plitmann, U. (1970). *Vicia* L. In: Davis P.H. (ed.) *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. University Press, Edinburgh, pp. 274–321.
- [25]. Zelditch, M.L., Swiderski, D.L., Fink, W.L. (2000). Discovery of phylogenetic characters in morphometric data. In: Wiens J. J. (ed.) *Phylogenetic analysis of morphological data*. Smithsonian Institution Press, Washington and London, pp. 37–83
- [26]. Weber, L.H. and Schifino-Wittmann, M.T. (1999). The *Vicia sativa* L. aggregate (*Fabaceae*) in Southern Brazil. *Genet Res Crop Evol.* **46**(3): 207–211
- [27]. Tardío Pato, F.J., García Gonzalo, P., Ortiz Marcide, J.M. (1998). Observaciones cariológicas en *Vicia amphicarposensis* L. *Anales Jard. Bot. Madrid*. **56**: 261–268.
- [28]. Bennett, S.J and Maxted, N. (1997). An ecogeographic analysis of the *Vicia narbonensis* complex. *Genetic Resources and Crop Evolution*. **44**: 411–428
- [29]. Van De Wouw, M., Maxted, N., Chabane, K., Ford-Lloyd, B.V. (2001). Molecular taxonomy of *Vicia* s. *Vicia* based on Amplified Fragment Length Polymorphisms. – *Plant System. Evol.* **229**: 95–105.
- [30]. El Bakatoushi, R. and Ashour, F.M. (2009). Genetic diversity among some *Vicia narbonensis* L. varieties as revealed by karyotype and protein analysis. *Egypt. J. Genet. Cytol.* **38**: 85–97
- [31]. Van de Wouw, M., Maxted, N., Bria Fordlyoyd, B.V. (2003). Agromorphological characterisation of common Vetch and its close relatives. *Euphytica*. **130**(2): 281–292.
- [32]. Chung, J.W., Kim, T.S., Suresh, S., Lee, S.Y, Cho, G.T. (2013). Development of 65 novel polymorphic cDNA-SSR markers in common vetch (*Vicia sativa* subsp. *sativa*). *Molecules*. **18**(7): 8376–8392.
- [33]. Abd El Moneim, A.M. (1992). *Narbon Vetch (Vicia narbonensis L.): A Potential Feed Legume Crop for Dry Areas in West Asia. Journal of Agronomy and Crop Science*. **169**(5): 347–353
- [34]. Emberger, L. (1955). Une classification biogéographique des climats. *Rev. Trav. Lab. G., ol. Bot. et Zool., Fac. Sc. Montpellier*. **7**: 1–43.

## GENETIC RESOURCES OF CAROB TREE (*CERATONIA SILIQUA* L.) IN ALGERIA: INSIGHT FROM POD AND SEED MORPHOLOGY

KOCHERANE Rima <sup>1\*</sup>, KROUCHI Fazia <sup>2</sup> and DERRIDJ Arezki <sup>2</sup>

Department of Agronomy, Faculty of Nature and life Science, ZIANE Achour University, Djelfa, 17000, Algeria.  
Laboratoire de production, amélioration et protection des végétaux et des denrées alimentaires, Department of Agronomic Sciences, Faculty of Biological and Agronomic Sciences, Mouloud MAMMERRI University, Tizi-Ouzou, 15000, Algeria

Reçu le 08/07/2019, Révisé le 14/12/2019, Accepté le 23/12/2019

### Abstract

**Description of the subject.** In Algeria, the carob tree extends over a large area from East to West. Yet data on the pattern of morphological variation of its pods and seeds across such area are lacking, despite the usefulness of a good understanding of intraspecific variation of such traits for domestication, conservation and sustainable management purposes.

**Objective:** The present study aims at describing morphological variation in pod and seed traits of such populations and addresses the following questions: (a) what is the level of variation within and between wild carob populations; (b) and how is such variation spatially distributed?

**Methods:** 07 wild carob populations of northern Algeria were investigated for pod and seed morphology.

**Results:** Significant differences between provenances were observed for all quantitative traits. Slight differences between trees were also observed. Pod shape and seed surface were the most uniform traits among provenances. Within-provenance, the proportion of polymorphic trees for a given qualitative trait was variable. The pattern of variation did not reflect ecological conditions at site of origin suggesting rather a mosaic of variations.

**Conclusion:** This study provides a first insight into carob genetic resources in Algeria through morphological characters of pods and seeds. It indicates a good potential of Algerian populations as a source of raw material for future breeding programs.

**Keywords:** *Ceratonia siliqua* L., Algeria; morphology; pod; seed; provenance; variation.

## RESSOURCES GÉNÉTIQUES DU CAROUBIER (*CERATONIA SILIQUA* L.) EN ALGÉRIE: APERÇU À TRAVERS LA MORPHOLOGIE DES GOUSSES ET DES GRAINES

### Résumé

**Description du sujet:** En Algérie, le caroubier s'étend sur une vaste zone allant d'Est en Ouest, mais on manque de données sur le patron de la variation morphologique de ses gousses et de ses graines dans cette zone, malgré l'utilité d'une bonne compréhension de la variation intra-spécifique de ces caractères pour la domestication; la conservation et la gestion durable.

**Objectifs:** La présente étude vise à décrire la variabilité morphologique des caractères des gousses et des graines de ces populations et aborde les questions suivantes: a) quel est le niveau de variation à l'intérieur et entre les populations du caroubier sauvage; (b) et comment cette variation est-elle répartie spatialement?

**Méthodes:** 07 populations spontanées du caroubier du nord de l'Algérie ont été étudiées pour la morphologie des gousses et des graines.

**Résultats:** Des différences significatives entre les provenances ont été observées pour tous les caractères quantitatifs. De légères différences entre arbres ont aussi été observées. La forme et l'aspect des surfaces des gousses sont les plus uniformes entre les provenances. Au sein des provenances, la proportion d'arbres polymorphes pour un caractère qualitatif donné est variable. Le patron de variation ne reflète pas les conditions écologiques du site d'origine et suggère plutôt une mosaïque de variation.

**Conclusion.** Cette étude fournit un premier aperçu des ressources génétiques du caroubier en Algérie à travers les caractères morphologiques des gousses et des graines. Elle indique un bon potentiel des populations algériennes comme source de matière de base pour les futurs programmes de sélection.

**Mots clés:** *Ceratonia siliqua* L., Algérie; morphologie; gousse; graine; provenance; variabilité.

\* Auteur correspondant: KOCHERANE Rima. e-mail: rimrim53@ymail.com

## INTRODUCTION

The Carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) is one of the most characteristic species of the Mediterranean region [39]. It is a legume of the Fabaceae family and Caesalpiniaceae sub-family. It is a spontaneous or a cultivated tree that may reach a height of 5 to 15 m [50, 9]. Together with *Pistacia lentiscus* L. and *Olea europaea* L. var. *sylvestris*, this species forms one of the most characteristic associations of the lowest zone of the Mediterranean vegetation and is thus considered to be a climax community (*Oleo-Ceratonion*) [9]. The Carob tree is cultivated in the Mediterranean countries including Spain, Portugal, Italy, Morocco, Tunisia and Algeria [50, 1, 4, 9, 8, 54, 45, 59], in Turkey [11], in south Africa and USA [27]. In Algeria, carob tree has been reported to be very common in the Tell region by [39] and [50] and frequently cultivated in the Saharan Atlas [50]. The Carob tree is tolerant to salt stress and drought [15, 21, 20, 14, 22]. In Algeria, it grows on all types of soils except very moist ones and it resprouts abundantly [39]. In Morocco, it grows under arid, semi-arid, sub humid and humid bioclimates in their warm and mild variants and it is also adapted to all soil types [1]. Carob cultivation in marginal and prevailing calcareous soils of the Mediterranean region is important environmentally and economically [9]. The species may contribute to developing disadvantaged marginal areas of Morocco [27] and salted zones of northwestern Algeria particularly Relizane region [40]. Carob tree produces an edible sweet pod with a much appreciated pulp in the Mediterranean region. Besides its consumption as fresh, dry or transformed material, the pod represents a valuable source of forage for livestock and is largely used in food industry [10]. The fruit provides flour used in food industry for its polyphenols antioxidant properties and in industrial production of bioethanol [44]. Carob pod extracts are also used for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* [63, 67, 25], citric acid production [44],  $\beta$ -mannanase production [66, 26] and for enhancement of lactic acid production by *Lactobacillus casei* [62]. Carob seeds contain a gum called locust bean gum (LBG) or "E410" used in food industry as a stabilizing and gelatinous agent in various products [6], as an additive into sugar-free, starch-free flour for diabetics [65],

as drug ingredient in pharmaceutical industry [57, 49] and as a source of dietary fibers in foods [16].

Pods extracts play a role in suppression of intestinal parasites [43] in the treatment of diarrhea [56], in the treatment or control of hyperlipidaemia (high cholesterol in plasma) and have antiproliferative [53], antibacterial [42], antioxidant and anti-inflammatory properties [44].

Such examples of multipurpose uses illustrate the growing importance of carob products mainly pulp and locust gum likely to promote its cultivation, use and conservation.

Indeed, despite its economic importance, *Ceratonia siliqua* an agroforestry tree in North Africa [30] is underutilized in such region particularly in Algerian which occupies only the 8th rank for carob production [9, 24]. Lack of research on diversity assessment is one of the constraints in national programs to promote conservation and use of underutilized crop species [47] and characterization, evaluation and descriptors lists are among the required activities to overcome such constraints [47]. A better understanding of genetic diversity and its distribution is essential for its conservation and use [51]. Seed source choice is important in a restoration and management perspective [12]. Morphological characterization of carob pods and seeds around the Mediterranean region has been carried out on spontaneous populations of the species [35, 11]; on cultivars [4, 54, 8, 59, 38, 29] or both types [28, 18, 45, 23, 19]. Carob pod and seed traits (i.e. size and quality of pods, seed yield) have been reported by [9] to vary according to cultivars as a result of centuries of cultivation. Significant variations of pod and seed traits have also been reported on wild populations of the species [28, 35, 18]. Such variation is suggested to be under influence of environmental factors [28]; edapho-climatic site factors [18]; latitude [29] and/or agronomic practices in the case of varieties [18].

In Algeria, the carob tree, a component of the *Oleo-Ceratonion*, extends over a large area from East to West encompassing low and medium elevations and semi-arid and humid bioclimates.

Yet data on the pattern of morphological variation of its pods and seeds across such area are lacking despite the usefulness of a good understanding of the within- species variation of such traits for domestication, conservation and sustainable management purposes.

The present study aims at describing morphological variation in pod and seed traits of such populations and addressed the following questions: (i) what is the level of variation within and between wild carob populations; (ii) and how is such variation geographically distributed?

## MATERIAL AND METHODS

### 1. Study sites

The study has been undertaken on 7 spontaneous carob populations in north Algeria which are Annaba, Jijel, Setif, Blida, Tipaza, Relizane and Tlemcen respectively from East to West (Fig. 1). Such populations are located at various elevations (including low land, hilly and mountainous landscape) and evolve under different bioclimates based on calculations made on data provided by National Meteorology Office of Algeria (Table1).

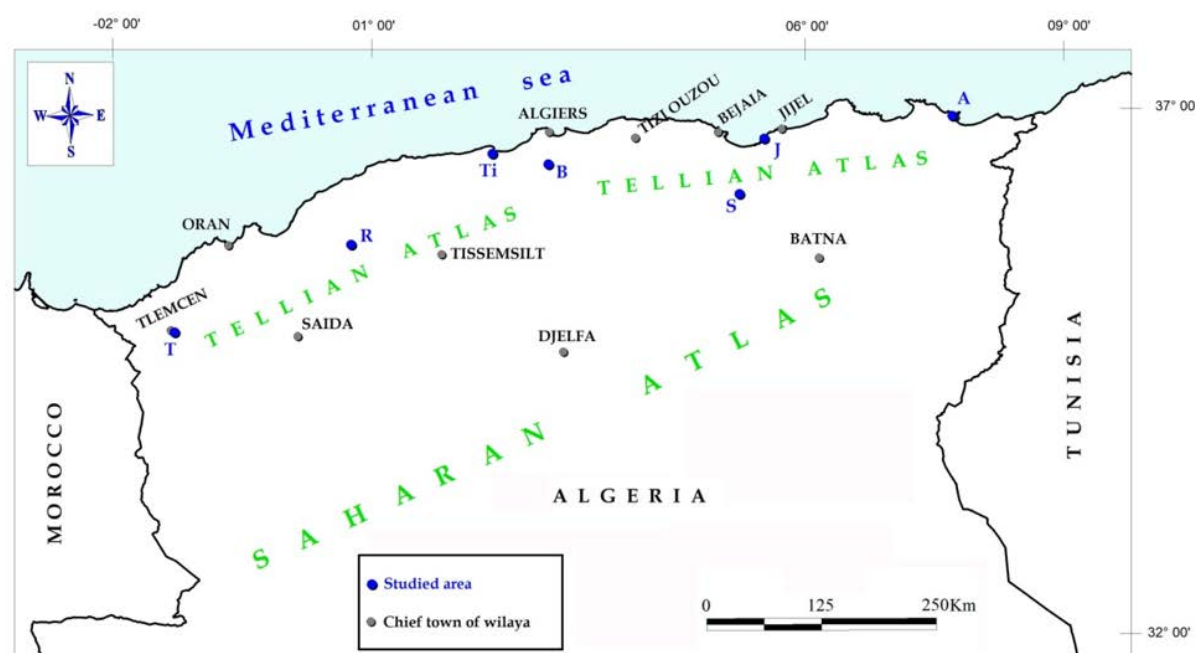


Figure 1. Map of Algeria showing locations of the carob sites analyzed.

\*T:Tlemcen; R: Relizane; Ti: Tipaza; B: Blida; S:Setif; J:Jijel; A:Annaba.

Table 1. Geographic and climatic data of studied sites.

Site	Code	Latitude	Longitude	Altitude (m)	m (°C)	M (°C)	Rainfall (mm/year)	Q <sub>3</sub>	Bioclimate
Annaba	A	36°55'N	007°43'E	740	6.7	31.5	978.93	135.39	mild humid
Jijel	J	36°42'N	005°32'E	81	6.80	31.6	1044.1	144.41	mild humid
Setif	S	36°11'N	005°15'E	1050	1.92	34.30	414.5	43.91	fresh semi-arid
Blida	B	36°29'N	003°02'E	187	7	31.57	796.0	111.12	warm subhumid
Tipaza	Ti	36°34'N	002°24'E	32	9.50	32.1	574.8	87.24	warm subhumid
Relizane	R	35°42'N	000°46'E	155	5.8	32.7	402	51.26	mild semi-arid
Tlemcen	T	34°52'N	001°16'W	757	3.8	32.5	484	57.84	mild subhumid

Q<sub>3</sub>: Emberger quotient. M: Mean of the maxima temperature of the warmest month. m: Mean of the minima temperature of the coldest month.

## 2. Plant material

Pods and seeds used in this study were collected from the 7 carob populations during September and October 2014 coinciding with the peak maturity of pods. In each population, a random sample of 20 trees was retained and 20 pods per tree were randomly harvested, totalizing 140 trees and 2800 pods. The collected material was labelled with respect of tree and population identity then brought to the lab for measurements. The 20 pods of each tree were crashed or individually for seed extraction. Given the homogeneity of seed size within pods, one seed per pod was randomly retained for subsequent measurements totalizing 20 measured seed per tree and 2800 seeds in total.

## 3. Measured traits

### A. Qualitative traits

Pods and seeds were characterized by their color, shape and surface aspect. Modalities of such qualitative traits were inspired from data literature [9].

### B. Quantitative traits

Characterization of pods and seeds was made basing on descriptors of the International Plant Genetic Resources Institute "IPGRI" [9]. Pod and seed description were carried out on the basis of 14 variables namely: length; width; thickness chord; weight; pulp weight; total number of seeds per pod in the case of pods; length; width; thickness and total seed weight, mean seed weight in the case of seeds. Some synthetic variables were also calculated: ratio "pod length/pod width"; ratio "pod chord/pod length" and ratio "total seed weight/ pod weight  $\times 100$ " corresponding to seed yield. Mean seed weight was calculated by dividing the total seed weight per pod on total number of seeds per pod.

In all 17 morphological characters were measured, of which 3 are qualitative and 14 are quantitative. Quantitative measurements were done using a caliper with a precision of  $\pm 0.1$  mm and an electronic balance (SCALTEC SBA33, Heiligenstadt, Germany) with accuracy of  $\pm 0.1$  mg. Qualitative measurements were based on naked eye observations.

## 4. Statistical analysis

In order to compare morphological variability of carob populations, data obtained on quantitative traits were subjected to statistical analysis.

A descriptive analysis (mean and coefficient of variation) was performed on quantitative traits followed by a two-way nested ANOVA. Linear correlations between variables were also calculated. Data obtained on qualitative traits were subjected to analysis of relative frequencies of modalities for each variable at three levels: on the whole sample, at provenance level and within-provenance. The Statistica10 software (Shareware) and Rx64.3.4.0 software were used for analyses.

## RESULTS

### 3.1. Qualitative traits

Pod and seed qualitative traits (color, shape and surface aspect) and corresponding modalities are given in table 2.

**Pod color :** Three pod shade colors were identified among the whole sample of pods (Table2): dark-brown (45.97%), reddish-brown (28.36%) and light-brown (25.67%).

Light-brown pods were represented at a very high proportion in Relizane (i.e. 98.75%) and at an intermediate one in Annaba (40.75%). Dark-brown pods were dominant in Tlemcen, Jijel and Blida (i.e. 59.25; 80.50 and 90.50% respectively). Reddish-brown pods were better represented in Setif; Tipaza and Annaba (i.e. 57.75; 53.50 and 38.50% respectively) but were absent in Relizane and Blida and on all but one individual of Jijel.

Monomorphic individuals with exclusively light-brown pods were dominant in Relizane (95%). Monomorphic ones with exclusively dark-brown pods were dominant in Blida (85%); Jijel (70%) and Tlemcen (50%). Polymorphic individuals for pod color were dominant in Tipaza (100%); Annaba (65%) and Setif (60%).

**Pod shape:** Three pod shapes were recorded (Table 2): curved (90.07%); straight (6.29%) and spiral (3.64%).

At provenance level, curved pods were represented at high proportions across all provenances (Table 2) while spiral shape reached a maximum of 14.5% in Tlemcen and 10.25% in Annaba.

Within-provenance, monomorphic individuals for the straight or spiral pod shape were absent. Monomorphic ones for curved pod shapes were dominant in Relizane (80%) but were also present in Setif (55%) and Tipaza (45%).

Polymorphic individuals were dominant in Tlemcen; Jijel; Annaba; Blida where they accounted for 80 to 85%.

**Pod surface:** Three pod surfaces were recorded (Table 2): wrinkled (59.25%); smooth (40.11%) and very rough (0.64%).

At provenance level, wrinkled pod surfaces were better represented in Tlemcen, Jijel, Annaba, Relizane and Blida (91.25 to 56.75%)

and smooth ones better represented in Tipaza i.e. 75.75%.

Within-provenance, a very rough pod surface was present only on 3 individuals in Tlemcen. Individuals with an exclusively wrinkled pod surface were better represented in Tlemcen; Jijel, Annaba and Relizane (80; 65; 55 and 50% respectively) contrarily to Tipaza where they accounted for only 10%. Those with an exclusively smooth pod surface were absent in Tlemcen and best represented in Tipaza (60%) followed by Setif (50%). Polymorphic individuals for pod surface were best represented in Blida (60%).

Table 2: Distribution of trees for pod and seed qualitative traits.

Trait	Modalities	% of trees within-provenance (n=20)							% of total trees (n=140)
		Annaba	Jijel	Setif	Blida	Tipaza	Relizane	Tlemcen	
Pod color	Light -brown	40.75	14.5	0.25	0	19	98.75	6.50	25.67
	Dark-brown	20.75	80.5	42	90.50	27.5	1.25	59.25	45.97
	Reddish- brown	38.50	5	57.75	9.5	53.5	0	34.25	28.36
Pod shape	Straight	1.75	8	0	11	1.50	0.50	2.75	3.64
	Curved	88	85.75	97	85.75	92.75	98.50	82.75	90.07
	Spiral	10.25	6.25	3	3.25	5.75	1	14.50	6.29
Pod surface	Smooth	37.75	27.5	58	43.25	75.75	34.25	4.25	40.11
	Wrinkled	62.25	72.5	42	56.75	24.25	65.75	91.25	59.25
	Very rough	0	0	0	0	0	0	4.50	0.64
Seed color	Reddish brown	0	36.75	7.25	3.5	16.75	0	0	9.18
	Dark-brown	51.75	48	22.75	28.5	35.50	31	39.50	36.71
	Blakish-brown	28.25	5.25	0.25	0	0.50	3.50	1	5.54
	Light- brown	20	10	69.75	68	47.25	65.50	59.50	48.57
Seed shape	Rounded	59.25	31	96.25	10.25	22.75	96	49.75	52.18
	Oval	23.25	35.5	0.25	58.5	17.25	0	21.50	22.32
	Elliptical	17.50	33.5	3.5	31.25	60	4	28.75	25.50
Seed surface	Smooth	81.50	69.5	88.75	53.75	90	82.25	77	77.54
	Wrinkled	18.50	27.75	11.25	42	10	17.75	22	21.32
	Very rough	0	2.75	0	4.25	0	0	1	1.14

**Seed color:** 4 seed colors were identified (Table 2): light-brown (48.57%); dark-brown (36.71%); reddish-brown (9.18%) and blackish-brown (5.54%).

Light-brown seeds were dominant among 5 out of 7 provenances (Setif, Blida, Tipaza, Relizane and Tlemcen) with proportions ranging from a low of 47.25% to a high of 69.75% (Table 2). Dark-brown seeds were better represented in Jijel (48%) and Annaba (51.75%). Reddish-brown ones were absent among three provenances (Annaba, Relizane and Tlemcen). Blackish-brown seeds were absent in Blida and did not exceed 5.25% in other provenances

except Annaba where they reached a maximum of 28.25%.

The proportion of polymorphic individuals for seed color is higher than that of monomorphic ones for all provenances except Relizane and Blida which showed relatively balanced proportions of monomorphic and polymorphic trees.

**Seed shape:** Three modalities of this trait were observed (Table 2): rounded; oval and elliptical, which accounted respectively for 52.18; 22.32 and 25.50% of the whole sampled seeds.

Rounded seeds were highly represented in Relizane and Setif (96%) followed by Annaba (59.25%) and Tlemcen (49.5%); elliptical seeds were better represented in Tipaza (60%) and oval ones better represented in Blida (58.5%). Jijel contained these three modalities at comparable rates.

Polymorphic individuals for seed shape were best represented in Jijel; Tlemcen and Blida (65 to 60 %). Individuals with only rounded seeds were dominant in Setif (80%) and Relizane (70%), while those with only elliptical seeds best represented in Tipaza (40%).

**Seed surface:** Seed surface comprised three modalities (Table 2): smooth (77.54%), wrinkled (21.32%) and very rough (1.14%). The latter category is absent in 3 provenances (Tipaza, Setif and Relizane) and present at very low rates i.e. 1; 2.75 and 4.25% in Tlemcen; Jijel and Blida respectively.

For this trait, the proportion of polymorphic trees is higher than that of monomorphic ones for all provenances except Tipaza which contained 60% of monomorphic trees with an exclusively smooth seed surface.

### 3.2. Quantitative traits

Statistical parameters for pod and seed traits (i.e. overall means and corresponding coefficients of variation and range per tree) are given in Table 3. Boxplots of main traits are given in Fig. 2. The distribution of trees within-provenance for along with their mean values of pod and seed traits are given in Table 4 /Fig 3. The results of the two-way nested Anova on pod and seed traits are given in Table 5. The correlation matrix between traits is given in table 6.

#### 3.2.1. Within and between provenance variations for quantitative traits

**Pod length:** The overall mean for this trait is 15.27 cm. The longest pods were observed in Tlemcen, followed by Annaba, and the shortest ones in Relizane followed by Jijel. All provenances contained individuals pertaining to the class of low and intermediate pod length even at fluctuating rates, while the class of longest pods was absent among individuals of Relizane, Jijel and Setif.

**Pod width:** The overall mean for this trait is of 1.97 cm. The largest pods were recorded in Setif; the narrowest ones in Jijel followed by Tipaza. 100% of individuals from Setif pertained to the class of the largest pods i.e. ]2-2.5]cm and 100% of those from Jijel to the class of intermediate pod width i.e. ]1.5 - 2] cm (Table 4). The remaining provenances contained individuals pertaining both to the class of intermediate and high values of pod width.

**Pod thickness:** The overall mean for this trait is of 0.76 cm. The thickest pods were found in Blida; the thinnest ones in Relizane. Overall, the intermediate class of pod width was recorded on 79% of individuals and was represented within each provenance. Contrary to the class of low values, it was recorded only among 25 and 35% individuals from Tlemcen and Relizane respectively and the class of high values recorded only among 35 to 45% of individuals from Annaba and Blida respectively.

**Pod weight:** The overall mean for this trait is 11.08 g. The heaviest pods were found in Blida, followed by Tlemcen, and the lightest ones in Relizane. As a whole, half of individuals pertained to the same class of mean values of pod weight. Individuals with low and intermediate pod weights were observed in each provenance while those with heavy pods were observed only in Blida, Tipaza and to a lesser extent in Tlemcen.

**Total number of seeds per pod:** In average there were 10.56 seeds per pod. The highest number of seeds per pod was recorded in Blida and the lowest one in Relizane. Indeed, Relizane contained a great proportion of individuals with no more than 8 seeds per pod, contrary to Blida and Tlemcen which contained a consistent proportion of individuals with more than 13 seeds/pod (Table 4/Fig. 3).

**Seed yield:** Overall, total seed mass represented 18.19% of pod weight. The highest mean was recorded in Tipaza and the lowest one in Relizane. Indeed, this parameter was below 10% among 80% of individuals from Relizane and exceeded 20% for 70% of individuals from Jijel and Tlemcen and for 55% of those from Blida and Tipaza.



Table 3: Statistical parameters on quantitative traits of pods and seeds.

Character	Pod											Seed			
	Length (cm)	Width (cm)	Thickness (cm)	Chord (cm)	Weight (g)	Pulp weight (g)	Seed number/pod	Total seed weight (g)	Seed yield (%)	Length / width	Chord/ Length	Mean seed weight(g)	Length (mm)	Width (mm)	Thickness (mm)
	pl	pwd	pth	pch	pwg	ppwg	tsn	swg	sy	pl/pwd	chr/pl	mSWG	sl	swd	sth
Annaba	16.91	2.04	0.85	12.27	12.24	10.43	10.01	1.81	15.95	8.38	0.73	0,18	9.91	6.85	3.90
Jijel	13.64	1.76	0.81	11.50	9.38	7.45	11	1.92	21.88	7.78	0.84	0,18	8.86	6.65	4.28
Setif	15.36	2.34	0.66	11.52	11.48	9.99	9.32	1.49	13.32	6.57	0.75	0,16	8.90	6.98	4.14
Blida	15.46	1.98	0.90	12.50	14.30	11.57	12.76	2.73	21.34	7.81	0.81	0,23	9.76	6.82	4.34
Tipaza	14.66	1.84	0.78	11.72	10.25	8.20	11.01	2.04	23.98	8.02	0.80	0,19	9.33	7.09	4.19
Relizane	13.76	1.95	0.60	11.56	8.67	7.97	7.15	0.70	8.58	7.25	0.84	0,10	8.07	6.56	2.96
Tlemcen	17.08	1.91	0.68	12.63	11.18	8.84	12.63	2.34	22.55	8.94	0.74	0,19	8.98	6.86	4.44
Overall mean	15.27	1.97	0.76	11.97	11.08	9.22	10.56	1.86	18.19	7.83	0.79	0,17	9.12	6.84	4.04
CV (%)	18.47	14.91	22.18	21.28	36.20	40.67	29.54	41.89	49.51	20.42	17.03	33,13	10.05	7.66	15.18
Range per tree	10,09 - 20,59	1,02 - 2,47	0,30 - 1,25	7,40 - 17,09	5,27 - 22,60	3,23 - 19,00	5,50 - 15,00	0,54 - 3,60	6,25 - 46,50	5,52 - 13,13	0,49 - 0,98	0,09-0,31	7,82 - 11,80	6,05 - 7,80	2,79 - 5,56

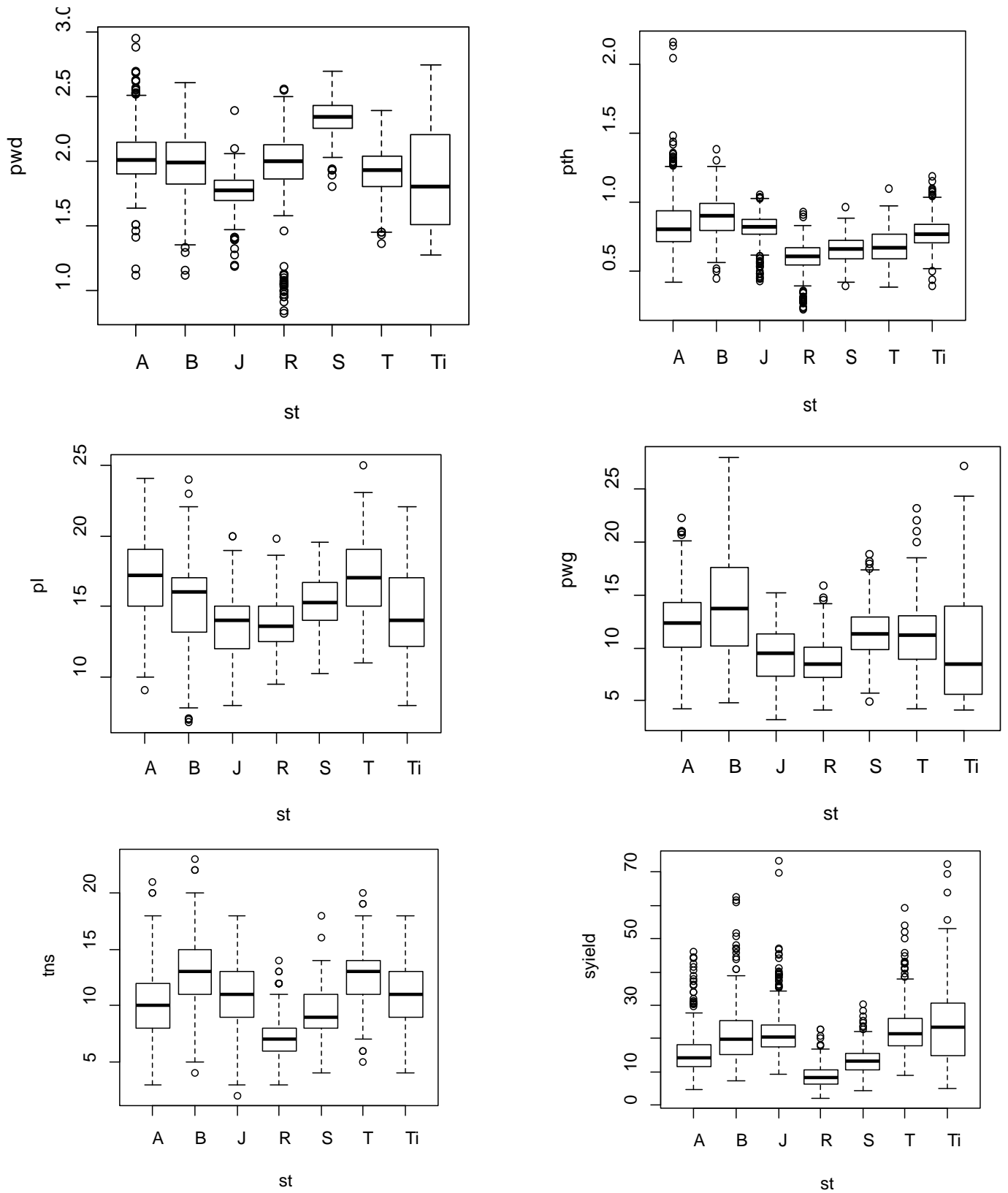


Figure 2: Boxplot of pod and seed traits per population.

**Pod chord:** This trait averaged 11.97 cm. The highest mean was registered in Tlemcen, followed by Blida, and the lowest one in Jijel. Between provenances variation of this trait was less pronounced comparatively to other pod traits.

In average, pod chord represented 79% of pod length (range per provenance: 73-84% and per tree: 49-98%). 71.43 % of individuals pertained to the intermediate class i.e.] 0.65 - 0.85]. At provenance level, 100% of individuals from Setif pertained to this class whereas 70% of those from Jijel pertained to the class ] 0.85 - 1.00].

**Ratio “pod length/pod width”**

In average, pods were 7.82 times longer than wider (range per tree: 5.52 – 13.13 and per provenance: 6.57 - 8.94% for Setif and Tlemcen respectively).

As a whole, 65% of individuals pertained to the same class of ratio i.e. ]7 - 10]. Relizane and Setif showed respectively 65 and 70% of individuals in the class of low ratio i.e. ]5 - 7] which indicates their relatively larger pods.

**Mean seed weight:** In average, a seed weighed 0.17 g. The heaviest seeds were registered in Blida and the lightest ones in Relizane. The former provenance had 75% of individuals with mean seed weight  $\geq 0.20$  g and the latter 100% of individuals with mean seed weight  $< 0.15$  g.

**Seed length:** Overall, seed length averaged 9.12 mm. The longest seeds were found in Annaba followed by Blida and the narrowest ones in Relizane. Annaba contained no individual in the class of short pods, contrary to Relizane which contained 100% of individuals in this class (Table 4/ Fig. 3).

**Seed width:** Seed width averaged 6.84 mm. The largest seeds were observed in Tipaza followed by Setif and the thinnest ones in Relizane. Individuals with large seeds are missing in Relizane and those with narrow seeds are missing in Tipaza.

The other provenances contained individuals pertaining to the 3 classes of this trait (Table 4).

**Seed thickness:** In average seeds are 4.04 mm thick. The thickest seeds were recorded in Blida and Jijel and the thinnest ones in Relizane. Indeed, 100% of individuals from Relizane pertained to the class of low mean values; 100% of those from Setif pertained to the class of high mean values. Individuals of the remaining provenances pertained mainly to the class of intermediate means.

As a whole, the ranking of provenances for mean values of pod and seed traits showed an inconsistent pattern according to the trait of interest. Relizane segregated from the other provenances by the lowest means for 9 traits of which 4 are related to seed size, 3 to pod size and 2 others to seed production (number of seeds per pod and seed yield). The only trait for which such provenance was ranked in an intermediate position is pod width which registered the lowest mean at Jijel. The top position for high mean values was occupied by some provenances (Annaba, Blida and Tlemcen) for 3 to 4 traits; by Tipaza for seed width and seed yield and by Setif for pod width. Conversely, the bottom position for the lowest mean values was occupied by Jijel just behind Relizane for 2 pod traits (length and weight) and 2 seed ones (length and width).

The two-way nested Anova revealed significant differences between provenances for all considered traits (Table 5). It also revealed slight but significant differences within-provenance, i.e. among trees. The extent of among provenance differences for pod and seed traits is the highest for seed thickness and the lowest for pod chord (Fig. 4).

Table 4: Distribution of trees within-provenance per class of mean values of pod and seed traits.

Trait	Class of mean values per tree	% of trees within-provenance (n=20)							% of trees (n=140)
		A	B	J	R	S	T	Ti	
Pod length (cm)	≤14	15	30	75	95	15	10	55	42,14
	]14-18]	40	45	25	5	85	55	35	41,43
	>18	45	25	0	0	0	35	10	16,43
		A	B	J	R	S	T	Ti	
Pod width (cm)	]1 - 1.5]	0	0	0	5	0	5	20	4,29
	]1.5 - 2]	70	65	100	50	0	65	45	56,43
	]2 - 2.5]	30	35	0	45	100	30	35	39,29
		A	B	J	R	S	T	Ti	
Pod thickness (cm)	]0.30 - 0.60]	0	0	5	30	0	25	0	8,57
	]0.60 - 0.90]	70	55	90	70	100	75	90	78,57
	> 0.90	30	45	5	0	0	0	10	12,86
		A	B	J	R	S	T	Ti	
Pod weight (g)	]5 - 10]	20	15	60	85	15	30	50	39,29
	]10 - 15]	80	50	40	15	85	65	25	51,43
	> 15	0	35	0	0	0	5	25	9,29
		A	B	J	R	S	T	Ti	
Total number of seeds	]5,5 - 8]	10	0	5	85	15	0	5	17,14
	]8 - 10,5]	45	0	35	15	70	0	25	27,14
	]10,5 - 13]	45	55	60	0	15	75	60	44,29
	>13	0	45	0	0	0	25	10	11,43
		A	B	J	R	S	T	Ti	
Seed yield (%)	≤10	0	0	0	80	0	0	0	11,43
	]10-15]	60	15	0	20	95	0	20	30
	]15-20]	30	30	30	0	5	30	25	21,43
	>20	10	55	70	0	0	70	55	37,14
		A	B	J	R	S	T	Ti	
Mean seed weight(g)	<0,15	0	0	0	100	0	0	0	14,29
	]0,15 -0,20[	90	20	85	0	100	0	0	42,14
	]0,20 -0,25[	10	55	10	0	0	60	70	29,29
	≥0,25	0	25	5	0	0	40	30	14,29
		A	B	J	R	S	T	Ti	
Seed thickness (mm)	]2.5-3.5]	0	0	0	20	0	0	0	14,29
	]3.5-4.5]	18	16	16	0	0	13	17	57,14
	> 4.5	2	4	4	0	20	7	3	28,57
		A	B	J	R	S	T	Ti	
Total seed weight (g)	≥1	0	0	0	20	0	0	0	14,29
	] 1-2]	18	0	12	0	20	1	12	45
	>2	2	20	8	0	0	19	8	40,71
		A	B	J	R	S	T	Ti	
Seed width (mm)	]6-6.5]	45	15	40	25	5	15	0	20,71
	]6.5-7]	20	50	50	75	50	40	55	48,57
	>7	35	35	10	0	45	45	45	30,71
		A	B	J	R	S	T	Ti	
Seed length (mm)	] 7-9]	0	10	70	100	75	50	45	50
	] 9-11]	95	85	30	0	25	50	50	47,86
	>11.00	5	5	0	0	0	0	5	2,14

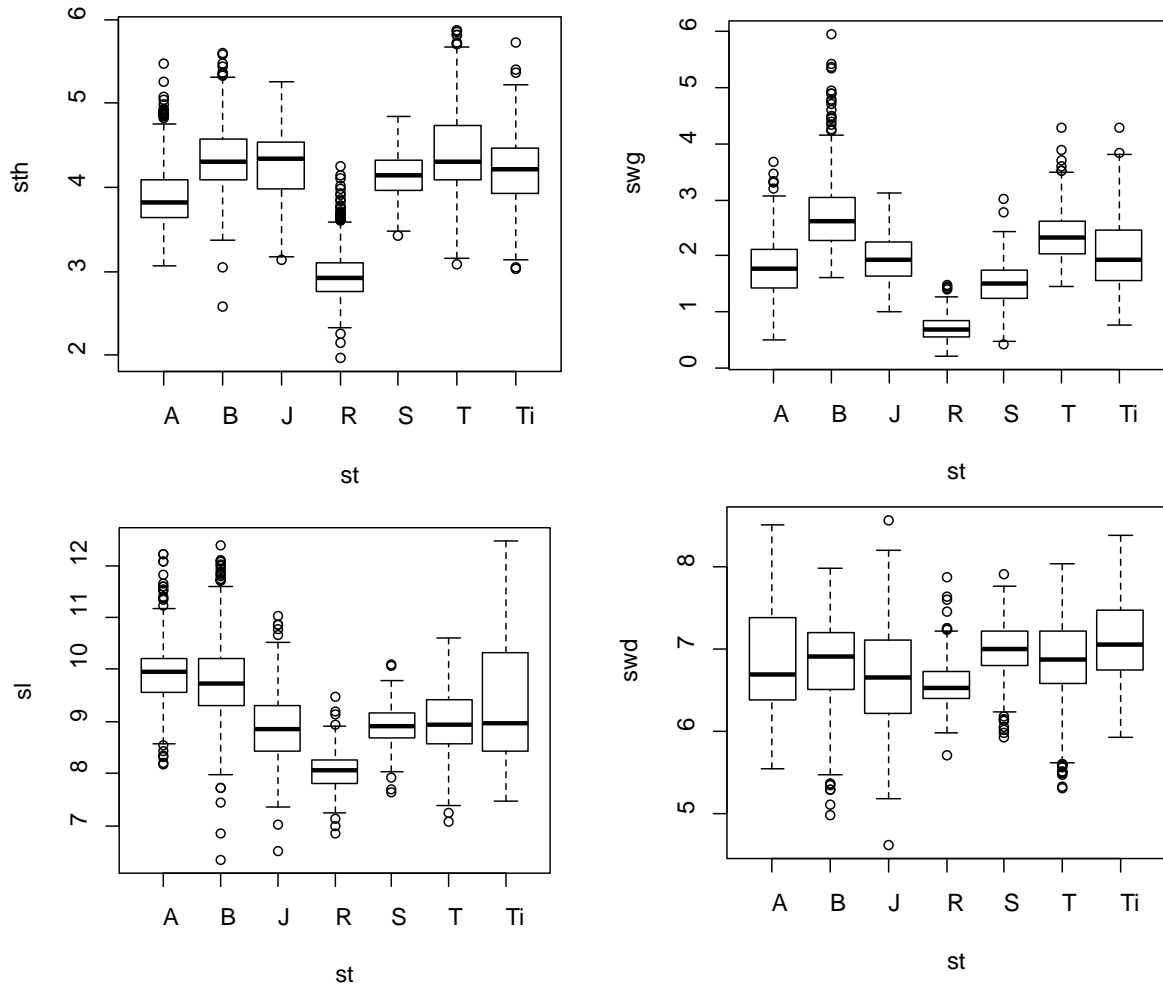


Figure 3 : Continued: Boxplot of pod and seed traits per population.

Table 5: Results of two way nested Anova on quantitative traits of pods and seeds.

Trait	Source of variation	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Pod width	st	6	82.76	13.793	631.01	<2e-16 ***
	st:tree	133	102.79	0.773	35.36	<2e-16 ***
	Residuals	2660	58.14	0.022		
Pod thickness	st	6	28.72	4.786	504.83	<2e-16 ***
	st:tree	133	25.18	0.189	19.97	<2e-16 ***
	Residuals	2660	25.22	0.009		
Pod length	st	6	4540	756.6	271.94	<2e-16 ***
	st:tree	133	10320	77.6	27.89	<2e-16 ***
	Residuals	2660	7401	2.8		
Pod weight	st	6	8513	1418.8	235.87	<2e-16 ***
	st:tree	133	20489	154.1	25.61	<2e-16 ***
	Residuals	2660	16001	6.0		
Pod chord	st	6	577	96.20	27.83	<2e-16 ***
	st:tree	133	8394	63.11	18.26	<2e-16 ***
	Residuals	2660	9196	3.46		
Seed yield	st	6	79404	13234	392.93	<2e-16 ***
	st:tree	133	57944	436	12.94	<2e-16 ***
	Residuals	2660	89589	34		
Total number of seeds/pod	st	6	9187	1531.1	307.973	<2e-16 ***
	st:tree	133	4822	36.3	7.293	<2e-16 ***
	Residuals	2660	13224	5.0		
Mean seed weight	st	6	3.538	0.5897	345.844	
	st:tree	133	1.272	0.0096	5.609	<2e-16 ***
	Residuals	2660	4.536	0.0017		
Seed thickness	st	6	605.8	100.97	1218.4	<2e-16 ***
	st:tree	133	225.9	1.70	20.5	<2e-16 ***
	Residuals	2660	220.4	0.08		
Seed weight	st	6	1002.9	167.14	890.384	<2e-16 ***
	st:tree	133	201.9	1.52	8.086	<2e-16 ***
	Residuals	2660	499.3	0.19		
Seed length	st	6	929.9	154.98	701.42	<2e-16 ***
	st:tree	133	837.1	6.29	28.49	<2e-16 ***
	Residuals	2660	587.7	0.22		
Seed width	st	6	77.8	12.961	89.32	<2e-16 ***
	st:tree	133	303.0	2.278	15.70	<2e-16 ***
	Residuals	2660	386.0	0.145		

Significance code: '\*\*\*' : '0.001'

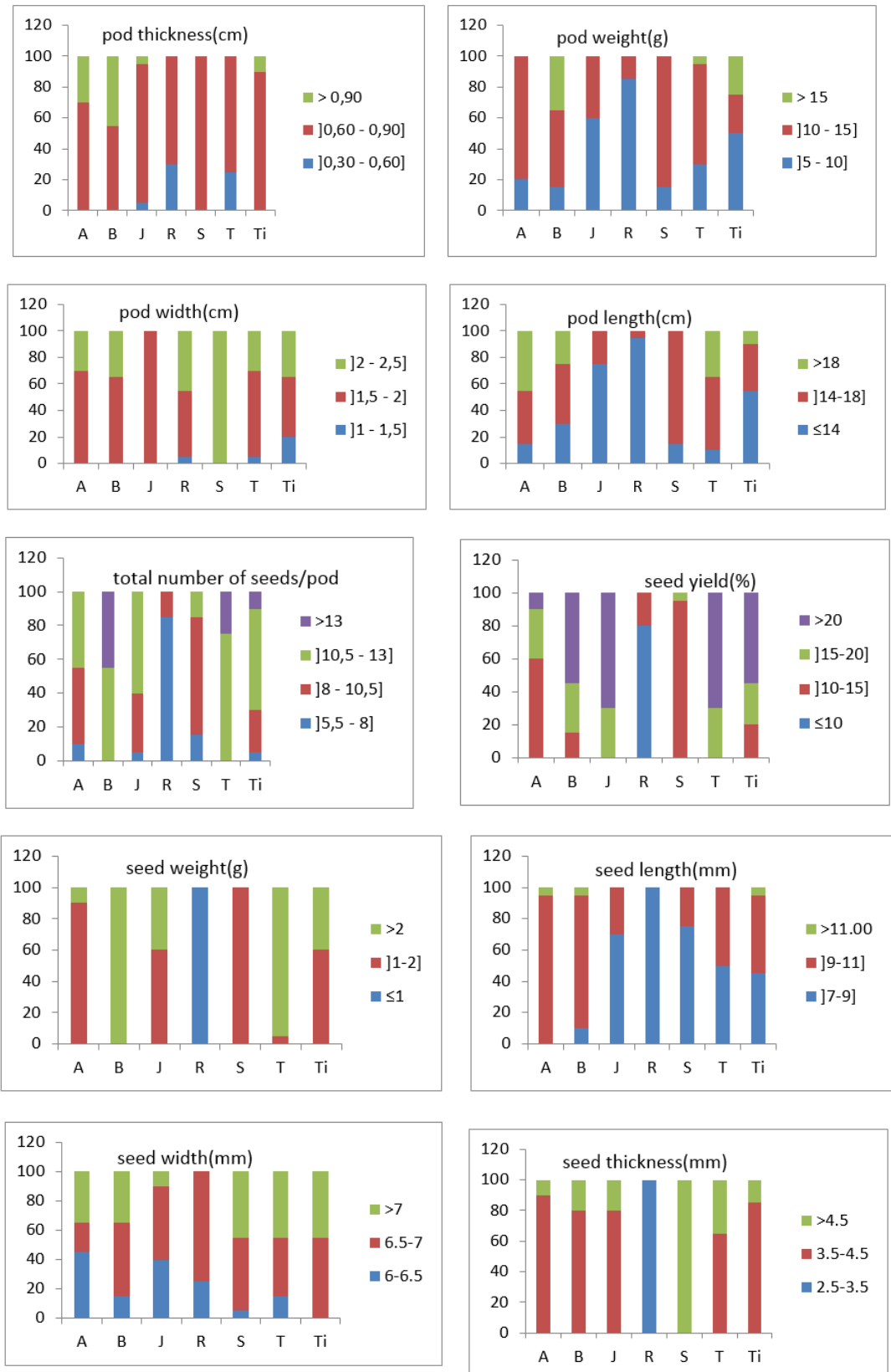


Figure 4 : Distribution of trees within-provenance for mean values of pod and seed traits

### 3.2.2. Correlation between quantitative traits

The strongest correlation was observed between pod weight and pulp weight ( $r = 0.98$ ) indicating that pod weight is mainly determined by pulp weight (Table 6).

Among the 4 pod size traits (i.e. pod weight, length, width and thickness), pod weight revealed positive correlations with all other pod traits and with seed length.

Among the 4 seed size traits (i.e. mean seed weight; length; width and thickness), seed length showed positive correlations with all other seed traits and with all pod size traits except pod width.

Seed yield revealed slight but positive correlations with seed weight ( $r = 0.38$ ) and seed thickness ( $r = 0.38$ ) and negative correlations with pulp weight ( $r = -0.54$ ); pod weight ( $r = 0.42$ ) and pod width ( $r = -0.42$ ).

Table 6 : Correlation matrix between quantitative traits of pods and seeds

	pl	pwd	pth	chr	pwg	tns	mswg	sl	swd	sth	tswg	ppwg	syield
pl	1												
pwd		1											
pth			1										
chr	0,58			1									
pwg	0,63	0,45	0,43	0,49	1								
tns					0,30	1							
mswg			0,30				1						
sl	0,37		0,37		0,42	0,31	0,39	1					
swd								0,36	1				
sth			0,35			0,40	0,42			1			
tswg	0,31		0,38			0,78	0,64	0,50		0,54	1		
ppwg	0,61	0,48	0,38	0,48	0,98			0,35				1	
syield		-0,42			-0,42	0,49	0,38			0,38	0,57	-0,57	1

Correlation coefficients lower than 0.30 are not shown. All correlation coefficients are significant at  $\alpha = 0.001$  ( $n = 2800$ ).

### 3.2.3. Correspondence between quantitative and qualitative traits

The examination of a possible correspondence between pod and seed qualitative traits indicated a variable pattern with only a few cases of concordance between modalities of traits. For example, the dark-brown color was dominant both among pods and seeds of Jijel and the light brown color both among pods and seeds of Relizane, contrary to Tlemcen and Blida where the dark brown-color was dominant on pods and the light- brown color on seeds. Setif and Tipaza were the only provenances which had pods and seeds of similar surface (i.e. smooth).

Qualitative pod traits did not seem to be linked to quantitative pod ones, suggesting for example, that pod color at tree level may not be a good predictor of seed yield. Indeed, this agronomic trait ranged between 10.40 and 30.53% ; 10.18 and 38.32% ; 6.25 and 21.60% among trees bearing 100% reddish-brown; dark-brown and light-brown pods respectively. This applies also to the relationship between aspect of pod surface and seed yield.

In Tipaza for example, trees bearing pods of 100% smooth surface showed either high i.e. 46.5% or low i.e. 13.70% seed yield. Similarly, in Relizane seed yield was invariably low both among trees with 100% smooth pod surface and those with 100% rough pod surface.

## DISCUSSION AND CONCLUSION

The morphological analysis of carob pod and seed quantitative traits revealed significant variations between and within-populations. Qualitative traits (color, shape and surface aspect of pods and seeds) also proved variable within and between populations.

3 pod colors were registered as a whole: Light-brown, dark-brown and reddish brown in agreement with data literature on the species [52, 9, 2, 46]. The dominant pod color varied according to provenance: blackish-brown in Tlemcen, Blida and Jijel; light-brown in Relizane and reddish-brown in Tipaza and Setif. 3 modalities of pod shapes were registered: straight; curved and spiral, in concordance with literature [9, 46], but the curved shape was dominant across all provenances.



Pod surface varied from smooth to wrinkled in concordance with other authors [9, 46]. The wrinkled surface was better represented among 5 provenances and the smooth surface in one provenance. Among the 4 modalities of seed color recorded, the light-brown was the most represented across all provenances except Annaba and Jijel which rather showed a higher proportion of dark-brown seeds.

Among the three modalities of seed surface recorded, the dominant one corresponded to the smooth surface in agreement with other sources [4, 9, 46].

Among the three modalities of seed shapes registered, the rounded shape concerned half of the seeds and was represented at very high rates in Setif and Relizane. Oval seed shapes were dominant in Blida and elliptical ones dominated in Tipaza.

Regarding the quantitative traits of pods and seeds, the extent of their variation within and between population depended on the trait of interest: the least pronounced between-provenance variation was registered for pod chord and the most pronounced one for seed thickness.

The rank of provenances for their mean values depended on the trait of interest: Relizane cumulated the lowest mean values for 9 quantitative pod and seed traits; followed by Jijel for 4 traits; while the top position for high mean values was occupied by 3 provenances (Annaba, Blida and Tlemcen) for 3 to 4 traits, Tipaza for seed width and seed yield and by Setif for pod width.

Comparatively to authors' findings, overall means registered for pod size proved either similar [3, 18] in the case of pod weight ; lower [8, 54,60,11, 45, 18] in the case of pod length or even higher [28, 23,19].

The population range for pod traits proved larger than those reported by one source [59] and overlapping with those mentioned by other sources [9, 7, 35, 46, 38, 29].

The overall mean registered on total seed weight per pod lies within the range reported for carob [19, 28, 11, 8]. The population range for this trait is larger than that found by Konaté *et al.* [35] and it overlaps with that registered by Haddarah *et al.* [29].

Seed dimensions (i.e. length, width and thickness) displayed overall means which are also lie within the range of values reported for carob [54, 28,23,19,11].

Indeed, the lowest means displayed by Relizane population for traits such as seed thickness, length, seed yield and mean seed weight lie within those reported in the Berkane ecoregion in Northern Morocco [59].

Comparatively to the authors findings [61, 46, 59], range per population for these traits proved either lower or similar. Mean seed weight proved slightly lower than other Authors' findings [3, 64, 18, 8]. The population range for this trait overlaps with that given by other authors [7, 61, 59, 45, 38, 61] reports that a seed weight of 0.20g is the minimum required for a cultivar to be considered of medium quality for industrial applications. In the present study only the Blida population reached such threshold with an average of 0.23g.

Overall, seed yield proved higher than that of European cultivars [3, 8] and lower than that of Moroccan samples [28, 19]. The population range proved comparable to that reported by Naghmouchi *et al.* [45] and overlaps with that reported by other authors [31, 61, 7, 10, 59, 38, 17]. At population level, Tipaza registered the highest seed yield followed by Blida and Tlemcen which contained respectively 50% and 70% of individuals with seed yield >20%. Such individuals may be promising as a potential source of raw material.

Regarding correlations between traits, contrary to pod thickness and seed width, pod weight proved to be the most correlated trait to both other pod traits and seed ones. Correlations between pod weight and other pod and seed traits are concordant with those mentioned by Bostan & Kaşko Arici [11]. Those between pod length and other pod traits are concordant with [59].

The high positive correlation between pod weight and pulp weight ( $r = 0.98$ ) indicates that the heavier the pods the higher may be their pulp content. Conversely, pod weight was negatively correlated to seed yield in agreement with [4, 7, 45] but the strength of such relationship is higher according to Naghmouchi *et al.* [45].

Correlations between the total number of seeds per pod and pod size traits are weak. This trend is concordant with Carlson [13] who observed no apparent relationship between the number of kernels per pod and the size of pod.

The examination of a possible concordance between qualitative and quantitative traits at tree and provenance level did not show any particular trends. For example, pod color, an easily measurable trait, did not show a particular concordance with seed yield. That is, similar ranges of seed yield were observed among trees which produced either 100% of clear; reddish or blackish brown pods. On the other hand, only in a few cases were concordances between qualitative attributes of pods and seeds signaled. The geographic range explored in this study, corresponds to the northern fringe of carob in North Africa. Moroccan carob has been studied both in the same fringe [35, 59] and more Southward in the high Atlas regions [59]. Some Tunisian sampling sites [18,45] extend more Southward than Tlemcen which represents the southernmost sampled site in our study but not the southernmost one in Algeria. Indeed, carob populations are also found more southerward in sites such as El-Bayadh, though in marginal situations, probably due to their degradation [40].

Despite the large geographic area presently explored, from East to West, results indicated a pattern of variation not clearly related to bioclimate, elevation or distance from the sea coast. Relizane (an inland population located at an elevation of 155 m within a mild semi arid bioclimate) segregated from the other populations by the lowest means (for 9 quantitative traits) followed by Jijel for 4 traits (a coastal population of eastern Algeria, located at an elevation of 81 m and evolving under a mild humid bioclimate) and then by Tipaza for 2 traits (pod length and pod weight). On the other hand, Blida (a north-central provenance located at an elevation of 187 m in a warm subhumid bioclimate) shared high mean values of seed length, pod weight and pod thickness with Annaba (a coastal population of eastern Algeria located at 740 m and evolving under a mild humid bioclimate). Blida also shared high mean values of seed thickness; mean seed weight and total seed weight with Tlemcen (a Western population located at 757 m and evolving under a mild semi-arid bioclimate). The two most distant populations, i.e. Annaba and Tlemcen, shared high means of pod length. The two coastal provenances of eastern Algeria (Jijel and Annaba) were ranked each with a provenance from either North central or North-western Algeria.

The coastal provenances (Annaba, Jijel and Tipaza) and the inland ones (Tlemcen, Relizane and Setif) showed a segregation pattern that did not totally match their distance from the sea coast.

The absence of concordance between ecological conditions (bioclimate, elevation and distance from the sea coast) at the site of origin and the variation pattern of carob pod and seed morphology is in discordance with the general trend, under natural conditions, where there is a close relationship between the morphological and the physiological traits of plants and of habitats in which the traits have evolved and are expressed [51]. The observed trend is also in discordance with authors who carried out similar studies on carob. El Ferchichi *et al.* [18] and Naghmouchi *et al.* [45] suggested edapho-climatic factors as a source of variation observed among Tunisian populations. Environmental factors have also been suggested as a possible source of carob pod and seed traits variation among Moroccan populations by Gharnit *et al.* [28] and Sidina *et al.* [59] who found highest pod traits among Northern ecoregions of Morocco comparatively to southern ones. Similarly, Haddarah *et al.* [29] observed a latitudinal gradient among Lebanese varieties of carob for pod and seed traits with seed mass in the field positively correlated with latitude and longitude.

The present study of carob populations is based on fruits and seeds which are components of plant sexual reproduction and traits such as seed number per fruit and seed weight may be subjected to plant adjustment [48, 58] as may also be adjusted other reproductive parameters such as the number of fruits per plant as a consequence of predation [5] and resource limitation [58]. Fruit production may also fluctuate from year to year as a result of alternation, a phenomenon largely acknowledged in perennial plants [33, 34]. Such alternation may result in fluctuation of reproductive parameters such as the number of cones per tree and of seeds per cone [36] on Atlas cedar and seed weight on *Nothofagus nervos* [41] and carob [13, 61, 32]. Therefore, it may be interesting to test the stability of the variation pattern presently observed.

On the other hand, in the perspective of identifying the best genotypes for breeding programs and/or accession collection, additional descriptors should be examined such as regular bearing [13,61, 32]; gender and harvest period or fruit ripening [13,61], pedicel length as a criterion of pod abscission [61]; trunk cross section and canopy volume [61], fruit sweetness, flowering and fruiting phenology and precocity [37].

The study showed consistent variation among wild carob populations for pod and seed morphology even though such variation did not seem to be geographically structured. The analyzed traits may be considered under an agronomic and an industrial perspective (seed yield and pulp weight) and/or an ecological one (seed size and number are components of plant sexual reproduction that may have implication on its regeneration potential). Such descriptors, together with additional ones, will contribute to the characterization of carob genetic resources and guide the choice of populations for *in situ* conservation or as a source of material for restoration; breeding programs and germplasm collections.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are thankful to the forest conservation staff (Annaba, Relizane and Tipaza) and the National Park staff (Tlemcen, Blida and Jijel) for their crucial help during field sampling. We would like to thank also H. BAAZIZ for his help as guide in Setif site.

## REFERENCES

- [1]. **Aafi A. (1996)**. Note technique sur le caroubier (*Ceratonia siliqua* L.). Centre National de la Recherche Forestière, Rabat. Maroc.
- [2]. **Ait Chitt A., Belmir H., Lazrak A. (2007)**. Production des plants sélectionnés et greffés du caroubier. Transfert de technologie en Agriculture. Bulletin mensuel d'information et de liaison du PNTTA MAPM/DERD 153, 1-4.
- [3]. **Albanell E., Caja G., Plaixats J. (1991)**. Characteristics of Spanish carob pods and nutritive value of carob kibbles. In : Tisserand J.-L. (Ed.), Alibés X. (Ed.). Fourrages et sousproduits méditerranéens. Zaragoza : CIHEAM. p. 135-136 (Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens; n°16).

- [4]. **Albanell E., Caja G., Plaixats J. (1996)**. Characterization of carob fruits (*Ceratonia siliqua* L.), cultivated in Spain for agroindustrial use. International Tree Crops Journal 9: 1- 9.
- [5]. **Anto M., Jothish P. S., Angala M., Anilkumar C. (2018)**. Fruit predation and adaptive strategies of *Garcinia imberti*, an endangered species of southern Western Ghats. CURRENT SCIENCE, 115:12- 25.
- [6]. **Arocas A., Sanz T., Fizman S. M., (2009)**. Improving effect of xanthan and locust bean gums on the freeze-thaw stability of white sauces made with different native starches. *Food Hydrocolloids*, 23: 2478-2484.
- [7]. **Barracosa P., Osório J., Cravador A. (2007)**. Evaluation of fruit and seed diversity and characterization of carob (*Ceratonia siliqua* L.) cultivars in Algarve region. Scientia Horticulturae. 114: 250-257.
- [8]. **Barracosa P., Lima M.B., Cravador A. (2008)**. Analysis of genetic diversity in Portuguese *Ceratonia siliqua* L. cultivars using RAPD and AFLP markers. Scientia Hort. 118:189-199.
- [9]. **Battle I., Tous J., (1997)**. Carob tree *Ceratonia siliqua* L., Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 17, Gatersleben: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Rome: International Plant Genetic Resources Institute. 92 pages.
- [10]. **Biner B., Gubbuk H., Karhan M., Akus M., Pekmezei M. (2007)**. «Sugar profiles of the pods of cultivated and wild types of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.) in Turkey». Food chemistry 100: pp. 1453-1455.
- [11]. **Bostan S. Z., Kaşko Arici Y. (2015)**. Evaluation of some Carob (*Ceratonia siliqua* L.) Genotypes in Silifke (Mersin, Turkey) province by Cluster Analysis. Fruit Science, 2(1): 35- 41.
- [12]. **Bozzano M., Jalonon R., Thomas E., Boshier D., Gallo L., Cavers S., Bordács S., Smith P., Loo J. (2014)**. Genetic considerations in ecosystem restoration using native tree species. State of the World's Forest Genetic Resources – Thematic Study. Rome, FAO and Bioversity International.
- [13]. **Carlson W.A. (1986)**. The carob: Evaluation of trees, pods and kernels. The international Tree Crops Journal. 3:281-290.
- [14]. **Cavallaro V., Barbera A.C., Maucieri C., Gimma G., Scalisi C., Patanè C. (2016)**. Evaluation of variability to drought and saline stress through the germination of different ecotypes of carob (*Ceratonia siliqua* L.) using a hydrotimic model. Ecological Engineering. 95: 557-566.

- [15]. **Correia P.J., Gama F., Pestana M., Martins-Loução M.A. (2010).** Tolerance of young (*Ceratonia siliqua* L.) carob rootstock to NaCl. *Agricultural Water Management*, 97: 910- 916.
- [16]. **Dakia P. A., Blecker C., Robert C., Wathelet B., Paquot M (2008).** Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pre-treatment. *Food Hydrocolloids*, 22(5), 807-818.
- [17]. **El Batal H., Hasib A., Ouatmane A., Boulli A., Dehbi F., Jaouad A. (2013).** Yield and composition of carob bean gum produced from different Moroccan populations of carob (*Ceratonia siliqua* L.). *J. Mater. Environ. Sci.* 4 (2): 309-314.
- [18]. **El Ferchichi Ouarda H., Naghmouchi S., Walker D.J., Correal E., Boussaïd M., Larbi Khouja M. (2008).** Variability in the pod and seed parameters and nuclear DNA content of Tunisian populations of *Ceratonia siliqua* L. *Agroforest Syst* 74(1): 73-81.
- [19]. **El Kahkahi R., Zouhair R., Ait Chitt M., Errakhi R. (2014).** Morocco carob(*Ceratonia siliqua* L.) populations: Morphological variability of pods and kernel. *Int. J. Pure App. Biosci.* 2 (4): 38-47.
- [20]. **El Kahkahi R., Mouhajir M., Bachir S., Lemrhari A., Zouhair R., Ait Chitt M., Errakhi R.(2015).** Morphological and Physiological Analysis of Salinity Stress Response of Carob (*Ceratonia siliqua* L.) in Morocco. *Science International* 3 (3): 73-81.
- [21]. **El-Refaey F.A. El-Dengawy., Ahmed A. Hussein., Saad A. Alamri.(2011).** Improving Growth and Salinity Tolerance of Carob Seedlings (*Ceratonia siliqua* L.) by *Azospirillum* Inoculation. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 11 (3): 371-384.
- [22]. **Eshghi S., Rostami A.A., Jamali B.(2018).** Carob tree: a suitable species for the future. *Acta Hort.* 1190. ISHS 2018
- [23]. **Fadel F., Tahrouch S., Elmadidi S., Benddou Q., Hatimi A. (2011).** Etude morphométrique et physicochimique comparative du caroubier forestier et celui d'une plantation privée. *Biomatec-Echo*.V4 n°7.pp.3-10. Maroc.
- [24]. **FAOSTAT.( 2013).** FAO Statistics Division.
- [25]. **Germeç M., Turhan İ., Karhan M., Demirci A. (2015).** Ethanol production via repeatedbatch fermentation from carob pod extract by using *Saccharomyces cerevisiae* in biofilm reactor. *FUEL*, vol.161, pp.304-311.
- [26]. **Germec M., Yatmaz E., Karahalil E., Turhan I., (2017).** Effect of different fermentation strategies on beta-mannanase production in fed-batch bioreactor system. *Biotech*, (7), Article Number 77.
- [27]. **Gharnit N., El Mtili N., Ennabili A., Sayah F. (2006a).** Importance socio-économique du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) dans la Province de Chefchaouen (nord-ouest du Maroc). *J. Bot. Soc. Bot. France* 33: 43-48.
- [28]. **Gharnit N., El Mtili N., Ennabili A., Sayah F. (2006b).** Pomological characterization of carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) from the province of Chefchaouen (NW of Morocco). *Moroccan J. Biol.* 2-3: 1-11.
- [29]. **Haddarah A., Ismail A., Bassal A., Hamieh T., Ioannou I., Ghoul M. (2013).** Morphological and chemical variability of Lebanese carob varieties. *European Scientific Journal*, 9 (18): 353-369.
- [30]. **Harfouche A., Nedjahi A., Ellatifi M., Daly-Hassen H. (2005).** Les ressources génétiques forestières nord-africaines et leur conservation. *Biologie et écologie* , Rev. For. Fr. LVII - 1.
- [31]. **Haselberg C. (1988).** A contribution to the classification and characterization of female and male varieties of *Ceratonia siliqua* L. *Proceedings of the II International Carob Symposium*. Valencia, pp. 137-151.
- [32]. **Keles H., Bilir N. (2015).** Interaction of growth and reproduction characteristics in Carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) populations. *Agriculture & Forestry / Poljoprivreda i Sumarstvo.*, Vol. 61 Issue 4, p : 369-377.
- [33]. **Kelly D. (1994).** The evolutionary ecology of mast seeding. *Tree* vol.9 n°12: 665-670.
- [34]. **Kelly D., Sork V. L. (2002).** Mast Seeding in Perennial Plants: Why, How, Where? *Annual Review of Ecology and Systematics*. Vol. 33:427-447.
- [35]. **Konaté I., Filali-Maltouf A., Berraho B. (2007).** Diversity analysis of Moroccan carob(*Ceratonia siliqua* L.) accessions using phenotypic traits and markers. *Acta BotanicaMalacitana*, 32: 79- 90.
- [36]. **Krouchi F., Derridj A., Lefevre F. (2004).** Year and tree effect on reproductive organisation of *Cedrus atlantica* Manetti in a natural forest. *Forest ecology and management*, 197: 181-189.
- [37]. **Ladipo D. O., Fondoun J.M., Ganga N. (1996).** Domestication of the bush mango (*Irvingia* spp.): some exploitable intraspecific variations in west and central Africa. *In Proceedings of the international conference on domestication and commercialization of non timber forest products in agroforestry systems*, Nairobi, Kenya 19-23. Edited by R.R.B. Leakey, A.B. Temu, M. Melnyk and P. Vantomme, pp:193 - 204.

- [38]. La Malfa S., Avola C., Brugaletta M., La Rosa G., Muratore G. (2012). Morphological and technological characterization of different Carob cultivars in Sicily. Proc. XXVIIIth IHC – IS on the challenge for a sustainable production, protection and consumption of Mediterranean fruits and nuts. Eds. A.M. D’Onghia et al. Acta Hort. 940, ISHS, Italy.
- [39]. Lapie G., Maige A. (1916). Flore forestière de l’Algérie, éditeur: Librairie générale de l’Enseignement, ORLHAC. Paris. 357p.
- [40]. Mahdad M. Y., Guaour S.B. (2016). Le caroubier (*Ceratonia Siliqua* L.) dans le Nord-Ouest de l’Algérie, Situation et perspective d’amélioration. Éditions Universitaires européennes. 90 pages.
- [41]. Marchelli P., Gallo L.M. (1999). Annual and geographic variation in seed traits of Argentinean populations of southern beech *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. Forest Ecology and Management 121:239-250.
- [42]. Meziani S., Dave Oomah B., Zaidi F., Simon-Levert A., Bertrand C., Zaidi-Yahiaoui R. (2015). Antibacterial activity of carob (*Ceratonia siliqua* L.) extracts against phytopathogenic bacteria *Pectobacterium atrosepticum*. Microbial Pathogenesis 78: 95-102.
- [43]. Min B.R., Hart S.P. (2003). Tannins for suppression of intestinal parasites. *J. Anim. Sci.* 81: 102-109.
- [44]. Makris D.P., Kefalas P. (2004). Carob pods (*Ceratonia siliqua* L.) as a source of polyphenolic antioxidant. Food Technol. Biotechnol. 42: 105-108.
- [45]. Naghmouchi S., Khouja M.L., Romero A., Tous J., Boussaid M. (2009). Tunisian carob (*Ceratonia siliqua* L.) populations: Morphological variability of pods and kernel. *Scientia Horticulturae*, 121:125–130.
- [46]. Orwa C., Mutua A., Kindt R., Jamnadass R., Simons A. (2009). Agroforestry: une version de référence de l’arbre et guide de sélection 4.0. World Agroforestry Centre, Kenya. pp:1- 6.
- [47]. Padulosi S., Eyzaguirre P., Hodgkin T. (1999). Challenges and Strategies in Promoting Conservation and Use of Neglected and Underutilized Crop Species. Reprinted from: Perspectives on new crops and new uses. J. Janick (ed.), ASHS Press, Alexandria, VA.
- [48]. Parciak W. (2002). Environmental Variation in Seed Number, Size, and Dispersal of a Fleshy-Fruited Plant. *Ecology*. 83(3), 780-793
- [49]. Prajapati Vipul D., Jani Girish K., Moradiya Naresh G., Randeria Narayan P., Nagar Bhanu J. (2013). Locust bean gum: A versatile biopolymer. *Carbohydrate Polymers* 94:814–821.
- [50]. Quezel P., Santa S. (1962). Nouvelles flore de l’Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I. Paris : Centre National de la Recherche Scientifique. 1170p.
- [51]. Rao V.R., Hodking T. (2002). Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68: 1–19.
- [52]. Rejeb M.N. (1995). Le caroubier en Tunisie: Situations et perspectives d’amélioration. Dans: Quel avenir pour l’amélioration des plantes? Edit. AUPELFUREF. John Libbey Eurotext. Paris. pp: 79-85.
- [53]. Roseiro L. B., Duarte L.C., Oliveira D.L., Roque R.M., Bernardo-Gil G., Martins A.I., Sepúlveda C., Almeida J., Meireles M., Gírio F. M., Rauter A. P. (2013). Supercritical, ultrasound and conventional extracts from carob (*Ceratonia siliqua* L.) biomass: Effect on the phenolic profile and antiproliferative activity. *Industrial Crops and Products* 47:132–138.
- [54]. Russo G., Andrea L. (2002). Evaluation and preservation of genetic resources of Carob (*Ceratonia siliqua* L.) in Southern Italy for pharmaceutical use. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 9:4, 367-372.
- [55]. Rtibi K., Jabri M.A., Selmi S., Sebai H., Amri M., Marzouki L., El-Benna J. (2016). Preventive effect of carob (*Ceratonia siliqua* L.) in a dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in rat. *RSC Adv.*, 6, 19992-20000.
- [56]. Serairi-Beji R., Mekki-Zouiten L., Tekaya-Manoubi L., Loueslati M.H., Guemira F., Ben Mansour A. (2000). Can carob powder be used with oral rehydration solution for the treatment of acute diarrhea? *Med. Top.* 60: 125. *Med. Trop.* 60 (2): 125-8.
- [57]. Sandolo C., Coviello T., Matricardi P., Alhaique F. (2007). Characterization of polysaccharide hydrogels for modified drug delivery. *Eur. Biophys. J.* 36 (7): 693–700.
- [58]. Shi X., Wang J.-C., Zhang D. Y., Pan B. R. (2010). Pollen source and resource limitation to fruit production in the rare species *Eremosparton songoricum* (Fabaceae). *Nordic Journal of Botany*. 28(4):438 - 444.
- [59]. Sidina M.M., El Hansali M., Wahid N., Ouatmane A., Boulli A., Haddioui A. (2009). Fruit and seed diversity of domesticated carob (*Ceratonia siliqua* L.) in Morocco. *Scientia Horticulturae* 123:110-116.

- [60]. **Tetik N., Turhan I., Oziyci H.R., Gubbuk H., Karhan M., Ercişli S. (2011).** Physical and Chemical Characterization of *Ceratonia siliqua* L. germplasm in Turkey. *Scientia Horticulturae*, 129(4), 583-589.
- [61]. **Tous J., Romero A., Hermoso J. F., Ninot A., Plana J., Batlle I. (2009).** Agronomic and commercial performance of four Spanish Carob cultivars. *Hortecchnologie*. April–June, 19(2): 465-470.
- [62]. **Turhan I., Bialka L.K., Demirci A., Karhan M. (2010a).** Enhanced lactic acid production from carob extract by *Lactobacillus casei* using invertase pretreatment. *Food Biotechnology*. 24(4):364-374.
- [63]. **Turhan I., Bialka L.K., Demirci A., Karhan M. (2010b).** Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*. 101(14), 5290-5296.
- [64]. **Turnbull L.A., Luis Santamaria L., Martorell T., Rallo J., Hector A. (2006).** Seed size variability: from carob to carats. *Biol. Lett.* 2: 397–400.
- [65]. **Wenzl T. G., Schneider S., Scheele F., Silny J., Heimann G., Skopnik H. (2003).** Effects of thickened feeding on gastroesophageal reflux in infants: a placebo-controlled crossover study using intraluminal impedance. *Pediatrics*, 111: 355-359.
- [66]. **Yatmaz E., Karahalil E., Germeç M., Ilgin M., Turhan İ. (2016).** Controlling Filamentous Fungi Morphology with Microparticles to Enhanced  $\beta$ -mannanase Production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 39:1391–1399.
- [67]. **Yatmaz E., Turhan I., Karhan M. (2012).** Optimization of ethanol production from carob pod extract using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells in a stirred tank bioreactor. *Bioresource Technology*. 135:365-371.

## COMPARATIVE EFFECT OF TWO VARIETIES OF TOMATO (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.) TO SALINITY

ABBAD Mohamed<sup>1\*</sup>, SNOUSSI Sid Ahmed<sup>1</sup>, DJERDJOURI Amina<sup>2</sup> and GHANEM BOUGHANMI Néziha<sup>3</sup>

1. University of Blida1. Faculty of Nature and Life Sciences. Department of Biotechnology. Laboratory of Biotechnology and Plant Productions. 09000, Algeria.

2. Laboratory of Genetic Resources and Plant Biotechnology. Higher National School of Agronomy (ENSA), El Harrach, Algeria.

3. Department of Life Sciences. Faculty of Sciences of Bizerte. University of Carthage 7021 Zarzouna, Tunisia.

Reçu le 02/06/2019, Révisé le 28/09/2019, Accepté le 30/09/2019

### Abstract

**Description of the subject:** The majority of irrigation water in Algeria is of underground origin and laden with salt, whose harmful effects vary with the plant sensitivity and the nature of salt.

**Objective:** This work deals with the comparative study of two tomato genotypes sensitive, Marmande and Saint-Pierre, grown in aboveground and irrigated with water enriched in sodium salts in the form of NaCl or Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

**Methods:** The seed was sown in a hydroponic system during 110 days after sowing (DAS); the plants were treated with 30.45 meq.L<sup>-1</sup> sodium chloride or sodium sulfate. The plant's samples were collected from 20th, 65 and 110th DAS.

**Results:** Our results showed that the salt stress exert a depressive effect on growth more pronounced on the Marmande variety than the Saint-Pierre variety and that NaCl is more harmful than Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. However, an osmotic adjustment partially achieved by the accumulation of proline is recorded in the Marmande variety than Saint-Pierre in the presence of NaCl than Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

**Conclusion:** Based on the results obtained, it is assumed that cv. Saint-Pierre is more tolerant to salinity than the cv. Marmande due to a higher ability of maintaining the root function for the uptake and supply water to shoot under salt stress conditions.

**Keywords:** Tomato, Salinity, Marmande; Saint-Pierre; NaCl; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; proline.

## EFFET COMPARATIF DE DEUX VARIÉTÉS DE TOMATE (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.) À LA SALINITÉ

### Résumé

**Description du sujet :** La majorité des eaux d'irrigation en Algérie sont d'origine souterraine et chargée en sel, dont les effets néfastes sur les cultures variant avec la sensibilité de la plante et la nature de sel.

**Objectifs :** Nouvelle idée, nouvelle connaissance, nouvelle méthode, nouvelle approche, rapporter un fait nouveau, non encore publié, ou apporter un nouvel éclairage, peut-être une question.

**Méthodes :** Ce travail à porte sur l'étude comparative de deux variétés de tomate (Marmande et Saint-Pierre) cultivées en système hydroponique en condition semi contrôlées irriguées avec une eau chargée en sodium apporté sous forme de NaCl ou de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> avec le même nombre d'équivalent gramme par litre (30,65meq/L) durant 20, 65 et 110 jours.

**Résultats :** Nos résultats ont montré que les deux sels exercent un effet dépressif sur la croissance plus marqué sur la variété Marmande que la variété Saint-Pierre et que NaCl est plus nocif que Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Toutefois, un ajustement osmotique partiellement réalisé par l'accumulation de la proline est enregistré chez la variété Marmande que Saint-Pierre en présence de NaCl que de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

**Conclusion :** Sur la base des résultats obtenus, on suppose que cv. Saint-Pierre est plus tolérant à la salinité que le cv. Marmande en raison de sa plus grande capacité à maintenir la fonction racinaire absorbée et à fournir de l'eau pour tirer en conditions de stress salin.

**Mots clés :** Tomate, salinité, Marmande ; Saint-Pierre ; NaCl ; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ; proline.

\* Auteur correspondant: ABBAD Mohamed, E-mail: abbadmohammedd@gmail.com

## INTRODUCTION

According to the [1], approximately 800 million ha of land and 32 million ha of agricultural land are affected by salinity. 45 million ha (20%) of irrigated land is affected by this phenomena [2]. These areas are characterized by a marked decrease in rainfall, strong evaporation of water from the soil, and an increase in the extension of agricultural and pastoral activities with salinized water irrigation [3].

Plants are exposed to changes in their morphological and physiological behavior in the presence of salinity [4]; [5] and [6].

Therefore, a better understanding of the structural variations, ion distribution in crop plants induced by salinity should facilitate the identification of saline tolerance mechanisms [7]. The ability of plant cells to realize an osmotic adjustment and to accumulate through of the compatible solutes is the main factor of salt tolerance mechanisms. The accumulation of key osmolytes such as proline can provide a marker of the degree of tolerance to stress induced by osmoregulation. It is one of the major non-enzymatic antioxidants that plants need to counteract the inhibitory effects of salt stress [8].

Now it is well known that stress causes a number of effects on plants such as ion toxicity, hormonal imbalance [9 and 10]. This reaction results in metabolic, physiological and morphological changes [11]. One of the main physiological characters of environmental stress tolerance is osmotic adjustment, which plays a key role in resistance or tolerance of the plant to stress. This is achieved through an accumulation of osmoregulatory compounds leading to a reduction of the osmotic potential thus allowing the maintenance of the turgor potential [12].

One of the strategies for adaptation to salinity is to synthesize osmoprotective agents, mainly amino compounds and sugars, and to accumulate them in the cytoplasm and organelles [13]. The accumulation of these organic compounds has been demonstrated in several plant species subjected to salt stress.

Tomato (*Solanum Lycopersicum* L.) is one of the most important crops in terms of human consumption. It is cultivated in many regions and in different climates, including arid and semi-arid. Over the last decade, its production has grown to reach almost 160 million tons' fresh fruit in the world [14].

It is consumed as fresh or processed fruit due to its excellent nutritional properties. In addition, it is a rich source of vitamins, carbohydrates, proteins, mineral nutrients and other several important chemicals: carotenoids (lycopene, b-carotene, and lutein), tocopherols, and polyphenols [15]. Tomato is considered an ideal fruit model system because it can be easily grown under different conditions; it has a short lifecycle, and simple genetics due to the relatively small genome [16].

Furthermore, knowledge in tomato biology can be easily transferred to other economically important *Solanaceae* species [17]. Despite the economic relevance of this crop, the mechanisms underlying its response to abiotic stresses are not yet fully clarified and few information is currently available on the key role of stress-responsive genes [18 and 19]. Since salinity is a global scientific problem which affects crop productivity including vegetables. It is frequently answered in nature and it is one of the most negative environmental constraints for plants and tomato in particular [20 and 21].

The present study, conducted under semi-controlled conditions, aimed to examine the salinity tolerance by two saline solutions containing (NaCl and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) in two tomato varieties most cultivated in Algeria (Marmande and Saint-Pierre). This effect is evaluated in terms of plant growth (plant height and dry matter production). Also to examine the physiological implications for photosynthetic activity and osmotic adjustment (expressed by chlorophyll and proline leaf content respectively). This experiment was designed to test the impact of sodium supplied as NaCl or Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 20, 65 and 110 days.

## MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Plant material and growth conditions

The present experiment was conducted during winter to spring 2011-2012 in the greenhouse "semi-controlled conditions". Two tomato genotypes sensitive, Marmande and Saint-Pierre, were selected for this study. Seeds were surface-sterilized for 20 min in 20 % (v/v) sodium hypochlorite, rinsed and soaked in distilled water. This procedure is required to eliminate saponin from seeds and to avoid contamination by microorganisms during the germination process. The entire sterilization procedure, including soaking, took 1h and did not affect the germination process [22].



After that, seeds were placed on filter paper in round Petri dishes of 10cm diameter then they have been kept in the growth chamber at a temperature of 25°C in the dark with a relative humidity of 70%. Seeds were considered germinated when the radicle had extended at least 2 mm. After 10 days, the seedlings were transferred to plastic pots (23 cm diameter × 22 cm height) onto a semi-closed hydroponic device with river gravel substrate (3 mm diameter). The seedlings were irrigated every morning with a full nutrient solution during the period of first 15 days (pH 5,6; EC 2.11 mS cm<sup>-1</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 10,20 meq/L; S<sub>0</sub><sub>4</sub><sup>-2</sup> 1,50 meq/L; PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 3,30 meq/L; Cl<sup>-</sup> 0.60 meq/L; Na<sup>+</sup> 1,30 meq/L; K<sup>+</sup> 4.25 meq/L; Ca<sup>+2</sup> 5.10 meq/L; Mg<sup>+2</sup> 1.80 meq/L; NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 1,80 meq/L) [23].

**2.2. Salt stress**

In this experiment, the irrigation solutions provided during the cultivation cycle were prepared by adding to the water the sodium supplied as NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> with the same number of gram equivalent per liter as it is found in the underground water of Gassi Touil (Na<sup>+</sup> concentration is 30,45meq/L), and a standard nutrient solution used as a control (Table 1). These treatments were applied in three times according to the duration of stress: (1) short-term (20 days); (2) Medium term (65 days); (3) Long-term (110 days).

Table 1: The composition of water from the Gassi Touil source and various saline solutions tested (expressed in meq. L<sup>-1</sup>).

	pH	EC	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	Cl <sup>-</sup>	S <sub>0</sub> <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	Na <sup>+</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>	K <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
Water from the source	7,80	2.94	0.35	0.00	16.75	29.95	30.45	5.10	7.25	4.25	0.00
Tap water + Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,67	2,13	10,20	3,30	0,60	30,65	30,45	5,10	1,80	4,25	1,80
Tap water + NaCl	5,79	2.43	10,20	3,30	29,75	1,50	30,45	5,10	1,80	4,25	1,80

**2.3. Dry matter determinations**

A dry matter (DM) determination for plant growth is according to [24]. Three independent dry matter measurements analysis was performed on twinned leaves and stems. In addition to fresh weight (FW), dry weight (DW) was determined after desiccation at 105 °C for 48 h. Dry matter content (%) was estimated using the equation: DM % = [(FW - DW) / DW] \* 100

**2.4. Determination of physiological parameters**

**Estimation of Chlorophyll content**

To study the Chlorophyll (Chl) contents in control and stress conditions. Pigment content was determined using the method of [25] in [26]. 0.1 g leaf tissue was put it in 10 ml of 95% acetone at 4°C in darkness for 48 h. The absorption was measured at 470, 645 and 663 nm using a UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu UV-1700, Kyoto, Japan). Chlorophyll a (Chl a), chlorophyll b (Chl b) contents per unit area (mg/ml) were calculated by the formula [26].

Chl a = (9.78 × A663 – 0.99 × A645), Chl b = (21.42 × A645 – 4.65 × A663) respectively.

**Estimation of proline content**

The proline was extracted and assayed according to methods described by [27], simplified and developed by [28] and modified by [29]. It was determined at the level of the root part and the aerial part (median leaf + stem). The principle is the quantification of the proline-ninhydrin reaction by spectrophotometric measurement at a wavelength of 528 nm. The proline couples with the ninhydrin forming a colored complex. The determination of the content of the proline is carried out according to the formula Proline (µg/g MF) = DO<sub>528</sub> × 0.62 [29].

**2.5. Experimental design and statistical analysis**

The experiment was both set up as a completely randomized design with three replicates of each treatment. Data were subjected to One-Way ANOVA tests for each parameter at P < 0.05 using XLSTAT 2017, 4.467 software.

## RESULTS

### 1.1. Effect of NaCl and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on growth

#### 1.1.1. Effect on growth in length

Plant height in the control treatments did not differ from the two varieties. They showed a significant increase as a function of time (20, 65 and 110 days), with a slight decrease which was revealed for the Saint-Pierre variety after 110 days of culture (4.92 % of control at 65 days) (Fig.1). Whereas Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> treatments decreased plant height relative to controls at 20 days of treatment, and the decrease was greater for cv. Marmande than for cv. Saint-Pierre (28.79 % and 15.29 % respectively of control).

After 65 days, plant height in the Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> treatment was higher in Marmande (13.81 % of control) than Saint-Pierre that presents a decreased plant height (2.39% of control). Conversely, plant height in NaCl treatment was decreased for Marmande variety (6.25 % of control) but she was increased in presence of Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> treatments from the Saint-Pierre (3.09 % of control). After 110 days, plant height in the NaCl treatment was increased in Saint-Pierre variety (3.09 % of control). On the other hand, this treatment was decreased the plant height of Marmande variety (14.77 % of control).

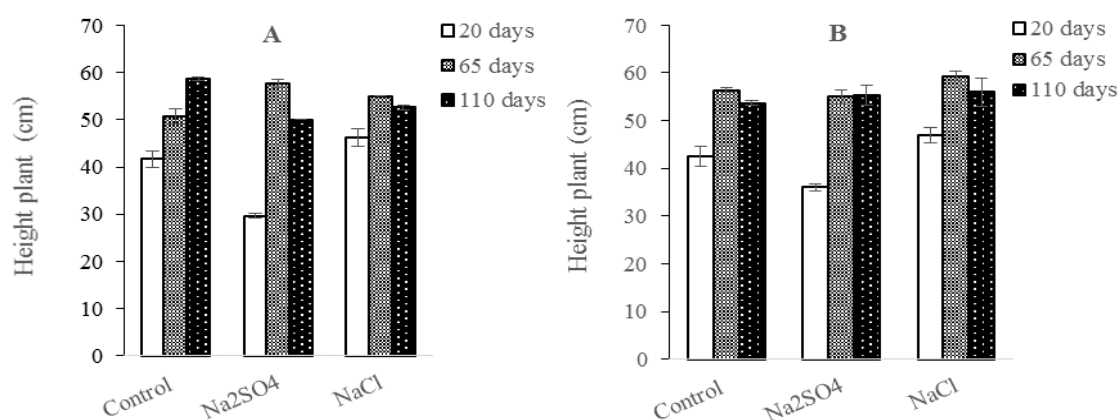


Figure 1. Plant height (cm) of the tow tomato cultivars [Marmande (A) and Saint-Pierre (B)] under 20, 65 and 110 irrigation's days of control, NaCl and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> with Na<sup>+</sup> concentration is 30.45 meq/L). The data represent mean values ± SD (n = 3).

#### 1.1.2. Effect on plant dry matter

Salinity can severely affect the dry matter content of different vegetative parts of the plant. The tomato cultivars' response to salinity has been quite diversified. It was found that the exposure time to salts affects the plant dry matter. Thus, a longer exposure to the salt content leads to solutes accumulation in the leaves stems and consequently increases the dry matter in the aerial tissues (Fig. 2). The dry matter according to the irrigation with the Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution of the two varieties of tomato was significantly decreased during 20 and 65 days. Nonetheless, at day 20 the decreased was more severely for the cv. Marmande than the cv. Saint-Pierre (61.62 % and 29.59 %) respectively of control.

Thus, a longer exposure to the salt content (110 days) leads to solutes accumulation in the leaves and consequently increases the dry matter in the tissues. In the Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> treatment, the dry matter accumulated in the aerial tissues was increased in cv. Marmande (1.95% of control) and decreased in cv. Saint-Pierre (12.24% of control) respectively. It is to highlight that the irrigation with saline water containing NaCl induced a decrease of the dry matter, especially in the cv. Marmande during a long exposure (10.75% of control). On the other hand, this reduction is lower in cv. Saint-Pierre (1.14%).

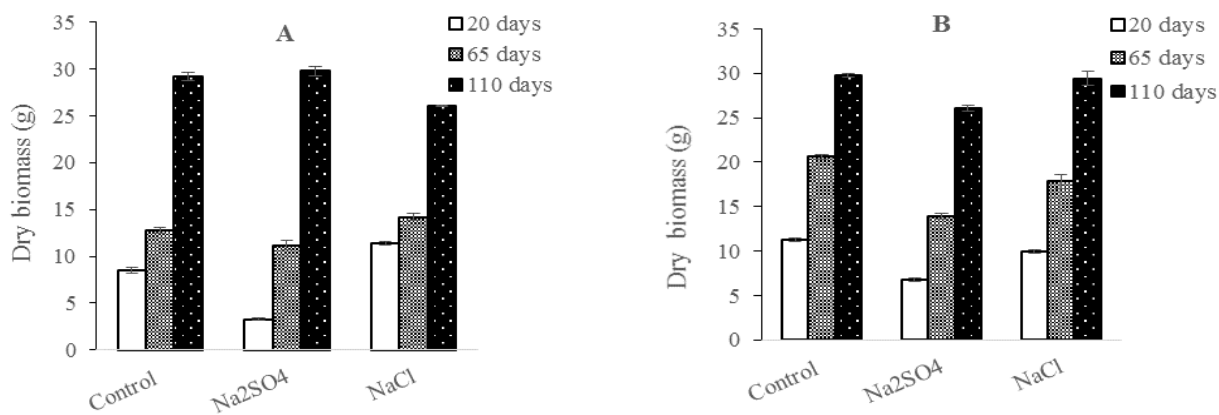


Figure 2. Dry matter of the aerial part (g) of the tow tomato cultivars [Marmande (A) and Saint-Pierre (B)] under 20, 65 and 110 irrigation's days of control, NaCl and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> with Na<sup>+</sup> concentration is 30.45 meq/L). The data represent mean values ± SD (n = 3).

**1.1.3. Effect on the chlorophyll content**

Levels of pigments in control and salt-treated plants are illustrated by the histogram in Fig. 3.4. In the control plants, Chlorophyll (a) concentrations were presented a significant decrease between days 20 and 110 (68.18 and 77.54%) respectively. Conversely, chlorophyll (b) concentrations accumulated were (11.66 and 19.75%) for cv. Marmande and cv. Saint-Pierre respectively. However, both pigments (chlorophyll a and b) showed a significant decrease in Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-treated plants at days 110

(63.84 and 30.78 %), (64.70 and 21%) for the cv. Marmande and cv. Saint-Pierre respectively. The levels of pigments according to the irrigation with the NaCl solution of the two varieties of tomato was significantly decreased at day 110. Nonetheless, this decreased were more severely for the chlorophyll (a) (72.60 and 64.17%) that chlorophyll (b) (12.89 and 26.24%) respectively for the cv. Marmande and Saint-Pierre.

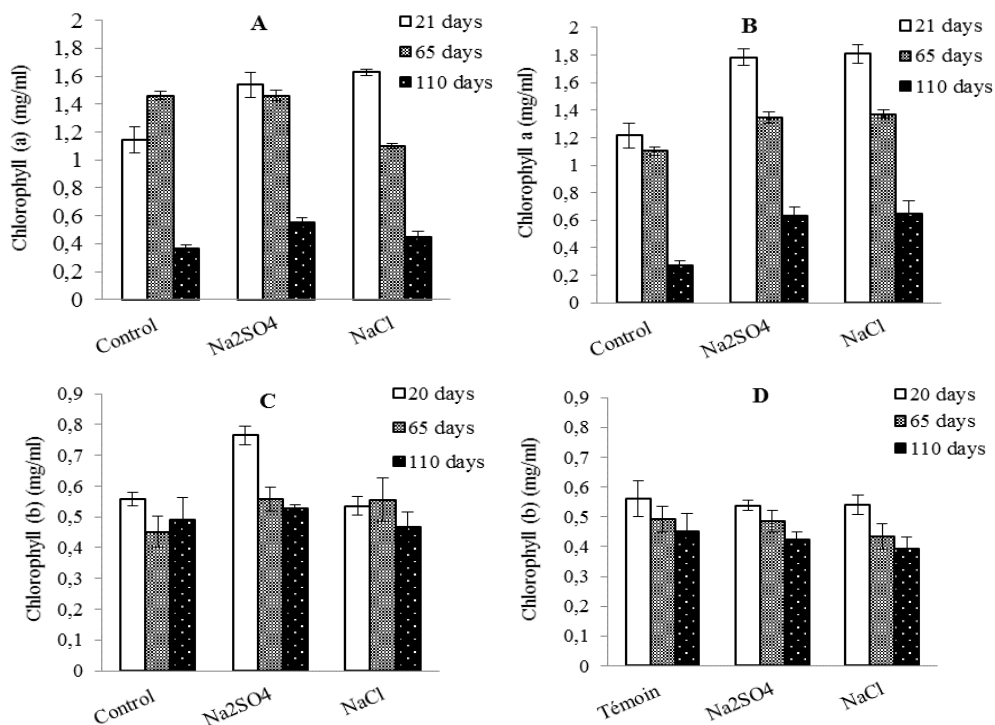


Figure 3. Leaf chlorophyll (a and b) content (mg/ml) of the tow tomato cultivars [Marmande (A and C) and Saint-Pierre (B and D) respectively] under 20, 65 and 110 irrigation's days of control, NaCl and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> with Na<sup>+</sup> concentration is 30.45 meq/L). The data represent mean values ± SD (n=3).

**1.2. Effect on water status**

**1.2.1. Effects of NaCl and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on proline content**

The Proline content in *S. Lycopersicum* was estimated in the root and in the aerial part. The data are shown in Fig. 4 and 5. In control conditions, the proline concentration is very lower in the root (0.006 and 0.010 µg/g FM) and in the aerial part (0.019 and 0.036 µg/g FM) for cv. Marmande and cv. Saint-Pierre respectively. As compared to the control, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> treatment increase proline root contents by 200 and 250% for the cv. Marmande and by 10 and 240% for the cv.

Saint-Pierre at day 20 and 65 respectively of control. NaCl treatment increases this content more rapidly. Effect of NaCl stress showed a similar pattern on proline contents in root when the plants were received the Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> but it was higher (1150 and 360% of control at day 20 of stress for the Marmande and Saint-Pierre respectively). Moreover, proline contents were found to be greater than that of control even in the aerial part under NaCl treatment. It was more increased for the cv. Marmande (226.31 and 152.63%) that in the cv. Saint-Pierre (44.44 and 216.66%) at 20 and 110 days respectively.

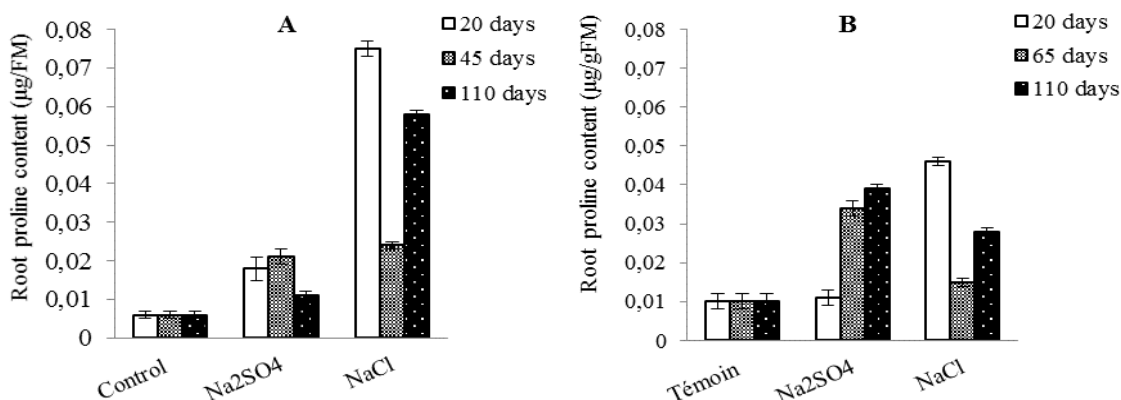


Figure 4. Root proline content (µg/g MF) of the tow tomato cultivars [Marmande (A) and Saint-Pierre (B)] under 20, 65 and 110 irrigation's days of control, NaCl and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> with Na<sup>+</sup> concentration is 30,45 meq/L). The data represent mean values ± SD (n = 3).

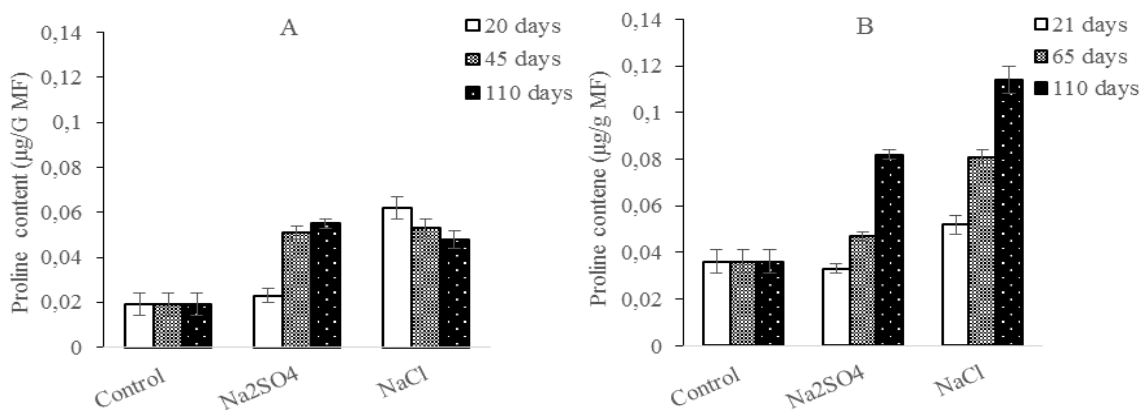


Figure 5. Proline content in the aerial part (µg/g MF) of the tow tomato cultivars [Marmande (A) and Saint-Pierre (B)] under 20, 65 and 110 irrigation's days of control, NaCl and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> with Na<sup>+</sup> concentration is 30,45 meq/L). The data represent mean values ± SD (n = 3).

## DISCUSSION

Salt stress had a negative influence on most of the parameters studied of *S. Lycopersicum* as has also been demonstrated in other studies [30], [31] and [32]. Our study suggests that this may be due to both osmotic and ion specific effects. According to [33] plants display a two-phase growth response to salinity. The first phase appears quickly and is due to osmotic stress caused by salt outside the plants.

The second phase takes the time to develop, and results from the toxic effect of salt inside the plant, as the ability of the cells to compartmentalize salt in the vacuole is exceeded. The present study indicates that *S. Lycopersicum* had entered the second growth response phase, as  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  inhibited growth relatively more than NaCl. The ion specific effect was only evident in the two highest salinity treatments, supporting the assumption that the greater growth reduction caused by  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  than NaCl was due to an inability of leaves to prevent salt from reaching toxic levels.

This translates into significant reductions in growth parameters such as plant height and dry matter and indicated that the cv. Marmande is more sensitive than the cv. St. Pierre toxic within the 110 days of treatment used here. These growth data were consistent with those reported in previous work [34]; inhibition of plant growth is one of the most sensitive parameters indicating that increased EC affecting the hydric potential in soil and plant. Moreover, the salt tolerance in plants is also related to their aptitude to maintain their chlorophyll level [35].

The chlorophyll response to salinity seems to depend on stress severity. Low salinities generally lead to an increase in chlorophyll levels whereas severe salinities often cause reduction [36]. In the present experiment, the cv. Saint-Pierre showed a good ability to tolerate elevated  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  concentrations that the cv. Marmande, while NaCl stress significantly reduced chlorophyll concentration. Under NaCl stress, decreases in photosynthetic pigments are related with high pH that increases the activity of Chl-degrading enzyme: chlorophyllases [37]. Other possibility for reduction in pigments may a reduction in biosynthesis of d-aminolevulinic acid (a precursor of chlorophyll) [38].

As regards the accumulation of proline in salt stress, the present study also showed that exposure of cv. Marmande to sodium stress

increased proline content of root and in the aerial part. Proline provides tolerance against different abiotic stresses including NaCl stress by increasing endogenous level. It plays significant role in osmotic adjustment under salinity stress [40]; [41]; [42] and [39]. Such solutes at high concentrations are involved in maintaining turgor pressure and high concentrations of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  in the vacuole. Besides acting as an osmolytes, Proline is known to contribute in stabilizing sub-cellular structures (membranes and proteins).

## CONCLUSION

This work shows that salt stress exerts a depressive effect on both the morphological and physiological parameters studied in both of two tomato genotypes, Marmande and Saint-Pierre. However, the degree of affection depends on the duration, the type of salt tested and the variety studied.

Based on the results obtained, it is assumed that cv. Saint-Pierre is more tolerant to salinity than the cv. Marmande due to a higher ability of maintaining the root function for the uptake and supply water to shoot under salinity conditions. Thus, it can be retained that the measured physiological parameters are important indicators of the tolerance of this species to salinity. Further research is needed to explore the salt sensitivity of tomato to  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  and  $\text{SO}_4^{2-}$  separately and 'tissue tolerance' needs to be assessed across many genotypes prior to generalizations being made on salt tolerance mechanisms in tomato.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the laboratory of Biotechnology and plants production of the University of Blida1, Algeria (Project title: Eco physiology, the adaptation of plant material to the soil, N°: F00420140 500). We thank Professor Néziha Ghanem Boughanmi for helping in the writing of this paper in Bizerte's laboratory at the University of de Carthage. Tunisia and Djardjouri Amina from the Higher National School of Agronomy for helping with the statistical analysis and data collection. We also thank Professor Djazouli Zahr-Eddine for providing the extraction protocols used in this paper.

REFERENCES

- [1] **Food and Agricultural Organization.** Land and plant nutrition management service. 2009, [www.fao.org/wsfs/forum](http://www.fao.org/wsfs/forum) 2050
- [2] **Shelden M. C., Dias D. A., Jayasinghe N. S., Bacic A., and Roessner U.** Root spatial metabolite profiling of two genotypes of barley (*Hordeum vulgare* L.) reveals differences in response to short-term salt stress. *J. Exp. Bot.* 2016. 67, 3731–3745. Doi: 10.1093/jxb/erw059
- [3] **Munns R., Richard A.J., Lauchli A.** Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *J. Exp. Bot.* 2006. 57(5): 1025- 1043.
- [4] **Munns R., Tester M.** Mechanisms of salinity tolerance. *Ann Rev Plant Physiol.* 2008, 59:651-681
- [5] **Hussain S, Khaliq A, Matloob A, Wahid MA, Afzal I.** Germination and growth response of three wheat cultivars to NaCl salinity. *Soil Environ*, 2013. 32:36–43
- [6] **Mustafa Z, Pervez MA, Ayyub CM, Matloob A, Khaliq A, Hussain S, Nakaune M, Hanada A, Yin Y-G, Matsukura C, Yamaguchi S, Ezura H.** Molecular and physiological dissection of enhanced seed germination using short-term low-concentration salt seed priming in tomato. *Plant Physiol Biochem*, 2012. 52:28–37
- [7] **Roy S. J., Negrão, S., and Tester, M.** Salt resistant crop plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 26, 2014. 115–124. Doi: 10.1016/j.copbio.2013.12.004
- [8] **Farhangi-Abriiz S. and Torabian S.** Antioxidant enzyme and osmotic adjustment changes in bean seedlings as affected by biochar under salt stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 137, 2017. 64–70.
- [9] **ASHRAF M.,** Some important physical selection criteria for salt tolerance in plant *Flora*, 199 :361-376. 2004-
- [10] **Flowers T.J., Flowers S.A.,** Why does salinity pose such a difficult problem for plant breeders? *Agricultural Water Management*, Vol.78, No.1-2 :15-24. 2005-
- [11] **Garg AK., Kim JK., Owens TG., Ranwala AP., Choi YD., Kochian LV., Wu RJ.,** Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to Références bibliographiques 49 different abiotic stressent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 99 :15898–15903. 2002
- [12] **El Midaoui M., Benbella A., Aït Houssa M. Ibriz A., et Talouizte A.,** Contribution à l'étude de quelques mécanismes d'adaptation à la salinité chez le tournesol cultivé (*helianthus annuus* L.). *Revue HTE* N°136. P : 1. 2007.
- [13] **Belfakih M., Ibriz M., et Zouahri A.,** Effet de la salinité sur les paramètres morpho physiologiques de deux variétés de bananier (*Musa acuminata* L). *Journal of Applied Biosciences* 70 :5652-5662. P : 5643. 2013-
- [14] **Petit J.** Identification et validation fonctionnelle de gènes candidats contrôlant la composition de la cuticule chez le fruit de tomate. Thèse de doctorat, Université de Bordeaux I, France, 2013. 270p
- [15] **Singh M., Singh V.P., Prasad S.M.** Nitrogen modifies NaCl toxicity in eggplant seedlings: assessment of chlorophyll a fluorescence, antioxidative response and proline metabolism. *Biocatal. Agric. Biotechnol*, 2016. 7, 76e86.
- [16] **Bergougnoux V.** The history of tomato: from domestication to biopharming. *Biotechnol Adv*, 2014. 32:170–189
- [17] **Kimura S., Sinha N.** Tomato (*Solanum Lycopersicum*): a model fruit-bearing crop. *Cold Spring Harb Protoc*, 2008. Doi: 10.1101/pdb.emo105
- [18] **Gong P., Zhang J., Li H., Yang C., Zhang C., Zhang X., Khurram Z., Zhang Y., Wang T., Fei Z.** Transcriptional profiles of drought-responsive genes in modulating transcription signal transduction, and biochemical pathways in tomato. *J Exp Bot*, 2010. 61:3563–75.
- [19] **Campos JF., Cara B., Perez-Martin F., Pineda B., Egea I., Flores FB., Fernandez Garcia N., Capel J., Moreno V., Angosto T.** The tomato mutant *ars1* (altered response to salt stress 1) identifies an R1-type MYB transcription factor involved in stomatal closure under salt acclimation. *Plant Biotechnol J*, 2015. 14 :1345–56
- [20] **Zhang Y., Hu XH., Shi Y., Zou ZR., Yan F., Zhao YY.** Beneficial role of exogenous spermidine on nitrogen metabolism in tomato seedlings exposed to saline–alkaline stress. *J Am Soc Horticultural Sci.* 2013; 138(1):38–49.
- [21] **Hu L., Xiang L., Zhang L., Zhou X., Zou Z., Hu X.** The photo protective role of spermidine in tomato seedlings under salinity–alkalinity stress. *PLoS One*, 2014. 9(10): e110855
- [22] **Burrieza HP., Koyro A-W., Tosar LM., Kobayashi K., and Maldonado S.** High salinity induces dehydrin accumulation in *Chenopodium quinoa* Willd. cv. Hualhuas embryos. *Plant and Soil*, 2012. 354 : 69–79.
- [23] **Snoussi S.A.** Valorisation des eaux salines pour la nutrition des plantes cultivées. Thèse Doctorat, 2001. INA El-Harrach, Algérie. 182p
- [24] **Saadallah K., Drevon J.J., Abdelly C.** Nodulation et croissance nodulaire chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) sous contrainte saline. *Agronomie* 21, 2001. 627–634

- [25] **Shabala S.** Learning from halophytes: physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops. *Ann. Bot.* 112, 1209–1221, 2013. Doi: 10.1093/aob/mct205.
- [26] **Hassani A., Seddiki D., Kouadria M., Bouchenafa N., Negadi L.** Effet de la salinité sur le comportement physiologique et biochimique de l'Oléastre (Olivier spontané) et l'olivier cultivé (variété Sigoise). *Revue Ecologie-Environnement*, 2014. N 10.
- [27] **Troll W., and Lindesly J.** A photometric method for the determination of proline. *J. Biol. Chem.* 1955, 215:655-660
- [28] **Dreier W., & Göring M.,** Der Einfluss hoher Salzkonzentration auf verschiedene physiologische Parameters von Maiswurzeln. *Wiss. Z. Humboldt Univ. Berlin, Reihe/Math. Naturwiss.*, 1974. 23, 641-644.
- [29] **Monneveux P., and Nemmar M.** Contribution à l'étude de la résistance à la sécheresse chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) et chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.) : étude de l'accumulation de la proline au cours du cycle de développement. *Agronomie, EDP Sciences*, 1986, 6 (6), pp.583-590.
- [30] **Pagter M., Bragato C., Malagoli M., Brix H.** Osmotic and ionic effects of NaCl and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> salinity on *Phragmites australis*. *Aquatic Botany* 90, 2009. 43–51
- [31] **Moles T.M., Pompeiano A., Reyes T.H., Scartazza A., Guglielminetti L.** The efficient physiological strategy of a tomato landrace in response to short-term salinity stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 109, 2016. 262e272
- [32] **Annunziata MG., Ciarmiello LF., Woodrow P., Maximova E., Fuggi A., and Carillo P.** Durum wheat roots adapt to salinity remodeling the cellular content of nitrogen metabolites and sucrose. *Front. Plant Sci*, 2017. 7: 2035. doi: 10.3389/fpls.2016.02035
- [33] **Munns R.** Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist*, 2005. 167: 645–663
- [34] **Howladar SM.** A novel Moringaoleifera leaf extract can mitigate the stress effects of salinity and cadmium in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2014. 100: 69–75
- [35] **Redondo-Gomez S., Mateos-Naranjo E., Davy AJ., Fernández-Munoz F., Castellanos E.M., Luque T.** Growth and photosynthetic responses to salinity of the salt-marsh shrub *Atriplex portulacoides*. *Annals of Botany*, 2007. 100: 555–563.
- [36] **Wei Y., Xu X., Tao H., Wang P.** Growth performance and physiological response in the halophyte *Lycium barbarum* grown at saltaffected soil. *Annals of Applied Biology*, 2006. 149:263–269.
- [37] **Gong P., Zhang J., Li H., Yang C., Zhang C., Zhang X., Khurram Z., Zhang Y., Wang T., Fei Z.** Transcriptional profiles of drought-responsive genes in modulating transcription signal transduction, and biochemical pathways in tomato. *J Exp Bot*, 2013. 61:3563–75.
- [38] **Santos C.V.** Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. *Sci. Hortic*, 2004. 103, 93e99.
- [39] **Wang K., Liu Y., Dong K., Dong J., Kang J., Yang Q., Zhou H., Sun Y.** The effect of NaCl on proline metabolism in *Saussurea amara* seedlings. *Afr. J. Biotechnol*, 2011. 10, 2886e2893.
- [40] **Siddiqui M.H., Mohammad F., Masrooor M., Khan A., Al-Whaibi M.H.** Cumulative effect of nitrogen and sulphur on *Brassica juncea* L. genotypes under NaCl stress. *Protoplasma* 249, 2012. 139e153.
- [41] **Yang Y., Yang F., Li X., Shi R., Lu J.** Signal regulation of proline metabolism in callus of the halophyte *Nitraria tangutorum* Bobr. Grown under salinity stress. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2013. 112, 33e42.
- [42] **Singh M., Singh V.P., Prasad S-M.** Responses of photosynthesis, nitrogen and proline metabolism to salinity stress in *Solanum lycopersicum* under different levels of nitrogen supplementation. *Ranjan Plant Physiology and Biochemistry Laboratory, Department of Botany, University of Allahabad, Allahabad*, 2012. 211002, India

## RÉPONSES MORPHO-PHYSIOLOGIQUES DES PLANTULES DE *RETAMA RAETAM* À DES NIVEAUX DE SALINITÉ EXTRÊMES

MALLEM Hamida<sup>1\*</sup>, HOUYOU Zohra<sup>1</sup> et BENRIMA Atika<sup>2</sup>

1. Université Amar Telidji, Laghouat-département d'Agronomie –laboratoire de mécanique –équipe désertification et climat-Algérie
2. Université de Blida –Département de Biotechnologies – laboratoire de recherche en Biotechnologie des productions végétales

Reçu le 13/09/2019, Révisé le 19/12/2019, Accepté le 24/12/2019

### Résumé

**Description du sujet :** L'utilisation des plantes halophytes dans la restauration des sols salins dégradés et transférer leurs gènes vers des plantes sensibles, sont des solutions efficaces face à la salinité.

**Objectifs :** Nous avons visé par cette étude à rechercher le comportement halotolérant des plantules de *Retama raetam* dans un sol sableux.

**Méthodes :** L'expérience a été conduite sous serre, 120 graines de *Retama raetam* ont été semées dans des pots (11) remplis de sable. L'irrigation a été faite avec 6 niveaux de solutions de NaCl, à savoir : 1,4 g/l, 2 g/l, 4 g/l, 6 g/l, 8 g/l et 10 g/l. Après 90 jours de culture, nous avons mesuré des paramètres morphologiques et physiologiques.

**Résultats :** Les résultats ont démontré que les milieux de 8g/l et de 10 g/l de NaCl, n'ont pas été favorables pour la plante, ils ont été létaux. La teneur en proline la plus élevée a été constatée chez le milieu 6g/l. La teneur en proline et les sucres solubles ont été positivement corrélés avec la teneur en Na<sup>+</sup>. Les deux milieux 2g/l et 4 g/l ont présenté des rapports K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> plus élevés que le reste des milieux ainsi que la hauteur des plants, le nombre des feuilles, le K<sup>+</sup>, la chlorophylle totale et la teneur en matière sèche. Par ailleurs, le milieu à 1,4g/l n'a pas été adéquat pour les plants de *Retama raetam* malgré sa faible salinité.

**Conclusions :** *Retama raetam* n'est pas une vraie halophyte, elle pourrait être une halophyte facultative ou halophyte marginale à 6 g/l.

**Mots-clés :** *Retama raetam*, salinité, halophyte, NaCl, proline, sucres solubles

## MORPHOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL RESPONSES OF *Retama raetam* YOUNG PLANTS AT EXTREME SALINITY LEVELS

### Abstract

**Description of the subject:** Using halophyte plants in the restoration of degraded saline soils and transfer of their genes to sensitive plants are effective solutions in front of salinity.

**Objectives:** This study aimed to investigate the halotolerant performance of *Retama raetam* plants in sandy soil.

**Methods:** The experiment was conducted under glass, 120 *Retama raetam* seeds were sown in pots (11), filled with sand. Irrigation was carried out with 6 levels of NaCl solutions, namely: 1.4 g/l, 2 g/l, 4g/l, 6 g/l, 8 g/l and 10g/l. After 90 days of growing, we have measured morphological and physiological parameters.

**Results:** The results have shown that the 8 g/l and 10 g/l NaCl mediums have been unsuitable for this plant, they have also been lethal. The highest proline content was observed in the 6g/l medium. Proline content and soluble sugars have been positively correlated with Na<sup>+</sup> content. Both 2g/l and 4 g/l mediums have shown higher K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> ratios than the other mediums and also plant height, leaf-number, K<sup>+</sup>, total chlorophyll, and dry matter content. However, the medium at 1.4g/l has not been adequate for *Retama raetam* plants despite its low salinity.

**Conclusions:** *Retama raetam* is not a true halophyte, it may be an facultative halophyte or marginal halophyte at 6 g/l.

**Keywords:** *Retama raetam*, salinity, halophyte, NaCl, proline, soluble sugars

\* Auteur correspondant: MALLEM Hamida, Email :h.mallem@lagh-univ.dz



## INTRODUCTION

Dans le monde presque 800 millions d'hectares de terres sont affectés par le sel. La salinité s'étend sur plus de 6 % de la superficie totale de la planète [1], dont 3.8 % sont situés en Afrique [2 ; 1]. En Afrique, la salinisation touche 40 millions d'hectares de terres dont 15 millions sont directement liés aux facteurs anthropiques [3]. Afin de lutter contre les effets néfastes des sels sur les plantes, une approche dite biologique est adoptée, elle consiste à sélectionner des plantes et/ou les modifier génétiquement afin qu'elles puissent s'adapter aux conditions de ces zones [4].

Les halophytes sont définis comme des plantes capables d'accomplir leur cycle biologique en présence de 200 mM de NaCl [5 ; 6]. Leur capacité antioxydante supérieure à celle des glycophytes a été suggérée pour leur conférer une plus grande capacité à tolérer des conditions environnementales extrêmes dans les écosystèmes naturels [6]. En outre, il a été également démontré que la salinité peut accroître la tolérance à la sécheresse [7] et aux métaux lourds [8].

La compréhension plus approfondie et la reproduction des bases physiologiques et biochimiques de la résistance à la sécheresse et à la salinité peuvent servir de base pour la culture des plantes appropriées dans des régions menacées par la désertification et la rareté de l'eau, par le transfert des gènes des plantes halophytes-xérophytes au lieu de ceux des glycophytes vers des plantes cultivées afin d'améliorer leur résistance au sel. Les zones arides pourraient offrir dans ce cas des opportunités économiques et écologiques concrètes [9].

Le genre *Retama* appartient à la famille des Fabaceae. Il comprend trois espèces (*Retama monosperma*, *Retama raetam* et *Retama sphaerocarpa*) avec une large répartition dans la région de la Méditerranée orientale, en Afrique du Nord et aux îles de Canaries. *Retama raetam* (Forssk.)Webb & Berthel, localement appelé "Retem", est un arbuste désertique originaire de plusieurs pays d'Afrique du Nord (Algérie, Egypte, Libye, Maroc, Tunisie), d'Asie tempérée (Israël, Jordanie, Liban, Palestine et Syrie) et d'Europe du Sud-Est (Sicile en Italie) [10]. Se sont des arbustes de 3 à 4 m de haut, qui ont un rôle écologique important dans la formation d'îles de fertilité", où la croissance de nombreuses espèces annuelles et ligneuses est favorisée [11].

Grâce à leur capacité à fixer N<sub>2</sub> en association symbiotique avec les bactéries nodulatrices des légumineuses (LNB) [12] et à son système racinaire profond, fonctionnel à plus de 20 m de profondeur permettant l'accès aux nutriments profonds et aux ressources en eau [13], le genre *Retama* pourrait être utile comme outil de restauration, fournissant des plantations à long terme sans aide artificielle et permettant la succession primaire [14]. *Retama raetam* joue un rôle important dans la protection et la stabilisation des sols contre l'érosion éolienne ou hydrique et constitue une source alimentaire importante pour des espèces animales telles que les chameaux, les chèvres et les moutons [15]. De plus, cette espèce représente une source de combustible viable pour les humains [16], elle a aussi des vertus médicinales et industrielles potentielles puisque ses racines sont utilisées pour traiter la diarrhée, ses feuilles sont utilisées pour soulager les douleurs articulaires, le mal de dos et les troubles oculaires [17]. *Retama raetam* est une légumineuse du désert, à C<sub>3</sub>, toujours verte, commune aux écosystèmes arides du bassin méditerranéen. Elle utilise un certain nombre d'adaptations anatomiques et physiologiques qui lui permettent de s'acclimater et de grandir dans divers milieux arides [18]. *R. raetam* peut représenter un aliment de substitution au fourrage conventionnel et un fourrage de substitution prometteur dans l'écosystème méditerranéen [19].

Mechergui *et al.* [20], ont étudié le comportement des populations de *Retama raetam* sous stress hydrique et salin au stade de la germination, les résultats obtenus ont révélé que cette espèce peut résister à une salinité de 15 g/l de sel au stade germination. Par ailleurs il n'existe pas des études démontrant le seuil de tolérance de *R. raetam* à la salinité, ni au stade plantule, ni au stade adulte. L'objectif de notre étude est de contribuer à une meilleure connaissance du statut halotolérant des plants de *Retama raetam*, susceptibles d'être utilisés dans la valorisation des terres salées.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Récolte et semis des graines

Des graines de *R. raetam* ont été collectées dans la ville de Laghouat en Algérie durant le mois de juin 2016, ces graines ont été prétraitées à l'acide sulfurique pendant 6 heures et ont été mis pour germer à 25°C [21].

120 graines pré germées ont été semées dans 60 pots (11) en raison de 2 graines par pot. Le substrat utilisé a été composé de sable provenant de la même zone géographique. Les pots ont été placés dans la serre de l'Université de Laghouat sous des températures minimales et maximales moyennes de 20-25°C, une humidité relative de 40-60% et une lumière naturelle du jour. Avant le début de l'expérience de salinité, les pots ont été arrosés quotidiennement avec de l'eau distillée jusqu'à l'apparition des feuilles cotylédonaire et ce durant 20 jours.

## 2. Dispositif expérimental

Les 60 pots ont été soumis à six traitements sous différentes concentrations de NaCl : 24, 35, 70, 103, 137, 172 mM. 10 pots ont été conçus pour chaque traitement de salinité. Nous avons ajouté du NaCl à l'eau distillée pour obtenir les six solutions citées ci-dessus à savoir : 1,4, 2, 4, 6, 8 et 10 g de NaCl par litre, respectivement. Les jeunes plantes ont été arrosées régulièrement avec une dose de 25 ml de chaque solution par pot, deux fois par semaine.

## 3. Paramètres mesurés

Le suivi de l'expérience a duré 60 jours, après cette période, soit 90 jours après le semis, nous avons mesuré la hauteur (cm) des plants à l'aide d'un décimètre, et nous avons calculé le nombre de feuilles par plant, après nous avons détaché les plants des pots et nous avons effectué les analyses citées ci après.

### 3.1. Teneur en eau et en matière sèche

A l'aide d'une balance (avec une précision de 0,01 g), nous avons mesuré le poids frais de chaque plant, la partie aérienne séparée de la partie racinaire, ces deux parties ont été placées dans une étuve à 70°C et pesé après 48 heures, nous avons déterminé leur poids sec. La teneur en eau des plants de *R. raetam* a été déterminée par la méthode décrite par [22]: Teneur relative en eau (%):  $TRE (\%) = [(Poids\ frais - Poids\ sec) / Poids\ frais] \times 100$ , notant que le Taux de matière sèche a été ainsi déduit par cette formule :  $MS (\%) = 100 - TRE (\%)$

### 3.2. Teneur en Sucres solubles

Selon la méthode de Dubois *et al.* [23], 5 ml d'éthanol (80%) ont été ajoutés à 100 mg de feuilles fraîches de chaque plant et placés dans un bain-marie pendant 30 minutes à 70°C. A 1 ml de cette solution, on ajoute 1 ml de phénol (5%) et 5 ml d'acide sulfurique (96%).

Des mesures d'absorbance ont été effectuées à 640 nm.

### 3.3. Teneur en chlorophylle totale

Cinquante mg prélevés sur les tiers médians des plus jeunes feuilles, sont broyés dans de l'acétone à 80%, selon la méthode de Arnon [24] puis mesurée par spectrophotométrie à 645 et 663 nm. La teneur totale en chlorophylle a été déterminée selon l'équation :  $Chlorophylle\ totale\ (mg/g\ MF) = 20,2 \times DO\ (645\ nm) + 8,02 \times DO\ (663\ nm) V / M$ , où V désigne le volume de l'extrait total en litres et M la masse de la matière fraîche broyée en grammes.

### 3.4. Dosage de la proline

La méthode appliquée est celle de Bates *et al.* [25], qui est basé sur la réaction d'oxydation proline-ninhydrine. Pour extraire le soluté, 100 mg de matière fraîche (MF) dans 2 ml de méthanol (40%) ont été chauffés à 85°C dans un bain-marie pendant 1 h. Après refroidissement à 1 ml d'extrait, nous avons ajouté 1 ml d'acide acétique, 25 mg de ninhydrine, 1 ml de mélange (120 ml de H<sub>2</sub>O, 300 ml d'acide acétique, 80 ml d'acide orthophosphorique), puis réchauffer 30 minutes à 100°C. Après refroidissement, 5 ml de toluène ont été ajoutés à la solution et agités, la phase supérieure a été récupérée et 5 mg de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de sodium anhydre ont été ajoutés. La densité optique (OD) a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre (DO 528 nm).

### 3.5. Teneur en Sodium et en Potassium

Pour la détermination de la concentration en Na + et K +, 0,5 g de feuilles séchées de chaque plante ont été broyées et incinérées à 550 °C pendant 8 heures, suivies d'une digestion acide. Les concentrations d'ions Na et de K+ en pourcent de matière sèche ont été déterminées par spectromètre à flamme. Les racines des plantes n'ont pas été utilisées dans cette expérience en raison de la faible quantité recueillie.

## 4. Analyse statistiques des données

Les données enregistrées ont été traitées avec le test ANOVA à un seul facteur étudié, au seuil de 5%, le test Tukey a été réalisé pour déterminer les groupements statistiques. Nous avons testé la normalité le test non paramétrique de Shapiro-Wilk. La recherche des corrélations entre les paramètres morphologiques et physiologiques a été réalisée avec le test de corrélation de Pearson. Le logiciel utilisé a été le XLSTAT (Premium 2016.02.28451).

**RÉSULTATS**

**1. Réponses morphologiques**

Après 90 jours d'expérience, nous avons obtenu les résultats mentionnés dans le tableau 1, les valeurs de la hauteur des plants, le nombre des feuilles par plant et le taux de la matière sèche ont été les plus élevées au niveau des plants irrigués par les solutions de NaCl : 2 g/l, 4 g/l et 6g/l avec des moyennes supérieures à (19.36 cm de hauteur, 13 feuilles par plant et 13.8 % de matière sèche). Les plus faibles moyennes ont été enregistrées chez la

solution à basse salinité (1.4 g/l) et chez les solutions salines de 8 g/l et 10 g/l avec des valeurs inférieures à (18.54 cm de hauteur, 10.42 feuilles par plant, 8.48% de matière sèche). Les valeurs de la teneur en eau ont été les plus élevées chez les plants des solutions salines 8g/l et 10g/l avec des moyennes supérieures à 92.16% et 92.75% respectivement. Les teneurs en eau les plus basses ont été enregistrées au niveau du milieu salin 4g/l avec une moyenne de 82.79 %.

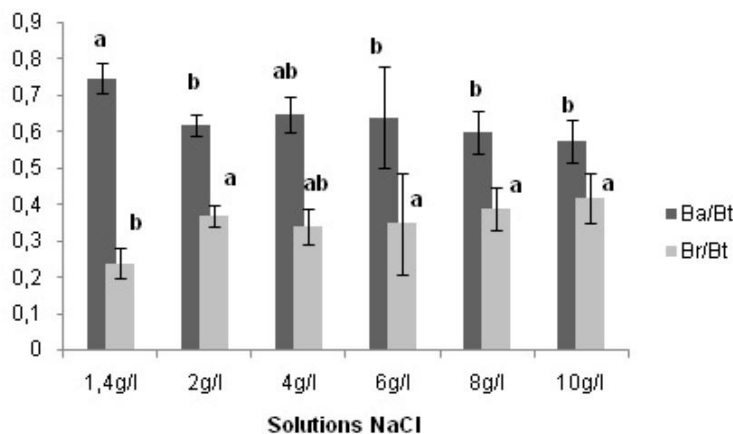
Tableau 1. Réponses morphologiques (Moyennes + déviations standards) des plants de *Retama raetam* aux différents niveaux de salinité

Solutions NaCl	N	hauteur (cm) ***	N. Feuilles **	MS% ***	TRE% ***
1,4 g/l	10	18,54 ±2,53 (cd)	12 ±1,58 (ab)	13,37 ±4,88 (b)	86,63±4,88 (b)
2 g/l	10	23,82 ±3,4 (a)	13 ±3,74 (a)	13,89 ±1,73 (b)	86,1±1,73 (b)
4 g/l	10	19,36±2,07 (bc)	11,6±0,54 (ab)	17,2 ±0,72 (a)	82,79±0,72 (c)
6 g/l	10	22,48 ±2,05 (ab)	13±2,55 (a)	13,8 ±1,11 (b)	86,19±1,11 (b)
8 g/l	10	15,3 ±1,48 (de)	9,8±1,64 (bc)	7,83 ±0,78 (c)	92,16±0,78 (a)
10 g/l	10	14,2±3,05 (e)	8±0,7 (c)	7,24 ±1,4 (c)	92,75±1,4 (a)

N: nombre d'échantillons ; MS : matière sèche; TRE: teneur relative en eau; \*\* : P<0.01, \*\*\* : P<0.001.

Le rapport de la biomasse aérienne sur la biomasse totale (Ba/ Bt) a été influencé par la concentration saline de 2 à 6 g/l (Fig. 1), le rapport le plus élevé a été enregistré par le milieu à faible salinité 1,4 g/l avec une valeur moyenne de 0.75, le test ANOVA a révélé une différence significative (P=0,03). Par ailleurs

le rapport de la biomasse racinaire sur la Biomasse totale (Br /Bt) a été plus élevée chez les plants des milieux (2g/l, 4g/l, 6g/l, 8g/l, 10 g/l) et le plus bas rapport a été constaté chez le milieu 1,4 g/l avec une moyenne de 0.24, la différence a été significative (P=0,03).



Ba :Biomasse aérienne, Bt : Biomasse totale, Br : biomasse racinaire

Figure1: Rapport de la biomasse aérienne (Ba) et la biomasse racinaire (Br) avec la biomasse totale (Bt) des plants de *Retama raetam* sous différents niveaux de salinité

**2. Réponses physiologiques**

Les plus grandes moyennes des sucres solubles et de la proline ont été observées chez les plants irrigués avec la solution NaCl de 6 g/l (Tableau 2), avec des valeurs de 0,23 mg/g MF et de 0,52 µg/g de matière fraîche (MF) respectivement, le reste des solutions de NaCl (1,4, 2, 4, 8 et 10 g/l) ont présenté des taux

variables en sucres solubles entre 0,09 et 0,14 mg/g MF, et des taux de proline variant de 0,09 à 0,19 (µg/g MF).

La chlorophylle totale a été la plus élevée chez les plants irrigués avec 4 g/l et 6 g/l avec des valeurs supérieures à 13,58 mg/g MF, la plus faible moyenne a été marquée chez le milieu à 10 g/l NaCl, avec une valeur de 8,85 mg/g MF.

Tableau 2 : Réponses physiologiques (Moyennes + déviations standards) des plants de *Retama raetam* aux différents niveaux de salinité

Solutions NaCl	N	Sucres Solubles * (mg/g MF)	Proline * (µg/g MF)	Chlorophylle totale (mg/g MF) **	Na+ (%) **	K (%) **
1,4 g/l	3	0,14±0,01 (b)	0,19±0,02 (b)	11,49±1,07(abc)	0,010 ± 0,002(b)	0,57±0,02 (d)
2 g/l	3	0,11±0,01 (b)	0,09±0,001 (b)	11,03±1,85 (bc)	0,005±0,0001(c)	0,55 ±0,01(d)
4 g/l	3	0,13±0,03 (b)	0,09±0,008 (b)	14,27±1,62 (a)	0,005 ±0,002(c)	0,71±0,02(a)
6 g/l	3	0,23±0,06 (a)	0,52±0,35 (a)	13,58±2,68 (ab)	0,026 ±0,003(a)	0,67±0,01(b)
8 g/l	3	0,09±0,05 (b)	0,17±0,1 (b)	12,52±1,04 (ab)	0,009 ±0,001(b)	0,62±0,001(c)
10 g/l	3	0,14±0,02 (b)	0,18±0,01(b)	8,85±1,07 (c)	0,009 ±0,001(b)	0,44 ±0,002(e)

N: nombre d'échantillons, MF: matière fraîche, \*  $P \leq 0.05$ , \*\* :  $P \leq 0.01$ , \*\*\* :  $P \leq 0.001$ .

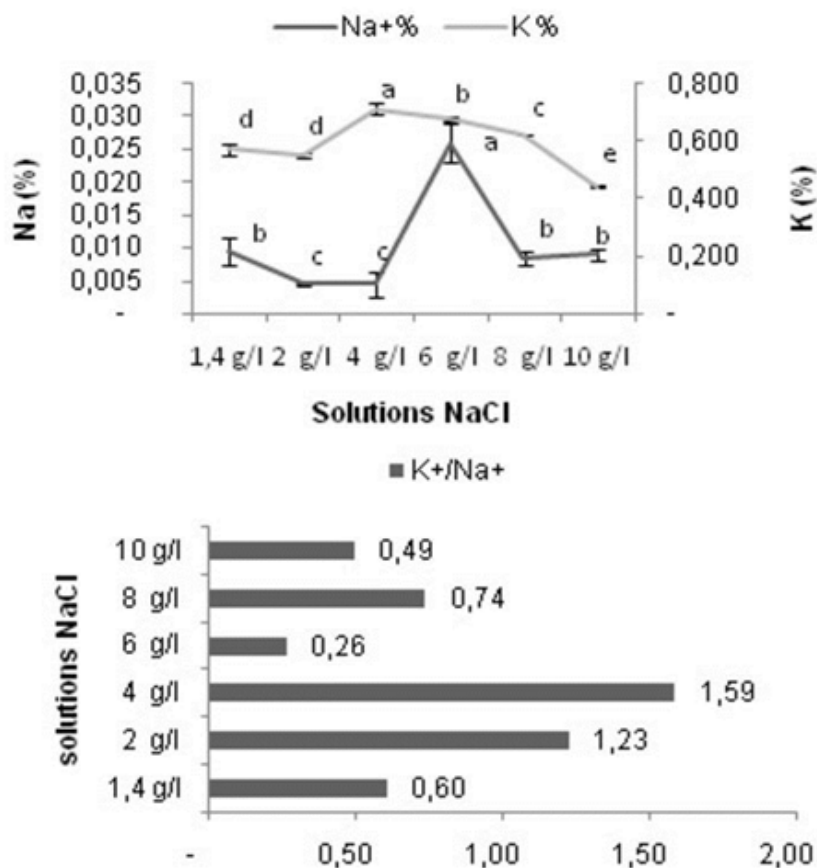


Figure 2 : Teneur en Na+ et en K+ et le rapport K+/Na+ chez les plants de *Retama raetam* traités par les solutions de NaCl

La teneur moyenne en sodium a été aussi influencée par la concentration saline de la solution NaCl, nous avons constaté que les plants irrigués avec le milieu 6 g/l ont accumulés plus de sodium que le reste des solutions avec une valeur supérieure à 0,02 % de matière sèche, les milieux de 2 g/l et 4 g/l de NaCl ont présenté les plus faibles valeurs (0,005%), par ailleurs les milieux à forte salinité 8 et 10 g/l ont présenté une moyenne de 0,009%. La teneur du potassium chez les plants de *Retama raetam* a été aussi influencée par la concentration saline, la plus faible valeur a été marquée chez les plants irrigués avec 10 g/l de NaCl avec une moyenne de 0,44%, la plus haute valeur a été marquée par le milieu à 4 g/l de NaCl avec une moyenne de 0,71% suivi du milieu à 6 g/l de NaCl (0,67%). En observant la figure 2, nous avons constaté qu'il ya eu un ajustement osmotique entre le Na<sup>+</sup> et le K<sup>+</sup> chez les plants irrigués avec 6 g/l, où le taux sodium a été le plus élevé. Les rapports K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> chez les plants des milieux (1,4 g/l, 6 g/l, 8 g/l, 10 g/l) ont été plus bas (valeurs inférieures et égales à 0,74) que ceux des milieux (2 g/l et 4 g/l) qui ont présenté des valeurs supérieures à 1,23 (Fig. 2), la plus basse valeur a été constatée chez les plants de 6 g/l avec un rapport de 0,26.

## DISCUSSION

A travers cette étude nous avons visé à étudier les réponses de l'espèce *Retama raetam* à la salinité au stade plantule, nos résultats ont pu démontrer que cette plante n'est pas une vraie halophyte, et n'est pas une glycophyte résistante, elle pourrait être une halophyte facultative.

Les résultats sur les réponses morphologiques ont démontré que les milieux de 8 g/l et de 10 g/l n'ont pas été favorables pour la croissance et le développement de cette plante, nous avons même assisté à des mortalités des plants à la fin de l'expérience. La hauteur des plants, le nombre des feuilles par plant et la biomasse sèche (MS%) ont été tous réduits. Plusieurs recherches ont montré que la croissance en hauteur [26], la production de biomasse des tiges et des racines [27] ont été négativement affectés par l'augmentation de la salinité. Chez les plantes sous stress salin, la synthèse protéique est inhibée, la décomposition des protéines est augmentée [28], l'accumulation de sel dans les tissus entraîne une réduction de la croissance [29], ce qui est conforme avec nos résultats.

De même nous avons trouvé qu'à partir de 2 g/l les valeurs de Ba/Bt ont diminué, alors que les valeurs de Br/Bt ont augmenté en comparant avec ceux du milieu 1,4 g/l. Certaines études décrites par Morais *et al.* [30] suggèrent que la salinité inhibe davantage la croissance aérienne que la croissance souterraine. Une concentration élevée de salinité inhibait la croissance des plantes, mais les parties aériennes étaient plus sensibles à l'inhibition que les parties souterraines, ce qui a entraîné une baisse de Ba/Bt chez les plantes traitées à une concentration élevée de salinité par rapport aux traitements à faible salinité. Zunzunegui *et al.* [31] ont conclu que l'expansion plus rapide du système racinaire du genre *Retama* par rapport à ses parties aériennes pourrait aider cette espèce à s'adapter à un habitat salin, il apparaît dans notre cas que *Retama raetam* s'adapte dans les milieux salin.

Les teneurs élevées en eau (TRE%) chez les plants des milieux salin 8 g/l et 10 g/l est un mécanisme d'adaptation des plantes à la salinité, qui se justifie par la fermeture des stomates par la libération des osmorégulateurs tels que, la proline et les sucres solubles. La stratégie de fermeture des stomates pour éviter la perte d'eau par transpiration a pour conséquence de réduire les taux de photosynthèse [32]. Selon un autre point de vue, l'accumulation de proline n'est pas une réaction d'adaptation au stress, mais plutôt le signe d'une perturbation métabolique [33].

Le système d'osmorégulation est l'une des réponses défensives aux stress abiotiques, en particulier à la salinité et à la sécheresse [34]. Dans de nombreux cas, la proline libre s'accumule en réponse à ces conditions défavorables [28]. L'accumulation de solutés compatibles dans le cytoplasme est considérée comme un mécanisme de tolérance au sel [35], les plants stressés étaient capables de produire à la fois de la proline et de la glycine bêtaïne [34]. Dans notre étude la teneur en proline la plus élevée a été constatée dans le milieu 6 g/l ; significativement différente de tous les autres milieux ce qui indique que la plante a été soumise à des perturbations métaboliques. La teneur en proline et les sucres solubles ont été positivement et significativement corrélés avec la teneur des feuilles en Na<sup>+</sup> (Fig. 3). Cette corrélation a été expliquée par les déclarations de DeFreitas *et al.* [36] ont démontré que l'application de proline sur du sorgho traité par la salinité diminue les lésions membranaires et n'augmente pas la teneur relative en eau.

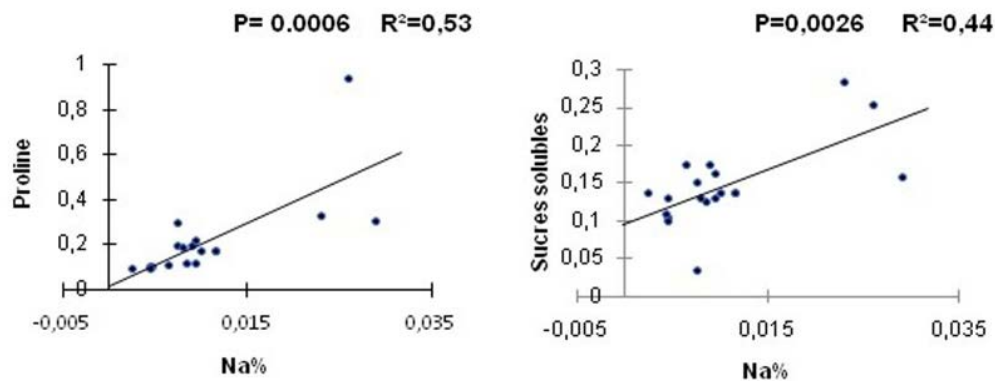


Figure 3. Régression linéaire montrant la corrélation positive du Na<sup>+</sup> avec la proline et les sucres solubles

Leurs résultats montrent clairement que le traitement à la proline entraîne des changements favorables, réduisant les dommages causés par le sel et améliorant l'acclimatation au sel.

La chlorophylle totale chez les plants de *Retama raetam* a été affectée par la salinité excessive de 10 g/l (172 mM) où elle a présenté le plus faible taux, des études similaires ont démontré la réduction de la photosynthèse sous une salinité excessive chez *Retama monosperma*, après 60 jours de stress sous 200 mM de NaCl [31]. A cet effet, Barhoumi *et al.* [37] ont décrit une désorganisation de l'ultrastructure chloroplastique d'*Aeluropus littoralis*, Qiu *et al.* [38] ont rapporté une réduction considérable du système des grana et stroma thylakoïdes et parfois même une déformation morphologique des chloroplastes dans le candélabre de *Kandelia* sous l'effet de sels, ce qui peut être liée au fait que le stress salin augmente l'accumulation de NaCl dans les chloroplastes des plantes supérieures, entraînant une augmentation du stroma causée par des dégâts aux membranes des chloroplastes. Le milieu 4g/l semble le plus favorable pour une bonne photosynthèse.

Par ailleurs, la présence de NaCl dans le milieu de culture limite l'alimentation de la plante en cations majeurs, tels que le potassium et le calcium [39]. En présence de stress salin, les plantes ont tendance à sélectionner certains ions, cette sélectivité est généralement liée aux mécanismes d'exclusion des ions Na<sup>+</sup>. Une forte sélectivité K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> a été démontrée au niveau du plasmalemme du cortex racinaire et dans le xylème des plantes les plus tolérantes

au NaCl [40]. Le maintien de ce rapport K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> élevé constitue un mécanisme aidant au bon déroulement des processus métaboliques sous stress salin [41], nos résultats ont démontré que les deux milieux 2 g/l et 4 g/L ont présenté des rapports K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> plus élevés que le reste des milieux, il apparaît donc que ces 2 milieux sont les plus favorables à la croissance et au développement des plants de *Retama raetam*, alors que le rapport le plus faible a été celui du milieu 6 g/l. La séquestration du sel dans les vacuoles cellulaires par le biais de transporteurs est un autre mécanisme clé utilisé par les halophytes pour maintenir un rapport K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> cytosolique élevé et ainsi contrôler les concentrations en sel dans le cytosol [42]. L'accumulation d'osmoprotecteurs tels que la proline, la glycine bêtaïne, les polyphénols, les sucres solubles et les ions inorganiques est un mécanisme conventionnel de défense des plantes couramment utilisé par les halophytes pour faire face au stress [43].

L'analyse en composante principale (Fig. 4) nous a donné une bonne visualisation de la relation entre les traitements salins et les variables étudiées, l'information donnée a été de 83,68%, le facteur F1 a été lié aux variables influençant les réponses morphologiques en particulier la photosynthèse (hauteur des plants, nombre des feuilles, % MS, chlorophylle, K<sup>+</sup>) et le facteur F2 a été lié aux variables expliquant des réponses physiologiques à l'effet de sel (Sucre solubles, proline, Na<sup>+</sup>). Dans cette figure il apparaît que la teneur relative faible en eau (TRE%) est la plus corrélée avec le taux élevée de NaCl chez les milieux 8 g/l et 10 g/l.

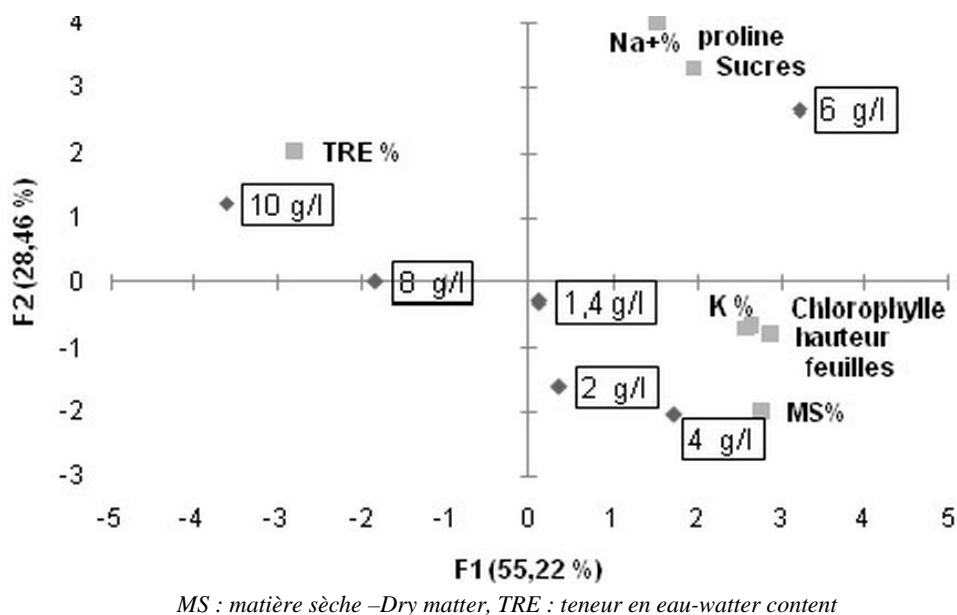


Figure 4. Deux principaux axes de l'Analyse en composante principale démontrant les réponses morpho physiologiques de *Retama raetam* aux niveaux de salinité NaCl

Les milieux les plus favorables à la croissance et au développement des plants de *Retama raetam* sont les milieux à 4g/ de NaCl suivi de celui de 2 g/l , corrélé positivement par des moyennes élevées de la hauteur des plants , le nombre des feuilles , le taux du potassium , la chlorophylle totale , et la teneur en matière sèche , tous ces résultats sont des indicateurs d'une bonne photosynthèse et une bonne activité métabolique.

Les mêmes résultats ont été trouvés dans une étude sur une espèce halophyte des forêts du Mangrove (*Bruguiera gymnorhiza*), indiquant que la surface foliaire, la masse foliaire par plante et la longévité relative des feuilles augmentent avec l'augmentation de la salinité [44]. Une autre étude a montré que le Cl<sup>-</sup> était nécessaire au bon fonctionnement du centre catalytique du PSII pour catalyser l'oxydation de l'eau en dioxygène [45], la teneur en Cl<sup>-</sup> s'est également révélée essentielle à l'activité optimale de l'oxygène au niveau de PSII [46]. Les thylakoïdes des feuilles d'*Avicennia marina* nécessitent des niveaux élevés de Cl<sup>-</sup> pour le transport photosynthétique des électrons autour de PSII [47] et sont beaucoup plus résistants au sel que les thylakoïdes des glycophytes [47 ; 48].

Il semble que le Cl<sup>-</sup> a joué aussi un rôle à expliquer la nécessité d'une salinité pour le bon fonctionnement métabolique de *Retama raetam*.

Par ailleurs, le milieu à 1,4 g/l n'a pas été adéquat pour la croissance et le développement des plants de *Retama*, malgré sa faible salinité. Notant que ce milieu n'a pas été létal pour les plants comme ceux des milieux 8 g/l et 10 g/l. Il apparaît donc que *Retama raetam* n'est pas une glycophyte ni sensible ni résistante à la salinité. Des résultats similaires ont été trouvés chez certains halophytes et ont justifié qu'une exposition prolongée à l'eau douce entraîne une taille de feuille plus petite, ce qui donne par la suite une surface photosynthétique active plus petite que celle observée pour les plantes poussant dans des environnements à salinité faible ou modérée [44].

L'adaptation des halophytes aux milieux salins peut prendre la forme d'une tolérance au sel ou d'une répulsion pour le sel. Les plantes qui évitent les effets d'une forte teneur en sel même si elles vivent dans un milieu salin peuvent être appelées halophytes facultatives plutôt que vrais halophytes, ou halophytes obligatoires. Des plantes comme l'orge (*Hordeum vulgare*) et le palmier dattier (*Phoenix dactylifera*) peuvent tolérer environ 5g/l et peuvent être considérées comme des halophytes marginales [49].

## CONCLUSION

Les plants de *Retama raetam* ont présenté un aspect Halotolérant à une dose de 6 g/l de NaCl, les doses supérieures à 8 g/l ont été létales. Le milieu non salin (1,4 g/l) a été non favorable pour la croissance et le développement des plants de retem, ces

derniers ont présenté leur optimum de croissance sous une dose de 4 g/l de NaCl. Nous avons pu conclure que *Retama raetam* n'est pas une vrais halophyte, Nous résultats ont permis de classer cette plante comme une halophyte facultative et marginale.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. **Manchanda G. & Garg N. (2008).** Salinity and its effects on the functional biology of legumes. *Acta Physiologiae Plantarum.* 30(5): 595-618.
- [2]. **Eynard A., Lal R. & Wiebe K. (2005).** Crop response in salt-affected soils. *Journal of Sustainable Agriculture.* 27 : 5–50.
- [3]. **CNCR (2011).** La salinisation au Sénégal: une menace pour la sécurité alimentaire. <http://www.cncr.org/spip.php?article 4031>
- [4]. **Faye E. (2003).** Réponses au stress salin de jeunes plants de *Atriplex lentiformis* S. Wats. Calif. biologiquement améliorés. DEA. UCAD. 30p
- [5]. **Jithesh MN., Prashanth SR., Sivaprakash KR. & Parida AK. (2006).** Antioxidative response mechanisms in halophytes: their role in stress defence. *Journal of Genetic.* 85: 237–254.
- [6]. **Flowers TJ. & Colmer TD. (2008).** Salinity Tolerance in Halophytes. *New Phytologist.* 179: 945-963
- [7]. **Slama I., Ghnaya T., Messedi D., Hessini K., Labidi N., Savoure A. & Abdelly C. (2007).** Effect of sodium chloride on the response of the halophyte species *Sesuvium portulacastrum* grown in mannitol-induced water stress. *J Plant Res.* 120: 291–299.
- [8]. **Zaier H., Ghnaya T., Lakhdar A., Baioui R., Ghabriche R., Mnasri M., Sghair S., Lutts S. & Abdelly C. (2010).** Comparative study of Pb phytoextraction potential in *Sesuvium portulacastrum* and *Brassica juncea*: tolerance and accumulation. *J Haz Mat.* 183 (1–3): 609–615.
- [9]. **Koyro HW., Geissler N. & Hussin S. (2009).** *Survival at extreme locations: life strategies of halophytes.* In *Salinity and Water Stress.* Springer. Dordrecht.p.167-177
- [10]. **GRIN databse (2019).** USDA. ARS. National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network-(GRIN). <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?1440> ( 28/08/2019).
- [11]. **Pugnaire FI., Haase P., Puigdefábregas J., Cueto M., Clark SC. & Incoll LD. (1996).** Facilitation and succession under the canopy of a leguminous shrub. *Retama sphaerocarpa* in a semi-arid environment in south-east Spain. *Oikos.* 76 (3): 455-464.
- [12]. **Valladares F. , Villar-Salvador P., Domínguez S., Fernández-Pascual M., Peñuelas JL. & Pugnaire FI. (2002).** Enhancing the early performance of the leguminous shrub *Retama sphaerocarpa* (L.) Boiss.: fertilisation versus Rhizobium inoculation. *Plant and Soil.* 24 (2): 253-262.
- [13]. **Haase P., Pugnaire FI., Clark SC. & Incoll LD. (1996).** Spatial patterns in a two-tiered semi-arid shrubland in southeastern Spain. *Journal of Vegetation Science.* 7(4): 527-534.
- [14]. **Singh AN., Raghubansh AS., Singh JS. (2002).** Plantations as a tool for mine spoil restoration. *Current Science.* 82(12): 1436-1441.
- [15]. **Laudadio V., Tufarelli V., Dario M., Hammadi M., Seddik MM., Lacalandra GM. & Dario C. (2009).** Chemical and nutritional characteristics of halophytes plants used by camels in Southern Tunisia. *Tropical Animal Health and Production* 41: 209–215.
- [16]. **Cheriti A., Talhi MF., Belboukhari N., Taleb S. & Roussel C. (2009).** Removal of copper from aqueous solution by *Retama raetam* Forssk. growing in Algerian Sahara. *Desalination and Water Treatment.* 10 : 317–320.
- [17]. **Said O., Khalil K., Fulder S. & Azaizeh H. (2002).** Ethno-pharmacological survey of medicinal herbs in Israel. the Golan Heights and the West Bank region. *Journal of Ethnopharmacology* 83: 251–265.
- [18]. **Streb P., Tel-Or E. & Feierabend J. (1997).** Light stress effects and antioxidative protection in two desert plants. *Functional ecology.* 11(4): 416-424.
- [19]. **Barakat NA., Laudadio V., Cazzato E. & Tufarelli V. (2013).** Potential contribution of *Retama raetam* (Forssk.) Webb et Berthel as a forage shrub in Sinai. *Egypt. Arid Land Research and Management.* 27(3): 257-271.
- [20]. **Mechergui K., Mahmoudi H., Khouja ML. & Jaouadi W. (2017).** Factors influencing seed germination of the pastoral plant *Retama raetam* subsp. *bovei* (Fabaceae): interactive effects of fruit morphology, salinity, and osmotic stress. *BIOLOGIJA.* 63 (2): 134–151



- [21]. **Bouredja N., Mehdadi Z., Bendimered FZ. & Chérifi K. (2011).** Effets de quelques prétraitements physicochimiques sur la levée de l'inhibition tégumentaire des graines de *Retama monosperma* Boiss. et recherches des conditions thermiques optimales de germination. *Acta Botanica Gallica*. 158(4): 633-643.
- [22]. **Garnier BY. & Laurent G. (1994).** Leaf anatomy, specific mass and water content in congeneric annual and perennial grass species. *New Phytol.* 128: 725-736.
- [23]. **Dubois M., Gilles KA., Hamilton JK., Rebers PA. & Smith F. (1956).** Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- [24]. **Arnon DI. (1949).** Copper enzymes in isolated chloroplasts. polyphenoxidase in beta vulgaris. *plant physiology*. 24: 1-15.
- [25]. **Bates L., Waldren R. & Teare I. (1973).** Rapid Determination of Free Proline for Water-Stress Studies. *Plant and Soil.* 39: 205-207
- [26]. **Maaouia-Houimli SI., Denden M., Dridi-Mouhanded B. & Mansour-gueddes S. (2011).** Caractéristiques de la croissance et de la production en fruits chez trois variétés de piment (*Capsicum annum* L.) sous stress salin. *Tropicultura.* 29(2) :75-81.
- [27]. **Zaman-Allah M., Sifi B., L'Taief B. & El Aouni MH. (2009).** Paramètres agronomiques liés à la tolérance au sel chez le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.)/Agronomical traits associated with salinity-tolerance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BASE.* 13(1) : 113-119.
- [28]. **Hare PD. & Cress WA. (1997).** Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation.* 21: 79–102.
- [29]. **Munns R. (2002).** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant. Cell and Environ.* 250: 239–250.
- [30]. **Morais MC., Panuccio MR., Muscolo A. & Freitas H. (2012).** Salt tolerance traits increase the invasive success of *Acacia longifolia* in Portuguese coastal dunes. *Plant Physiol Bioch.* 55: 60–65.
- [31]. **Zunzunegui M., Esquivias MP., Fernández-González P., Valera-Burgos J., Díaz Barradas MC. & Gallego-Fernández JB. (2017).** Morpho-physiological response of *Retama monosperma* to extreme salinity levels. *Ecohydrology.* 10(7). e1871.
- [32]. **Parida AS. & Das AB. (2005).** Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotox Environ Safe.* 60: 324–349.
- [33]. **Dix PJ. & Pearce RS. (1981).** Proline accumulation in NaCl-resistant and sensitive cell lines of *Nicotiana sylvestris*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie.* 102(3): 243-248. .
- [34]. **Ben Hassine A., Bouzid S. & Lutts S. (2010).** Does habitat of *Atriplex halimus* L. affects plant strategy for osmotic adjustment?. *Acta physiol. Plant.* 32 : 325-331.
- [35]. **Jaleel CA., Manivannan P., Kishorekumar A., Sankar B. & Panneerselvam R. (2007).** Calcium chloride effects on salinity induced oxidative stress, proline metabolism and indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus*. *C.R. Biol.* 330 (9): 674-683.
- [36]. **De Freitas PAF., de Carvalho HH., Costa JH., de Souza Miranda R., da Cruz Saraiva KD., de Oliveira FDB. & Gomes-Filho. E. (2019).** Salt acclimation in sorghum plants by exogenous proline: physiological and biochemical changes and regulation of proline metabolism. *Plant cell reports.* 38(3) : 403-416.
- [37]. **Barhoumi Z., Djebali W., Smaoui A., Chaïbi W. & Abdelly C. (2007).** Contribution of NaCl excretion to salt resistance of *Aeluropus litoralis* (Willd) Parl. *Journal of plant physiology.* 164 (7): 842-850.
- [38]. **Qiu DL., Lin P. & Su JW. (2005).** Relationship of leaf ultrastructure of mangrove *Kandelia candel* (L.) Druce to salt tolerance. *J For Sci.* 51: 476-480.
- [39]. **Flowers TJ. & Yeo AR. (1986).** Ion relations of plants under drought and salinity. *Functional Plant Biology.* 13(1): 75-91.
- [40]. **Taleisnik E. & Grunberg K. 1994.** Ion balance in tomato cultivars differing in salt tolerance. I. Sodium and potassium accumulation and fluxes under moderate salinity. *Physiologia Plantarum.* 92(3): 528-534.
- [41]. **Ashraf A. & Khanum A. (1997).** Relationship between ion accumulation and growth in two-spring wheat lines differing in salt tolerance at different growth stages. *J. Agron. Crop Sci.* 178: 39-51.
- [42]. **Kronzucker HJ. & Britto DT. (2011).** Sodium transport in plants: a critical review. *New Phytol.* 189: 54–81.
- [43]. **Lokhande VH. & Suprasanna P. (2012).** Prospects of halophytes in understanding and managing abiotic stress tolerance.” in *Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change.* eds P. Ahmad and M. N. V. Prasad (New York, NY: Springer). p. 29–56.
- [44]. **Wang W. & Lin P. (1999).** Influence of substrate salinity on the growth of mangrove species of *Bruguiera gymnorhiza* seedling. *Nat Sci.* 2: 273–279.
- [45]. **Ferreira K., Iverson TM., Maghlaoui K., Barber J. & Iwata S. (2004).** Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science.* 303: 1831–1838
- [46]. **Roose JL., Wegener KM. & Pakrasi HB. (2007).** The extrinsic proteins of photosystem II. *Photosynth Res.* 92:369–387.

- [47]. **Critchley C. (1982).** Stimulation of photosynthetic electron transport in a salt tolerant plant by high chloride concentration. *Nature*. 298:483–485
- [48]. **Critchley C. (1983).** Further studies on the role of chloride in photosynthetic O<sub>2</sub> evolution in higher plants. *Biochim Biophys Acta*. 724 :1–5
- [49]. **Glenn EP., Brown JJ. & Blumwald E. (1999).** Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Plant Sciences*. 18 (2): 227 - 255.

## ADVENTICES LIANESCENTES DES CASIERS RIZICOLES DANS LE DELTA DU FLEUVE SÉNÉGAL

BASSENE César <sup>1,2\*</sup>, MBALLO Rahimi <sup>2,3</sup>, MBAYE Mame Samba <sup>2</sup>, CAMARA Abdoul Aziz <sup>2</sup> et NOBA Kandoura <sup>2</sup>

1 UFR des Sciences Agronomiques, de l'Aquaculture et des Technologies Alimentaires, Université Gaston Berger de Saint Louis, BP. 234 Saint Louis, Sénégal.

2 Laboratoire de Botanique et Biodiversité, Département de Biologie Végétale, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta DIOP, B.P. 5005 Dakar-Fann, Sénégal.

3 Centre de Recherche Agricole de l'Institut Sénégalais de Recherches Agricoles de Saint Louis. BP.

*Reçu le 21/10/2019, Révisé le 12/12/2019, Accepté le 28/12/2019*

### Résumé

**Description du sujet :** Les mauvaises herbes ou adventices représentent une contrainte majeure à la production agricole, plus particulièrement en région tropicale. Dans le delta du fleuve Sénégal, la riziculture couvre environ 25500ha irrigués, et les adventices lianescentes apparaissent comme un groupe difficile à gérer.

**Objectifs :** Identifier les adventices lianescentes du milieu et fournir des informations utiles pour leur gestion durable.

**Méthodes :** Des inventaires floristiques ont été effectués sur l'ensemble des cuvettes du delta du fleuve Sénégal entre 2017 et 2019. Dans les parcelles choisies au hasard la technique d'inventaire itinérante portant uniquement sur les adventices lianescentes est utilisée. La composition de cette flore lianescente, les caractéristiques biologiques de ces espèces, leurs affinités biogéographiques et leur mode de multiplication sont déterminés.

**Résultats :** Cette flore est riche de 34 espèces appartenant à 23 genres et 10 familles dominées par les Convolvulaceae avec 41,18% et Cucurbitaceae avec 17,65%. Les thérophytes avec 58,82% dominent la flore comme les espèces d'affinités pantropicales (32,35%) et africaines (29,41%). Les adventices lianescentes se multiplient majoritairement par des graines et aussi par combinaison de ce mode de multiplication avec la voie végétative.

**Conclusion :** Ces informations sur l'identification des adventices lianescentes doivent permettre d'améliorer les pratiques de lutte intégrée contre ces espèces.

**Mots clés:** Adventices lianescentes, caractéristiques, riziculture, delta du fleuve Sénégal.

## CREEPERS WEEDS OF RICE GROWING PLOTS IN THE SENEGAL RIVER DELTA

### Abstract

**Description of the subject:** Weeds represent a major constraint in agricultural production, particularly in tropical region. In Senegal River Delta, rice crops cover about 25500ha of irrigated land, and creepers weeds appear to be a hardly control group.

**Objective:** Identify creepers weeds in the environment and provide useful information for their sustainable management.

**Methods:** Floristic surveys were carried out on all the basins of the Senegal river delta between 2017 and 2019. In the randomly selected plots the mobile inventory technique is concerning only creepers weeds. The composition of this creeping flora, biological characteristics of these species, biogeographic distribution and their mode of spatial dissemination are determined.

**Results:** The inventoried flora is composed of 34 species belonging to 23 genera and 10 families which are dominated by the Convolvulaceae (41.18%) and the Cucurbitaceae (17.65%). This flora is also characterized by the predominance of the therophytes (58.82%). From a biogeographic distribution, pantropical species (29.5%) and african (28.2%) are dominated. Creepers weeds are mainly reproduced by seeds and also by a combination of seeds reproduction and vegetative reproduction.

**Conclusion:** This identification information should help to improve integrated management practices against these creepers species.

**Keywords:** creepers weeds, characteristics, rice-growing, Senegal river delta

\*Correspondant auteur, César BASSENE, E-mail : cesar.bassene@yahoo.fr

## INTRODUCTION

En agriculture, les adventices ou mauvaises herbes représentent une contrainte majeure pour la production agricole [1]. Sous les Tropiques, les mauvaises herbes sont les plus sous-estimés des fléaux des cultures, alors que nulle part au monde elles ne causent autant de réduction de rendement et de travaux pénibles [2]. Elles sont responsables de pertes de rendement de 10 à 60% en fonction des cultures et des systèmes de culture [2, 3, 4] soit une moyenne de 25% pour les pays tropicaux, contre seulement 5% dans les pays développés des régions tempérées. Les temps de travaux consacrés au désherbage représentent 20 à 60 % du temps consacré à la culture [5] ce qui constitue l'une des principales raisons de limitation des surfaces cultivables par les petits agriculteurs [6].

Au Sénégal, dans le delta du fleuve Sénégal, la culture du riz couvre environ 25500 ha irrigués, mis en valeur et représente la première production agricole de la zone [7]. Cette riziculture contribue également à assurer un emploi pour les populations rurales [8]. Les études réalisées ces dernières années sur la caractérisation des enherbements du riz et les observations de terrain et les informations issues des agriculteurs et des conseillers agricoles soulèvent l'importance et la contrainte croissante des espèces à port lianescent [9]. Développer des systèmes de gestion de ces adventices nécessite la reconnaissance d'une part les adventices et d'autre part de connaître les facteurs favorables à leur développement [1].

C'est dans cette optique que cette étude a été entreprise pour étudier les adventices lianescentes du riz dans le delta du fleuve Sénégal. Elle permettra de fournir des informations utiles pour une gestion durable des adventices du milieu. De manière spécifique, le travail consiste à déterminer la composition et la structure de cette flore lianescente et de déterminer les caractéristiques biologiques susceptibles de favoriser leur développement, leurs affinités biogéographiques ainsi leur mode de multiplication.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1- Zone d'étude

Le delta du fleuve est une immense zone humide inondable de 74 000 à 110 000 ha au Sénégal [10]. Il se situe entre 16° et 14°4 latitude Nord et entre 15°30 et 16°30 longitude ouest [11].

Les sols du delta sont très diversifiés : les sols hollaldés ; ils sont argileux aptes à la riziculture ; les faux hollaldés, argilo-limoneux ; les fondés qui sont des sols limoneux peu évolués inadaptés à la riziculture; les falos avec des cultures maraîchères et les diacrés rarement cultivés [11].

Le climat est tropical semi-aride avec une pluviométrie annuelle faible (200 à 300 mm/an) et une humidité relative variant de 47 à 80 % [12].

La végétation est faite de savanes arbustives à *Tamarix senegalensis* et les espèces du genre *Acacias*. La flore herbacée y est très diversifiée et est caractéristique des zones humides [13].

Les principales activités socio-économiques des populations du delta sont : la pêche, l'agriculture (riziculture et maraichage), l'élevage, le commerce stimulé par la proximité avec la Mauritanie etc. [14].

### 2. Méthodes

Des inventaires floristiques ont été effectués sur l'ensemble des cuvettes de la zone du delta du fleuve Sénégal entre 2017 et 2019. Dans chaque cuvette, des parcelles sont choisies au hasard et la technique d'inventaire itinérante portant uniquement sur les adventices lianescentes. Cette technique consiste à parcourir la parcelle et de recenser les espèces lianescentes rencontrées.

#### 2.1. Identification des espèces

L'identification des espèces a été faite sur le terrain et au laboratoire. Certaines espèces ont été identifiées sur place et les autres qui n'ont pas été identifiées ont été échantillonnées et un code provisoire leur a été attribué pour une identification ultérieure. Ces échantillons indéterminés sont mis sous presse, séchées puis ramener à l'herbier de Dakar pour l'identification. Les identifications ont été effectuées à l'aide des flores [15, 16, 17, 18] ; des travaux de [19, 20].

La nomenclature utilisée est celle de [21, 22, 23, 24]. La classification utilisée pour déterminer les familles est celle phylogénique [25].

#### 2.2. Analyse de la structure de la flore

Pour analyser la flore adventice lianescente, le spectre taxonomique, les caractères biologiques (spectre biologique et les modes de multiplication) et le spectre chorologique ont été établis.

Pour le spectre taxonomique, chaque espèce recensée et identifiée, son nom scientifique (nom de genre + épithète spécifique) et sa famille lui ont été attribués.

Ainsi, le nombre total des espèces, des genres et des familles et les classes de la flore sont déterminés et leurs proportions relatives analysées.

En ce qui concerne les caractères biologique, les espèces ont été classées selon leur type biologique et les modes de multiplication.

Concernant le spectre biologique, la classification de Raunkier [26], adaptée à la zone tropicale où la saison défavorable correspond à la saison sèche, a été utilisée. Les informations sont recueillies à partir des travaux de Bassène et al. [27].

Pour les modes de multiplication, les adventices lianescentes peuvent associer différents modes de multiplication pour assurer leur reproduction : multiplication sexuée (MS) réalisée par des graines, la multiplication végétative (MV) assurée par des tubercules, rhizomes, fragments, rejets et l'association de ces deux types de multiplication (MSV).

Les informations obtenues concernant ces modes de multiplication sont recueillies dans les travaux de [16, 21, 22, 23, 24].

En ce qui concerne les affinités biogéographiques des espèces répertoriées, une classification selon leur origine géographique a été effectuée. Pour ce faire, les informations ont été tirées essentiellement de la flore de [28], de la flore illustrée de [17, 18] des travaux de [27, 29].

**RÉSULTATS**

**1. Spectre taxonomique**

L'inventaire des adventices lianescentes dans les casiers rizicoles du delta du fleuve Sénégal montre que cette flore est riche et est composée de deux groupes que sont les Angiospermes et les Ptéridophytes (Tableau 1). Sur cette liste, les informations sur les types biologiques, les affinités biogéographiques et les modes de multiplication sont notées.

Tableau 1 : Liste des adventices lianescentes répertoriées

Familles	Espèces	TB	AB	MM
Apocynaceae-Apocynoideae (D)	<i>Pentatropis spiralis</i> (Forssk.) Decne.	Th	Mas	graines
Apocynaceae-Asclepioideae (D)	<i>Pergularia deamea</i> (Forssk.) Chiov.	H	Af	graines
Apocynaceae-Asclepioideae (D)	<i>Oxystelma bornouense</i> R. Br	Th	Af	graines
Apocynaceae-Asclepioideae (D)	<i>Leptadenia hastata</i> L.	Np	Af	graines
Ceratophyllaceae (D)	<i>Ceratophyllum demersum</i> L.	Hy	Cosm	graines/ Fragments
Characeae (A) algue	<i>Chara fibrosa</i> Ag.	Hy	Cosm	graines/
Commelinaceae (M)	<i>Commelina forskalei</i> Vahl.	Th	Pt	graines
Convolvulaceae (D)	<i>Aniseia martinicensis</i> (Jacq.) Choisy	Th	Pt	graine
Convolvulaceae (D)	<i>Cuscuta campestris</i> Yunck.	Par	Pt	graines
Convolvulaceae (D)	<i>Ipomoea acanthocarpa</i> (Choisy) Asch. & Schweinf.	Th	Cosm	graines
Convolvulaceae (D)	<i>Ipomoea asarifolia</i> (Desr.) R. et Sch.	C	Pt	graines
Convolvulaceae (D)	<i>Ipomoea aquatica</i> Forssk	C	As	graines
Convolvulaceae (D)	<i>Ipomoea coptica</i> (L.) Roth.	Th	Masu	graines
Convolvulaceae (D)	<i>Ipomoea eriocarpa</i> R. Br.	Th	Masu	graines
Convolvulaceae (D)	<i>Ipomoea kotschyana</i> Hochst	Th	Af	graines
Convolvulaceae (D)	<i>Ipomoea pes-tigridis</i> L.	Th	Af	graines
Convolvulaceae (D)	<i>Ipomoea vagans</i> Bak.	Th	Af	graines
Convolvulaceae (D)	<i>Jacquemontia tamnifolia</i> (L.) Griseb.	Th	Pt	graines
Convolvulaceae (D)	<i>Merremia aegyptica</i> (L.) Urban	Th	Pt	graines
Convolvulaceae (D)	<i>Merremia pinnata</i> Hochst	Th	Af	graines
Convolvulaceae (D)	<i>Merremia tridentata</i> (L.) Hallier f.	Th	Af	graines
Cucurbitaceae (D)	<i>Coccinia grandis</i> (L.) J.O. Voigt.	C	Afasu	graines
Cucurbitaceae (D)	<i>Cucumis ficifolius</i> A. Rich.	Ch	Afasu	graines/
Cucurbitaceae (D)	<i>Cucumis melo</i> var. <i>agrestis</i> (L.) Berh.	Th	Masu	graines
Cucurbitaceae (D)	<i>Luffa aegyptiaca</i> Mill	Th	Pt	graines
Cucurbitaceae (D)	<i>Momordica balsamina</i> L.	Th	Pt	graines
Cucurbitaceae (D)	<i>Mukia maderaspatana</i> (L.) M.J.Roem.	Th	Asu	graines
Fabaceae- Faboideae (D)	<i>Neptunia oleracea</i> Lour.	Hy	Cosm	graines
Fabaceae- Faboideae (D)	<i>Phaseolus adenanthus</i> G.F.W. Mey.	C	Af	graines
Fabaceae- Faboideae (D)	<i>Rhynchosia minima</i> (L.) DC.	Th	Cosm	graines
Najadaceae (M)	<i>Najas pectinata</i> Parl	Hy	Pt	graines
Passifloraceae (D)	<i>Passiflora foetida</i> L.	Th	Af	graines
Potamogetonaceae (M)	<i>Potamogeton octandrus</i> Poiret.	Hy	Pt	graines/ Rhizome
Potamogetonaceae (M)	<i>Potamogeton schweinfurthii</i> A. Benn.	Hy	Pt	graines/ Fragments

M = Monocotylédones ; D = Dicotylédones, TB = Types Biologiques ; AB = Affinités Biogéographiques ; MM = Modes de multiplication, Th = Thérophytes; Hy = Hydrophytes; C = Chaméphytes; NP = Nanophanéphytes; H = Hémycryptophytes; Par = Parasites

La flore adventice lianescente regroupe 34 espèces réparties dans 23 genres et 10 familles. Les Angiospermes regroupent deux classes que sont les Monocotylédones et les Dicotylédones. Les Monocotylédones renferment 4 espèces soit 11,76% des espèces répertoriées, réparties dans 3 genres soit 13,4% et réunies dans 3 familles soit 30% du total des familles rencontrées. Quant aux Dicotylédones, 29 espèces (85,29%) sont listées. Ces espèces sont réparties dans 19 genres (82,61%) et 6 familles soit 60% des familles listées. Le groupe des Ptéridophytes est représentées par une seule espèce appartenant aux Algues (Fig. 1). Les espèces rencontrées sont regroupées en 10 familles (Fig. 2).

Parmi ces familles 2 (deux) d'entre elles représentent plus de la moitié des espèces répertoriées soit 58,83%. Il s'agit des Convolvulaceae et des Cucurbitaceae et comportent respectivement 14 espèces (41,18%) et 6 espèces (17,65%). Pour les Convolvulaceae 2 genres sont prépondérants (*Ipomoea* avec 8 espèces) et *Merremia* avec 3 espèces. Les autres familles restantes représentent au total 41,16%. Elles sont composées par ordre d'importance les Apocynaceae avec 11,76%, Fabaceae (8,82%), Potamogetanaceae (5,88%), Cératophyllaceae, Characeae, Commelinaceae, Najadaceae et Passifloraceae avec chacune (2,94%) soit une 1 espèces.

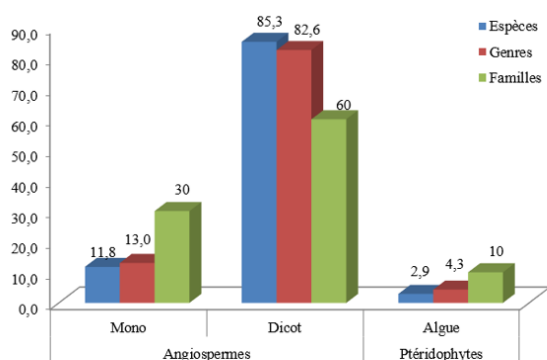


Figure 1 : Structure de la flore

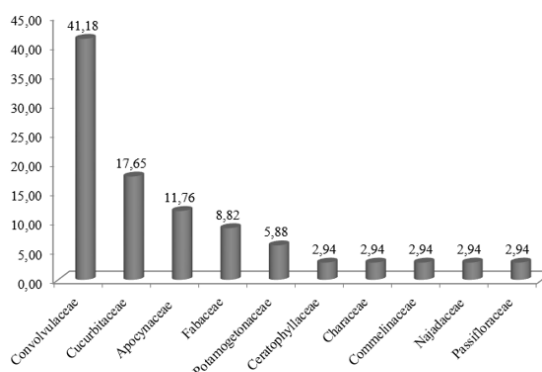


Figure 2 : Proportion des familles d'adventices répertoriées

## 2. Spectre biologique

Dans cette flore, les types biologiques notés sont les Chaméphytes (C), Hémicryptophytes (H), Parasites (Par), Nanophanérophytes (Np) et Thérophytes (Th) et les hydrauphytes (Hy)

figure 3. Toutefois, elle est nettement dominée par les thérophytes avec 58,82%, les autres types présentent un pourcentage total de 41,18% avec des proportions inférieures à 20% pour chacun.

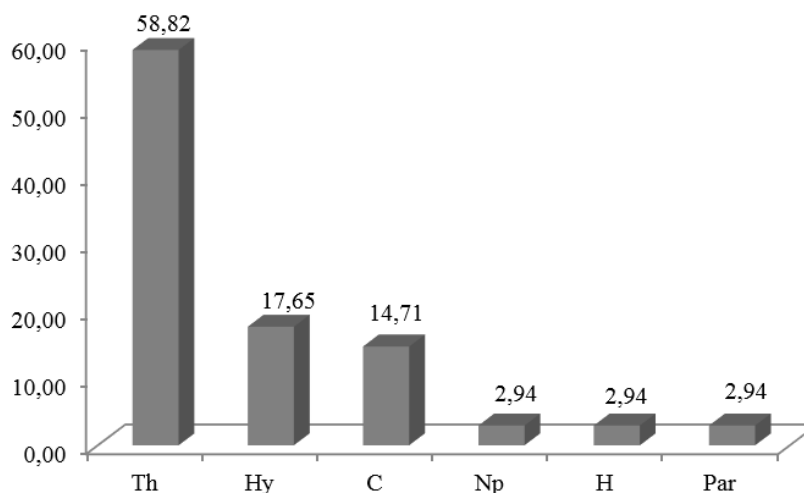
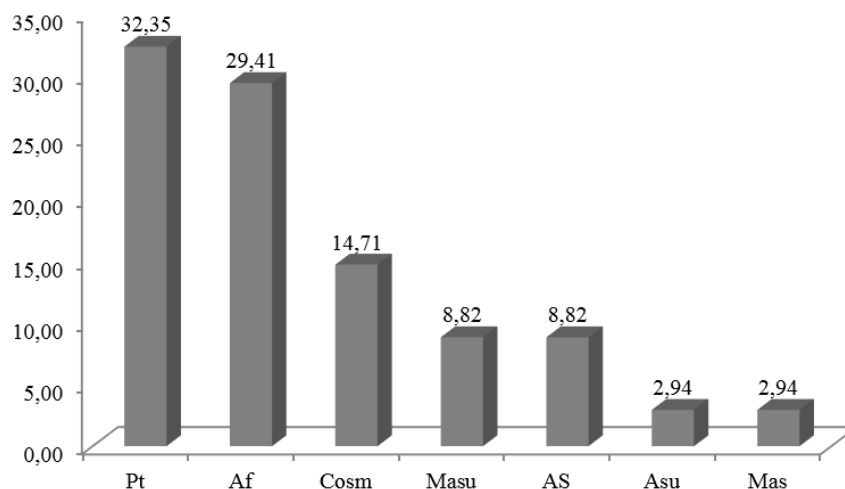


Figure 3 : Types biologiques des espèces recensées

### 3. Spectre chorologique

Les affinités biogéographiques des espèces recensées sont représentées par 7 groupes consignés dans la figure 4 ci-dessous. L'essentiel de cette flore (61,76%) est constitué d'espèces d'origines pantropicales (32,35%) et

africaines (29,41%). Les espèces d'affinités cosmopolites, afro-malgaches asiatiques et australiennes ; asiatiques ; australiennes ; afro-malgaches et asiatiques, sont très peu représentées dans cette flore avec un total de 38,24%.



Figures 4 : Affinités biogéographiques des espèces recensées

Pt = Pantropicales; Af = Africaines ; Cosm = Cosmopolites, Masu = Afro- malgaches asiatiques et australiennes ; As = Asiatiques ; Asu = Australiennes ; Mas = Afro- malgaches et asiatiques

### 4. Modes de multiplication

Le mode de multiplication de ces adventices lianescentes varie d'une espèce à l'autre. Le mode le plus utilisé reste tout de même la graine (voie sexuelle = VS) avec 64,71%. Les plantes vivaces ont tendance à associer deux modes de

reproduction, comme les rejets, les boutures, les marcottes etc (voie végétative = VV) et la voie sexuelle (VS). En somme nous notons VS+VV = VSV que l'on observe chez les plantes vivaces (Fig. 5).

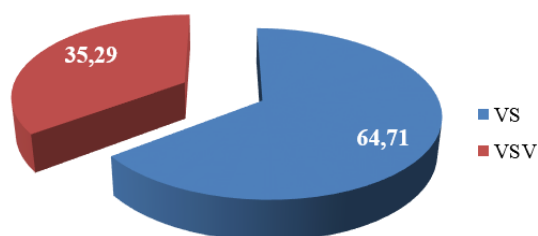


Figure 5 : Modes de multiplication des espèces répertoriées

## DISCUSSION

Le nombre total d'espèces adventices lianescentes enregistrées sur l'ensemble de cette étude menée au niveau du delta du fleuve Sénégal montre que cette flore est riche de 34 espèces réparties dans 23 genres et 10 familles. Comparé à la flore globale des adventices du delta et de la moyenne vallée du fleuve Sénégal [29] composée de 179 espèces réparties dans 117 genres et 46 familles, cette présente flore est loin moins riche. Cette flore adventice lianescente représente 1/5 de celle du delta et de la moyenne vallée du fleuve Sénégal.

Il ressort de cette étude que la famille des Convolvulaceae domine largement cette flore avec 41% des espèces lianescentes répertoriées. La même tendance est observée dans la structure de la flore globale du delta et la moyenne vallée du fleuve Sénégal [29]. Cette dominance pourrait s'expliquer par le fait que cette famille assez nombreuse qui, comme son nom l'indique, comprend presque exclusivement des espèces herbacées aux tiges souples, grimpantes qui s'enroulent généralement sur un support [17].

Les résultats montrent aussi que dans cette famille, le genre *Ipomoea* avec 8 espèces recensées et *Merremia* avec 3 espèces sont les plus importants. Ces observations rejoignent ceux de Berhaut [17] qu'indique qu'au Sénégal, cette famille renferme 15 genres dont le plus important est *Ipomoea* avec plus de 30 espèces, suivies du genre *Merremia* avec 7 espèces. Ce même auteur montre que la famille des Convolvulaceae renferme des espèces qui peuvent croître dans l'eau (*I. aquatica*) ou dans les sables secs (*I. pes-tigridis*). Généralement en agriculture, les plantes grimpantes s'enroulent sur la plante hôte pour la recherche de la lumière.

Les types biologiques notés montrent que la flore adventice est majoritairement composée de thérophytes. Cette dominance de thérophytes pourrait s'expliquer par la l'action de l'homme qui est la riziculture, principale activité réalisée dans cette zone. Ces thérophytes sont adaptées aux variations de conditions climatiques et aux perturbations culturales [30]. En culture annuelle, les travaux agricoles réalisés manuellement laissent peu de chance au développement des espèces vivaces et favorisent les espèces annuelles [31, 32]. Ces espèces thérophytes bouclent leur cycle rapidement au cours du cycle de la culture [1]. Il est aussi important de noter la présence d'une espèce parasite (*Cuscuta campestris*) qui ne vie au dépend de son hôte.

Au plan de la répartition géographique, les espèces pantropicales et africaines constituent plus de la moitié de la flore. Les espèces d'origine pantropicales sont plus nombreuses et représentent plus du quart (32,35%). L'importance des espèces pantropicales semble être liée à la position géographique du Sénégal qui est occidentale et océanique [30]. L'importance des espèces africaines pourrait s'expliquer par la position continentale et probablement par l'adaptation de ces espèces aux conditions bioclimatiques de la zone [1]. Les autres affinités biogéographiques sont faiblement notées à cause d'une introduction accidentelle lors des cultures de nouvelles variétés améliorées [33]. Selon Noba *et al.* [30], les autres espèces à faibles proportions ont dû être éliminées progressivement d'une part par les techniques culturales et les désherbages et d'autre part à cause de leur inadaptation aux conditions de la zone.

Deux modes de multiplication des adventices lianescentes sont notés.

C'est la multiplication sexuée, réalisée par des graines et celle végétative qui se fait à partir de la partie végétative de la plante. Certaines adventices se multiplient uniquement par les graines dont la majorité sont des thérophytes tandis que d'autres se multiplient par la combinaison des deux voies de multiplication (végétative et sexuée). Il ressort de ces résultats que les espèces qui combinent les modes de multiplication sont des hydrophytes.

## CONCLUSION

L'étude a permis de recenser 34 espèces appartenant à 23 genres réunies dans 10 familles d'adventices lianescentes. Cette flore est caractérisée par la prédominance des Convolvulaceae avec 41,18% suivie Cucurbitaceae avec 17,65%. Les thérophytes dominent nettement cette flore (58,82%) toutefois, les autres types biologiques sont faiblement représentées. Sur le plan de la répartition biogéographique, cette flore est dominée par les espèces pantropicales (32,35%) et africaines (29,41%). Il ressort aussi de cette étude que les adventices lianescentes se multiplient majoritairement par des graines (plantes annuelles) et aussi par combinaison de ce mode de multiplication avec la voie végétative (plantes vivaces plus)

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Bassène C. (2014). La flore adventice dans les cultures de maïs (*Zea mays* L.) dans le sud du Bassin Arachidier : structure, nuisibilité et mise au point d'un itinéraire de désherbage. Thèse de Doctorat Unique. Université Ckeikh Anta Diop de Dakar, 189 p.
- [2]. Akobundu I.O. 1987. Weed science in the tropics. Principles and practices, 474 p.
- [3]. Koch W., Beshir M.E., Unterladstatter R. (1982). Crop losses due to weeds, Improving weed management, FAO, Rome, Italie. pp. 154-165.
- [4]. Sauerborn J. (1991). The economic importance of the phytoparasites Orobanche and Striga. 5th Int. symp. of Parasitic Weeds, Nairobi, Kenya: pp. 137-143.
- [5]. Le Bourgeois T., Marnotte P. (2002). La lutte contre les mauvaises herbes. In Cirad-Gret-MAE [ed.], Mémento de l'agronome, Montpellier, France. pp. 663-684,
- [6]. Sauerborn J., Kroschel J. (1996). Underrated methods of weed control and their use in the agriculture of developing countries. IWCC Second International Weed Control congress, Copenhagen, Denmark, 2: 611-621.



- [7]. **SAED. (2012).** Le Delta du Fleuve Sénégal–Cirad. Dynamique des espaces agricoles dans le *delta du fleuve Sénégal*. [https://www.cirad.fr/file/Atlas+NEPAD+FR\\_planche17](https://www.cirad.fr/file/Atlas+NEPAD+FR_planche17).
- [8]. **Martignac C., Pariente P. (2002).** Canne à sucre, état des lieux : Les planteurs entre patrimoine et productivité. Economie de la Réunion (4ème trimestre 2002): pp.12-14.
- [9] **Mballo R. (2019).** Communautés d'adventices du riz irrigué de la vallée du fleuve Sénégal: structure de la flore, amplitude d'habitat, degrés d'infestation des espèces et itinéraire de désherbage. Thèse de Doctorat Unique. Université Cheikh Anta Diop de Dakar, 212 p.
- [10]. **Anonyme. (2014).** Note sur la maîtrise de l'eau dans la vallée du fleuve Sénégal, Société Nationale d'Aménagement et d'Exploitation des Terres du Delta du Fleuve Sénégal et des Vallées du Fleuve Sénégal et de la Falémé (SAED), 23 p.
- [11]. **Mboup M. (2014)** - Changements socio-environnementaux et dynamique de la végétation aquatique envahissante dans le delta du fleuve Sénégal (dans un contexte d'après barrages)- Thèse de Doctorat unique, UCAD. 182 p.
- [12]. **Diop O., Fofana M. B., & FALL A. A. (2008).** Caractérisation et typologie des exploitations agricoles familiales du Sénégal, Tome 1 Vallée du fleuve Sénégal. 38 p.
- [13]. **Noba K., Mbaye M.S., Coundoul M., Kane A., Hane P.D., Ba N., Mbaye N., Guissé A., Faye M.N. et Ba A.T. (2010).** La flore du Parc national des oiseaux de Djoudj-une zone humide du Sénégal. Sécheresse vol. 21, n° 1. 71-78.
- [14]. **Mbaye M.S. (2015).** Etude de référence sur la situation des plantes aquatiques au niveau des axes hydrauliques de la délégation de Dagana de la SAED. Rapport, 131 p.
- [15]. **Hutchinson J. & Daziel J. M. (1958).** Flora of West Tropical Africa 2<sup>nd</sup> Ed. Revised by R.W.J. Keay. C.A.O.G.A. The whitefriars Press L.T.D. London and Trombrige. Vol. II part 2. 533 p.
- [16]. **Berhaut J. (1967).** Flore du Sénégal. 2<sup>ème</sup> Ed. Dakar, clairafrique. 485 pp.
- [17]. **Berhaut J (1975).** Flore Illustrée du Sénégal. Tome III– CONNARACEES à EUPHORBIACEES. Editions Maisonneuve Diffusion Clairafrique Dakar, 634 p.
- [18]. **Berhaut J. (1976).** Flore Illustrée du Sénégal. Tome V – LEGUMINEUSES PAPIILLIONACEES. Editions Maisonneuve Diffusion Clairafrique Dakar, 658 p.
- [19]. **Merlier H., Montégut J. (1982).** Adventices tropicales. ORSTOM-GERDAT-ENSH, Montpellier, France, 490.
- [20]. **Le Bourgeois T. & Merlier H. (1995).** Adventrop: les adventices d'Afrique soudano-sahélienne. CIRAD-CA Montpellier. 637 p.
- [21]. **Lebrun J. P. & Stork A. (1991).** Enumération des plantes à fleurs d'Afrique Tropicale. Vol I. Edition des conservatoires et jardin botaniques de la ville de Genève. 249 p.
- [22]. **Lebrun J. P. & Stork A. (1992).** Enumération des plantes à fleurs d'Afrique Tropicale. Vol II. Edition des conservatoires et jardin botaniques de la ville de Genève. 257 p.
- [23]. **Lebrun J. P. & Stork A. (1995).** Enumération des plantes à fleurs d'Afrique Tropicale. Vol III. Edition des conservatoires et jardin botaniques de la ville de Genève. 341 p.
- [24]. **Lebrun J. P. & Stork A. (1997).** Enumération des plantes à fleurs d'Afrique Tropicale. Vol IV. Edition des conservatoires et jardin botaniques de la ville de Genève. 711 p.
- [25]. **APG III (2009).** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Botanical Journal of the Linnean Society, 161: 105–121.
- [26]. **Raunkier C. (1934).** The life forms of plants and statistical Plants Geography. Clarendon, Press, Oxford. 623 p.
- [27]. **Bassène C., Mansaly N., Mballo R., Camara A.A., Mbaye M.S., Noba K. (2018).** Structure et caractéristiques de la flore adventice de la ferme agricole de l'Université Gaston Berger de Saint-Louis (Sénégal). European Scientific Journal August 2018 edition Vol.14, N°24: 229-244. Doi: 10.19044/esj.2018.v14n24p229.
- [28]. **Hutchinson J. & Daziel J. M. (1972).** Flora of West Tropical Africa 2<sup>nd</sup> Ed. C.A.O.G.A. The whitefriars Press L.T.D. London and Trombrige. Vol. III. part 2. 298 p.
- [29]. **Mballo R., Bassene C., Mbaye M. S., Diallo S., Camara A. A., Noba K. (2018).** Caractérisation de la flore adventice du riz irrigué dans quatre sites d'expérimentation dans la vallée du fleuve Sénégal. Journal of Animal & Plant Sciences, 2018. Vol.38, Issue 2: 6257-6271. <http://www.m.elewa.org/JAPS>.
- [30]. **Noba K., Ba A.T., Caussanel J-P., Mbaye M.S., Barralis G. (2004).** Flore adventice des cultures vivrières dans le sud du Bassin arachidier (Sénégal). Webbia. 59 (2): 293-308.
- [31]. **Traoré H. (1991).** Influences des facteurs agroécologiques sur la constitution des communautés adventices des principales cultures céréalières (Sorgho, Mil, maïs) du Burkina- Faso. Thèse de Doctorat, USTL, Montpellier II. 180 p.
- [32]. **Bassène C., Mbaye M.S., Kane A., Diangar S. et Noba K. (2012).** Flore adventice du maïs (*Zea mays* L.) dans le sud du Bassin arachidier (Sénégal) : structure et nuisibilité des espèces. Journal of Applied Biosciences 59: 4307-4320.
- [33]. **Baker H.G. (1986).** Patterns of plant invasion in Northamerica. In. Ecology of Biological Invasions of North America and Hawai (éds H.A. Mooney & J.A. Drake). pp. 44-57.

## INITIATION A LA MICROPROPAGATION PAR MICROBOUTURAGE DE L'ARGANIER (*ARGANIA SPINOSA* L. Skeels)

AIZER Nassima<sup>1</sup>, ABDELLATIF Nabila<sup>2</sup>, SAIDI fairouz<sup>3</sup>, CHAOUIA Cherifa<sup>4</sup>

1. Laboratoire de Biotechnologies, Environnement et Santé. Département de Biologie et Physiologie Cellulaire. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Blida 1. B.P. 270, route de Soumaa ; Blida, Algérie.

2. Laboratoire de Biotechnologie des Productions Végétales. Département des Biotechnologies, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Blida 1. B.P. 270, route de Soumaa ; Blida, Algérie.

Reçu le 26/01/2019, Révisé le 19/12/2019, Accepté le 25/12/2019

### Résumé

**Description du sujet :** L'Arganier, *Argania spinosa* (L.) Skeels, est une espèce forestière de la famille des Sapotacées de l'ordre des Ebénales, endémique du sud-ouest algérien (région de Tindouf) cette espèce est en voie d'extinction. La régénération de cette espèce par voie naturelle est impossible. En effet, le recours aux techniques de biotechnologie végétale s'avère nécessaire pour préserver cette essence naturelle.

**Objectifs :** L'objectif de notre travail consiste à déterminer les conditions optimales pour la micropropagation par microbouturage de l'arganier.

**Méthodes :** Des vitrosemis d'*Argania spinosa* issues des graines germées *in vitro* sont repiquées sur milieu de culture Murashige et Skoog (MS) additionnés de différentes concentrations de phytohormones (treize combinaisons hormonales d'auxines et de cytokinines pour le débourrement, trois concentrations de gibbérelline (GA3) pour l'élongation caulinaire sont testées.

**Résultats et conclusion :** Les résultats obtenus montrent que la régénération de l'arganier par microbouturage est plus rapide et efficace pour la préservation de cette espèce. Nous avons enregistré un meilleur taux de débourrement avec un pourcentage de 100% au terme de 80 jours de mise en culture sur un milieu MS contenant (1mg/l Kin et 0,5mg/l AIA). L'adjonction de 1,5mg /l de GA3 au milieu de culture (MS) permet un meilleur allongement caulinaire d'ordre de 5cm des vitro-plants d'arganier après 60 jours de culture.

**Mots clés:** *Argania spinosa* ; micropropagation ; culture *in-vitro* ; débourrement ; allongement.

## INITIATION OF MICROPROPAGATION BY MICROBOUTURAGE OF ARGANIER (*ARGANIA SPINOSA* L.Skeels)

### Abstract

**Description of subject:** The Argan tree, *Argania spinosa* (L.) Skeels, is a forest species of the Sapotaceae family of the order Ebénales, endemic to southwestern Algeria (Tindouf region) this species is on the way extinction. Regeneration of this species by natural route is impossible. Indeed, the use of plant biotechnology techniques is necessary to preserve this natural essence.

**Objectives:** The objective of our work is to determine the optimal conditions for micropropagation microbouturing of the argan tree.

**Methods:** *Argania spinosa* vitro-seedlings derived from *in vitro* germinated seeds are subcultured on Murashige and Skoog (MS) culture medium supplemented with different concentrations of phytohormones (thirteen hormonal combinations of auxins and cytokinins for bud burst, three concentrations). of gibberellin (GA3) for the shoot elongation are tested.

**Results and conclusion:** The results obtained show that regeneration of the argan tree by microbouturing is faster and more effective for the preservation of this species. We recorded a better rate of bud burst with a percentage of 100% at the end of 80 days of culture on an MS medium containing (1 mg / l Kin and 0.5 mg / l AIA). The addition of 1.5 mg / l of GA3 to the culture medium (MS) allows a better elongation of 5cm of the argan vitro-plants after 60 days of culture

**Keywords:** *Argania spinosa* ; micropropagation, *in vitro* culture; bud burst; elongation.

\* Auteur correspondant : AIZER Nassima, Email : nacima.bio@gmail.com

## INTRODUCTION

L'arganier, (*Argania spinosa* L. Skeels), est une espèce unique de la famille des Sapotaceae. C'est un arbre endémique de Maroc, il se trouve également dispersé dans le sud-ouest de l'Algérie, notamment dans la région de Tindouf [1]. C'est un arbre épineux, pouvant atteindre 8 à 10 mètres de haut [2, 3], sa longévité peut atteindre 150 à 200 ans et il est très résistant à la sécheresse et à la chaleur [4]. Il joue un rôle très important tant par son intérêt écologique dans le maintien d'écosystème fragilisé par la désertification, que par son intérêt économique.

Cette essence a connu au fil des temps, d'importantes perturbations liées essentiellement au climat et à l'action anthropozoogène qui se traduit par des coupes massives et l'utilisation sauvage du bois d'arganier pour la production de charbon. D'autres pratiques d'exploitation favorisent, également, le surpâturage qui a transformé profondément la physionomie de ce fragile écosystème, induisant ainsi une modification profonde dans la répartition spatiale de cette essence [5].

Or, malgré son importance, cette espèce n'est pas valorisée en Algérie, donc l'élaboration d'une stratégie nationale pour la conservation et la lutte contre la disparition de l'espèce en question s'avère indispensable. Elle doit reposer sur la protection et l'intensification du reboisement. Cependant la multiplication

végétative traditionnelle pose d'importants problèmes pour cette raison nous avons utilisé les techniques modernes de multiplication notamment la micropropagation pas microbouturage qui permet à partir d'un matériel de départ souvent très restreint, d'obtenir en un temps court et dans un espace minimum, un rythme de multiplication extrêmement élevé [6].

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Matériel végétal

Les graines d'arganier ont été récoltées sur des pieds âgés de 15 ans de l'arboretum d'INRF de Baraki (Algérie), puis elles sont stérilisées et mises à germer.

### 2. Milieu de culture

Le milieu de culture de base utilisé est celui de Murashige et Skoog (1962) additionné de 0.1g/l d'acide ascorbique, de 30g/l de saccharose et solidifié par 7g/l d'agar, le pH est ajusté à 5.7. Les milieux sont répartis dans des tubes à essais (2.5×20cm) à raison de 15ml/tube ou dans des bocaux, puis autoclavés à 120°C durant 20min.

#### 2.1. Milieu de débourement (initiation)

Afin de sélectionner le milieu le plus performant pour le débourement des bourgeons des micro-boutures d'arganier, treize milieux à concentrations hormonales différentes d'auxines et de cytokinines sont testés (Tableau1).

Tableau 1: Balance hormonale du milieu d'initiation à la micropropagation

Milieux	BAP mg/l	Auxines mg/l	Kin mg/l
Mi0	0	0	0
Mi1	1	0,5 AIA	-
Mi2	1	0,5 AIB	-
Mi3	1	0,5 ANA	-
Mi4	1,5	0,5 ANA	-
Mi5	2	0,1ANA	-
Mi6	-	0,5 AIA	1
Mi7	-	0,5 AIB	1
Mi8	-	0,5 ANA	1
Mi9	-	0,5 AIA	1.5
Mi10	-	0.5AIA	
Mi11	-	-	1

#### 2.2. Milieu d'allongement

Quatre milieux à différentes concentrations de gibbérelline A3 (GA3) sont testés, afin de

mettre en évidence l'influence de cette hormone de croissance sur l'allongement des vitro-plants obtenus (Tableau 2).

Tableau 2: Concentrations hormonales testées pour le milieu d’allongement

Milieux	Concentrations de GA3 mg/l
Ma0	0
Ma1	0,5
Ma2	1
Ma3	1,5

**3. Mise en culture**

Des explants (de 0.5 à 1cm) obtenus des vitro-semis âgés de 28 jours sont utilisés pour l’initiation de microbouturage dans des tubes à essais puis transférés dans des bocaux contenant 100 ml de milieu de culture à raison de 10 microboutures par bocal. Ils sont placés ensuite dans une chambre de culture à une température de 25 ± 2°C sous une photopériode de 16/8h.

**RÉSULTATS**

**1. Etape de débourement**

**1.1. Taux de débourement**

Les résultats obtenus, après 80 jours de mise en culture, montrent que les milieux Mi0, Mi1, Mi5 et Mi6 donnent les meilleurs taux de débourement des bourgeons (100%) (Fig. 1).

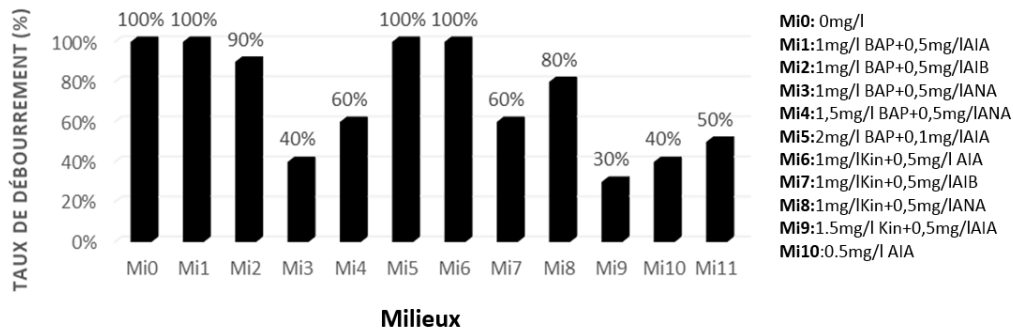


Figure 1: Taux de débourement des bourgeons chez *Argania spinosa* (L.)

**1.2. Développement des microboutures**

**1.2.1. Longueur**

L’analyse de la variance a révélé une différence très hautement significative ( $p < 0,000001$ ) du facteur milieu de culture sur la longueur des microboutures. En effet, le

milieu Mi6 (1mg /l Kin+0.5mg /lAIA) a un effet considérable sur l’élargissement des microboutures, elle est d’ordre de 1,96 cm (Fig. 2). Le test post hoc (Newman-Keuls) au seuil  $\alpha = 5\%$  fait ressortir 4 groupes homogènes (Tableau 3)

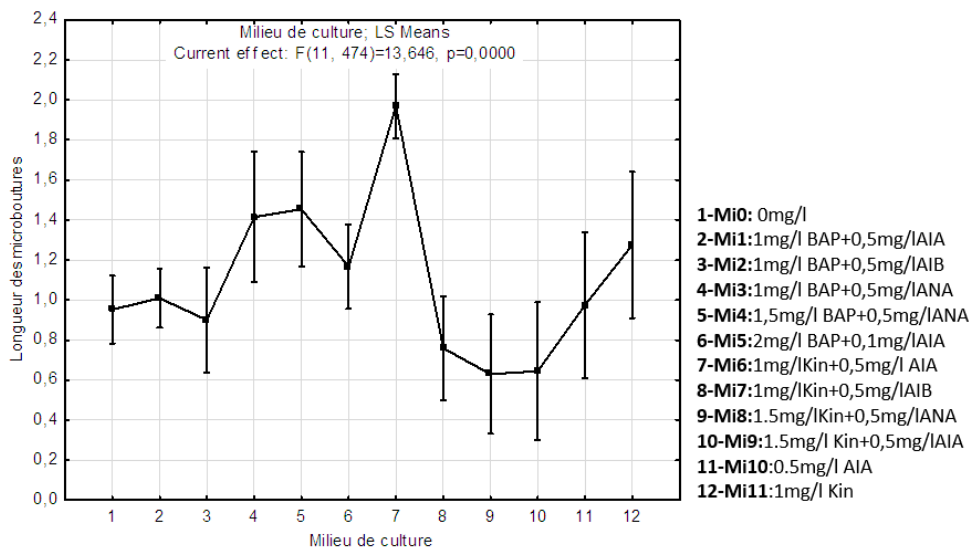


Figure 2 : Effet de l’équilibre hormonal sur la longueur des microboutures

Tableau 3 : Effet du milieu sur la longueur des microboutures (Test Newman-Keuls)

Cell No.	Milieu de culture	Longueur des microboutures Mean	1	2	3	4
9	9	0,6291	****			
10	10	0,6444	****			
8	8	0,7593	****		****	
3	3	0,9000	****	****	****	
1	1	0,9527	****	****	****	
11	11	0,9750	****	****	****	
2	2	1,0091	****	****	****	
6	6	1,1666	****	****	****	
12	12	1,2750		****	****	
4	4	1,4150		****		
5	5	1,4538		****		
7	7	1,9698				****

1.2.2. Nombre de bourgeons

L'analyse de la variance montre qu'il y a une différence très hautement significative de l'effet du milieu de débourrement sur le nombre moyen des bourgeons néoformés des

microboutures (Fig. 3). Le test de Newman-Keuls, fait ressortir trois groupes homogènes (Tableau 4). Le milieu Mi7 (1mg /l Kin+0,5mg /l AIA) est le plus favorable pour la néoformation des bourgeons.

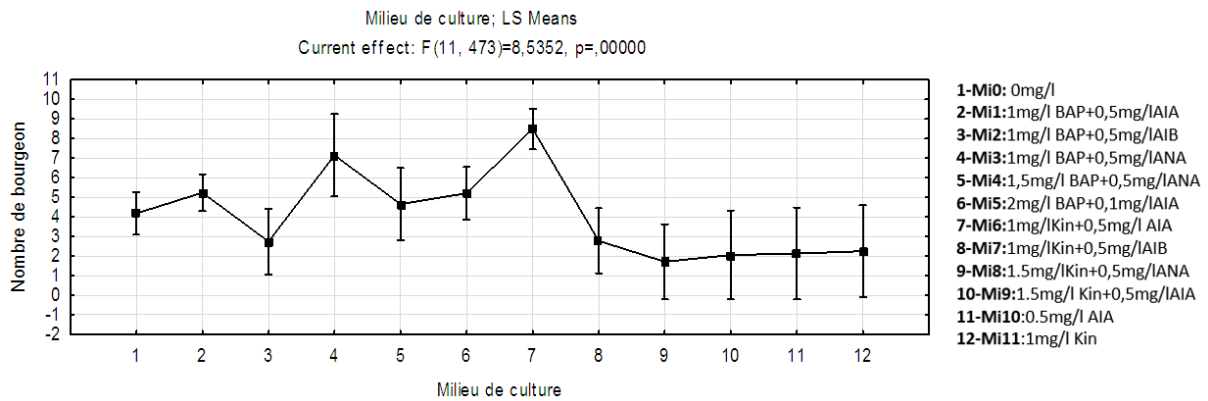


Figure 3 : Effet de l'équilibre hormonal sur le nombre de bourgeon par microbouture

Tableau 4 : Effet du milieu sur le nombre des bourgeons (Test Newman-Keuls)

Cell No.	Milieu de culture	Nombre de bourgeon Mean	1	2	3
9	9	1,7083	****		
10	10	2,0588	****		
11	11	2,1250	****		
12	12	2,2500	****		
3	3	2,7419	****		
8	8	2,7812	****		
1	1	4,1756	****	****	
5	5	4,6538	****	****	
6	6	5,2083	****	****	****
2	2	5,2346	****	****	****
4	4	7,1500		****	****
7	7	8,4939			****

**1.2.3. Nombre de feuilles**

L'analyse de la variance révèle une différence très hautement significative ( $p < 0,000001$ ) du facteur milieu de culture sur le nombre des feuilles néoformées par microbouture (Fig. 4). Le test de Newman-Keuls fait ressortir quatre

groupes homogènes (Tableau 5) le milieu Mi7 (1mg/l Kin+0,5mg/l AIA) est le plus favorable pour la néoformation des feuilles avec un nombre moyen des feuilles néoformées d'ordre de 16 feuilles.

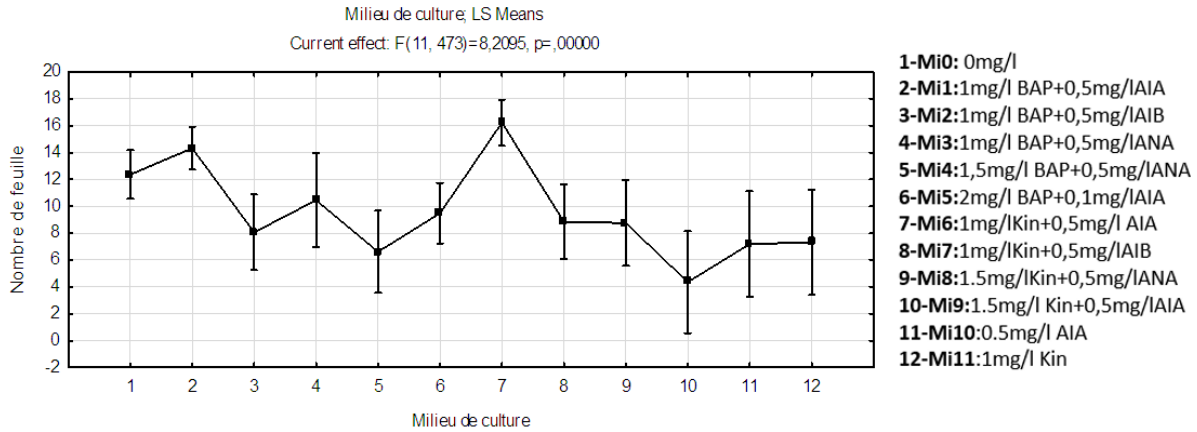


Figure 4 : Effet de l'équilibre hormonal sur le nombre des feuilles néoformées

Tableau 5 : Effet du milieu sur le nombre de feuilles (Test Newman-Keuls)

Cell No.	Milieu de culture	Nombre de feuilles Mean	1	2	3	4
10	10	4,3529	****			
5	5	6,6153	****	****		
11	11	7,1875	****	****		
12	12	7,3125	****	****		
3	3	8,0645	****	****	****	
9	9	8,7500	****	****	****	
8	8	8,8437	****	****	****	
6	6	9,4791	****	****	****	
4	4	10,4500	****	****	****	
1	1	12,3648		****	****	****
2	2	14,3265			****	****
7	7	16,2289				****

**1.3. Morphologie des microboutures**

Les résultats font remarquer que l'aspect morphologique de microboutures obtenues, après quatre subcultures donne de l'avantage aux microboutures évoluant sur le milieu de culture (Mi6), qui est conforme à celui de la plante mère (Fig. 5). Les feuilles sont alternées

lancéolées, de couleur vert sombre à la face supérieure, plus claire en dessous, conformes à celles de la plante mère. En revanche, les mêmes résultats signalent l'absence des épines sur ces microboutures en les comparant avec la plante mère.

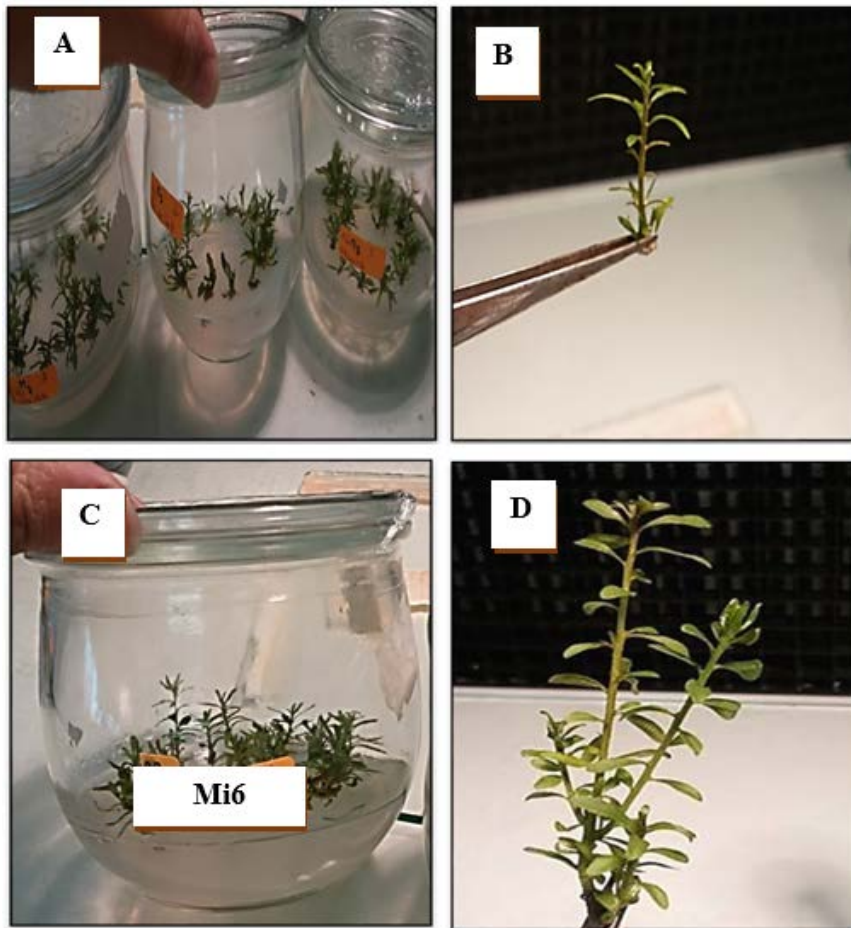


Figure 5: Aspect des microboutures d'*Argania spinosa* L.

A et B : Aspect des microboutures sur milieu Mi6 à la 1<sup>ère</sup> subculture. C : Aspect des microboutures sur milieu Mi6 à la 3<sup>ème</sup> subculture. D : Aspect des microboutures sur milieu Mi6 à la 4<sup>ème</sup> subculture

**2. Etape d'allongement**

L'analyse de variance montre un effet très hautement significative de milieu d'allongement sur l'élongation des microboutures (Fig. 6 et 7).

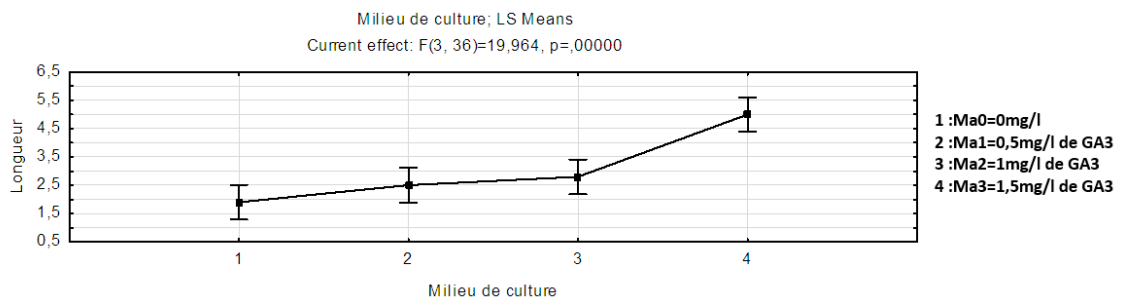


Figure 6 : Effet de GA3 sur l'allongement caulinaire des microboutures

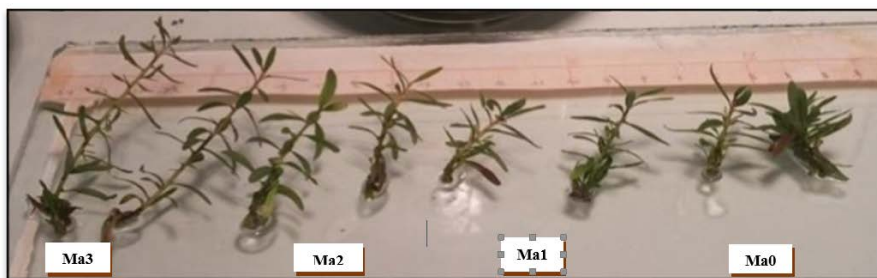


Figure 7 : Aspect des microboutures sur les milieux d'allongement

Le test de Newman-Keuls fait ressortir deux groupes homogènes (Tableau 6), le milieu Ma3 (1.5mg/l GA3) est le plus favorable pour l'allongement des microboutures avec une hauteur moyenne de 5cm.

Tableau 6 : Effet du milieu sur la longueur des microboutures (Test Newman-Keuls)

Cell No.	Milieu de culture	Longueur Mean	1	2
1	1	1,9000	****	
2	2	2,5000	****	
3	3	2,8000	****	
4	4	5,0000		****

## DISCUSSION

Le milieu Mi0 (témoin) a présenté un taux de débourrement de (100%) ceci peut s'expliquer par l'existence de l'apport interne des régulateurs de croissance qui sont utilisés par l'explant, pour se développer sur le milieu MS qui est aussi caractérisé principalement par une très forte teneur en azote dont le tiers est apporté sous forme réduite (ions  $\text{NH}_4^+$ ) et une concentration élevée en potassium ( $\text{K}^+$ ). Ces deux composants, interviennent fortement dans le développement des plantes. En outre, l'azote est l'élément minéral qui favorise le développement végétatif, tandis que le potassium favorise la division cellulaire [7]. Par contre à partir de la deuxième subculture, nous avons noté une baisse de la capacité de développement des microboutures.

Les microboutures dans les milieux Mi1 (1mg/l BAP+0,5mg/lAIA), Mi5 (2mg/l BAP+0,1mg/lAIA) et Mi6 (1mg/l Kin ; 0,5mg/l AIA) ont présenté un taux de débourrement des bourgeons très important (100%). En revanche, parmi ces trois milieux, c'est le milieu Mi6 (1mg/l Kin ; 0,5mg/l AIA) qui a fourni des vitro-plants vigoureux d'une longueur moyenne de 1.96 cm, 8 bourgeons et 16 feuilles néoformées. Selon Margara [7], les cytokinines associées aux auxines, favorisent généralement la prolifération *in vitro* des méristèmes préexistants ce qui explique le meilleur taux de débourrement des bourgeons, obtenu lors d'utilisation de cytokinines associées aux auxines. Selon Mdarhri Alaoui [8], l'apport de cytokinine à des valeurs comprises entre 0.5mg/l et 1mg/l pendant la phase d'initiation, s'avère efficace pour le débourrement des bourgeons d'arganier. De plus plusieurs auteurs ont souligné l'effet positif de kinétine sur le développement des pousses. Yagoub-Bougdal [9] a montré que le

développement des bourgeons d'olivier était plus important en présence de kinétine comparé à la BAP.

Le meilleur allongement caulinaire avec une moyenne de 5 cm est obtenu sur le milieu Ma3 avec 1,5mg/l de GA3. Chlyah et Demarly [10], signalent que la phase d'allongement préalable à l'enracinement peut être indispensable. Au cours de cette phase l'acide gibbérellique peut être un activateur de l'enracinement notamment chez *le Prunus myrobalan* et chez *le Pinus mugho*.

## CONCLUSION

Le débourrement des bourgeons axillaires ainsi que l'allongement caulinaire a été testé avec plusieurs combinaisons de phytohormones. Les résultats montrent que l'utilisation de milieu de culture Murashige et Skoog (1962), avec adjonction de, 0.1g/l d'acide ascorbique, du saccharose à raison de 30 g/l et de l'agar à 7 g/l, le pH = 5,7 avec la combinaison de Mi6 (1mg/l Kin ; 0,5mg/l AIA) donne les meilleurs taux (100%) de débourrement des bourgeons et des microboutures vigoureux. Le milieu d'allongement caulinaire Ma3 (1,5mg/l GA3) est favorable pour l'élongation des microboutures d'arganier où la longueur moyenne de la tige atteint 5 cm. La phase d'induction racinaire et d'acclimatation est en cours d'expérimentation.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Loussert R. (1989). *Les agrumes, production*. Ed sci. Vol 2, Liban, 280p.
- [2]. Jaccard P (1926) L'Arganier, Sapotaceae oléagineuse du Maroc, *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 203–209.
- [3]. Wagret P (1962) L'Arganeraie du sud Marocain relique du tertiaire et providence des populations. *Nature Science Progrès*, 390–393.



- [4]. **Charrouf Z (1999)** Valorisation des produits de l'arganier pour une gestion durable des zones arides du sud-ouest marocain. Actes du 4<sup>ème</sup> Colloque Produits naturels d'origine végétale, laboratoire d'analyse et de séparation des essences végétales, Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi, Québec, 195-209
- [5]. **Benkheira, A. (Juin 2009)**, "L'arganeraie algérienne". Conservation de la biodiversité et gestion durable des ressources naturelles, publication du projet ALG/00/G35, Numéro spécial, n°9, 15p.
- [6]. **Haicour, Robert, (2002)**, Biotechnologie végétale, techniques de laboratoire Tec & Doc. Lavoisier 305p 23-24.
- [7]. **Boulay, M, (1979)**, "Multiplication et clonage rapide du *Sequoia sempervirens* par la culture *in vitro*". Etu.et Rech. A.F.O.C.E.L. V.6, n°12 49-55.
- [8]. **Mdarhri Alaoui, M., Boukmou, J. et Bouzoubaa, Z. (2011)**, " Application de la biotechnologie pour la sauvegarde de l'arganeraie " : étude de la multiplication *in vitro*. Actes du Premier Congrès International de l'Arganier, Agadir, 119-123.
- [9]- **Yacoub-Bougdal S., Hamlat M. et Bonaly J, (1998)**. "Potentialités organogènes des embryons d'olivier (*Olea europea* L., var. Chemlal) cultivés *in vitro*", Sciences et technologie, Univ. Mentouri, n°9, , pp. 89-92.
- [10]. **Tsogas, M., Bouriquet, R.**, "Propagation de l'épicea par culture *in vitro* d'embryons et de plantules". Etu. et Rech. A.F.O.C.E.L. V.9, n°22, (1982), 346-367.

## PATHOGENICITY OF *FUSARIUM* AND *MICRODOCHIUM* SPECIES ASSOCIATED WITH CROWN ROT OF BARLEY (*HORDEUM VULGARE* L.)

BOUNGAB Karima<sup>1\*</sup>, MOKRANI Slimane<sup>1,2</sup> and RIGHI Kada<sup>1</sup>

1. University of Mustapha Stumbouli. Faculty of Natural and Life Sciences, Department of Agronomy. Laboratory of Research on Biological Systems and Geomatic (L.R.S.B.G). P.O. Box 305, 29000 Mascara. Algeria.

2. University of Bejaia, Faculty of Natural and Life Sciences, Department of Microbiology. Laboratory of Renewable Energies Management, 06000 Bejaia, Algeria.

Reçu le 24/05/2019, Révisé le 06/06/2019, Accepté le 17/08/2019

### Abstract

**Description of the subject:** Fusarium root and crown rot are a very important complex disease of cereals worldwide which may lead to very high yield losses.

**Objective:** The objective of this study is to evaluate the pathogenicity of four *Fusarium* and *Microdochium* species causing crown rot (FCR) in barley under controlled conditions.

**Methods:** Four fungal species were isolated from barley seedlings. Their pathogenicity was evaluated on the susceptible barley cultivar, as well as its effect on seedling growth and emergence.

**Results:** All species tested caused crown rot symptoms on the barley seedlings. *F. culmorum* and *F. graminearum* were the most pathogenic species, whereas, *F. equiseti* and *M. nivale* have intermediate pathogenicity. The root and shoot length were significantly reduced in infected seedlings.

**Conclusion:** Pathogenicity assessment of *Fusarium* isolates is crucial to develop effective control strategies against crown rot disease of barley.

**Key words:** Barley, *Fusarium spp.*, crown rot, seedling emergence, growth parameters.

## ÉTUDE DU POUVOIR PATHOGENE DE QUELQUES ESPÈCES DU GENRE *FUSARIUM* ET *MICRODOCHIUM* ASSOCIÉES A LA POURRITURE DU COLLET DE L'ORGE (*HORDEUM VULGARE* L.)

### Résumé

**Description du sujet :** La pourriture racinaire, et la pourriture du collet sont des maladies complexes très importantes des céréales dans le monde entier, qui peuvent entraîner des pertes de rendement très importantes.

**Objectifs :** L'objectif de ce travail est d'évaluer la pathogénicité de quatre espèces de *Fusarium* et de *Microdochium* causant la pourriture du collet (FCR) de l'orge dans des conditions contrôlées.

**Méthodes :** Quatre espèces fongiques ont été isolées à partir des plantules d'orge. Leur pathogénicité a été évaluée sur une variété d'orge sensible, ainsi que leur impact sur l'émergence et la croissance des plantules contaminées.

**Résultats :** Toutes les espèces testées ont causé des symptômes de pourriture du collet sur les plantules d'orge. *F. culmorum* et *F. graminearum* étaient les espèces les plus pathogènes, tandis que *F. equiseti* et *M. nivale* ont un pouvoir pathogène intermédiaire. La longueur des racines et des tiges ont été considérablement réduite chez les plantules contaminées.

**Conclusion :** L'évaluation de la pathogénicité des isolats de *Fusarium* est cruciale pour la mise au point de stratégies de lutte efficaces contre la pourriture du collet chez l'orge.

**Mots clés:** Orge, *Fusarium spp.*, pourriture du collet, émergence, paramètres de croissance.

\* Auteur correspondant : BOUNGAB Karima, E-mail : karima.boungab@yahoo.fr

## INTRODUCTION

Barley (*Hordeum vulgare* L.) is an important cereal crop for supplying human and animal food in the world. In Algeria, it is one of the main sectors of agricultural production particularly in semi-arid areas, and it shows an adaptation as compared with other cereals [1]. Despite this economic importance, barley suffers from many phytosanitary problems, which are probably the main causes of low production [2].

The genus *Fusarium* is one of the most relevant fungus affecting cereal crops in many areas of the world. The fungus can be soil borne, seed borne or carried in plant residue and can be recovered from any part of the plant from the deepest root to the highest flower [3]. Many *Fusarium* species are widespread and occur commonly as pathogens of wheat and barley, causing different diseases. Root rot, and crown rot are economically important diseases of cereals in many grain producing areas worldwide and appear to be particularly enhanced by dry climatic conditions [4]. Root colonization negatively affects plant development and leads to systemic plant invasion by tissue-adapted fungal strategies [5]. Some of those pathogens are able to form mycotoxins- secondary metabolites (eg fumonisin, moniliformin, trichothecenes) with

possible health hazards and significant influence on food safety [6].

The *Fusarium* crown rot infection cycle consists of three distinct phases: initial infection in which the pathogen proliferates around the site of infection, a lag phase in which little increase in fungal biomass or symptom development is observed, and a necrotrophic phase in which the pathogen rapidly colonizes internal crown tissue leading to development of necrotic lesions and stem browning [7]. The objective of this study was to compare the relative pathogenicity of *Fusarium* and *Microdochium* isolates on barley seedlings and their impact on seedling growth and emergence.

## MATERIALS AND METHODS

### 1. Presentation of the study area

Our surveys were carried out at a three sites, located in the Mascara department from February to March during the crop season 2017-2018 (Fig. 1). The first site is located between Mascara and Maoussa (35°23' N 0°11' E). The second site, El Hashem, is located in the East of Mascara (35°22' N 0°29' E). The third site, Ghriss, is located in the South from Mascara (35°14' N 0°9' E).



Figure 1: Study area of Mascara, Algeria, indicating the three districts sites covered by the survey

### 2. Sample collection

Sampling was carried out randomly at the edges and the center of the plots. This sampling, mainly concerned barley plants showing symptoms associated with seedling blight, and rotting of roots, crowns and stems of barley seedlings.

Samples collected at each site were immediately placed in Kraft paper bags that record the sampling site, phenological stage of the plant, and the date of collection. Samples were then transported to the laboratory for isolation and identification of phytopathogenic fungi.

### 3. Isolation and purification of plant pathogenic fungi

The diseased stems collected from each field were washed thoroughly under tap water. Three diseased crown or stem segments (1–1.5 cm) were collected from each plant. These sections were surface-sterilized sequentially with 3% sodium hypochlorite for 1–2 min, rinsed thrice with sterile distilled water, and then dried on a sterile filter paper. The samples were placed onto potato dextrose agar (PDA) (200 g of peeled potato, 20 g of dextrose, and 20 g of agar in 1,000 mL distilled water) medium containing 150 µg/mL streptomycin. The plates were incubated at 25°C for 7 days under a day/night photoperiod of 12/12 h.

Table 1: The isolates used in this study and their respective regions

Fungal species	Code	Plant part	Site of sampling
<i>Fusarium culmorum</i>	F1	Crown	Ghriss
<i>Fusarium graminearum</i>	F2	Crown	El Hachem
<i>Fusarium equiseti</i>	F3	Root	Maoussa
<i>Microdochium nivale</i>	F4	Root	El Hachem

The plant material used in all experiments is the susceptible barley variety Saida 183. The seeds of this variety were supplied by The Technical Institute of Field Crops in Saida.

Pots were prepared using soil autoclaved at 148 °C at for 45 min. The fungal isolates of *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. equiseti* and *M. nivale* were each grown on PDA medium for about 7 days. An agar plug (1 cm diameter) with mycelium only was cut from the periphery of the agar cultures and placed agar-side-up at the bottom of four 4-cm-deep holes made previously in each pot. Barley seeds (*Hordeum vulgare* L), variety Saida 183, surface-sterilized for 1 min in an aqueous solution of 0.6% NaOCl and rinsed twice in sterile deionized water, was then placed on top of the agar plug and covered with soil. An agar plug without fungus was used as a control treatment) [9].

The pots were watered daily with sterilized tap water and grown in a greenhouse at 21 to 25°C. The test included 5 replicates for each isolate. The emergence of the seedlings was evaluated 2 weeks after planting.

The assessment of disease severity index was carried out on each plant within each pot three weeks after inoculation. FCR disease symptoms were assessed using a four-point Browning Index (BI) scale (0: symptom less, 1: slightly necrotic, 2: moderately necrotic, 3: severely necrotic) [7].

Resulting fungal colonies were re-isolated on PDA to develop monoxenic cultures by taking hyphal tips. The isolates of *Fusarium spp.* were identified and purified using the single spore isolation protocol described by Xu et al. [8].

### 4. Effects of *Fusarium spp* isolates on Bartley seedling

#### 4.1. Pathogenicity test

Four isolates of *Fusarium* and *Microdochium* species recovered from barley seedling were used in this study. The following table represents the origin of the isolates tested.

Disease index (DI) was then calculated by using the following formula:  $DI = \frac{\sum (R_n \times X)}{N} \times 100$

Where:  $R_n$  is the number of plants in the category,  $X$  is the scale value of each plant, and  $N$  is the total number of plants assessed [10].

#### 4.2. Disease impacts on plant development

After evaluation of the disease index, the plants are carefully pulled up and washed. Root length (cm), and growth of aerial parts of inoculated and non-inoculated (control) seedlings were assessed in order to determine the effect of infection on seedling development.

### 5. Statistical analysis

Effects of *Fusarium spp.* isolates on Barley seedling emergence, inhibition of the emergence rate (IIR) and disease index (DI) were expressed by mean percentage values  $\pm$  standard deviation (SD). Data were analyzed by a one-way analysis of variance (ANOVA). Tukey test (Least significant differences, LSD) was used to estimate least significant range between means. Also, impacts of *Fusarium spp.* on Bartley growth traits (stem and root lengths) were analyzed by two-way ANOVA. Flowed, by Dunnett multiple comparisons. All results were statistically compared to their corresponding controls.

## RESULTS

### 1. Isolation and identification of fungi

Crown rot infection caused by *Fusarium* spp. was observed in various regions in Mascara. This Disease causes browning and necrosis of roots and consequently reduces seedling vigour and affects root and crown functions. Disease infects the stem base of barley causing necrosis and dry rot of the crown bases, often extending up 2 at 3 nodes, pinkish fungal growth was formed on lower nodes especially during moist weather (Fig. 2).

*Fusarium* species associated with symptoms were isolated and identified from different barley crops from Mascara. Identification of isolates recovered from roots and stem base sections of barley samples mainly revealed the presence of *F. culmorum*, *F. graminearum* *F. equiseti* and *M. nivale*. *F. culmorum* and *F. graminearum* dominated the fungi isolated from roots, whereas *F. equiseti* and *M. nivale* was the predominant *Fusarium* species isolated from crowns.



Figure 2: Symptoms of Fusarium crown rot (FCR) on barley

### 2. Effect of *Fusarium* spp on plant emergence

The barley variety Saida 183 is known for its high germination and emergence capacity. The emergence of the uninoculated control barley seedlings under laboratory conditions was 97.67 % (Table 2).

*Fusarium* spp. isolates had a significant effect on emergence of barley plants. The results obtained showed a variability in the emergence percentages of seedlings according to the pathogen inoculated.

*F. culmorum* induced highly emergence percentage reduction of barley seedlings 35.66%. The percentage of emerged plants decreased after inoculation with *F. graminearum* by 27%, when compared with uninoculated control, while the lowest percentage of inhibition was recorded in *F. equiseti* and *M. nivale* with 25.33% and 17.66 % respectively.

Table 2: Emergence rate of barley seedlings contaminated by *Fusarium* spp

Fungus	Control	<i>F. culmorum</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>F. equiseti</i>	<i>M. nivale</i>
ER% ± SD	97.67±2.52	62.00±4.00****	70.67±2.08***	72.33±4.04****	80.00±5.00%***

ER: Emergence rate ± standart deviation; \*\*\*\*: very highly significant difference; \*\*\*: highly significant difference at p=0.05.

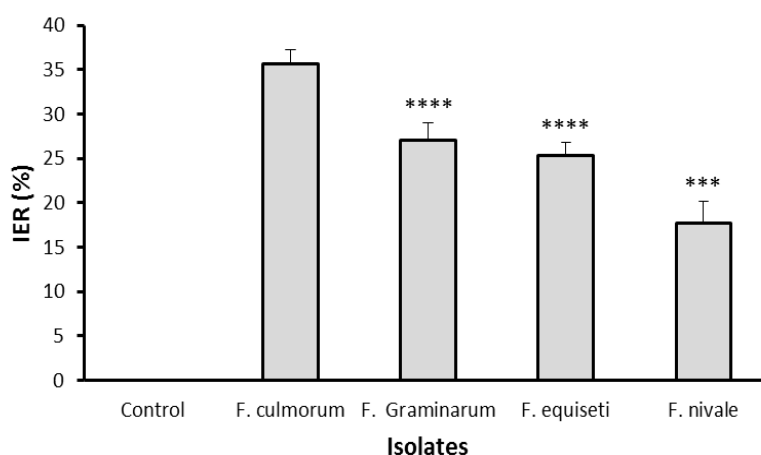


Figure 3: Effect of Fusarium isolates on the inhibition of the emergence of Barley seedlings (IIR: inhibition of the emergence rate). \*\*\*\*: very highly significant difference; \*\*\*: highly significant difference at  $p=0.05$ .

### 3. Effect of Fusarium spp on the disease index

Inoculations with Fusarium species caused discoloration of the subcrown internodes and crowns. *F. culmorum* and *F. graminearum* caused the greatest discoloration on both plant parts, whereas *M. nivale* and *F. equiseti* caused the least discoloration.

Diseased crowns are brown in contrast to the white color of healthy crowns (Fig. 4). Barley crowns rot to a greater or lesser degree depending on the stage and severity of disease development. Plants with severe crown damage generally do not survive. Those with moderate root and crown damage tiller sparsely.



Figure 4: Effect of artificial inoculation with *Fusarium spp* on barley seedlings (C: control, F1: *F. culmorum*; F2: *F. graminearum* ; F3: *F. equiseti*; F4: *M. nivale*)

All isolates of the three *Fusarium spp.* and *M.nivale* were able to cause crown rot of barley seedling, however, there was a significant difference in their pathogenicity. *Fusarium culmorum* proved to be the most severe pathogen and had a mean crown rot index of 2.8 (table 3). There was no significant difference in the mean crown rot index

between *F. culmorum* and *F. graminearum* (mean = 1.9) ( $p < 0.05$ ), Whereas, *Fusarium equiseti* and *M. nivale* exhibited weak aggressiveness on barley seedlings and had a mean crown rot index of 0.63 and 0.9, respectively. Control plants did not develop any symptoms.

Table 3: Mean disease index on barley seedlings evaluated 21 days after inoculation

Fungal species	Control	<i>F. culmorum</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>F. equiseti</i>	<i>M. nivale</i>
DI $\pm$ SD	0	2.8 $\pm$ 0.35****	1.9 $\pm$ 0.36****	0.63 $\pm$ 0.35*	0.9 $\pm$ 0.46**

DI $\pm$ SD: Disease index  $\pm$  standard deviation; \*\*\*\*: very highly significant difference; \*\*\*: highly significant difference, \*\*: moderate significant difference, \*: significant difference at  $p=0.05$ .

#### 4. Disease impacts on barley growth parameters

Laboratory infection of barley seedlings by fungi reduced root length, and shoot length of barley seedlings (figure 5). The root length of control barley plant was 17.50 cm, which was reduced to 14.36 and 14.70 cm after infection by *F. graminearum* and *F. culmorum* respectively. The length of shoot system was also affected.

Untreated barley plants were 22.30 cm long which became reduced to 17.73 cm after infection by *F. culmorum* and 18.63 cm after infection by *F. graminearum*. There was a significant decrease in the growth of barley shoot in infected plants compared with healthy plants (Fig. 5). On the other hand, the weakest effect on the growth of barley seedlings was recorded for *F. equiseti* and *M. nivale*.

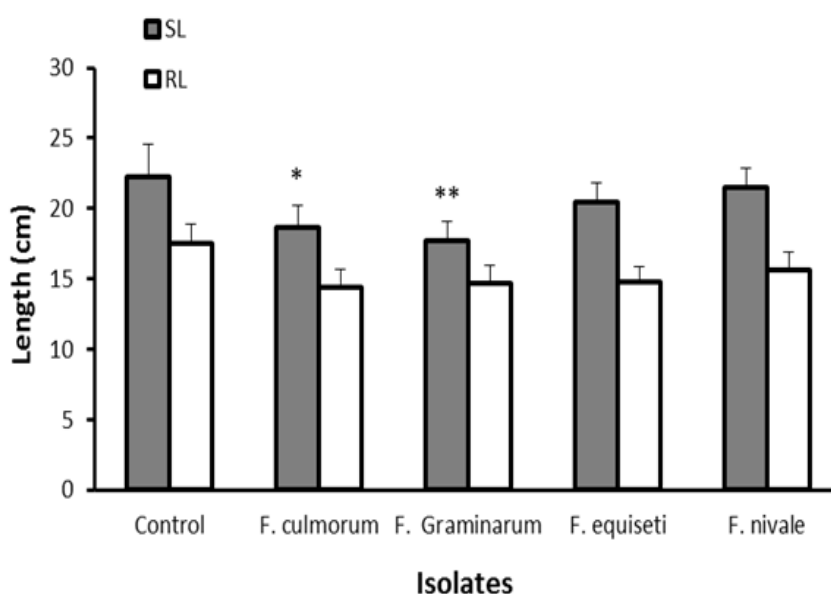


Figure 5: Effect of *Fusarium spp* on barley seedling growth (RL: root length; SL: stem length). \*\*: moderate significant difference, \*: significant difference at  $p=0.05$ .

## DISCUSSION

Fungal pathogens with a necrotrophic phase of their infection cycle, such as *Fusarium spp.*, cause substantial losses in grain crops globally, amounting to billions of dollars every year [11]. Crown rot of barley is caused by a complex of species, that includes *Fusarium pseudograminearum*, *F. graminearum*, *F.culmorum*, *F. poae*, *F. equiseti*, *F.avenaceum* and *Microdochium nivale* (formerly known as *Fusarium nivale*) [9, 12, 13]. The infection of the root and crown causes the vascular system to constrict, which limits the uptake and transport of water, causing whiteheads at the filling stage [12, 14].

Four fungal species were collected from the barley fields survey across Mascara city. Morphological identification of isolates revealed the presence of *F. culmorum*, *F. graminearum* *F. equiseti* and *M. nivale*. Their pathogenicity was evaluated on the susceptible barley cultivar "Saida 183".

The mycelium agar plug inoculation technique was used to evaluate the pathogenicity of *Fusarium* and *Microdochium* isolates on barley seedlings. This technique was adopted, since it has proved to be easier and require less time. In addition, some isolates of *F.spp* failed to sporulate abundantly. This technique has also been used by Fernandez and Chen [9] and Tunali et al. [15].

The typical necrosis symptoms were present after inoculation with all the *Fusarium* species, confirming their ability to cause FCR. For all measurements taken, *F. culmorum* and *F. graminearum* induced the highest disease severity index, whereas *F. equiseti* and *M. nivale* were the weakest pathogenic species. Variation in the disease severity can result from differences in the aggressiveness of fungal isolates. Variability among species and isolates should be considered when designing strategies for controlling this disease.

The results of seedling pathogenicity tests are in agreement with previous reports on the fungal pathogenicity of crowns of barley.

Fernandez and Chen [9] found that *F. culmorum* and *F. graminearum* were more aggressive as crown rot pathogens than *F. avenaceum* under greenhouse conditions. Other *Fusarium* strains that caused less severe FCR on wheat or barley seedlings in greenhouse tests included some isolates of *F. equiseti*, *F. acuminatum*, *F. proliferatum* and *M.nivale* [16, 12, 9].

Both isolates recorded from root or crown of barley seedling induces crown rot in barley seedlings after 21 days of inoculation. These findings are in agreement with Paulitz [17], who found that the symptoms of *Fusarium* root rot crown rot are often associated with those of crown rot because these pathogens are also able to infect the roots and grow to the crown.

All the inoculated isolates caused emergence percentage reduction of barley seedlings. Fernandez and Chen [9] also found that *F.culmorum* affected plant emergence to a greater extent than *F.graminearum*, *F. avenaceum*, *F. equiseti*, or *F. poae*.

In artificial inoculation studies most of the *Fusarium* isolates tested reduced seedling root and shoot growth barley seedlings. Growth of the surviving plants was retarded most by *F. culmorum* and *F. graminearum*. Whereas, *F. equiseti* and *M. nivale* caused the weakest reduction in root length, and shoot length of barley seedlings which was not significantly different from the control. Similar results had been recorded by Neumann and Xue [18], who tested the reactions of field pea cultivars to four races of *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi., they found that wilt severity was significantly correlated with reduction in shoot length, and that the reduction in shoot length could be used to supplement the visual severity rating for fusarium wilt in field pea.

## CONCLUSION

FCR disease is an endemic disease in barley crops caused by different pathogens of the genera *Fusarium*. Predictions associated with climate change suggest considerable yield loss and widespread distribution of the pathogens associated with this crown and root rot complex in Algeria. Therefore, preventive measures should be taken to reduce pathogen infection and spread, by using integrate pest management for the disease through using resistance cultivars, biological control, rotation and crop management.

## REFERENCES

- [1]. Bouchetat F. et Aissat A. (2018). Analyse génétique de quelques génotypes d'orge (*Hordeum vulgare* L.) et de leurs descendants en vue d'une évaluation de quelques caractères a intérêt agronomiques. *Agrobiologia*, 8 (1): 792- 801.
- [2]. Boungab K., Belabid L. and Fortas Z. (2009). Net blotch of barley in northwestern Algeria. *Arab Journal of Plant Protection*. Abstracts Book. 27 : F74.
- [3]. Summeral B.A., Salleh B. and Leslie J.F. (2003). A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Disease*, 87:117–128.
- [4]. Burgess L.W., Backhouse D., Summerell B.A. and Swan L.J. (2001). Crown rot of wheat. Pages 271–294. in B.A Summerell, J.F Leslie, D Backhouse, W.L Bryden, LW Burgess (eds.), 'Fusarium: Paul E Nelson Memorial Symposium'. The American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota.
- [5]. Wang Q., Buxa S.V., Furch A., Friedt W. and Gottwald S. (2015). Insights into *Triticum aestivum* seedling root rot caused by *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant –Microbe Interactions*. 28(12): 1288-1303.
- [6]. Bennett J.W. et Klich M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16: 497-516.
- [7]. Beccari G., Covarelli L. et Nicholson P. (2011). Infection processes and soft wheat response to root rot And crown rot caused by *Fusarium culmorum*. *Plant Pathology*. 60(4): 671-684.
- [8]. Xu F., Song Y. L., Zhou Y. L., Zhang H., Wang J. M. and Li Y. H. (2016). Occurrence dynamics and characteristics of *Fusarium* root and crown rot of wheat in Henan Province during 2013-2016. *Plant Protection*, 42:126–132.
- [9]. Fernandez M.R. et Chen Y. (2005). Pathogenicity of *Fusarium* species on different plant parts of spring wheat under controlled conditions. *Plant Disease*, 89(2):164-169.
- [10]. Çakır B., Gül A., Yolageldi L. and Özaktan H. (2014). Response to *Fusarium oxysporum* f. sp. radicle-lycopersici in tomato roots involves regulation of SA-and ET-responsive gene expressions. *European Journal of Plant Pathology*, 139 (2): 379-391.
- [11]. Savary S., Ficke A., Aubertot J-N., Hollier C. (2012). Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. *Food Security*, 4: 519–537.



- [12]. **Cook R.J. (2010)**. Fusarium root, crown, and foot rots and associated seedling diseases. p. 37-39. In Bockus, W.W., R. Bowden, R. Hunger, W. Morrill, T. Murray, and R. Smiley (eds.) Compendium of wheat diseases and pests. 3rd ed. The Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, USA.
- [13]. **Moya-Elizondo E. (2013)**. Fusarium crown rot disease: biology, interactions, management and function as a possible sensor of global climate change. *Ciencia e Investigación Agraria*, 40(2): 235-252.
- [14]. **Poole G. J., Smiley R.W., Walker C., Huggins D., Rupp R., Abatzoglou J., Garland-Campbell K., and Paulitz T.C. (2013)**. Effect of climate on the distribution of *Fusarium spp.* causing crown rot of wheat in the Pacific Northwest of the United States. *Phytopathology*, 103:1130- 1140.
- [15]. **Tunali B., Nicol J.M., Hodson D., Uçkun Z., Büyük O., et Erdurmuş D. (2008)**. Root and crown rot fungi associated with spring, facultative, and winter wheat in Turkey. *Plant Disease*, 92:1299-1306.
- [16]. **Brennan J.M., Fagan B., van Maanen A., Cooke B.M., and Doohan F.M. (2003)**. Studies on *in-vitro* growth and pathogenicity of European *Fusarium* fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 577-587.
- [17]. **Paulitz T.C. (2006)**. Low input no-till cereal production in the Pacific Northwest of the U.S.: the challenges of root diseases. *European Journal of Plant Pathology*, 115: 271–281.
- [18]. **Neumann S. and Xue A.G. (2003)**. Reactions of field pea cultivars to four races of *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi. *Canadian Journal of Plant Science*. 83: 377–379.

## PREVISION DU MILDIOU DE LA POMME DE TERRE DANS LE NORD-OUEST ALGERIEN

ABDERRAHMANE Omar <sup>1,2\*</sup>, BERDJA Rafik <sup>3</sup> et BENCHABANE Messaoud <sup>1</sup>

1. Université de Blida1, Faculté SNV - Laboratoire de la protection et développement des ressources agrobiologiques (LPVRAB), BP 270, Blida 09000, Algérie.
2. Université Djilali Bounaama, Faculté SNV, Département des sciences agronomiques, Route de Theniet El Had, 44225. Khemis Miliana, Algérie.
3. Université de Batna 1, Faculté SNV, laboratoire de recherche en amélioration des techniques de protection phytosanitaire en agrosystèmes montagnoux (LATPPAM), avenue Chahid Boukhrouf 05000 Batna, Algérie.

*Reçu le 06/06/2019, Révisé le 15/12/2019, Accepté le 28/12/2019*

### Résumé

**Description du sujet :** Le présent travail a pour but de tester la validité de deux modèles prévisionnels (Smith et Negfry) en termes de pouvoir prévisionnel de la maladie du mildiou dans la vallée du Chelif Algérien.

**Objectifs :** L'objectif principal du présent travail est de mettre en exergue les différents facteurs de risque de développement de la maladie du mildiou de la pomme de terre et de recommander un programme de lutte chimique dans le nord-ouest Algérien.

**Méthodes :** Les informations concernant : la date de plantation, l'utilisation des fongicides, l'intensité et la progression de la maladie sont recueillies et utilisées en terme d'entrées des deux modèles de Smith et Negfry, afin d'obtenir des prévisions en terme de recommandation de traitements fongicide.

**Résultats :** Les deux modèles ont montré une bonne sensibilité aux épidémies en lançant des avertissements pertinents allant de 04 à 07 jours avant leurs occurrences réelle du mildiou sur terrain.

**Conclusion :** L'application de ce type d'approche contemporaine de recommandation et application de fongicides appropriés durant les périodes critiques d'initiation de la maladie du mildiou peut retarder ou éventuellement éviter le développement d'épidémies ; approche que nous recommandons de manière vive et qui pourrait avoir des répercussions concrètes en terme de diminution de pertes économiques.

**Mots clés :** Mildiou, Pomme de terre, Epidémie, Lutte, fongicide, NegFry, Période de Smith.

## POTATO DOWNY MILDEW FORECAST IN NORTHWEST ALGERIA

### Abstract

**Description of the subject:** The purpose of this work is to test the validity of two predictive models (Smith and Negfry) in terms of their predictive power of downy mildew disease in the Algerian's Chelif Valley.

**Objective:** The main objective of this work is to highlight the different risk factors for the development of downy mildew disease in potatoes and to recommend a chemical control programme in northwestern Algeria.

**Methods:** Information on: planting date, fungicide use, disease intensity and progression are collected and used in terms of inputs from both Smith and Negfry models to obtain predictions in terms of fungicide treatment recommendations.

**Results:** Both models showed good sensitivity to epidemics by issuing relevant warnings from 04 to 07 days before the actual occurrence of late blight in the field.

**Conclusion:** The application of this type of contemporary approach of recommending and applying appropriate fungicides during critical periods of late blight disease initiation can delay or possibly avoid the development of epidemics; this approach is strongly recommended and could have concrete repercussions in terms of economic losses reduction.

**Keywords:** Mildew, Potato, Epidemic, Disease control, Fungicide, NegFry, Smith's Period.

\* Auteur correspondant : ABDERRAHMANE Omar, E-mail : 3marabd@gmail.com

## INTRODUCTION

En Algérie, la pomme de terre est une culture stratégique, elle représente la deuxième source de carbohydrate dans le régime alimentaire des algériens. En 2016, la production a atteint 4,7 million de tonne soit le double de la production de 2006 (2,18 million de tonnes) [1, 2]. La totalité de cette production est destinée à la consommation locale. Les plans de développement agricoles misent sur l'élargissement des zones de cultures de cette espèce et à la production de semences pour répondre aux besoins de consommation qui ne cessent d'augmenter.

Cependant et en dépit des efforts financiers consenti pour le développement de cette culture, le mildiou ne cesse de provoquer des pertes considérables depuis l'épidémie sévère de 2007 [3, 4]. Des épidémies fréquentes et graves sont enregistrées dans la culture de saison et d'arrière-saison (60% et 35% de la production totale respectivement) [5].

Le mildiou de la pomme de terre causé par *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, est considéré comme étant la maladie la plus redoutable sur les cultures de pomme de terre, mêmes après de nombreuses années depuis ses premiers signalements et la proposition de différentes spécialités chimiques, cette maladie à caractère épidémique demeure être une réelle menace. L'impact financier de cette pathologie reste lourd et onéreux ou à titre d'exemple [1], estiment le coût de contrôle phytosanitaire à plus de 5,2 milliard de Dollars.

La maladie se développe en présence d'un fin film d'eau sur le feuillage qui se forme par la suite d'un arrosage par aspersion, des rosées persistantes du matin ou de par les de pluies orageuses le soir. L'ensemble de ces conditions est fréquemment associés à des taux d'humidité relative supérieure à 90 % [6].

Les stratégies de lutte mise en place face à cette maladie reste dans l'ensemble basé sur l'utilisation des fongicides tel que : Prévicure, Infinito, Consento, Sereno, Equation Pro, Curzate, Mancozébe, Ridomil, Manèbe. Globalement, l'application de ces produits chimiques se réalisent de façon systématique, sans planification prévisionnelle, à raison de un à deux traitement tous les quinze jours.

Une telle situation dénote de l'usage excessif des fongicides, qui souvent engendrent la pollution et la persistance de traces résiduelles de matières actives pesticides sur les tubercules. Ceci a pour conséquence, le développement de la résistance aux pesticides chez l'agent pathogène. L'objectif de notre travail est d'améliorer l'efficacité de la stratégie de control chimique, actuellement la seule opérationnelle, sur la base d'application des modèles prévisionnels (la période de Smith et Negfry).

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Pour mieux comprendre le développement de la maladie dans la région d'étude, des informations sur : la date de plantation, l'utilisation des fongicides, l'intensité et la progression de la maladie ainsi que des données météorologiques sont recueillis.

### 1. Région d'étude

La surveillance de la maladie a été menée dans deux régions du nord-ouest Algérien : Chlef (36°15'0" N, 1°15'0" E) et Mostaganem (35°55'52" N, 0°5'21" E) pendant une durée de trois ans (2013, 2014 et 2016), dans la culture de saison, qui s'étalent de mi-décembre jusqu'à Mai (Fig. 1). Notre étude s'est intéressée particulièrement aux plantations Spunta, sensible au mildiou, car elle occupe plus de 60% de la superficie cultivée.

### 2. Caractéristiques climatiques

La région de Chlef se caractérise par un climat semi-aride de type méditerranéen. La pluviométrie annuelle y est très irrégulière (160 mm à 400 mm). Deux saisons, une saison froide (octobre - Avril) et une saison chaude (Avril - septembre) très sèche marquée par des épisodes orageux. La température moyenne annuelle avoisine les 20°C avec un écart de températures l'ordre de 20°C entre les deux saisons [6].

La région de Mostaganem est caractérisée par un climat méditerranéen Chaud et sec en été, tiède et pluvieux en hiver, avec une pluviométrie annuelle de 398 mm. Les précipitations mensuelles maximales au cours de l'année se situent aux mois de novembre et Mars. La température moyenne annuelle est de l'ordre de 17.7°C pour un écart de 15.4°C [7].

Les données climatiques ont été collectées à partir des stations de l'office national de météorologie[8].

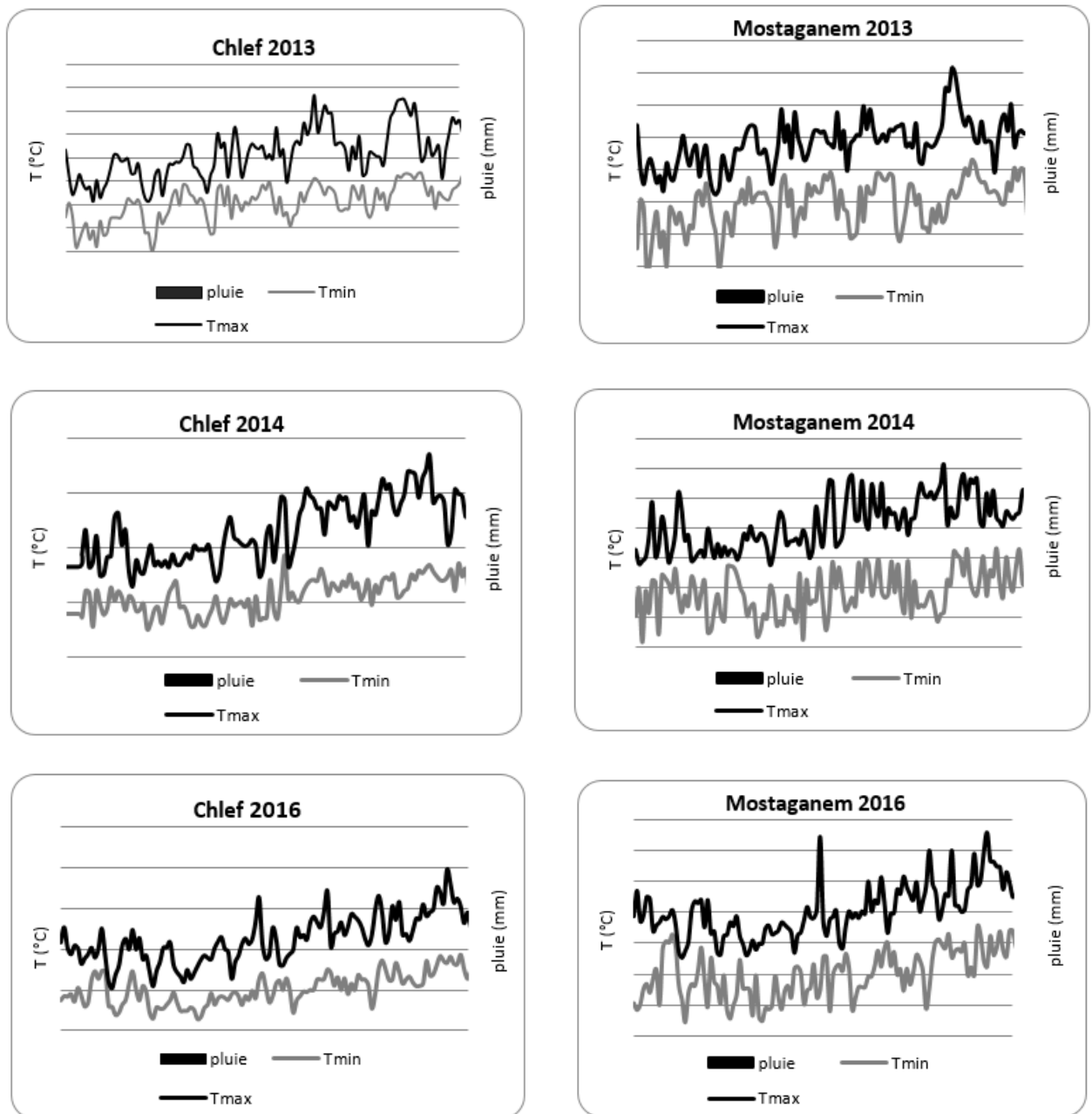


Figure1. Condition météorologique pour la culture de saison

### 3. Traitements phytosanitaires

Dans les deux régions d'étude, deux à cinq traitements ont été appliqués au long de la campagne de culture. Les traitements préventifs avec les fongicides de contact sont généralement appliqués à partir de fin Février et

début de Mars. La plupart des fongicides utilisés sont de type systémiques et curatives et sont appliquées au mois d'Avril pour anticiper sur les épidémies à venir (Tableau 1).

Tableau 1. Les traitements phytosanitaires appliqués.

Région		Chlef		Mostaganem	
Année		Date	Fongicide	Date	Fongicide
2013	1	01 Mars	Manèbe	19 Mars	Manèbe
	2	20 Mars 04Avril	Prévicure	22 Avril	Propinèbe
	3	04 Avril	Prévicure	30 Avril	Ridomil
	4	07 Avril	Prévicure	07 Mai	fortune
2014	1	16 Avril	Vacomil	20Février	Propinèbe
	2	28 Avril	electis	21 Mars	Mancothame
	3			27 Mars	Vacomil
2016	1	11 Avril	Electis	20Février	Manèbe
	2	14 Avril	Manco-C	05 Mars	Manèbe
	3			30 Mars	Propinèbe
	4			02 Avril	Vacomil
	5			13 Avril	Fortune

#### 4. Evaluation de la maladie

Dans chaque région d'étude, nous avons surveillé trois parcelles de différentes tailles allant de 01 à 15 Ha. Dans chaque parcelle, trois sous parcelles ont été suivi de manière hebdomadairement pour calculer la sévérité de l'infection (pourcentage de surface foliaire couverte par le mildiou; échelle d'évaluation ordinale) selon la clé de James [9]. Ces données ont été utilisées pour calculer la valeur de l'aire sous courbe de progression de la maladie (Area Under the Disease Progression Curve) [10] par la formule suivante :

$$AUDPC = \sum_{i=1}^n [(Y_{i+n1} + Y_i)/2][X_{i+1} - X_i]$$

Où  $Y_i$  : est la sévérité du mildiou à l'observation  $i$ ,  $X_i$  : est le temps en jour à l'observation  $i$  et  $n$  est le nombre total d'observation.

#### 5. Modèles prévisionnels

Dans la présente étude, nous avons utilisé deux modèles prévisionnels à savoir : le modèle de la période de Smith et le modèle dit, NegFry. L'application de ces modèles a commencé à partir du mois de Février. Cette décision a été adoptée étant donné les conditions climatiques et l'historique des attaques de mildiou.

#### 6. Le modèle de la période de Smith

Le modèle de la période de Smith, constitue depuis plus de 60 ans (1956-2019),

le principal system d'avertissement phytosanitaire du mildiou de la pomme de terre en Grande Bretagne. Ce dernier prend comme variables d'entrées la température minimale et l'humidité et considère qu'une période de Smith se produit totalement (100 %) lorsque : (i) la température minimale est supérieure à 10 °C, (ii) l'humidité relative est supérieure à 90 % pendant 11 h, durant deux jours consécutifs.

Si les critères du premier jour sont accomplis et le deuxième jour atteint seulement 10 heures d'humidité relative supérieur à 90%, ceci indique que 90% de la période de Smith a été atteinte [11].

#### 7. Le modèle NegFry

Ce modèle prévisionnel du mildiou de la pomme de terre a été développé par l'institut Danois d'étude des sciences végétales et du sol (Plant and Soil Science Institute) en 1995. Ce dernier, a été dérivé à partir de deux modèles de simulation qui décrivent pour le premier, les effets du climat sur la distribution et la quantité de fongicide. Concernant le deuxième modèle, celui-ci décrit les effets de résistance de l'hôte associés à l'action du climat, sur le développement de *Phytophthora infestans*.

Dans ce modèle, les unités de mildiou sont calculées à partir du nombre d'heures consécutives d'humidité relative supérieur ou égal à 90 %, et la température moyenne répartie entre six (06) intervalles < 3 °C, 3-7 °C, 8-12 °C, 13-22 °C, 23-27 °C et > 27 °C [12].

## RÉSULTATS

### 1. Situation générale du suivi phytosanitaire de la culture

Les premiers symptômes révélateurs du début de la maladie du mildiou se manifestent un mois et demi voir jusqu'à deux mois à partir de la date des premières émergences de la culture (mi-Février - Début Mars). Ces apparitions se manifestent sous forme de petites lésions éparses. Ces dernières, se développent lentement étant donné les températures défavorables (<10°C) qui règnent durant les périodes humides.

Ces lésions, sont souvent maîtrisées grâce à l'action des fongicides de contact qui entravent le développement de ses foyers primaires en épidémie telle que celle que nous avons vécu dans la wilaya de Chlef en l'année 2013 (tableau 2). Durant cette année, un cumul de plus de 60 mm de pluie durant la dernière semaine du mois de Février associé à et une température maximale variant entre 10,5 et 18,7°C, ont réuni les conditions favorables qui ont engendré l'apparition d'une épidémie précoce qui selon notre estimation de terrain a causé près de 60% de perte par rapport aux saisons normales, sans épisodes épidémiques.

Tableau 2. Résultats de la surveillance de la maladie

Année	Région	Date de plantation	Premiers symptômes	Début épidémie	Nombre de traitement	AUDPC
2013	Chlef	08 déc.	23 fév.	01 Mars	4	210
	Mostaganem	15 déc.	15 Mars	26 Avril	4	297,5
2014	Chlef	10 janv.	22 Avril	absence	2	9
	Mostaganem	10 déc.	18 fév.	absence	3	29
2016	Chlef	25 déc.	09 Avril	09 Avril	2	540
	Mostaganem	15 déc.	09 Avril	absence	5	7

La comparaison des dates d'apparition des premières lésions entre les deux régions d'étude, indique l'existence d'un décalage temporel dans l'apparition des premiers foyers du mildiou, du fait que la région de Mostaganem soit une région côtière où les dates de plantation sont souvent avancé de quelque jours jusqu'à un mois par rapport à la région de Chlef.

La saison chaude commence à partir du mois d'Avril et est souvent marqué par une instabilité climatique (Alternance entre période humide et sèche) favorable au développement de la maladie. Sous ces latitudes, la plupart des épidémies de mildiou ont été enregistrée durant le mois d'avril. Durant ce mois, nous avons noté la prévalence d'un climat pluvieux et chaud, identique à celui qui a régné lors de l'épidémie de 2007 qui a touché la totalité du nord-ouest Algérien (Mostaganem 2013 et à Chlef 2016). A Chlef et à Mostaganem, un cumul respectif de 22,8 mm et 50 mm de précipitations pendant trois jours successifs associé à des températures minimales et maximales variant respectivement entre [9 et 12,8°C & 18,6 à 19,2°C] et une température moyenne variant entre 13 et 17°C pour la région de Chlef. Dans les deux aires géographiques, un ciel couvert caractérisée par une absence plus moins totale de rafales de vent

a été observé lors des épidémies précédant les attaques de mildiou.

En parallèle, La valeur de l'indice AUDPC (Area Under the Disease Progression Curve) enregistré au courant de l'année 2013 pour les deux régions d'étude et en 2016 pour la seule région de Chlef, indique que la maladie a progressé de manière épidémique. Cette constatation est le signe de l'inefficacité et l'échec du programme de traitement phytosanitaire qui a été adopté dans ses deux wilayas (Tableau. 1) et où les matières actives les plus couramment utilisé sont : Mancozèbe, Propineb, Manébe, Metalaxyl et Propamocarb. Les traitements appliqués à base de fongicides systémiques sont appliqués de façon curative après les pluies. Dans la région de Chlef (2013, 2016), les premiers traitements ont consisté en un fongicide de contact qui a respectivement été appliqué le premier et troisième jour du début de l'apparition de l'épidémie. Tandis que dans la région de Mostaganem, un fongicide de contact a été pulvérisé quatre jours avant le début de l'épidémie.

Dans l'ensemble, le nombre total de traitement chimique a varié entre deux (02) et cinq (05) traitements et ce en fonction de la pression de la maladie, des ressources matérielles et de la balance traitements / rentabilité économique des agriculteurs.

**2. Previsions des modeles de simulation**

Dans la présente étude, nous avons évalué la capacité prévisionnelle de deux modèles de simulation à savoir le modèle donnant ladite période de Smith et NegFry, pour leurs

capacités à détecter les périodes critiques et à lancer des avertissements phytosanitaires pertinents. Les résultats de ces modèles sont illustrés dans la figure 2.

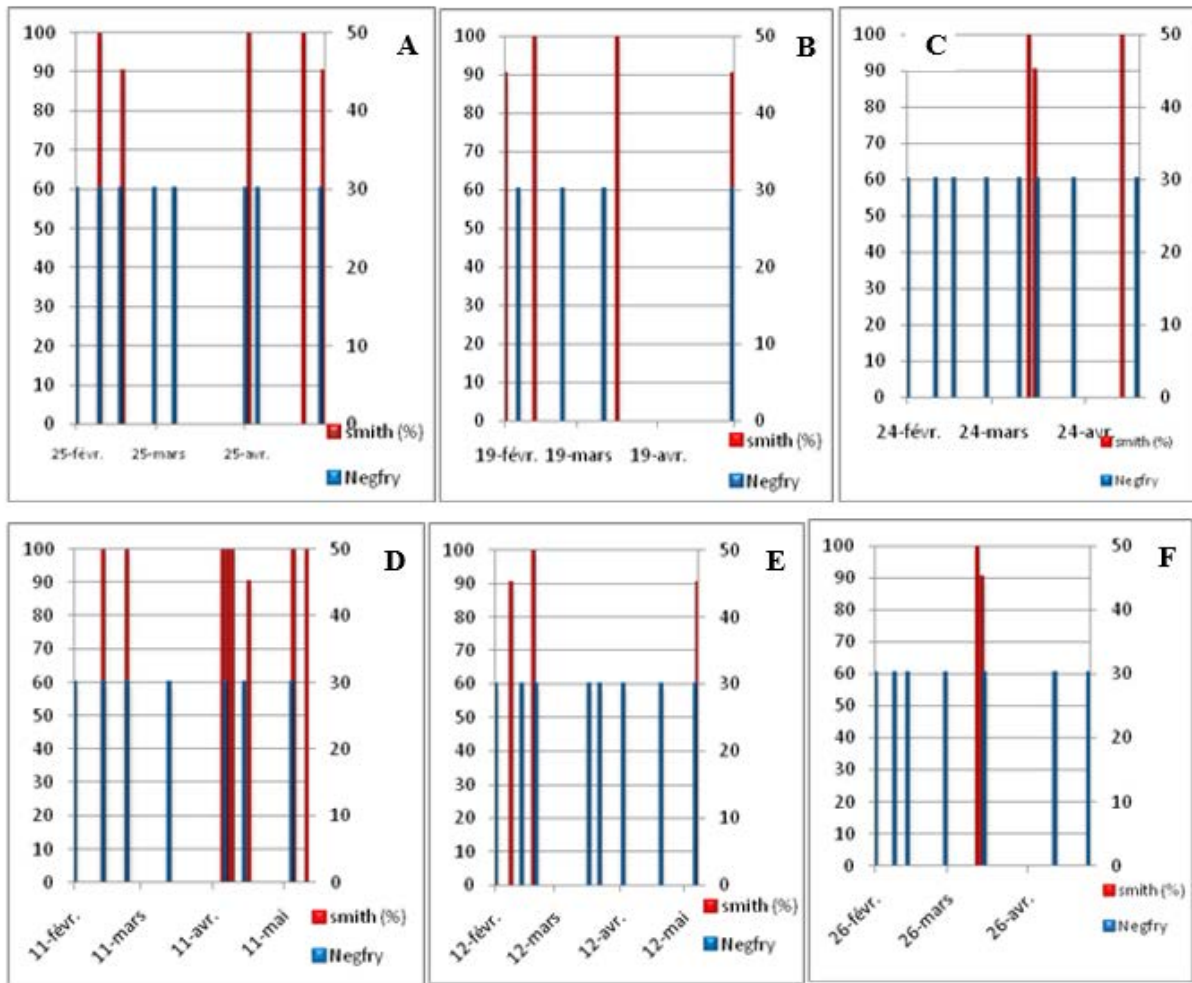


Figure 2. Resultats previsionnels des modeles donnant la periode de Smith et NegFry pour les wilayas de Chlef (A B,C) et Mostaganem (D, E, F), durant les années 2013,2014 et 2016 (de Gauche a droite respectivement).

A l'inverse de l'année 2014, les deux années 2013 et 2016, ont été caractérisés par une pression malade d'amplitude moyenne à élevé. Ainsi, Trois épidémies régionales ont été enregistrées dans les deux régions d'étude durant la saison 2013 et dans la région de Chlef au cours de la campagne agricole de 2016.

Généralement, l'accumulation de 30 unités de mildiou (Cf : Présentation du modèle NegFry, dans matériel et méthodes) est nécessaire pour la recommandation d'un traitement phytosanitaire. Le modèle NegFry a recommandé sept (07) traitements dans les deux régions durant les deux saisons 2013 et 2016, huit (08) traitements durant la saison 2014 à

Mostaganem et quatre (04) traitements seulement dans la région de Chlef. Globalement, il est considéré qu'à partir de quatre (04) traitements, le risque de perte des cultures devient fort. De plus le nombre d'alertes, nous renseignent indirectement sur les conditions biotiques et abiotiques relativement favorables au développement de la maladie lors de ces périodes.

Parallèlement, Sept (07) et trois (03) périodes de Smith à 100% ont été atteintes à Mostaganem et Chlef en 2013. Plus spécifiquement, Deux (02) et cinq (05) périodes de Smith et une (01) et deux (02) périodes de Smith ont été relevés en début et fin de saison dans les deux zones d'étude.

Le nombre de périodes de Smith, indique que les conditions climatiques étaient respectivement très favorables et moyenne en fin de saison pour les deux zones d'étude. Durant la saison de 2014, une seule (01) période de Smith à 100% a été observée au début de saison dans la région de Mostaganem et deux (02) périodes dans la région de Chlef ; la pression de la maladie a été globalement faible. En 2016, deux (02) périodes de Smith à 100% ont été observées dans la région de Chlef, une (01) au milieu et l'autre vers la fin de la saison de culture. Ces observations, indiquant également une pression moyenne à faible de la maladie ;

Tableau 3. Evaluation de la capacité prévisionnelle des deux modèles

Année	Régions	1 <sup>ères</sup> Périodes de Smith (100%)	1 <sup>er</sup> traitement NegFry	1 <sup>er</sup> traitement _ Negfry avant l'épidémie
2013	Chlef	-04 jours	-02 jours	+07 jours
	Mostaganem	+07 jours	+32 jours	+06 jours
2014	Chlef	/	+ 51 jours	
	Mostaganem	/	+06 jours	
2016	Chlef	+04 jours	+44 jours	+ 07 jours
	Mostaganem		+42 jours	

Au travers du suivi de la maladie sur terrain et au travers des résultats de simulation, nous avons constaté que les alertes prévisionnelles ont été variables, étant donné qu'elles fluctuaient entre quatre jours à plus d'un mois, avant l'occurrence des premiers symptômes de la maladie. Le modèle NegFry, a montré une grande performance en terme de prédiction de l'occurrence de l'épidémie. Ainsi, ce dernier a lancé des avertissements de traitement à partir de six (06) à sept (07) jours avant le début de chaque épidémie. Concernant le premier traitement, le modèle a lancé des avertissements avancés de plus d'un mois par rapport à l'apparition réelle des premiers symptômes sur terrain. Parallèlement, le modèle de la période de Smith, a pu lancer des avertissements allant de quatre (04) à sept (07) jours avant l'occurrence des premiers symptômes de la maladie. Cependant, le modèle a lancé un avertissement après quatre jours du début de l'épidémie dans la wilaya de Chlef en 2013 ; La période de Smith a montré une performance moyenne dans le domaine de la prédiction des épidémies.

## DISCUSSION

L'analyse des périodes climatiques favorables qui précèdent les attaques du mildiou,

une seule (01) période de Smith a eu lieu à Mostaganem en milieu de saison de culture.

Le tableau 3, a été établi pour comparer et évaluer les recommandations des modèles avec les observations de terrain. Pour le modèle donnant la période de Smith, nous avons comparé l'occurrence de la première période à 100% avec le début de la phase épidémiologique. Concernant le modèle NegFry, qui donne des recommandations sur la date du premier traitement et des traitements subséquents, nous avons comparé ces prévisions avec la date d'apparition des premiers symptômes et début de la phase épidémiologique.

a montré que le développement épidémiologique de la maladie est toujours lié à l'intensité et la durée des pluies. Cette période humide est parfois précédée par une phase d'irrigation, pendant le mois d'Avril et le début du mois de Mai. Ceci prolonge la période à risque et aggrave l'épidémie vu qu'il est impossible d'appliquer des traitements justes avant irrigation.

Les conditions climatiques peuvent influencer la période d'efficacité des fongicides sur le feuillage de la pomme de terre, car les fongicides se dégradent sous l'effet de la température élevée, la photolyse, les pluies et la volatilisation [13]. Les pluies peuvent dégrader la plupart des fongicides de contact des degrés différents qui sont fonction de la durée et l'intensité des pluies [12, 13].

L'épidémie se développe suite à une période pluvieuse, accompagnée d'un ciel nuageux avant et durant les pluies. Plus les nuages et les pluies perdurent, plus l'épidémie est sévère.

La couverture nuageuse est un facteur de risque épidémiologique important, car il influence directement sur l'intensité des radiations solaires qui jouent un rôle déterminant dans la viabilité et la dispersion des sporanges [14, 15].



Les nuages assurent non seulement l'humidité nécessaire sous forme de pluie pour le pathogène, mais également prolongent la durée des températures favorables pendant la nuit.

Les résultats de prévision des deux modèles ont révélé une bonne conformité avec les périodes à risques observées. Les avertissements des deux modèles ont positivement concordé avec le déclenchement des épidémies. Cependant, il est à noter que ces modèles se sont avérés être inefficaces en terme de prédiction des premiers foyers d'infections (Infection primaire). De ce fait, il nous semble être nécessaire d'adapter les différents modèles étudiés afin qu'ils incluent d'autres paramètres importants tels que le stade végétatif, le niveau et date des irrigations, présence et persistance des matières actives dans le sol, la sensibilité variétale et le niveau de l'inoculum initial.

Une période de Smith à 100% a eu lieu juste avant le déclenchement d'une épidémie sévère en 2013 et 2016 dans les deux régions d'étude. Cet échec prévisionnel pourrait être corrigé par le modèle de « Hutton Criteria » qui vient de remplacer le modèle de période de Smith à partir de 2017, en Grande Bretagne [16].

Le modèle de la période de Smith a été initialement développé comme un indicateur de risque de détérioration globale sur une vaste zone géographique du Royaume-Uni [17, 18]. Cependant, il est important de noter que l'apparition d'une période de Smith ne conduit pas nécessairement à l'application d'un fongicide sur la culture. Décision finale, devant être prise par l'agriculteur étant donné que ces modèles ne constituent in fine, que des outils d'aide à la décision [19]. Le modèle de la période de Smith est indiqué pour les zones et les années caractérisées avec une pression d'inoculum initiale faible ou moyenne [20].

Le modèle NegFry donne des conseils sur la date de la première application de fongicide et les traitements subséquents. Dans notre étude, ce modèle a recommandé un premier traitement à une date beaucoup trop avancé de +51 jours avant l'apparition des premiers symptômes sur terrain ; fait qui aurait exagérément augmenté le nombre de traitement rendant l'investissement agricole économiquement non viable. Malgré cette augmentation du nombre d'application, le modèle demeure être rassurant car il a pu lancer des avertissements entre six (06) à sept (07) jours avant le déclenchement des épidémies sévères de 2013 et 2016. Sous des conditions favorables de la maladie,

le modèle recommande une augmentation de 12% du nombre d'applications de fongicide [21].

Les calendriers de traitement guidés par les outils d'aides à la décision (OAD) ont abouti à réduire jusqu'à 50%, la quantité de fongicide utilisée. Dans les situations où les conditions météorologiques sont défavorables à la maladie, l'OAD a recommandé moins d'applications de fongicides sans perte de suppression de la maladie. Dans des situations météorologiques très favorables, l'OAD a recommandé plus applications de fongicides, avec une amélioration de la suppression de la maladie [22].

La coïncidence d'un traitement recommandé par le modèle NegFry avec l'occurrence d'une période de Smith à 100%, indique qu'il y a un grand risque qu'une épidémie est en cours de constitution et de déroulement durant cette période climatique.

La précision des avertissements est fortement liée à la disponibilité des données climatiques qui doivent être représentatives et précises (Forte résolution spatio-temporelle), donnant des prévisions fiables s'ajustant au mieux à la réalité biologique observé sur terrain [21]. Toutefois, il demeure une contrainte majeure qui est représenté par les pluviométries variables qui sont généralement très difficile à prédire avec précision avant plus de trois jours. Cet état de fait, ne laisse pas assez de temps pour que les agriculteurs agissent d'une manière efficace.

La période pluvieuse indiquée comme période à risque est facile à conceptualiser, repérer et analyser par les agriculteurs à faible ressource. Ce qui facilite les prévisions et augmente l'efficacité des fongicides.

## CONCLUSION

Le suivi de la maladie, durant trois années dans deux régions différentes, nous a permis de distinguer deux phases de développement de la maladie : une phase d'infection (infection primaire) et la phase de dispersion (épidémie). Ces dernières ont des dates et des conditions climatiques différentes. La première s'exprime au début de la saison (Février - début Mars), les températures basses entravent le développement de la maladie du mildiou où les taches restent localisées. La deuxième phase se manifeste au milieu et vers la fin de la saison de culture (Avril - début Mai),

elle se caractérise par un développement rapide de la maladie notamment en présence d'une période pluvieuse. Les deux modèles testés ont donné des avertissements variables, qui peuvent être complémentaires et exploités en fonction de leurs apports informationnels. Lorsqu'une période de Smith se produit et coïncide avec un conseil de traitement phytosanitaire par le modèle de NegFry, il existe un fort risque qu'une épidémie est en cours de déclenchement. Cette dernière pourrait être évitée en appliquant un fongicide convenable agissant sur les foyers primaires d'infection. Les premières infections sont d'une importance primordiale pour réussir le programme de lutte phytosanitaire. Il est utile de répertorier tous les foyers d'infection, par le réseau de surveillance, dans une carte thématique, pour qu'on puisse estimer avec exactitude le risque qu'elles constituent. L'application de fongicides spécifiques aux périodes de risques que nous avons pu déterminer dans le présent travail, pourrait raisonner et augmenter l'efficacité des traitements phytosanitaires. La durée et l'intensité de la pluviométrie ainsi que le type et la durée de persistance des nuages qui l'accompagnent, sont des paramètres faciles à comprendre, repérer et simplifier les prévisions des épidémies de mildiou en Algérie.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. **Haverkort A., Struik P., Visser R & Jacobsen E. (2009).** Applied biotechnology to combat late blight in potato caused by *Phytophthora infestans*. *Potato Research*;52. p.249-64.
- [2]. **FAOSTAT.(2016).** Food And Agriculture Organization of the United Nations, Agricultural statistics.
- [3]. **Abderrahmane O & Benchabane M. (2017).** Epidemiology and risk factors of potato late blight in Algeria [Conference poster]. Proceedings of the Sixteenth EuroBlight Workshop, 14-17 May 2017, Aarhus, Denmark: Applied Arable and Vegetable Research (Praktijkonderzoek AGV); p. 223-6.
- [4]. **Beninal L., Corbière R., Kedad A., Andrivon D & Bouznad Z. (2009).** A2 mating type, metalaxyl resistance and complex virulence profiles: common features in some *Phytophthora infestans* isolates from Algeria. PPO-Special Report no 13. p.237.
- [5]. **Corbière R., Rekad FZ., Galfout A., Andrivon D & Bouznad Z. (2010).** Phenotypic and genotypic characteristics of Algerian isolates of *Phytophthora infestans*. PPO-Special Report;14. p.291-6.
- [6]. **Jeda. F. (2006).** Cartographie de la précipitation du bassin hydrographique Cheliff. Université des Sciences et technologie Houari Boumediene, ALGER.
- [7]. **Smahi. El. (2001).** Etude du phénomène d'ensablement sur le plateau de Mostaganem et proposition d'aménagement. Es-Sénia, Oran: IGAT.
- [8]. **ONM. (2017).** Fiche des données climatiques de la station de Rebahia, Saida.
- [9]. **James C. (1980).** A manual of assessment keys for plant diseases. A manual of assessment keys for plant diseases.
- [10]. **Shaner G & Finney R. (1977).** The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology*;67. p.1051-6.
- [11]. **Hims M., Taylor M., Leach R., Bradshaw N & Hardwick N. (1995).** Field testing of blight risk prediction models by remote data collection using cellphone analogue networks. *Phytophthora infestans*;150. p.220-5.
- [12]. **Fife J & Nokes S. (2002).** Evaluation of the effect of rainfall intensity and duration on the persistence of chlorothalonil on processing tomato foliage. *Crop Protection*;21. p.733-40.
- [13]. **Neely D. (1970).** Persistence of foliar protective fungicides. *Phytopathology*;60. p.1583-6.
- [14]. **Mizubuti ES., Aylor DE & Fry WE. (2000).** Survival of *Phytophthora infestans* sporangia exposed to solar radiation. *Phytopathology*;90. p.78-84.
- [15]. **Olanya M., Larkin R., Zhongqi H & Jain S. (2011).** Survival potential of *Phytophthora infestans* sporangia in relation to meteorological factors. *Phytopathology*;101. p.S132.
- [16]. **DANCEY SR., SKELSEY P & COOKE DE. (2017).** The Hutton Criteria: a classification tool for identifying high risk periods for potato late blight disease development in Great Britain. *EuroBlight Workshop*. p. 53.
- [17]. **Large E. (1959).** The battle against blight. *Agriculture London*;65. p.603-8.
- [18]. **Sunseri MA., Johnson DA & Dasgupta N. (2002).** Survival of detached sporangia of *Phytophthora infestans* exposed to ambient, relatively dry atmospheric conditions. *American Journal of Potato Research*;79. p.443.
- [19]. **Hyre RA. (1950).** Spore traps as an aid in forecasting several downy mildew type diseases. *PI Dis Repr Suppl*;190. p.14-8.
- [20]. **van der Zaag DE. (1956).** Overwintering en epidemiologie van *Phytophthora infestans*, tevens enige nieuwe bestrijdingsmogelijkheden. *European Journal of Plant Pathology*;62. p.89-156.
- [21]. **Zwankhuizen MJ. (1998).** Potato late blight epidemics and population structure of *Phytophthora infestans*: Zwankhuizen.
- [22]. **Small IM., Joseph L & Fry WE. (2015).** Development and implementation of the BlightPro decision support system for potato and tomato late blight management. *Computers and Electronics in Agriculture*;115. p.57-65.

## MÉTHODES D'EXTRACTION ET DE DISTILLATION DES HUILES ESSENTIELLES : REVUE DE LITTÉRATURE

BOUKHATEM Mohamed Nadjib <sup>1,2\*</sup>, FERHAT Amine <sup>3</sup> et KAMELI Abdelkrim<sup>3</sup>

1. Département de Biologie et Physiologie Cellulaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université – Saad Dahlab - Blida 1, Blida, Algeria.
2. Laboratoire Ethnobotanique et Substances Naturelles, Ecole Normale Supérieure, Vieux-Kouba, Alger, Algeria.
3. Laboratoire de Recherche sur les Produits Bioactifs et Valorisation de la Biomasse, Ecole Normale Supérieure, Vieux-Kouba, Alger.

*Reçu le 15/06/2019, Révisé le 22/08/2019, Accepté le 03/09/2019*

### Résumé

L'exploitation du potentiel chimique des plantes à parfum passe par une première étape d'extraction des composés spécifiques d'espèces botaniques sélectionnées. Malheureusement ces molécules aromatiques, souvent à forte valeur ajoutée, sont présentes dans ces espèces en faible quantité. C'est le cas des huiles essentielles distillées des plantes aromatique et médicinales.

Si le principe de fabrication ou d'obtention des essences aromatiques est relativement simple - faire passer de la vapeur d'eau à travers une masse végétale – encore est-il que ce procédé admet des variantes nombreuses, chacune d'entre elles ayant un effet parfois important sur le rendement et sur la qualité du distillat obtenu.

Par ailleurs, l'ère industrielle a pris le pas sur un certain empirisme et développa ainsi de nouvelles technologies de distillation sophistiquées, désormais mises à contribution afin de pouvoir obtenir des extraits aromatiques de qualité accrue et dans des délais plus courts.

Lors de cet article de synthèse, différents procédés d'extraction et de distillation des huiles aromatiques ont été abordés et développés, de façon à mieux cerner l'objectif d'obtenir les constituants aromatiques dans des concentrations maximales et dans un état chimique le plus proche possible de leur structure native.

**Mots-clés :** Huiles Essentielles ; Molécules Terpéniques ; Méthodes d'Extraction ; Hydrodistillation ; Extraction sans Solvants ; Plantes Aromatique et Médicinale.

## EXTRACTION METHODS OF ESSENTIAL OILS FROM MEDICINAL PLANTS: A COMPREHENSIVE REVIEW

### Abstract

Medicinal use of phytochemical extracts involves a first step of extraction of these terpenoids from aromatic and medicinal plants. Unfortunately, these aromatic molecules and terpenes are considered as a high added value and are present in these plants in small quantities. This is the case of essential oils which can be distilled from medicinal plants by using different techniques.

In most cases, the principle of extraction and purification of essential oils is relatively simple and easy. It consists of passing water vapor through a plant material in vitro or in Alembic. However, these techniques and processes admit many variants which can lead sometimes to important effects on the yield and the quality (chemical composition and biological properties) of the essential oils.

Furthermore, some research laboratories and companies developed new and safe extraction and eco-friendly technologies used for extraction of phytochemicals and secondary metabolites. These techniques offer a great number of advantages such as shorter time extraction and high quality oils.

In this review article, different extraction and distillation methods were discussed and developed, in order to better understand the objective of obtaining essential oils with high yield and quality (chemical composition similar to the native structure in the plant).

**Keywords:** Essential Oils; Terpenes; Extraction Methods; Hydrodistillation; Solvent-Free Extraction; Aromatic and Medicinal Plants.

\* Auteur correspondant: BOUKHATEM Mohamed Nadjib, E-mail: mn.boukhatem@yahoo.fr

## INTRODUCTION

L'extraction d'une l'huile essentielles (HE) est nécessairement une opération complexe et délicate. Elle a pour but, en effet, de capter et recueillir les produits les plus volatils, subtils et les plus fragiles qu'élabore le végétal, et cela sans en altérer la qualité. Pour mesurer la difficulté de l'entreprise, il suffit de garder présente à l'esprit la rapidité avec laquelle se dégage, puis disparaît ou se dénature, le parfum d'une fleur, même la plus odorante, lorsqu'on en a froissé les pétales. Une fois la cuticule cireuse des poches épidermiques brisée, l'essence s'en échappe et plusieurs molécules odorantes se dispersent dans l'air ambiant [1,2].

D'un point de vue général, il est intéressant de noter que les HE ne sont pas nécessairement identiques à celles produites par les plantes. Aussi poétique que soit l'idée qu'une HE puisse correspondre à l'esprit de la plante, et donc être une réplique exacte de ce qui est présent dans le végétal, elle n'en demeure pas moins erronée, du moins le plus souvent. Les HE subissent généralement des modifications de leur composition chimique lors du processus d'extraction causées par la chaleur ou bien par leurs interactions avec l'eau. En fait, seules les HE issues de l'expression à froid, n'ayant pas eu de contact avec le jus de fruit et protégées de l'oxydation, pourraient correspondre à la véritable essence de la plante [3,4].

Une revue de littérature fait apparaître que plusieurs méthodes d'extraction ont été mises au point pour la distillation des molécules terpéniques des plantes à parfum [5-8]. Cependant les composés volatiles sont connus comme étant thermosensibles et vulnérables aux réactions chimiques. La perte de certains constituants, la dégradation de quelques composés insaturés par effet thermique ou par hydrolyse, ainsi que la présence de résidus de solvants organiques plus ou moins toxiques peuvent être engendrés par ces techniques d'extraction. Ces inconvénients ont attiré l'attention de plusieurs laboratoires de recherche et ont permis la mise au point de nouvelles techniques d'extraction des HE et des arômes, beaucoup plus écologiques, comme celles assistées par micro-ondes, aux ultrasons ou encore l'utilisation d'un solvant supercritique [9-11]

Au cours de cet article de synthèse, nous allons passer en revue et développer les procédés d'extraction et de distillation des huiles

aromatiques et des essences végétales, qu'elles soient traditionnelles ou innovantes. L'accent sera mis aussi sur les différents avantages et inconvénients de chaque technique, dans le souci permanent d'obtenir ces constituants aromatiques dans des concentrations maximales, et dans un état chimique le plus proche possible de leur structure native.

## LOCALISATION ET RENDEMENT EN HUILES ESSENTIELLES

A priori, toutes les plantes possèdent la faculté de produire des composés volatils mais seulement à l'état de traces le plus souvent. Parmi les espèces végétales, 10% seulement sont dites « aromatiques ». La capacité à accumuler l'HE est cependant la propriété de certaines familles de plantes réparties au sein de l'ensemble du règne végétal, aussi bien représentées par la classe des gymnospermes Cupressaceae (bois de cèdre) et Pinacea (pin et sapin) que celle des angiospermes. Les familles les plus importantes sont les dicotylédones comme celles des Apiaceae (coriandre), Asteracea (camomille), Geraniaceae (géranium), Illiciaceae (anis), Lamiaceae (menthe), Lauraceae (cannelle), Myricaceae (noix), Myrtaceae (eucalyptus), Oleacea (jasmin), Rosacea (rose), Sandatalacea (bois de santal) et Rutacea (citron). Les monocotylédones sont principalement représentées par les familles Poacea (vétiver) et Zingiberaceae (gingembre) [12-14].

Les HE sont des sécrétions naturelles élaborées par le végétal et contenues dans les cellules ou parties de la plante comme celles des fleurs (rose), sommités fleuries (lavande), feuilles (citronnelle), écorces (cannelier), racines (iris), fruits (vanillier), bulbes (ail), rhizomes (gingembre) ou graines (muscade). Pour certaines HE comme celles de lavande ou de sauge, c'est la plante entière qui est utilisée [15,16].

Seules les parties sécrétrices ou les plus concentrées de la plante sont récoltées à la période de rendement optimum : avant la floraison (menthes), pendant (lavandes) et après celle-ci (plantes à graines) ou encore après la rosée du matin (fleurs fragiles) [17, 18]. Les quantités d'HE produites par les plantes sont minimales, entraînant des rendements d'extraction extrêmement faibles, généralement inférieurs à 2%. Le rendement le plus faible est observé pour l'iris qui demande environ 4 kg de poudre pour obtenir 1 g d'absolue, ce qui explique le tarif exorbitant de cette huile [19].

## MÉTHODES D'EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES

### 1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

C'est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des HE (Figure 1) [20]. Dans ce système d'extraction, le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur sans macération préalable. Les vapeurs saturées en composés volatils sont condensées puis décantées dans l'essencier, avant d'être séparées en une phase aqueuse (HA) et une phase organique (HE). L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques, évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile. De plus, le parfum de l'HE obtenue est plus délicat et la distillation, régulière et plus rapide, fait que les notes de tête sont riches en esters [21].

Les fractions dites « de tête », fragrances très volatiles dues à des molécules légères,

apparaissent en premier. Le plus souvent, une demi-heure permet de recueillir 95 % des molécules volatiles, ce qui suffit aux besoins de l'industrie et de la parfumerie, comme pour la lavande. L'emploi en aromathérapie impose de prolonger l'opération aussi longtemps qu'il est nécessaire afin de récupérer la totalité des composants aromatiques volatils [3, 22, 23].

### 2. Extraction par Hydrodistillation

Elle consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau et l'ensemble est porté à ébullition (Figure 2). Elle est généralement conduite à pression atmosphérique. La distillation peut s'effectuer avec ou sans cohobage des eaux aromatiques obtenues lors de la décantation. Ce procédé présente des inconvénients dus principalement à l'action de la vapeur d'eau ou de l'eau à l'ébullition ; Certains organes végétaux, en particulier les fleurs, sont trop fragiles et ne supportent pas les traitements par entraînement à la vapeur d'eau et par hydrodistillation (HD) [24].

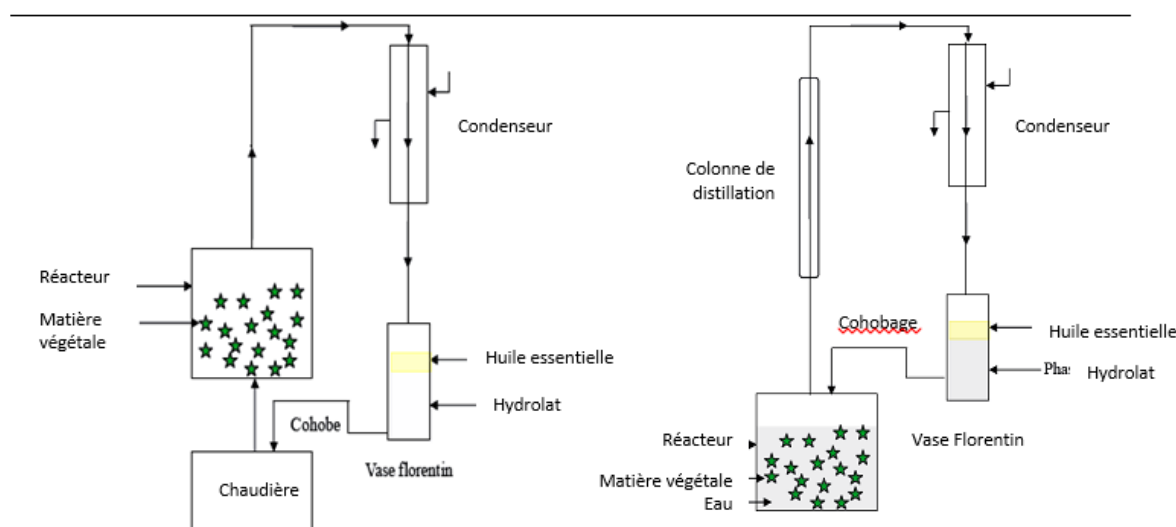


Figure 1. Principe schématisé de l'extraction par entraînement à la vapeur (EVE) [24].

Figure 2. Principe schématisé de l'hydrodistillation (HD) [24].

Cependant, le contact direct des constituants de l'HE avec l'eau occasionne des réactions chimiques conduisant à des changements dans la composition finale de l'extrait [21,25]. Les conditions opératoires et, notamment, la durée de distillation ont une influence considérable sur le rendement et la composition de l'HE. C'est pourquoi sont développés, aujourd'hui, des modèles mathématiques qui permettent d'optimiser, au mieux, ces conditions afin de produire des HE de manière reproductible.

La labilité des constituants des HE explique que la composition du produit obtenu par HD soit, le plus souvent, différente de celle du mélange initialement présent dans les organes sécréteurs du végétal [26-29]. L'hydrodistillation possède des limites. Le chauffage prolongé et puissant engendre une détérioration de certains végétaux et la dégradation de certaines molécules aromatiques. L'eau, l'acidité et la température peuvent induire l'hydrolyse des esters mais

aussi des réarrangements, des isomérisations, des racémisations et/ou des oxydations [30]. On comprend mieux les variations importantes de composition que fait ressortir l'analyse de la bibliographie sur l'HE.

### 3. Expression à froid

La technique est réservée à l'extraction des essences volatiles contenues dans les péricarpes d'agrumes en déchirant ces dernières par un traitement mécanique. Elle consiste à rompre ou dilacérer les parois des sacs oléifères contenus dans le mésocarpe situé juste sous l'écorce du fruit, l'épicarpe, pour en recueillir le contenu qui n'a subi aucune modification.

Les essences de *Citrus* ont longtemps été extraites manuellement, la mécanisation et l'industrialisation de la technique d'expression à froid ne s'étant effectuées qu'au début du XX<sup>e</sup> siècle, afin de diminuer les coûts de production et d'améliorer les rendements pour faire face à l'augmentation de la demande. Les systèmes récents, comme la « *Food Machinery Corporation-in-line* » (FMC), permettent d'extraire le jus de fruit et l'essence de manière quasi-simultanée sans contact des deux. C'est pourquoi l'expression à froid est la méthode de choix pour extraire ces essences, d'autant que la distillation n'est plus une technique très appropriée. En effet, la distillation produit des huiles aromatiques de moindre qualité principalement due à une présence importante d'aldéhydes, composés sensibles à l'oxydation et à la chaleur [31-34].

### 4. Extraction par solvant organique

Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, cyclohexane, l'éthanol, moins fréquemment le dichlorométhane et l'acétone. Le solvant choisi, en plus d'être autorisé, devra posséder une certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'oxygène. Sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait. L'extraction est réalisée avec un appareil de Soxhlet. Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau, si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils, mais également bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras et bien d'autres substances [35].

En fonction de la technique et du solvant utilisé, on obtient des hydrolysats (eau comme

solvant), des alcoolats (éthanol dilué), des teintures (éthanol/eau), des résinoïdes (extraits éthanoliques concentrés) et des concrètes (extraits à froid et à chaud au moyen de solvants divers) [27].

La technique d'extraction « classique » par solvant, consiste à placer, dans un extracteur, un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique.

L'emploi restrictif de l'extraction par solvants organiques volatils se justifie par son coût, les problèmes de sécurité et de toxicité, ainsi que la réglementation liée à la protection de l'environnement. Cependant, les rendements sont généralement plus importants par rapport à la distillation et cette technique évite l'action hydrolysante de la vapeur d'eau [26].

Face à cette situation, deux nouvelles techniques ont été mises au point, ces dernières années, pour la distillation des substances d'arômes à partir des plantes : l'extraction assistée par micro-ondes et l'extraction par le CO<sub>2</sub> supercritique.

### 5. Extraction assistée par micro-ondes

L'avantage de ce procédé est de réduire considérablement la durée de distillation et incrémenter le rendement. Toutefois, aucun développement industriel n'a été réalisé à ce jour. La distillation assistée par micro-ondes fait aujourd'hui l'objet de beaucoup d'études et ne cesse d'être améliorée parce qu'elle présente beaucoup d'avantages : technologie verte, économie d'énergie et de temps, investissement initial réduit et dégradations thermiques et hydrolytiques minimisées [36-38].

L'emploi des micro-ondes constitue, par ailleurs, une méthode d'extraction à part entière en plein développement. A titre d'exemple, La SFME (Solvent Free Microwave Extraction) est une combinaison originale des techniques de chauffage par micro-ondes et de distillation sèche. Elle consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur au sein d'un four micro-ondes sans ajout d'eau ou de solvant (Figure 3). Le chauffage interne de l'eau contenue dans la plante permet d'en dilater ses cellules et conduit à la rupture des glandes et des récipients oléifères. L'HE ainsi libérée est évaporée avec l'eau de la plante [39]. Comparée à l'hydrodistillation traditionnelle,

la SFME se caractérise par une diminution de la consommation énergétique et des rejets en CO<sub>2</sub> mais, surtout, par un temps d'extraction de l'ordre de 9 fois plus rapide. Les HE issues de ce procédé sont composées d'un taux plus important en composés oxygénés, de valeurs odorantes plus significatives, alors que les monoterpènes sont présents en moindre quantité [40-41].

Le protocole expérimental de l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes (SFME) s'articule autour de trois points importants :

- La quantité de matière végétale a été fixée de manière à obtenir une quantité d'HE suffisante pour une séparation par simple décantation. Le but de ce protocole étant d'éviter l'usage de solvant organique afin d'obtenir un produit le plus « propre » possible ;

- La puissance micro-ondes appliquée (300-450 Watts) lors de l'extraction SFME est obligatoirement fonction de la quantité de matière végétale à traiter. Cette grandeur représente la quantité de puissance appliquée en Watts par kilogramme de matériel végétal traité ;

- Le temps total de l'extraction est composé du temps de chauffage (première étape = 10 mn) et du temps d'extraction (seconde étape = 10 mn). La capacité de chauffage des micro-ondes étant nettement supérieure à un chauffage traditionnel. La durée de l'extraction sous micro-ondes sera considérablement réduite par rapport à une hydrodistillation classique [24,42].

Là encore, des expériences préliminaires ainsi que les données de la littérature [37] ont montré que sous micro-ondes, contrairement à une extraction classique de type « hydrodistillation », il n'était pas nécessaire de chauffer pendant de longues périodes pour obtenir des rendements intéressants.

La micro-onde agit sur certaines molécules, telles que l'eau, qui absorbent l'onde, et convertissent son énergie en chaleur. Contrairement au chauffage classique par conduction ou convection, le dégagement de chaleur a lieu dans la masse. Ainsi dans une plante, les micro-ondes sont absorbées par les parties les plus riches en eau (les vacuoles, véritables réservoirs liquides des cellules), puis converties en chaleur. Il en résulte une soudaine augmentation de la température à l'intérieur du matériel, jusqu'à ce que la pression interne dépasse la capacité d'expansion des parois cellulaires. La vapeur détruit la structure des cellules végétales, et les substances situées

à l'intérieur des cellules peuvent alors s'écouler librement à l'extérieur du tissu biologique, et l'HE est alors entraînée par la vapeur d'eau [24].

Lucchesi et al. [26] ont extrait des HE par SFME de trois herbes aromatiques: basilic, menthe et thym. Avec cette technique, ils ont isolé et concentré les composés volatiles en une seule étape, sans ajout de solvant ou d'eau. Les HE extraites sont plus riches en composés oxygénés, comparativement à la méthode conventionnelle. En fait, l'abondance des composés oxygénés dans l'HE est liée au chauffage rapide des substances polaires avec les micro-ondes et à la faible quantité d'eau dans le milieu, ce qui empêche la dégradation des composés par réactions thermiques et hydrolytiques. Cette technique offre plusieurs avantages comme un temps d'extraction plus courts, une réduction de la quantité de solvant, une très bonne reproductibilité avec de bons rendements.

Les HE obtenues par distillation ne représentent jamais exactement l'arôme et le parfum existants naturellement dans la plante. L'extraction assistée aux micro-ondes, une nouvelle technique innovante et écologique, peut permettre de résoudre certains problèmes de la distillation.

#### **6. Extraction par fluide à l'état supercritique**

L'originalité de la technique d'extraction par fluide supercritique, dite SFE, provient de l'utilisation de solvants dans leur état supercritique, c'est-à-dire dans des conditions de températures et de pressions où le solvant se trouve dans un état intermédiaire aux phases liquide et gazeuse et présente des propriétés physico-chimiques différentes, notamment un pouvoir de solvation accru. Si, en pratique, de nombreux solvants peuvent être employés, 90% des SFE sont réalisées avec le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), principalement pour des raisons pratiques. En plus de sa facilité d'obtention due à ses pression et température critiques relativement basses, le CO<sub>2</sub> est relativement non toxique, disponible à haute pureté et à faible prix, et il possède l'avantage d'être éliminé aisément de l'extrait [43].

La SFE est une technique dite « verte » utilisant pas ou peu de solvant organique et présentant l'avantage d'être bien plus rapide que les méthodes traditionnelles. Les compositions chimiques des HE ainsi obtenues peuvent présenter des différences, qualitatives et quantitatives, avec celles issues de l'hydrodistillation [6, 44, 45].

## CONCLUSION

En somme, l'extraction des HE de la matière végétale peut être réalisée au moyen de plusieurs procédés, basés sur des techniques anciennes ou récentes. Ces dernières, bien que présentant de nombreux avantages, notamment celui de réduire considérablement le temps d'extraction, ne sont pas, pour l'instant, reconnues par la Pharmacopée Européenne. Cependant, quel que soit le procédé utilisé, l'extrait final correspond à une concentration des composés initialement présents dans la matière première. De plus, les méthodes de production tout comme l'origine géographique, le climat, le sol, la période de récolte ou bien encore les pratiques agricoles, peuvent avoir une influence directe sur la composition chimique de l'huile essentielle distillée. Les prochaines années verront raisonnablement augmenter, de façon significative, le nombre de publications relatives à l'utilisation de nouvelles techniques innovantes, fiable et rapides, dans le domaine de l'extraction des substances aromatiques.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. **Lahlou, M. (2004).** Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 18(6), 435-448.
- [2]. **Richter, J., & Schellenberg, I. (2007).** Comparison of different extraction methods for the determination of essential oils and related compounds from aromatic plants and optimization of solid-phase microextraction/gas chromatography. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 387(6), 2207-2217.
- [3]. **Kaloustian, J., & Hadji-Minaglou, F. (2012).** La connaissance des huiles essentielles: Qualitologie et aromathérapie: entre science et tradition pour une application médicale raisonnée. *Collection Phytothérapie pratique*, Springer-Verlag, Paris, France.
- [4]. **Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. (2014).** Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of Food Science*, 79(7), R1231-R1249.
- [5]. **Khalid, K. A., Cai, W., & Ahmed, A. M. (2009).** Effect of harvesting treatments and distillation methods on the essential oil of Lemon Balm and Apple Geranium plants. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 12(2), 120-130.
- [6]. **Gomes, P. B., Mata, V. G., & Rodrigues, A. E. (2007).** Production of rose geranium oil using supercritical fluid extraction. *Journal of Supercritical Fluids*, 41(1), 50-60.
- [7]. **Andrade, M. A., Cardoso, M. G., Batista, L. R., Freire, J. M., & Nelson, D. L. (2011).** Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil of *Pelargonium odoratissimum*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(1), 47-52.
- [8]. **Slima, A. B., Ali, M. B., Barkallah, M., Traore, A. I., Boudawara, T., Allouche, N., & Gdoura, R. (2013).** Antioxidant properties of *Pelargonium graveolens* L'Her essential oil on the reproductive damage induced by deltamethrin in mice as compared to alpha-tocopherol. *Lipids in Health and Disease*, 12(1), 30.
- [9]. **Gavahian, M., Farahnaky, A., Farhoosh, R., Javidnia, K., & Shahidi, F. (2015).** Extraction of essential oils from *Mentha piperita* using advanced techniques: Microwave versus ohmic assisted hydrodistillation. *Food and Bioprocess Technology*, 9(4), 50-58.
- [10]. **Chemat, F., Fabiano-Tixier, A. S., Vian, M. A., Allaf, T., & Vorobiev, E. (2015).** Solvent-free extraction of food and natural products. *Trends in Analytical Chemistry*, 71, 157-168.
- [11]. **Mohammadhosseini, M. (2015).** Chemical composition of the essential oils and volatile fractions from flowers, stems and roots of *Salvia multicaulis* Vahl. by using MAHD, SFME and HS-SPME methods. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(6), 1360-1371.
- [12]. **Spichiger, R. E. (2002).** Botanique systématique des plantes à fleurs: une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales. *PPUR Presses Polytechniques*, Lausanne, Suisse.
- [13]. **Roux, D., & Catier, O. (2007).** Botanique, Pharmacognosie et Phytothérapie. *Wolters Kluwer*, France.
- [14]. **Khandelwal, K. (2008).** Practical pharmacognosy. *Pragati Books*.
- [15]. **Serrato-Valenti, G., Bisio, A., Cornara, L., & Ciarallo, G. (1997).** Structural and histochemical investigation of the glandular trichomes of *Salvia aurea* L. leaves, and chemical analysis of the essential oil. *Annals of Botany*, 79(3), 329-336.
- [16]. **Parthasarathy, V. A., Chempakam, B., & Zachariah, T. J. (2008).** Chemistry of spices. *Édition CABI, Londres, Royaume-Uni*.
- [17]. **Maffei, M., Chialva, F., & Sacco, T. (1989).** Glandular trichomes and essential oils in developing peppermint leaves. *New Phytologist*, 111(4), 707-716.
- [18]. **Sallé, J. L. (1991).** Le totum en phytothérapie, approche de la phyto-biothérapie. *Edition Frison-Roche*, Paris, France.
- [19]. **Shiva, M. P., Lehri, A., & Shiva, A. (2002).** Aromatic & medicinal plants: yielding essential oil for pharmaceutical, perfumery, cosmetic industries and trade. *International Book Distributors, Dehradun, Inde*.
- [20]. **Pharmacopée Européenne. (2007).** Direction de la Qualité du Médicament & Soins de Santé du Conseil de l'Europe (DEQM), Strasbourg, France.
- [21]. **Raaman, N. (2006).** Phytochemical techniques. *New India Publishing*, New Delhi, Inde.
- [22]. **Masango, P. (2005).** Cleaner production of essential oils by steam distillation. *Journal of Cleaner Production*, 13(8), 833-839.
- [23]. **Gavahian, M., & Chu, Y. H. (2018).** Ohmic accelerated steam distillation of essential oil from lavender in comparison with conventional steam



- distillation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 50, 34-41.
- [24]. **Farhat, A. (2010)**. Vapo-diffusion assistée par micro-ondes: conception, optimisation et application. Thèse de Doctorat en Sciences (option : Sciences des Procédés, Sciences des Aliments), Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse (France) & Ecole Nationale d'Ingénieurs de Gabès (Tunisie).
- [25]. **Walton, N. N. J., & Brown, D. D. E. (1999)**. Chemicals from plants: perspectives on plant secondary products. World Scientific.
- [26]. **Lucchesi, M. E. (2005)**. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes : conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat en Sciences (option : Chimie), Faculté des Sciences et Technologies, Université de la Réunion, France.
- [27]. **Hernandez Ochoa, L. R. (2005)**. Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combine (solvant/actif) d'origine végétale. Thèse de Doctorat en Science des Procédés (option Sciences des Agroressources), Institut National Polytechnique, Toulouse, France.
- [28]. **Boukhatem, M. N., Hamaidi, M. S., Saidi, F., & Hakim, Y. (2010)**. Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens*) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). *Nature & Technology*, (3), 37.
- [29]. **Boukhatem M.N. (2018)**. Plantes Aromatique et Médicinale : le Géranium Odorant. Description Botanique, Composition Chimique et Vertus Thérapeutiques. Editions Universitaires Européennes. ISBN : 6202277475
- [30]. **Bruneton, J. (1999)**. Huiles essentielles. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Edition Tec & Doc, 3<sup>ème</sup> édition, Lavoisier, Paris, France.
- [31]. **Belsito, E. L., Carbone, C., Di Gioia, M. L., Leggio, A., Liguori, A., Perri, F., & Viscomi, M. C. (2007)**. Comparison of the volatile constituents in cold-pressed bergamot oil and a volatile oil isolated by vacuum distillation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), 7847-7851.
- [32]. **Chemat, F. (2010)**. Techniques for oil extraction. *Citrus Essential Oils: Flavor and Fragrance*, 9-36.
- [33]. **Sawamura, M. (2011)**. Citrus essential oils: flavor and fragrance. John Wiley & Sons, New Jersey, USA.
- [34]. **Ferhat, M. A., Boukhatem, M. N., Hazzit, M., & Chemat, F. (2016)**. Rapid extraction of volatile compounds from Citrus fruits using a microwave dry distillation. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 8(3), 753-781.
- [35]. **Hubert, R. (1992)**. Epices et aromates. Edition Tec & Doc, Lavoisier, France.
- [36]. **Lucchesi, M. E., Chemat, F., & Smadja, J. (2004)**. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *Journal of Chromatography A*, 1043(2), 323-327.
- [37]. **Chemat, F., Abert-Vian, M., & Fernandez, X. (2013)**. Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds. Food Engineering Series, Springer, New York, USA.
- [38]. **Olivero-Verbel, J., González-Cervera, T., Güette-Fernandez, J., Jaramillo-Colorado, B., & Stashenko, E. (2010)**. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(4), 568-574.
- [39]. **Wang, Z., Ding, L., Li, T., Zhou, X., Wang, L., Zhang, H., & He, H. (2006)**. Improved solvent-free microwave extraction of essential oil from dried *Cuminum cyminum* L. And *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. *Journal of Chromatography A*, 1102(1), 11-17.
- [40]. **Ferhat, M. A., Meklati, B. Y., Smadja, J., & Chemat, F. (2006)**. An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. *Journal of Chromatography A*, 1112(1), 121-126.
- [41]. **Golmakani, M. T., & Rezaei, K. (2008)**. Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydro-distillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Food Chemistry*, 109(4), 925-930.
- [42]. **Ferhat, M. A., Meklati, B. Y., Visinoni, F., Vian, M. A., & Chemat, F. (2008)**. Solvent free microwave extraction of essential oils. Green chemistry in the teaching laboratory. *Chimica Oggi*, 21-23.
- [43]. **Leszczynska, D. (2007)**. Management de l'innovation dans l'industrie aromatique: Cas des PME de la région de Grasse. Editions l'Harmattan, Paris, France.
- [44]. **Peterson, A., Machmudah, S., Roy, B. C., Goto, M., Sasaki, M., & Hirose, T. (2006)**. Extraction of essential oil from geranium (*Pelargonium graveolens*) with supercritical carbon dioxide. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 81(2), 167-172.
- [45]. **Pereira, C. G., & Meireles, M. A. A. (2010)**. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives. *Food and Bioprocess Technology*, 3(3), 340-372.

## ANTIOXYDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF ESSENTIAL OIL AND ETHANOL EXTRACT OF *SANTOLINA CHAMAECYPARISSUS* L.

CHIRANE Manel Soumia\*<sup>1</sup>, BENCHABANE Otman<sup>2</sup>, BOUSBIA Nabil<sup>3</sup> and ZENIA Safia<sup>1</sup>.

1. Département préclinique, Laboratoire d'Alimentation, Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire (ENSV), El Alia Alger, Algérie.

2. Département de Technologie Alimentaire, Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA), 16200, El-Harrach Alger, Algérie.

3. Département d'Agro-alimentaire, Université de Blida 1, Route de Soumâa BP 270 Blida (09000), Algérie.

Reçu le 26/06/2019, Révisé le 13/12/2019, Accepté le 20/12/2019

### Abstract

**Description of the subject:** Essential oils and phenolic compounds extracted from the aromatic plants are widely used as antioxidants and antimicrobials agents.

**Objective:** Consists to evaluate the antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and ethanol extract of *Santolina chamaecyparissus* L.

**Methods:** Essential oil and ethanol extract were tested for their antioxidant activity by DPPH free radical-scavenging and ferric reducing power. The antimicrobial activity is evaluated by the agar disc diffusion method.

**Results:** Twenty eight components were characterized with the major compound is Artemisia ketone 42%. The polyphenols and flavonoids are abundant in ethanol extract. The essential oil showed a very weak antioxidant capacity for the two essays. However the ethanol extract was found to be effective toward DPPH inhibition, and for reducing power test it exhibited high activity in comparison with the chemical standard butylated hydroxytoluene BHT. The antimicrobial activity indicated that essential oil possessed the highest activity. However, the ethanol extract showed low antimicrobial activity.

**Conclusion:** The studied plant might indeed be potential sources of natural antioxidant and antimicrobial agents.

**Keywords:** *Santolina chamaecyparissus* L.; essential oil; ethanol extract; antioxidant and antimicrobial activities.

## ACTIVITE ANTIOXYDANTE ET ANTIMICROBIENNE DE L'HUILE ESSENTIELLE ET L'EXTRAIT ETHANOLIQUE DE *SANTOLINA CHAMAECYPARISSUS* L.

### Résumé

**Description du sujet :** Les huiles essentielles et les composés phénoliques extraient des plantes aromatiques sont utilisés comme des agents antioxydants et antimicrobiens.

**Objectifs :** Consiste à évaluer l'activité antioxydante et antimicrobienne de l'huile essentielle et l'extrait phénolique de *Santolina chamaecyparissus* L.

**Méthodes :** L'huile essentielle et l'extrait éthanolique sont testés pour leur activité antioxydante par le test de piégeage du radical DPPH et le pouvoir réducteur. L'activité antimicrobienne est évaluée par la méthode de diffusion sur l'agar.

**Résultats :** Vingt huit composés ont été identifiés où l'Artemisia ketone est le composé majoritaire 42%. Les polyphénols et les flavonoïdes sont abondants dans l'extrait éthanolique. L'huile essentielle montre une très faible capacité antioxydante pour les deux tests. Toutefois l'extrait éthanolique s'est avéré efficace contre l'inhibition du radical DPPH et pour le test du pouvoir réducteur on observe une bonne activité en comparant avec le standard chimique butylated hydroxytoluene BHT. Cependant l'huile essentielle possède une forte activité antibactérienne. Par contre l'extrait éthanolique a montré une faible activité antimicrobienne.

**Conclusion :** La plante étudiée est une source naturel d'agent antioxydant et antimicrobien très potentielle.

**Mots clés :** *Santolina chamaecyparissus* L.; huile essentielle; extrait éthanolique; activités antioxydante et antimicrobienne.

\* Auteur correspondant: CHIRANE Manel Soumia, E-mail: manel\_c@hotmail.fr

## INTRODUCTION

Aromatic plants are frequently used in traditional medicine and essential oils extracted from them are widely used as antioxidants and antimicrobial agents as well as for the prevention and treatment of different human diseases, many aromatic and medicinal plants have become attractive to scientists as natural sources of natural agents that could be safer than synthetic sources.

*Santolina chamaecyparissus* L. commonly known as cotton lavender belonging to the family Asteraceae is a hardly aromatic dwarf fragrant, dense mound with attractive grayish-silver foliage, evergreen shrub native to the Mediterranean area [1]. The inflorescence are widely used in Mediterranean folk medicine for their analgesic, anti-inflammatory, antiseptic, antispasmodic, bactericidal, fungicidal digestive and vulnerary properties, and is also used in phytotherapy for different kinds of dermatitis [2]. Several products (acetylenes, essential oils, flavonoids, sesquiterpenes) obtained from *Santolina* spp. have been investigated for their biological activities [3] The oil has been found to be efficacious in treating eye infections, a stimulator in scar-tissue formation and an insect repellent [4].

Oxidation mediated by free radical reaction is also responsible for the rancidity of unpreserved food rich in unsaturated fatty acids and many synthetic antioxidant components butylated hydroxytoluene (BHT) or butylated hydroxyanisole (BHA) have showed toxic and/or mutagenic effect [5]. In the other hand, the development of bacterial resistance to presently available antibiotics has necessitated the search for new antimicrobial agents [6]. In order to minimize or eliminate the use of synthetic additives in food; essential oils or plant extracts as natural agents have been used against the proliferation of microorganisms or protect food from oxidation [7].

The present study is aimed mainly to: (1) analyze the chemical composition of the essential oil extracted from the aerial part and to determine the phenolic compounds from the ethanol extract; (2) Investigate the antioxidant and antimicrobial activities for to determine if these essential oil and ethanol extract could be used as natural preservatives.

## MATERIALS END METHODS

### 1. Plant material

The aerial part of *Santolina chamaecyparissus* L. was collected in national experimental garden, El Hamma Algiers (Algeria). The taxonomic identity of the plant was confirmed by comparing the specimen with that of known identity already deposited in the herbarium of the National Superior School of Agronomy (ENSA), with the assistance of Professor Abdelkrim Hassen. The plant was dried in the shade at room temperature.

### 2. Essential oil extraction

Essential oil was isolated from the dried aerial part by hydrodistillation for 3 hours using a Clevenger-type apparatus according to the European Pharmacopoeia method. The essential oil was stored at +4°C in the dark until use.

### 3. Preparation of the ethanol extract

The aerial part was finely ground and 15 g was extracted in soxhlet with ethanol 95% for 6 hours, which was concentrated by using a rotary evaporator. Extract is kept in the dark at +4 °C until tested.

### 4. Analysis of the essential oils

The composition of the essential oil was performed by gas chromatography and accomplished with CP chrompack 9002 GC-FID system using a fused-silica capillary column with apolar stationary phase HP5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm film thickness), the column temperature program was 50°C for 3 min, increasing at 2°C/min toward 250°C and held at 250°C for 10 min. 0.2 µL were injected by splitting and the split ratio was 1:50; nitrogen was used as carrier gas at a flow rate 1 mL/min. Flame ionization detection was performed at 320°C.

The essential oil was analysed by gaz chromatography coupled to mass spectrometry with apparatus Hewlett Packard 289 using the apolar column HP5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm film thickness), the column temperature program was 60°C for 8 min, increasing at 2°C/min toward 280°C and held at 280°C for 15 min.

Oil constituents were identified by comparison of their GC Kovats retention indices (R.I.) and determined with reference to a homologous series of C8–C22 *n*-alkanes with those of literature and with those of available authentic standards. Confirmation of such identification was done by comparing their mass spectral fragmentation patterns with those stored in the MS database (NIST and Wiley) and with mass spectra literature data [8].

### 5. Total phenolic and total flavonoids contents

Total phenolic compounds from ethanol extract was determined by the Folin-Ciocalteu method with Galic acid as standard [9]. Thus 0.25 mL of extract dissolved in ethanol was mixed with 1.25 mL of Folin-Ciocalteu solution. After 3 min of reaction, 1 mL of solution of sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) at a concentration of 75 g/L was added. After 30 min of incubation in the dark at room temperature, the absorbance was measured at 765 nm. The test was performed in triplicate and average value recorded.

Total flavonoids contents of the sample was determined by the trichloride aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) method with quercetin as standard [10]. Thus 1 mL of extract dissolved in ethanol was added to 1 mL of solution of trichloride aluminium. After 1 h of incubation at room temperature, the absorbance was measured at 420 nm. The experiment was carried out in triplicate and average value recorded.

### 6. Antioxidant Activity

The essential oil and ethanol extract were made at various concentration (100, 200, 400, 600, 800, 1000 mg/L) and (5, 10, 20, 50, 100, 200, 400 mg/L) respectively.

#### 6.1. Free Radical Scavenging Activity (DPPH)

The DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazine) free radical scavenging assay is one of the most extensively used antioxidant assays for plant samples. DPPH is a stable free radical that reacts with compounds that can donate a hydrogen atom. This method is based on the scavenging of DPPH through the addition of a radical species or an antioxidant that decolorizes the DPPH solution, its violet color is transformed into yellow as its reduction [11]. Each sample (25  $\mu\text{L}$ ) at different concentrations was added to 975  $\mu\text{L}$  of ethanolic solution of DPPH and placed in dark and at room temperature. The antioxidant activity is then measured by the decrease in absorption at 517 nm after 30 min of reaction [12]. The percentage inhibition of the DPPH radical by samples was calculated according to the formula:

$$\% \text{Inhibition} = \left[ \frac{(A_c - A_t)}{A_c} \right] \times 100$$

Where  $A_c$  is the absorption of the blank sample ( $t = 0$  min) and  $A_t$  is the absorption of the tested oil or extract ( $t = 30$  min). Tests were carried

out in triplicate and BHT was used as positive control.

The values of  $\text{IC}_{50}$  were determined as reported above. Tests were carried out in triplicate and BHT was used as positive control.

#### 6.2. Reducing Power Assay

The reducing antioxidant power of essential oil and ethanol extract made at different concentration was assayed by the method of Oyaizu [13]. The 0.125 mL of sample was added with 2.5 mL of a sodium phosphate buffer (0.2 M) and 2.5 mL of 1% potassium ferricyanide [ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ]; the mixed was incubated in a water bath at 50 °C for 20 min. Afterwards 2.5 mL of 10% trichloroacetic acid was added to the mixture that was centrifuged for 10 min at 1500 rpm. Finally 2.5 mL of the supernatant was then mixed with 2.5 mL of distilled water and 0.5 mL of 0.1%  $\text{FeCl}_3$ . The absorbance was measured at 700 nm; high absorbance indicates high reducing power. Tests were carried out in triplicate and BHT was used as positive control.

#### 7. Antimicrobial Activity

Susceptibility of the microbial strains to the essential oil and ethanol extract were investigated by using the agar diffusion method [14]. Sterile Whatman discs (9 mm diameter) were impregnated with 10  $\mu\text{L}$  of the pure essential oil or ethanol extract and placed on the center surfaces of the inoculated ( $10^7$ - $10^8$  CFU/mL) Mueller-Hinton agar (for bacteria) and Sabouraud agar (for fungi). After the plates were incubated at 37 °C during 24 h for bacteria and at 25 °C during 48 h for fungi, the diameters of the distinctly clear zones were measured in millimeters. All the tests were performed in triplicate and the antimicrobial activity was expressed as the mean of inhibition diameters produced.

In this study the standard microbial strains were obtained from the Biotic SAIDAL Algiers, three bacteria strains were used: Gram-positive *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Bacillus subtilis* ATCC 6633, Gram-negative *Escherichia coli* ATCC 8739. Two fungi strains *Candida albicans* ATCC 10231 and *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763.

#### 8. Statistical Analysis

Statistical comparisons were made with ANOVA followed by Tukey's test; the level of significance was set at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### 1. Essential oil yield

The yield of essential oil extracted from the dried aerial part of *Santolina chamaecyparissus* L. is 0.85% (v/w) collected after 110 min; the volatile oil is a mobile liquid of pale yellow color having an aromatic harsh smell.

### 2. Chemical composition

Component identification along with their percent composition and RI values are summarized in Table 1, the chromatographic

analysis lead to identification of 28 components corresponding to 85.32% of the total essential oil. The most abundant of them were Artemisia ketone (42%) and other compounds present are as follow: Vulgarone B (8.44%),  $\beta$ -phellandrene (8.32%),  $\beta$ -Myrcene (7.67%), Cubenol (3.42%), Sabinene (2.87%),  $\beta$ -Pinene (2.51%), Camphor (2.51%) and Camphene (1.31%). Oxygenated monoterpenes are the most dominant with 47.51% of the total composition. The proportion of the oxygenated fraction, the most aromatic and therefore the most recyclable of the essential oil in the olfactory level represent 60.49%.

Table 1. Composition of essential oil of *Santolina chamaecyparissus* L.

N°	Compounds	RI	RI <sup>Adams</sup>	Area (%)
1	Santolina Triene	914	908	0.26
2	Tricyclene	931	926	0.05
3	$\alpha$ -Pinene	939	939	0.26
4	Camphene	953	953	1.31
5	Sabinene	980	976	2.87
6	$\beta$ -Pinene	983	980	2.51
7	$\beta$ -Myrcene	1000	991	7.67
8	Yomogi alcool	1010	998	0.46
9	p-Cymene	1031	1026	0.17
10	$\beta$ -Phellandrene	1036	1031	8.32
11	Artemisia ketone	1073	1062	<b>42.00</b>
12	cis-Sabinene hydrate	1076	1068	0.11
13	Artemisia alcool	1096	1083	1.04
14	Camphor	1151	1143	2.51
15	Borneol	1169	1165	0.97
16	4-Terpineol	1179	1177	0.10
17	p-Cymen-8-Ol	1197	1183	0.49
18	Myrtenal	1203	1193	0.19
19	Myrtenol	1205	1194	0.07
21	$\alpha$ -Longipinene	1363	1351	0.50
22	Patchoulene alpha	1445	1456	0.05
24	Germacrene-D	1474	1480	0.04
25	$\alpha$ -Curcumene	1492	1483	0.28
26	Caryophyllene oxyde	1584	1581	0.16
27	Cubenol	1616	1614	3.42
28	Vulgarone B	1671	1647	8.44
29	$\alpha$ -Bisabolol	1702	1683	0.69
30	Aristolone	1767	1756	0.24
Yield (% v/w)				0.85
Identified components (%)				85.32
Monoterpene hydrocarbons				23.92
Oxygenated monoterpenes				47.51
Sesquiterpene hydrocarbons				0.89
Oxygenated sesquiterpenes				12.98

IR<sup>Adams</sup> [15], retention indices relative to C<sub>9</sub>- C<sub>25</sub> n-alkanes on the HP 5MS column.

**3. Total phenolic and flavonoids contents**

Total phenolic and flavonoids contents from ethanol extract was determined by the Folin-

Ciocalteu method and the trichloride aluminium (AlCl<sub>3</sub>) method respectively. They are summarized in table 2.

Table 2. Polyphenols and flavonoids contents of ethanol extract (EE).

	Yield (%)	Polyphenols (a)	Flavonoids (b)
EE	18.44	43.22	27.41

(a)mg equivalent of gallic acid per gram of extract, (b) mg equivalent of quercetin per gram of extract.

**4. Antioxidant activity**

Antioxidant activity of the essential oil and ethanol extract from *Santolina chamaecyparissus* L. has been determined by two test namely DPPH and reducing power. They are summarized in table 3 and 4 respectively.

**5. Antimicrobial activity.**

The antimicrobial activity of the essential oil and ethanol extract from *Santolina chamaecyparissus* L. was recorded in Table 5.

Table 3. Scavenging activity of DPPH (%) free radical and reducing power of essential oil (EO) and BHT

Concentration (mg/L)	DPPH (%)		*Reducing power	
	EO	BHT	EO	BHT
100	2.17±0.35	73.15 ± 0.85	0.007 ±0.005	0.863 ± 0.054
200	2.03±0.20	80.63 ± 0.32	0.045 ±0.009	1.063 ± 0.023
400	2.25±0.46	84.75 ± 0.52	0.085 ±0.011	1.161 ± 0.031
600	2.23±0.19	86.35 ± 0.59	0.164 ±0.009	1.178 ± 0.030
800	2.13±0.14	88.81 ± 0.27	0.179 ±0.008	1.218 ± 0.015
1000	3.47±0.25	91.07 ± 0.13	0.116 ±0.010	1.303 ± 0.055
IC <sub>50</sub> mg/L	ND	ND	/	/

Table 4. Scavenging activity of DPPH (%) free radical and reducing power of ethanol extract (EE) and BHT.

	Concentration (mg/L)	DPPH (%)		*Reducing power		results
		EE	BHT	EE	BHT	
*The are	5	9.65±0.39	ND	0.128 ±0.010	ND	
	10	11.19±0.61	31.40 ± 0.70	0.136 ±0.011	ND	
	20	14.52±0.51	42.14 ± 0.48	0.200 ±0.016	0.311 ± 0.006	
	50	28.28±0.91	62.49 ± 0.69	0.443 ±0.038	0.576 ± 0.001	
	100	29.47±1.34	73.15 ± 0.85	0.465 ±0.028	0.863 ± 0.054	
	200	48.52±0.57	80.63 ± 0.32	0.804 ±0.072	1.063 ± 0.023	
	400	63.65±0.95	84.75 ± 0.52	1.129 ±0.016	1.161 ± 0.031	
	IC <sub>50</sub> mg/L	257.76±0.75	32.84±0.59	/	/	

expressed as the average absorbance at 700 nm of three repetitions ±S; ND : not determined.

Table 5. Diameter of inhibition zone Diameter (mm) of the essential oil (EO) and ethanol extract (EE) of *Santolina chamaecyparissus* L.

	Diameter of inhibition zone (mm)				
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>E. coli</i> ATCC8739	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763
EO	37 ±0.4	36 ±0.3	9	17 ±0.2	15 ±0.1
EE	14 ±0.4	11 ±0.2	9	9	11 ±0.5

Inhibition zone includes the diameter of the disk (9 mm). Each result is the mean ± SD of three replicates.

## DISCUSSION

Many studies are reported about the chemical composition of essential oil extracted from *Santolina chamaecyparissus* L. Comparing the results it can be divided the components of the oil of the various existing studies into two groups. The first group which includes Artemisia Ketone as a major component [16, 17, 18, 19]. The second group is that possesses other key compounds [20, 21, 22, 23]. Table 6 showed the major components. This great

variability and diversity observed in the chemical composition of the EOs of the same aromatic herb species and subspecies can be attributed to several factors, including local climatic and environmental conditions, season, geographical location, geology, postharvest drying and storage, availability of water, height above sea level, presence of fungal diseases and insects, part of the plant and the method used to obtain the EO [24].

Table 6. Major components of different studies.

Country	Reference	Components
Algeria	[16]	Artemisia ketone 40.33%, (Z)-Thujone 9.82%, (2Z,6E)-Farnesol 7.30%.
Spain	[17]	Artemisia ketone 27.19%, Dihydroaromadendrene 18.21%, b-Phellandrene 7.49%.
France	[18]	Artemisia ketone 45%, Myrcene 15%, Sabinene 5.5%.
Spain	[19]	Artemisia ketone (27.80-35.00) %, T-Cidanol (23.60-4.80) %.
Spain	[20]	1,8-cineole, camphor, borneol, terpinen-4-ol, terpinolene
Algeria	[21]	1,8-cineol (11.22%), spathulenol (7.59 %), terpinen-4-ol (6.13%).
Portugal	[22]	1,8 Cineol (25-30) %, Camphor (7-9) %, Borneol (7-8) %.
Tunisia	[23]	1,8-cineole (12.94 %), β-eudesmol (10.49 %) terpinene-4-ol (6.97 %), γ-cadinene (6.55 %).

The yield of the ethanol extract is 18.44 g per 100 g of plant material was higher than that reported by Benbrinis [25] who found 12 g per 100 g in the methanol extract. The results show that the polyphenols compounds and flavonoids are abundant in ethanol extract; these results are higher than that found in methanol extract 105.88 µg equivalent of gallic acid per mg of extract and 20.99 µg equivalent of quercetin par mg of extract respectively. The polyphenol content of the extract depends on the extraction method used and the nature of the solvent [26].

Essential oil exhibited very weak antioxidant abilities for reduce DPPH radicals when compared to BHT which remained below 3.47±0.25 % at concentration 1000 mg/L and

the IC<sub>50</sub> could not be calculated due to their low inhibition activity. This result was very lower than reported by Nouasri [16] (IC<sub>50</sub> was determined as 43.010 mg/mL). In the case of reducing power assay, a similar activity was observed as given in the first assay. Essential oil has been found significantly less effective than this antioxidant agent BHT ( $P < 0.05$ ).

The DPPH radical-scavenging activities show that the IC<sub>50</sub> of ethanol extract was found to be 257.76±0.75 mg/L was less active than BHT IC<sub>50</sub> 32.84±0.59 mg/L. For reducing power the ethanol extract showed potent activity compared to BHT at the concentration of 400 mg/L (1.129±0.016 and 1.161±0.031 respectively).

This antioxidant power is attributed to its richness in phenolic compounds which have a great capacity to trap free radicals [27, 28]. The antioxidant potential of polyphenols is provided with an inhibitory effect of lipid peroxidation of foodstuffs [3]. While the ethanol extract have a significant antioxidant power compared to the synthetic antioxidant BHT ( $P < 0.05$ ).

The determination of the zone of inhibition by the agar method shows that the EO has a strong inhibitory activity against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* with their respective diameter zones of inhibition 37 and 36 mm. While no activity showed against *Escherichia coli*. The essential oil of *S. chamaecyparissus* L. in this study showed a significant antibacterial activity ( $P < 0.05$ ). Most of the researches were found that the *S. chamaecyparissus* EO showed the highest antibacterial activity [16, 17, 29]. The composition, structure as well as functional groups of the EO play an important role in determining their antimicrobial activity [30]. Considering the large number of different groups of chemical compounds present in EOs, it is most likely that their antibacterial activity is not attributable to one specific mechanism, but that there are several targets in the cell [31]. It is believed that the phenolic components of essential oil show strongest antimicrobial activity, followed by aldehyde, ketone and alcohol [32].

The antifungal activity against *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* was moderate with a diameter zones of inhibition were respectively 17 and 15 mm. The agar disc diffusion method indicated that the EO showed the significant antifungal activity ( $P < 0.05$ ). Surech [33] and Khubeiz [29] reached that the volatile oil of *S. chamaecyparissus* L. possessed potent antifungal properties against *Candida albicans*. The essential oil containing terpenes are also reported to possess antimicrobial activity [34], which are consistent with our present study. In addition, the components in lower amount may also contribute to antimicrobial activity of the essential oil, involving probably some type of synergism with other active compounds [35]. However the ethanol extract showed low inhibitory activity for all tested microorganisms.

## CONCLUSION

The chemical composition show that essential oil of *Santolina chamaecyparissus* L was dominating by Artemisia ketone 42%, Vulgarone B 8.44%,  $\beta$ -phellandrene 8.32%,  $\beta$ -Myrcene 7.67%. The results showed that the essential oil was less effective than the synthetic antioxidant agent BHT. However the ethanol extract exhibited the strongest free radical scavenging and reducing power activity compared to essential oil and showed a moderate efficiency compared to BHT. Moreover the essential oil showed significant antimicrobial activity but the ethanol extract showed low antimicrobial activity. In conclusion, we can told that this medical aromatic plant has very interesting biological properties for subsequent use in various sectors.

## REFERENCES

- [1]. Akerreta S., Cavero R.Y., López V. and Calvo M.I. (2007). Analyzing factors that influence the folk use and phytonomy of 18 medicinal plants in Navarra. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, 3(16): 1-18.
- [2]. El-Sahhar K.F., Nassar D.M. and Farag H.M. (2011). Morphological and anatomical studies of *Santolina chamaecyparissus* L. (Asteraceae) Ii. Anatomical characteristics and volatile oil. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 7: 413-422
- [3]. Da Silva J.A.T. (2004). Mining the essential oils of the Anthemidea. African Journal of Biotechnology, 3(12): 706-720.
- [4]. Villar A., Giner R.M., Rios J.L. (1986). Chemical composition of *Santolina chamaecyparissus squarossa* essential oil. J. Nat. Prod. 49: 1143-1144.
- [5]. Belmekki N. and Bendimerad N. (2012). Antioxidant activity and phenolic content in methanol crude extracts from three Lamiaceae grown in Southwestern Algeria. Nat Prod Plant Resour, (2): 175-181.
- [6]. El Ouariachi el M., Tomi P., Bouyanzer A., Hammouti B., Desjobert J.M., Costa J. and Paolini J. (2011). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and solvent extracts of *Ptychotis verticillata* from Morocco. Food Chem Toxicol, 49(2): 533-536.
- [7]. Bubonja-Sonje M., Giacometti J. and Abram M. (2011). Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. Food Chem., (127): 1821-1827.
- [8]. Adams R.P. (1995). Identification of essential oil components by gas chromatography mass spectroscopy. Edition: Allured Publishing Corporation, 469 p.



- [9]. Singleton V.L., Ortofer R. and Lamuela-Raventos R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152-178.
- [10]. Lamaison J.L.C. and Carnet A. (1990). Teneurs en principaux flavonoïdes des fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus laevigata* (Poiret D. C) en fonction de la végétation. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 65: 315-320.
- [11]. Sang S., Cheng X., Stark R.E., Rosen R.T., Yang C.S. and Ho C.T. (2002). Chemical studies on antioxidant mechanism of tea catechins: analysis of radical reaction products of catechin an epicatechin with 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Bioorg. Med. Chem.* 10: 2233-2237.
- [12]. Mansouri A., Embarek G., Kokkalou E. and Kefalas P., (2005). Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*); *Food Chemistry*, 89: 411-420.
- [13]. Oyaizu, M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japan Journal of Nutrition*, 44: 307-315.
- [14]. Zaika L. (1988). Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Safety*, 9: 97-118.
- [15]. Adams R.P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy, 4<sup>th</sup> ed. Allured Publishing Co. Carol Stream, Illinois.
- [16]. Nouasri A., Dob T., Krimats S., Dahmane D., Toumi M., Lynda L., Chelgoume C. and Rachehe F. (2015). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil of *Santolina chamaecyparissus* L. of Algeria. *Journal of Coastal Life Medicine*, 3(3): 220-227.
- [17]. Ruiz-Navajas Y., Viuda-Martos M., Perez-Alvarez J.A., Sendra E. and Juana Fernández López (2012). Chemical Characterization and Antibacterial Activity of Two Aromatic Herbs (*Santolina chamaecyparissus* and *Sideritis angustifolia*) Widely Used in the Folk Medicine. *Journal of Food Safety*, 32(4): 426-434.
- [18]. Vernain G. (1991). Volatile Constituents of the Essential Oil of *Santolina chamaecyparissus* L. *Journal of Essential Oil Research*, 3(1): 49-53.
- [19]. Perez-Alonso M. and Velasco-Negueruela A. (1992). Essential Oil Components of *Santolina Chamaecyparissus* L. *Flavour and Fragrance Journal*, 7: 37-41.
- [20]. Grosso C., Figueiredo A.C., Burillo J., Mainar A.M., Urieta J.S., Barroso J.G., Coelho J.A. and Palavra A.M. (2009). Supercritical fluid extraction of the volatile oil from *Santolina chamaecyparissus* L. *J Sep Sci.*, 32: 3215-3222.
- [21]. Zaiter L., Benayache F., Beghidja N., Figueredo G., Chalard P., Jean-Claude Chalchat J.-C., Marchioni E. and Benayache S. (2015). Essential oils of *Santolina Africana* Jord. & Fourr. and *Santolina chamaecyparissus* L. *TEOP*, 18(6): 1338 - 1342.
- [22]. Clara G., Ana C.-F., Jesus B., Ana M.M., José S.U., José G. B., José A.C., António M.F.P. (2009). Supercritical fluid extraction of the volatile oil from *Santolina chamaecyparissus* L. *J. Sep. Sci.*, 32: 3215 - 3222.
- [23]. Salah-Fatnassi K.B.H., Hassayoun F., Cheraif I., Khan S., Jannet H.B., Hammami M., Aouni M. and Harzallah-Skhiri F. (2017). Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of flower head and root essential oils of *Santolina chamaecyparissus* L., growing wild in Tunisia. *Saudi J. Biol. Sci.*; 24: 875-882.
- [24]. Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernandez-Lopez J. and Perez-Álvarez J.A. (2007). Chemical composition of the essential oils obtained from some spices widely used in Mediterranean region. *Acta Chim. Slov.*, 54: 921-926.
- [25]. Benbrinis S. (2012). Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne des extraits de *Santolina chamaecyparissus* L. mémoire de magistère, université Ferhat Abbas Setif, 73 p.
- [26]. Hayouni E.A., Abedrabba M., Bouix M. and Hamdi M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, 105(3): 1126-1134.
- [27]. Calliste C. A., Trouillas P. and Allais D. P., (2001). Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 3321-3327.
- [28]. Torres de Pinedo A., Penalver P. and Morales J.C. (2007). Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: Structure-activity relationship. *Food Chemistry*, 103: 55-61.
- [29]. Mohamad jawed Khubez and Ghaytha Mansour (2016). In Vitro Antifungal, Antimicrobial Properties and Chemical Composition of *Santolina chamaecyparissus* L. Essential Oil in Syria. *IJTPR*, 8(5): 372-378.

- [30]. **Holly R.A. and Patel D. (2005).** Improvement in shelf life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Chem.*, 22: 273–292.
- [31]. **Burt S. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 94, 223–253.
- [32]. **Jarrar N., Abu-Hijleh A. and Adwan K., (2010).** Antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. alone and in combination with cefuroxime against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, (32): 121-123.
- [33]. **Suresh B., Sriram S., Dhanaraj S.A., Elango K. and Chinnaswamy K. (1997).** Anticandidal activity of *Santolina chamaecyparissus* volatile oil. *Journal of Ethnopharmacology*, 55: 151-159.
- [34]. **Dorman H.J.D. and Deans S.G. (2000).** Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88: 308-316.
- [35]. **Marino M., Bersani C. and Comi G., (2001).** Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *Int. J. Food Microbiol.*, 67: 187-195.

## ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE DE L'HUILE ESSENTIELLE DES FRUITS DU PISTACHIER LENTISQUE (*PISTACIA LENTISCUS* L.)

AMARA Nacira<sup>1\*</sup>, BENRIMA Atika<sup>1</sup>, ANBA Chahira<sup>1</sup>, BELKHIR Houria<sup>1</sup>

1. Université Blida 1-Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie – Département des Biotechnologies - Laboratoire de Recherche en Biotechnologie des Productions végétales. Algérie

Reçu le 07/06/2019, Révisé le 11/12/2019, Accepté le 22/12/2019

### Résumé

**Description du sujet :** Ce Travail s'inscrit, dans le cadre de la valorisation de l'huile essentielle (HE) des fruits du pistachier lentisque (*Pistacia lentiscus* L.). Récoltés dans une forêt à Damous (Tipaza).

**Objectifs :** Cette étude a pour objectifs, de déterminer la composition chimique de l'HE des fruits du pistachier lentisque afin d'établir son profil chromatographique, et l'évaluation son activité antimicrobienne.

**Méthodes :** L'HE des fruits de *Pistacia lentiscus* L extraite par la technique d'hydrodistillation, a été analysée sur un Chromatographe en Phase Gazeuse couplé à un Spectromètre de Masse GC-SM. L'activité antimicrobienne de cette huile a été évaluée sur cinq souches microbiennes par la méthode de l'aromatogramme.

**Résultats :** L'analyse de l'HE des fruits du pistachier lentisque a divulgué la présence de l' $\alpha$ -Terpinolène comme composé majoritaire (23,78%). L'activité antimicrobienne de cette huile a révélé une sensibilité pour les cinq souches testées.

**Conclusion :** Les résultats obtenus ont montré que l'HE étudiée présente une toxicité potentielle contre les souches testées. Ceux-ci pourraient contribuer au développement de nouveaux agents antimicrobiens.

**Mots clés :** *Pistacia lentiscus* L ; Huile essentielle ; GC-SM ; aromatoigramme ; activité antimicrobienne.

## ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL FRUITS OF THE LENTISQUE PISTACHIO (*PISTACIA LENTISCUS* L.)

### Abstract

**Description of the subject:** This work is part of the valuation of essential oil (EO) of fruits (*Pistacia lentiscus* L.). Harvested in a forest in Damous (Tipaza).

**Objective :** The objective of this study is to determine the chemical composition of the EO of *Pistacia lentiscus* fruits in order to establish its chromatographic profile and the evaluation of its antimicrobial activity.

**Methods :** The EO of *Pistacia lentiscus* fruits extracted by the hydrodistillation technic was analyzed on a Gas Chromatography coupled to a Mass Spectrometer GC-MS. The antimicrobial activity of this oil was evaluated on five microbial strains by the aromatogram method.

**Results:** The OE Analysis of *Pistacia lentiscus* fruits disclosed the presence of  $\alpha$ -Terpinolène (23.78%) as the majority compound. The antimicrobial activity of this OE revealed a sensitivity for the five strains tested.

**Conclusion :** The results obtained showed that studied OE exhibits a potential toxicity against the strains tested. These could contribute to the development of new antimicrobial agents.

**Keywords :** *Pistacia lentiscus* L, Essential oil, GC-MS, Aromatogram, Antimicrobial activity.

\* Auteur correspondant : AMARA Nacira, E-mail : amara\_nacira@live.fr

## INTRODUCTION

Le pistachier lentisque, couramment appelé «Dro» en arabe locale, est un arbrisseau ramifié de trois mètres de hauteur, à odeur de résine fortement âcre [1]. C'est une espèce de la famille des Anacardiaceae, dioïque à feuillage persistant [2]. Les fleurs sont en grappes spiciformes denses, de couleur rougeâtre, unisexuées et très aromatiques [3]. Le fruit du pistachier est une baie globuleuse de 2 à 3 mm monosperme ; d'abord rouge, puis noir à maturité [4]. *Pistacia lentiscus* pousse à l'état sauvage, sur tout type de sol dans l'Algérie subhumide et semi-aride. Généralement, elle se trouve dans les lieux arides de la région méditerranéenne [3]. En Algérie, elle occupe l'étage thermo-méditerranéen, sa limite méridionale se situe aux environs de Saïda [5]. Elle est dispersée tout au long du littoral et se développe dans divers habitats le long du gradient climatique qui varie suivant le rayonnement solaire, la température et la précipitation [4]. Par ailleurs, *Pistacia lentiscus* est connue pour ses propriétés médicinales depuis l'antiquité. En effet les médecines traditionnelles pratiquées, de part et d'autres des rives de la méditerranée, attribuent au lentisque des vertus dans le traitement des ulcères, l'hypertension, la toux, les maux de gorge, l'eczéma, les calculs rénaux et la jaunisse [6, 3]. Plusieurs études ont également signalé que l'huile essentielle (HE) des parties aériennes de *Pistacia lentiscus* possède des propriétés antifongiques et antibactériennes appréciables [7, 8, 6, 9]. Cependant est apparue et ne cesse de croître, au cours de ces dernières décennies, l'émergence d'une résistance antibiotique accrue au sein de la flore pathogène en raison d'une prescription inadaptée de ces agents antibactériens oraux par les praticiens au cours de leur exercice quotidien [10, 11]. Face aux limites thérapeutiques, des antibiotiques classiques ont poussé les scientifiques à orienter leur recherches vers de nouvelles voies et surtout l'utilisation des principes actifs de plantes aromatiques comme les huiles essentielles. Les molécules réputées d'être actives et présentant un plus large spectre sont les phénols, les alcools, les aldéhydes et les cétones [7, 8]. L'Algérie, pays Nord-Africain, est dotée d'une diversité climatique et de terrains fertiles. Il possède une flore très riche et offre des conditions de développement de nouvelles exploitations agricoles, des plantes médicinales et aromatiques [12]. Pour toutes

ses considérations ainsi que la rareté des travaux sur l'HE des fruits de cette plante en Algérie, nous ont amené à envisager des possibilités de valorisation de cette plante aromatique en vue d'offrir une alternative aux antibiotiques. De ce fait les objectifs assignés à ce travail consiste en l'étude de la composition chimique de l'HE par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG-SM), afin d'établir son profil chromatographique et son chémotype. De plus, l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE *in vitro* par la méthode aromagramme ainsi que la détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) par dilution en milieu gélosé.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Matériel végétal

L'échantillon est constitué de fruits de *Pistacia lentiscus* a été récolté au mois de novembre 2011 dans une forêt à Damous (Tipaza). Cette dernière est située à 41 mètres d'altitude, latitude : 36° 32' 58'' N et longitude 1° 42' 15'' E. La plante a été identifiée au niveau de l'Ecole Nationale des Sciences Agronomiques à El Harrach ENASA (Alger).

### 2. Souches microbiennes

Les souches microbiennes, mises à notre disposition par le laboratoire de microbiologie du groupe SAIDAL d'El Harrach (Alger), sont de référence ATCC (American Type Culture Collection). Elles ont été identifiées et caractérisées par l'Institut Pasteur (Alger). Selon la disponibilité du matériel, cinq souches ont été testées dont deux souches bactériennes à Gram positif (*Bacillus subtilis* ATCC 9372 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), deux à Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC 4158 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) et une levure (*Candida albicans* ATCC 24443).

### 3. Extraction de l'huile essentielle et rendement

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par la technique de l'hydrodistillation des fruits mûrs frais selon le protocole décrit par la Pharmacopée européenne [13]. L'huile essentielle extraite a été utilisée pour l'analyse physico-chimique, la CG-SM et l'évaluation de l'activité antimicrobienne. La quantité d'essence obtenue est pesée pour le calcul du rendement. Le rendement en huile essentielle ( $R_{HE}$ ) exprimé en (%) est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle

( $M_{HE}$ ) en (g) obtenue et la masse de matière végétale fraîche (MF) en (g). Il est calculé par l'équation suivante :  $R_{HE} \% = M_{HE} / MF \times 100$

#### 4. Etude analytique de l'huile essentielle

##### 4.1. Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle

Les différentes caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle (aspect, couleur et odeur) de l'essence des fruits du pistachier lentisque ont été notées.

##### 4.2. Mesures des indices chimiques

L'indice d'acide : (ISO 660 : 1996 F) [14]. C'est le nombre de milligrammes de KOH nécessaire pour neutraliser les acides libres présents dans 1 g d'HE. Il s'agit de neutraliser les acides libres par une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium titrée, en présence de phénolphaléine. Si l'acidité est forte, nous ajoutons du KOH alcoolique titré, jusqu'au virage rose dans la solution alcoolique du corps gras. L'indice d'ester : (AFNOR NF T 75- 104 : 1994) [14]. C'est le nombre de milligrammes de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans 1 g d'HE. L'hydrolyse des esters présents dans l'HE se fait par chauffage, dans des conditions définies, en présence d'une solution éthanolique titrée d'hydroxyde de potassium et dosage en retour de l'excès d'alcali par une solution titrée d'acide chlorhydrique.

##### 4.3. Mesures des grandeurs physiques

Densité relative à 20°C (ISO 279 : 1998 F) [14]. C'est le rapport entre la masse d'un certain volume d'HE et la masse d'un volume égal d'eau à 20°C. La densité relative est mesurée par une suite de pesées à l'aide d'un pycnomètre. Après nettoyage et séchage du pycnomètre, il a été pesé et rempli d'eau distillée. Le pycnomètre a été retiré, essuyé extérieurement et pesé. La même procédure a été suivie pour l'huile essentielle étudiée. L'indice de réfraction à 20°C (ISO 6320 : 2000) [14]. C'est le rapport entre le sinus des angles d'incidence et de réfraction, d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante.

#### 5. Analyses chromatographiques de l'huile essentielle

Les analyses chromatographiques de l'HE ont été effectuées sur un Chromatographe en Phase Gazeuse type Perkin Elmer Claros 500 couplé à un Spectromètre de Masse. La fragmentation a été effectuée par impact électronique sous un

champ de 70 eV. Le chromatographe est équipé d'une colonne capillaire HP-5MS (30 m  $\times$  0,25 mm), avec une épaisseur de film de 0,25  $\mu$ m. La température de la colonne est programmée à 50°C pendant 8 min, pallier 4°C min<sup>-1</sup> jusqu' à 250°C. Le gaz vecteur est l'hélium pur dont le débit est fixé à 1,5 ml. min<sup>-1</sup>. Le mode d'injection est split (rapport de fuite : 1/70) avec une valeur d'injection de 1  $\mu$ L. L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse NIST 98 et piloté par un logiciel « HP ChemStation » permettant de suivre l'évolution des analyses chromatographiques.

L'identification des constituants a été réalisée sur la base de la comparaison de leurs Indices de Rétention (IR) avec ceux des composés de référence de la littérature [15]. Une confirmation est apportée à l'aide des spectres de masse en comparaison avec ceux des composés standard de la banque de données informatisées (NIST 98).

#### 6. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE in vitro

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a consisté à estimer l'inhibition de la croissance des germes soumis à l'action de l'HE des fruits de *P. lentiscus* L. par la méthode aromagramme. Cette dernière a été adoptée par la technique préconisée par Tyagi et Malik [16]. La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été réalisée par la méthode de dilution sur gélose [17,18]. La gamme de concentration de l'huile essentielle testée est la suivante : (0,125 mg/l, 0,25 mg/l et 0,5 mg/l). A cet effet des disques de 6 mm ont été utilisés. Ils ont été imprégnés de 30  $\mu$ l d'huile essentielle pure d'une part et d'autre part par la même quantité d'huile essentielle à différentes concentrations. Ils sont déposés au centre d'une boîte de Pétri contenant un milieu gélosé préalablementensemencé par une souche microbienne (Muller-Hinton pour les bactéries ou la gélose Sabouraud pour la levure). Chaque boîte de Pétri est ensuite fermée et incubée dans l'étuve à température adéquate (37°C pendant 24h pour les bactéries et 25°C pendant 72h pour la levure). Les souches microbiennes croissent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'essence suffisante qui inhibe leur croissance. A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque dont le diamètre est mesuré et exprimé en

(mm). La CMI a été définie comme la plus faible concentration de l'huile essentielle qui inhibe complètement la croissance microbienne après la période d'incubation [19].

### 7. Analyse statistique

La signification statistique a été déterminée au moyen du test d'analyse de la variance à sens unique ANOVA, suivi par le test *post-hoc* de Tukey. Les valeurs de  $P < 0,01$  sont considérées comme différence significative. L'étude statistique a été réalisée à l'aide du Logiciel XLSTAT 2014.

## RÉSULTATS

### 1. Etude analytique de l'huile essentielle

#### 1.1. Propriétés organoleptique de l'huile essentielle

Les propriétés organoleptiques et physico-chimiques constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'HE. Nos essais ont été effectués selon un protocole précis obéissant aux normes éditées par ISO. A l'issue de l'extraction par hydrodistillation, l'HE obtenue est de couleur jaune pâle avec une odeur caractéristique. Les paramètres organoleptiques de notre HE sont en accord avec ceux répertoriés dans les normes AFNOR (Tableau 1).

Tableau 1 : Propriétés organoleptiques de l'HE de fruits du pistachier lentisque

Propriétés	Huile essentielle	
	AFNOR [11]	Notre étude
Aspect	Liquide, mobile et limpide	Liquide, mobile et limpide
Couleur	Jaune pâle	Jaune pâle
Odeur	Caractéristique	Caractéristique

#### 1.2. Caractéristiques physico-chimiques de l'HE des fruits de *Pistacia lentiscus*

Les spécificités physico-chimiques de l'huile essentielle du pistachier lentisque sont colligées dans le (Tableau 2).

Tableau 2 : Paramètres physico-chimiques de l'HE de fruits du pistachier lentisque

Paramètres	Huile essentielle	
	Notre étude	AFNOR [11]
Indice de réfraction 20°C	3,65	<5
Densité relative à 20°C	0,911	0,884- 0,912
Indice d'acide	1,70	<10
Indice ester	68,29	55-72

Pour les constantes chimiques, l'indice d'acide donne une idée sur le taux d'acides libres. Dans notre étude, ce dernier est inférieur à 2. Ce qui prouve une bonne conservation de l'essence (faible quantité d'acides libres). La détermination des propriétés physico-chimiques est une étape nécessaire mais demeure non suffisante pour caractériser l'HE. Il sera donc primordial de déterminer le profil chromatographique de l'essence aromatique.

### 2. Rendement et Composition chimique de l'huile essentielle par CG-SM

Nous avons obtenu un rendement en l'huile essentielle des fruits de *Pistacia lentiscus* L. de 1,18%. L'analyse de l'HE des fruits de *Pistacia lentiscus* L. par CG-SM a permis de détecter vingt et un constituants (21 pics) dont sept composés ont été identifiés.

Principalement l'Alpha-terpinolène a représenté le composé majoritaire avec un taux de (23,78 %), suivi par le 3-Cyclohexen-1-ol (12,35%), le 2-Undécanone (11,72 %), le Caryophyllène (9,60%), le Bergamotène (8,34%), le Beta-cadinène (7,45%) et l'Alpha-cadinol (6,66%). D'un point de vue biochimique, la famille des sesquiterpènes hydrocarbonés, est la plus abondante avec un taux de (37,11%) suivi des monoterpènes hydrocarbonés (23,78%), des monoterpènes oxygénés (12,37%) et des sesquiterpènes oxygénés (6,6%). D'après ces résultats, il est clair que, la molécule principale qui caractérise l'huile essentielle des fruits de cette plante aromatique et médicinale est l'Alpha-terpinolène (Fig. 1 et Tableau 3).

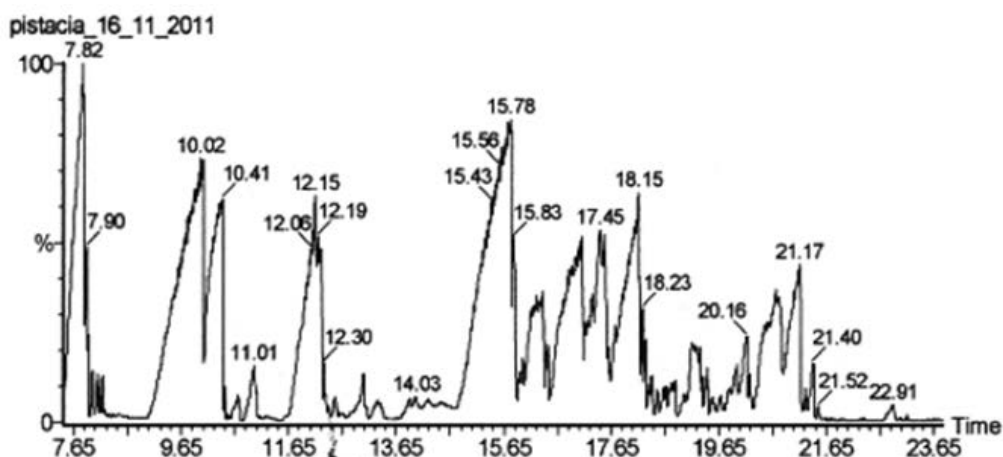


Figure 1 : Profil chromatographique de l'huile essentielle des fruits de *Pistacia lentiscus*  
Les chiffres sur les pics représentent les temps de rétention des composés détectés par CG-SM.

Tableau 3 : Composition chimique de l'HE de fruits du pistachier lentisque par CG-SM

N°	Huile essentielle		
	Composés	%	IR
1	$\alpha$ - Terpinolène	23,78	1078
2	2-Undecanone	11,72	1270
3	Caryophyllène	9,60	1407
4	Bergamotène	8,34	1410
5	$\beta$ -Cadinène	7,45	1538
6	$\alpha$ Cadinol	6,66	1645
7	3-Cyclohexen-1-ol	12,35	1668
Total		79,90	

IR, Indice de Rétention calculé sur une colonne apolaire (HP5-MS)

### 3. Activité antimicrobienne de l'HE in vitro

L'activité antibactérienne de l'essence aromatique des fruits de *P. lentiscus* L. effectuée par aromatochrome, a été réalisée sur cinq souches microbiennes. Au total, deux bactéries à Gram+, deux à Gram- ainsi une levure ont été utilisées lors de ce screening. L'analyse de la variance, a montré une différence significative entre trois souches sur cinq testées, par comparaison des moyennes par paire des Diamètres des Zones d'Inhibitions (DZI) à  $P < 0,01$ . A noter que le diamètre du disque (6 mm) a été inclus dans le calcul du DZI. A la lecture des résultats obtenus lors de

ce screening antimicrobien par aromatochrome et selon l'échelle d'estimation de [20]. Nous constatons que *Candida albicans* est l'espèce la plus sensible à l'action inhibitrice de l'huile essentielle des fruits de *P. lentiscus*, avec un DZI égal à  $64 \pm 1$  mm pour la dose  $30 \mu\text{l}$ / disque de l'huile essentielle pure et une CMI de  $0,125 \text{ mg/ml}$ . Elle est suivie par *Staphylococcus aureus*  $48 \pm 1$  mm avec une CMI de  $0,25 \text{ mg/ml}$ , *Bacillus subtilis*  $22 \pm 1$  mm et une CMI de  $0,50 \text{ mg/ml}$ , *Pseudomonas aeruginosa*  $18 \pm 1$  mm et *Escherichia coli*  $16 \pm 1$  mm (Tableau 4 et Fig. 2).

Tableau 4 : Activité antimicrobienne in vitro de l'HE des fruits du pistachier lentisque

Souches microbiennes			
	Gram	Zone d'inhibition $30 \mu\text{l}$ /disque en (mm)	CMI (mg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	$48 \pm 1$ b	0,25
<i>Bacillus subtilis</i>	Positif	$22 \pm 1$ c	0,50
<i>Escherichia coli</i>	Négatif	$16 \pm 1$ d	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif	$18 \pm 1$ d	-
<i>Candida albicans</i>	Levure	$64 \pm 1$ a	0,125

(-) non déterminée, CMI Concentration Minimale Inhibitrice, les lettres différentes indiquent des mesures significativement différentes à  $P < 0,01$

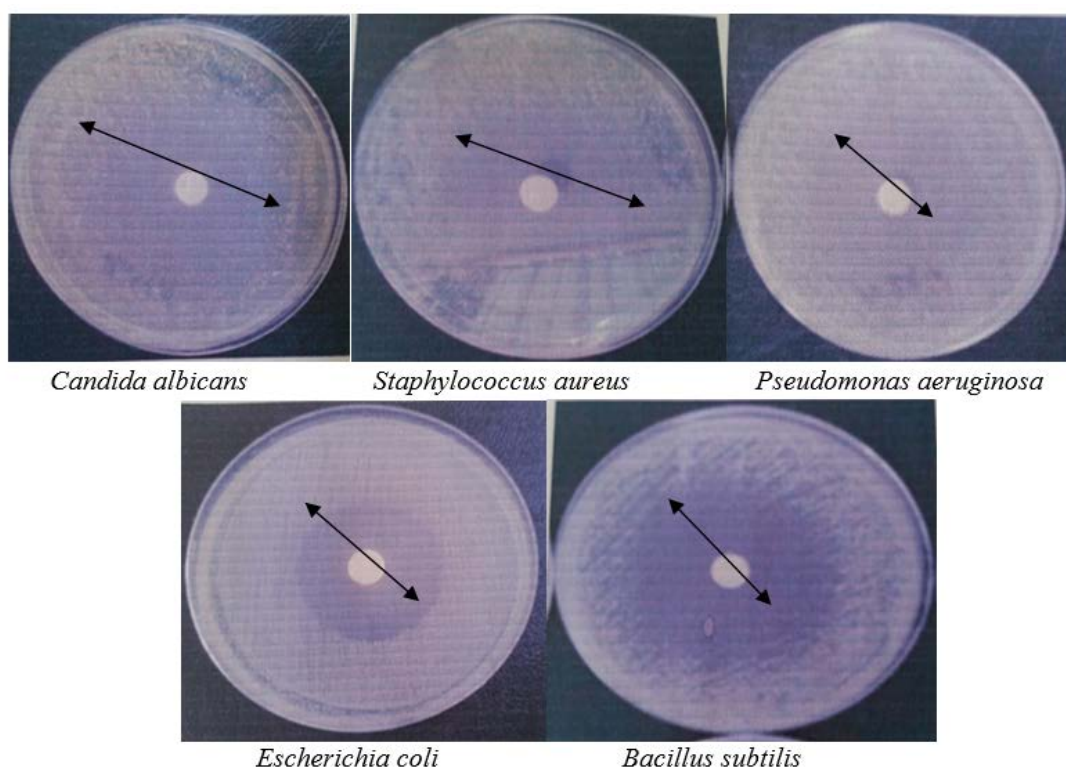


Figure 2 : Activité antimicrobienne de l'huile essentielle des fruits de *Pistacia lentiscus*

## DISCUSSION

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que les paramètres physico-chimiques de l'huile essentielle des fruits de *Pistacia lentiscus* L. sont en accord avec ceux mentionnés par les normes. Selon Kanko et al. [21], l'indice de réfraction renseigne sur la qualité de l'HE, il varie avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés, une forte teneur en monoterpènes donnerait un indice élevé. Le faible indice de réfraction de l'HE indique sa faible réfraction de la lumière ce qui pourrait favoriser son utilisation dans les produits cosmétiques. Donc notre HE est de bonne qualité.

Le rendement de l'huile essentielle des fruits de *Pistacia lentiscus* L. est de 1,18%. Des résultats similaires ont été rapportés par Shama et al. [22] 1,16% et 1,25%. Cependant Arab et al. [23] ont obtenu un rendement en HE de 0,253% au niveau des feuilles et des fruits récoltés dans la forêt Brouk située à environ 4,5 Km du centre de Boumerdès. D'après les mêmes auteurs le rendement en huile essentielle de *P. lentiscus* semble dépendre de l'organe de la plante utilisé, de la méthode d'extraction, du site de la plante et de la période de récolte.

L'analyse de l'HE des fruits de *Pistacia lentiscus* L. par CG-SM a permis

l'identification de 07 composés volatils majoritaires où l'Alpha-terpinolène a été isolé avec un taux de (23,78 %), suivi par le 3-Cyclohexen-1-ol (12,35%) et le 2-Undécanone (11,72 %). Ces résultats sont complètement différents de ceux obtenus par d'autres auteurs. Ainsi Arab et al. [23] ont trouvé comme composé majoritaire le Spathulenol. Néanmoins, il faut signaler que les mêmes molécules sont présentes mais à des pourcentages différents. Cependant Amhamdi et al. [24] ont détecté comme composé majoritaire de l'huile essentielle du pistachier lentisque le limonène au Maroc.

Par ailleurs Aouinti et al. [25] au Maroc ont déclaré que l'huile essentielle des fruits de *P. lentiscus* L. renferme les monoterpènes et les sesquiterpènes mais en faibles quantités. Les composés majoritaires sont : le myrcène, le pinène et le limonène. Cette variation de la composition chimique de l'huile essentielle n'est que le reflet de la biodiversité moléculaire rencontrée chez *Pistacia lentiscus* L. due au climat et aux biotopes appropriés [23]. En somme, Bruneton [26] et Elaïssi et al. [27] ont révélé que la composition chimique d'une huile essentielle est tributaire de plusieurs facteurs biotique et abiotique. Plusieurs études ont été faites dans ce sens dans le but de justifier les fluctuations qui ont



été observées dans le tracé chromatographique d'une seule plante aromatique.

Il a été remarqué que l'HE des fruits de pistachier lentisque est plus efficace sur les souches bactériennes à Gram<sup>+</sup> que celles à Gram<sup>-</sup>. En effet d'après Ali-Shtayeh et al. [28] et Kordali et al. [8], cette sensibilité est en relation avec la nature de la membrane externe des bactéries, et sa réaction avec les composés volatils de l'huile essentielle. La paroi cellulaire des bactéries à Gram<sup>+</sup> est constituée par une seule couche. Alors que la paroi des bactéries à Gram<sup>-</sup> a une structure multicouche liée par une membrane cellulaire externe, à cause de cette structure ces bactéries présentent une résistance. Nos résultats sont en concordance avec plusieurs travaux antérieurs. Effectivement selon Mazari et al. [29], Barra et al. [30], El-Idrissi et al. [31] et Debabi et al. [32], l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L. a été examinée pour son activité antifongique contre *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia solani*, et *Candida albicans*. Les deux composants principaux de l'huile essentielle sont : l'Alpha terpinéol et le terpinén-4-ol ont inhibé totalement la croissance mycélienne d'*Aspergillus flavus*.

Le mécanisme d'action des extraits aromatiques sur les souches fongiques n'a pas été totalement élucidé. Cependant, certaines études soulignent que l'action antifongique de ces substances terpéniques est due à une

augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci, entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure [33]. Les composés majoritaires sont souvent responsables de l'activité antibactérienne observée. En effet, il est admis que l'activité antimicrobienne des HE se classe dans l'ordre décroissant selon la nature de leurs composés majoritaires : phénols > alcools > aldéhydes > cétones > oxydes > hydrocarbures > esters [34].

## CONCLUSION

À la lumière des résultats obtenus, il ressort que l'huile essentielle des fruits de *Pistacia lentiscus* L. obtenue par hydrodistillation et identifiée par CG-SM est riche en sesquiterpènes hydrocarbonés et en monoterpènes hydrocarbonés. L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE des fruits de *Pistacia lentiscus* L. par la méthode de l'aromatogramme a montré que cette huile a exhibé toutes les souches testées. Néanmoins cette action est plus importante sur la levure *Candida albicans* avec une zone d'inhibition plus ou moins importante. De ce fait, il apparaît judicieux d'explorer l'effet antimicrobien de l'HE des fruits de pistachier lentisque à grandes échelles, dans les domaines pharmacologiques et agroalimentaires.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. **More D. & White J. (2005)**. Encyclopédie des arbres plus de 1800 espèces et variétés du monde. Ed flami : 12-24.
- [2]. **Alloune R., Laizid A & Tazerout M. (2012)**. Etudes comparatives de deux plantes oléagineuses locales pour la production de biodiesel en Algérie. Rev. Energ. Ren. SIENR, 12, Ghardaïa : 19-22.
- [3]. **Djerou Z. (2011)**. Etude des effets pharmacotoxicologique de plantes médicinales d'Algérie : L'activité cicatrisante l'innocuité de l'huile végétale de *Pistacia lentiscus* L. Thèse de doctorat sciences, Univ Mentouri, Fac Sci Nat Vie, Constantine, 156p.
- [4]. **Maamri-Habibatni Z. (2014)**. *Pistacia lentiscus* : Evaluation pharmaco-toxicologique. Thèse de doctorat sciences, Univ de Constantine1, Fac Sci Nat Vie, 138p.
- [5]. **Ait Said S. (2011)**. Stratégies adaptatives des deux espèces du genre *Pistacia* (*P. lentiscus* L. et *P. atlantica* Desf) aux conditions d'altitude de salinité et d'aridité : Approches morpho-anatomique, phytochimique et éco-physiologique. Thèse de doctorat de biologie végétale, Univ Mouloud Mammeri, Fac Sci Biol, Sci Agro, Tizi-Ouzou, 180p.
- [6]. **Gardeli C., Vassiliki P., Athanasios M., Kibouris H. & Komaitis M. (2008)**. Essential of composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* of methanolic extracts. Food chemistry 107 (3), p. 1120-1130.
- [7]. **Bonsignore L., Cottiglia F. & Loy G. (1998)**. Antibacterial activity of *Pistacia lentiscus* areal parts. Fitoterapia 67 (6), p. 537-538.
- [8]. **Kordali S., Cakir A., Zengin H. & Duru M.E. (2003)**. Antifungal activities of leaves of three *Pistacia* species grown in Turkey. Fitoterapia 74 (1), p. 164-167.
- [9]. **Bammou M., Daoudi A., Slimani I., Najeim M., Bouiamrine E.H., Ibijbijen J. & Nassiri L. (2015)**. Valorisation du lentisque "*Pistacia lentiscus* L: Etude ethnobotanique, screening phytochimique et pouvoir antimicrobien. J. Appl. Biosc. 86: 7966- 7975.
- [10]. **Benjlali B. (2005)**. Le materiel vegetal et extraction. In "Huiles essentielles de la plante à l'extraction". Manuel pratique, Edition universitaire de Québec à Chicoutimi. P. 61-78.

- [11]. **Smith R.L., Cohen S.M., Doult J., Feron V.J., Goodman J.I., Marnett L.J., Portoghese-Waddell W.J., Wagner B.M., Hall R.L., Higley N.A., Lugas-Gavin C. & Adams T.B. (2005).** A procedure for safety evaluation of natural flavor complexes used as ingredients in essential oils. *Food Chemistry. Toxicol* 43 p. 345-363.
- [12]. **Beloued A. (2005).** Plantes médicinales d'Algérie. Office de Publication Universitaire (OPU). Ben-Aknoun, Alger, 286p.
- [13]. **Pharmacopée européenne. (2002).** 3<sup>e</sup> édition, Conseil de l'Europe, Strasbourg, p. 681-683.
- [14]. **AFNOR. (2000).** "Recueil de normes" les huiles essentielles. Tome 2. Monographies relatives aux huiles essentielles. AFNOR, Paris, p. 661-663.
- [15]. **Adams R.P. (2007).** Identification of essential oils components by gas chromatography quadrupole mass spectroscopy. Carol Stream Illinois, USA.
- [16]. **Tyagi A.K. & Malik A. (2011).** Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapor phase against food spoiling microorganisms. *Food contr.* 22 (11), p. 1707-1714.
- [17]. **Billerbeck V.C., Roques C., Vaniere P. & Marquier P. (2002).** Activité antimicrobienne et antifongique des produits à base d'huiles essentielles. *Hygiène X* (10), p. 248-251.
- [18]. **Marino M., Bersani C. & Comi G. (2001).** Impedance measurements to study the antimicrobial activity oils from Lamiaceae and compositae. *Int. J. Food. Microbiol* 67 (3), p. 187-95.
- [19]. **Smania A., Monache F.D., Smania E.F., Gil M.L., Benchetrit L.C. & Cruz F.C. (1995).** Antibacterial activity of substance produced by the *Fungus Pycnoporus sanguineus* (FR) Mrr. *J. Ethnopharmacol* 45 (3), p. 177-81.
- [20]. **Mutai C., Bii C., Rukunga G., Oudicho J., Mwitari P., Abatis D., Vagias C., Roussis V. & Kirui J. (2009).** Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated *Acacia millifera*. *Afric. J. Trad. CAM*, 6 (1), p. 42-48.
- [21]. **Kanko C., Sawaliho B.E., Kome S., Koukoua G. & N'Guessan Y.T. (2004).** Etude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogmon citratus*, *Cymbopogmon nardus*, *Cymbopogmon giganteus*. *Comptes-rendus Chimie7*. P. 1039-1042.
- [22]. **Shama B., Ghanmi M., Aafi A., Fougrach H. & Bourkhis B. (2006).** Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* L. *Bulletin de la société de pharmacie Bordeaux*, 146: p. 85-96.
- [23]. **Arab K., Bouchenak O. & Yahyaoui K. (2014).** Phytochemical study and evaluation antimicrobial and antioxidant activity of essential oils and phenolic compound of *Pistacia lentiscus* L. *J. Fundam. App. Sci.* 6 (1), p. 77-91.
- [24]. **Amhamdi H., Aouinti F., Wathelet J.P. & El Bachiri A. (2009).** Chemical composition of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Eastern Morocco University Mohamed I. Morocco, 3 (2), p. 90-95.
- [25]. **Aouinti F., Zidane H., Tahri M., Wathelet J.P. & El Bachiri A. (2013).** Chemical composition mineral contents and antioxidant activity of fruits essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Eastern Morocco. *J. Mater. Environ. Sci*, 5 (1), p. 199-206.
- [26]. **Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie phytochimie plantes médicinales. 2<sup>e</sup> édition Tech et Doc Lavoisier Paris France 915p.
- [27]. **Elaissi A., Rouis Z. & Salem N.A.B. (2012).** Chemical composition of eight eucalyptus species essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities. *BMC, Complement Alternat Med* 12: 81.
- [28]. **Ali-Shtayeh M.S., Yaghmour R.M., Faidi Y.R., Salem K. & El-Nuri M.A. (1998).** Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *J. Ethnopharmacol. Apr.* 60 (3), p. 265-71.
- [29]. **Mazari K., Bendimerad N., Bekhechi C. & Fernandez X. (2010).** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Algerian *Juniperus phoenicia* L. and *Cupressus sempervirens* L. *Journal of Medicinal plants Research.* 4 (10), p. 959-964.
- [30]. **Barra A., Coroneo V., Dessi S., Cabras P. & Angioni A. (2007).** Characterisation of the volatile constituents in the essential oil of *Pistacia lentiscus* L from different origins and its antifungal and antioxidant activity. *J. Agri. Food. Chem.* 55 (17), p. 7093-7098.
- [31]. **El-Idrissi M., Bachouchi M., Choukrad M.B. & Louzi L. (2016).** Chemical composition and antimicrobial activity essential oil isolated from leaves and twigs of *Pistacia lentiscus* L. growing in Morocco. *World J. Pharm. Pharmaceu. Sci.* 5 (4), p. 516-524.
- [32]. **Debabi H., Nemri K. & Riahi H. (2017).** Effets antimicrobiens des extraits foliaires de *Pistacia lentiscus* L. dans les escalopes de dindes. *J. New. Sci. Agriculture and Biotechnology.* 40 (1), 2144-2151.
- [33]. **Cox S.D., Mann C.M. & Markham J.L. (2002).** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca lternifolia* (tea tree oil). *J of App Microbiol* 88(1), 170-175.
- [34]. **Dorman H.J.D. & Deans S.G (2000).** Antimicrobial agents from plants antibacterial activity of plant volatile oils. *J of App Microbio* 88(2), 308-316.

## IMPACT DE LA FORMULATION SUR LE POTENTIEL ANTIFONGIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DU BIGARADIER *CITRUS AURANTIUM* L.

BENDALI Abdelaziz<sup>1\*</sup>, OULEBSIR Chahinez<sup>1</sup>, EL HADI Djamel<sup>2</sup> et DJAZOULI Zahr-Eddine<sup>3</sup>

1. Université Blida 1, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Biotechnologie, Laboratoire de Recherche des Plantes Aromatiques et Médicinales. B.P. 270, Route de Soumaâ, Blida, Algérie
2. Université Blida 1, Département de Chimie Industrielle, Laboratoire d'Analyses Fonctionnelles des Procédés Chimiques. B.P. 270, Route de Soumaâ, Blida, Algérie
3. Université de Blida 1. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Département de Biotechnologie. Laboratoire de Biotechnologie des Productions Végétales, B.P. 270, Route de Soumaâ, Blida, Algérie

Reçu le 23/08/2019, Révisé le 11/10/2019, Accepté le 19/11/2019

### Résumé

**Description du sujet :** Les produits biologiques sont recherchés pour leur efficacité dans plusieurs secteurs pharmaceutiques et agricoles. La formulation permet de sécuriser, de réduire et de préserver les ressources phylogénétiques tout en protégeant le principe actif

**Objectifs :** Notre étude a porté sur l'évaluation de l'activité antifongique de quatre formulations de l'huile essentielle des feuilles de *Citrus aurantium* (L.) à savoir la formulation en gel, au Tween, au DMSO et à l'acétone vis à vis d'un champignon phytopathogène (*Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*) suivant deux modes d'administration, diffusion par disque et diffusion par micro-atmosphère.

**Méthodes :** L'huile essentielle de *Citrus aurantium* (L.) a été extraite par hydrodistillation-entraînement à la vapeur. 4 formulations ont été préconisées à partir de l'HE du bigaradier (F1 : Formulation en gel, F2 : Formulation au Tween, F3 : Formulation au DMSO, F4 : Formulation à l'Acétone). L'activité antifongique a été estimée selon une gradation positive de concentration (200, 400, 800, 1600 et 3200 µl/ml).

**Résultats :** Les résultats ont montré que les diverses formulations expriment un fort pouvoir inhibiteur suivant le gradient des concentrations du principe actif. La caractéristique propre aux différentes formulations se voit distincte entre diffusion par disque et diffusion par micro-atmosphère. La formulation en gel est performante suivant les concentrations de l'huile essentielle pour les deux méthodes. Tandis que les préparations au DMSO et à l'acétone sont très performantes par diffusion par disque.

**Conclusion :** Cette approche nous permet de valider l'utilisation des huiles essentielles dans divers domaines relatifs à la gestion antimicrobienne

**Mots clés :** feuilles d'oranger amer, CG/SM, adjuvant, *Fusarium*, diffusion par disque, diffusion par micro-atmosphère.

## IMPACT OF THE FORMULATION ON THE POTENTIAL ANTI FUNGAL ACTIVITY ESSENTIAL OIL OF *CITRUS AURANTIUM* L.

### Abstract

**Description of the subject:** Organic products are explored for their phytopharmaceutical impact. The formulation helps to secure, reduce and preserve phylogenetic resources while protecting the active ingredient.

**Objective:** Our study evaluated the antifungal activity of four (04) formulations of *Citrus aurantium* L the essential oil. namely the formulation on gel, Tween, DMSO and acetone against a phytopathogenic fungus (*Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*) according to two modes of administration, by diffusion by disk and by micro-atmosphere.

**Methods :** *Citrus aurantium* L. essential oil was extracted by steam hydrodistillation. 4 formulations were recommended from the HE of the bigarade orange (F1: Gel formulation, F2: Tween formulation, F3: DMSO formulation, F4: Acetone formulation). The antifungal activity was estimated according to ascending concentration (200, 400, 800, 1600 and 3200 µl / ml).

**Results :** The results showed that the various formulations express a strong inhibitory power according to the gradient concentrations of active principle. The specific characteristic of the different formulations is distinct between diffusion by disk and diffusion by micro-atmosphere. The gel formulation was effective according to essential oil concentrations for both methods. While the preparation from DMSO and acetone was highly efficient by disk diffusion.

**Conclusion :** This approach allows us to validate the use of essential oils in various areas related to antimicrobial management.

**Keywords :** leaves of bigarade orange, CG/MS, adjuvant, *Fusarium*, disk diffusion, micro-atmosphere diffusion.

\* Auteur correspondant: BENDALI Abdelaziz, E-mail: Aziz.Bendali@hotmail.com

## INTRODUCTION

L'intérêt pour les biopesticides d'origine végétale, comme alternatifs aux applications fortuites d'une pharmacopée aveugle s'est développé, en particulier ceux qui préservent un environnement sain, biodégradables, non toxiques et spécifiques dans leur action, gagnent une attention considérable [1]. Ils sont également nécessaires pour combattre l'évolution de la résistance aux produits de synthèses [2].

Les nouvelles recherches ont soulevé la possibilité d'employer de nouveaux composés naturels qui peuvent agir en tant que biofongicides [3, 4, 5]. La lutte contre les champignons par l'application de fongicides naturels a pris un envol très important dans les stratégies alternatives aux fongicides de synthèse. Ces derniers sont à l'origine de beaucoup de maladies de plantes. Ils causent de grandes pertes de rendement dans les champs et affectent la qualité des aliments en conservation [6].

Les huiles essentielles avec leurs larges spectres d'action vis-à-vis d'un grand nombre d'espèces fongiques constituent une alternative très prometteuse, sans être une source de danger pour la santé humaine ou de pollution pour l'environnement [7].

Le potentiel d'utilisation des huiles essentielles et de leurs constituants comme fongicides est renforcé par leur biodégradabilité. En outre, l'apparition de souches fongiques résistantes aux fongicides à base d'huiles essentielles est fortement improbable à cause de la composition souvent polymoléculaire de ces huiles et de l'action synergique de leurs constituants [8].

L'exploitation des huiles essentielles dans la protection des végétaux est encore dans ses débuts, mais ces produits ont un potentiel fongicide prémuni pour remplacer les fongicides de synthèse. Des biofongicides à base d'huile essentielle sont mis sur le marché pour les agriculteurs pratiquant de l'agriculture biologique. Il s'agit du Sporan<sup>TM</sup> (*Rosemarinus officianalis*), Promax<sup>TM</sup> (*Thymus vulgaris*), Trilogy<sup>TM</sup> (*Azadirachta indica*) et E-Rase<sup>TM</sup> (*Simmondsia californica*) [9].

Les huiles essentielles de *Citrus aurantium* (L.) sont utilisées dans plusieurs produits comme aromatisants et additives tels que les aliments, les jus, les produits cosmétiques et médicinaux.

Elles sont utilisées pour leurs propriétés antioxydantes, germicides et anticancérigènes [10, 11]. Les huiles essentielles de *Citrus aurantium* (L.) occupent un large spectre des propriétés antifongiques qui sont dévoilées par les différentes formulations en leur permettant d'être considérées comme des agents antimicrobiens efficaces dans le traitement de certaines infections et dans la lutte contre certains organismes phytopathogènes. Le but principale de la présente étude et d'évaluer les potentialités antifongiques d'une même huile essentielle sous diverses formulations. Le recours à ce type d'étude apportera une valeur ajoutée aux secteurs pharmaceutique et agricole, compte tenu de l'importance économique de la disponibilité du matériel végétal dans la production de produits antimicrobiens naturels

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Présentation du matériel végétal et reconnaissance botanique

Les échantillons de *Citrus aurantium* (L.) ont été collectés pendant la phase phénologique de feuillaison (avant floraison), durant les mois de mars et avril de l'année 2018. Les collectes ont eu lieu au même endroit, au niveau du jardin botanique de la Station Régionale de la Protection des Végétaux de Boufarik. La station est située à 3 km de la sortie nord du chef-lieu de la commune (36° 34' 00" Nord, 2° 55' 00" Est) à 63 mètres d'altitude. Ledit jardin botanique, s'étale sur une superficie de 5 hectares composé de rangés de bigaradier, clémentinier, pommier, poirier, néflier, abricotier, pêcher, prunier et grenadier. En bordure de ce jardin sont plantées des lignes d'oliviers et de figuiers envahi par une broussaille d'églantier et très infesté de phragmites et de chiendent.

Seulement les feuilles ont été utilisées. L'identification du spécimen étudié a été réalisée selon la nouvelle flore de l'Algérie [12], par l'équipe du Jardin d'Essai d'EL Hamma à Alger.

Le matériel végétal obtenu a été séché à l'abri de la lumière et de l'humidité, à température ambiante (24±1°C) pendant 7 jours au laboratoire de Phytopharmacie du Département des Biotechnologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (Université de Blida 1).

## 2. Procédure d'extraction des huiles essentielles du bigaradier

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de substances organiques aromatiques liquides qu'on trouve naturellement dans diverses parties des végétaux. Elles sont très concentrées, volatiles et sensibles à la décomposition sous l'effet de la chaleur [13]. Dans la présente étude, Les huiles essentielles ont été obtenues par hydrodistillation en utilisant un appareil de type Clevenger, Par référence aux directive de la pharmacopée européenne, l'extraction est effectuée durant trois heures, durée nécessaire à l'épuisement de la matière première (environ 90%) en huile essentielle. Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène. Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Sachant que la température d'ébullition d'un mélange est atteinte lorsque la somme des tensions de vapeur de chacun des constituants est égale à la pression d'évaporation, elle est donc inférieure à chacun des points d'ébullition des substances pures. Ainsi le mélange azéotropique « eau + huile essentielle » distille à une température égale 100°C à pression atmosphérique alors que les températures d'ébullition des composés aromatiques sont pour la plupart très élevées. Il est ensuite refroidi et condensé dans un essencier. Une fois condensées, eau et molécules aromatiques du fait de leurs différences de densité, se séparent en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle. Le stockage des huiles essentielles à -4°C à l'obscurité dans des flacons codés, dans l'attente de leur analyse. Le rendement en huiles essentielles (RHE) est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction ( $M'$ ) et la masse de la matière végétale utilisée ( $M$ ). Selon Boussaada et Chemli [14], le rendement est exprimé en pourcentage, il est exprimé par la formule suivante :  $RHE\% = (m_h/m_v) \times 100$ , Avec : RHE : Rendement en huile essentielle en %,  $M'$  : Masse d'huile essentielle en gramme,  $M$  : Masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme.

## 3. Caractérisation chimique de l'huile essentielle du bigaradier par Couplage chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse (CPG/SM)

Une fois l'huile essentielle obtenue, l'analyse chimique permet d'identifier et de quantifier les produits qui la composent. L'analyse de la partie volatile est réalisée par deux techniques chromatographiques (CPG & CPG/SM). Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CPG/SM) permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse des différents constituants d'un mélange complexe. Ce couplage est la technique la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles et réunit le meilleur de ces deux techniques et permet de connaître, dans la grande majorité des cas, la masse moléculaire d'un composé et d'obtenir des informations structurales relatives à une molécule à partir de sa fragmentation.

L'analyse chromatographique est réalisée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse (GC-2014 Shimadzu Gas Chromatograph), équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne capillaire DB5 peu polaire de longueur 30 m, de diamètre interne 25 µm et ayant un film d'épaisseur 0,25 µm. L'injecteur fonctionne en mode split avec un ratio de 1/50, le chromatographe est alimenté par trois gaz : l'azote, l'hydrogène et l'air, le gaz vecteur inerte est l'hydrogène ayant un flux total de 5,61 ml/min, un débit de 1 ml/min et une pression de 80,1 kPa. La température de l'injecteur est de 250°C et celle du détecteur est de 270°C, et la température de la colonne suit le programme suivant : la colonne à une température initiale de 50°C qui est maintenue pendant une minute ; puis de 50 à 175°C, elle suit un palier à raison de 5°C par minute. La température de 175°C est maintenue pendant dix minutes. Ensuite, la température passe de 175 à 250°C selon un palier, à raison de 15°C par minute [15].

L'identification des composants individuels est fondée sur la comparaison des indices de rétention ( $I_r$ ) calculés, sur les colonnes polaires et apolaires, avec ceux de composés authentiques ou des données de la littérature (National Institute of Standards and Technology, 2008), et des bibliothèques commerciales [16, 17], et par l'analyse de chaque spectre de masse des composés constitutifs.

#### 4. Préparation des différentes formulations de l'huile essentielle du bigaradier

La formulation consiste à additionner à l'huile essentielle un ou plusieurs adjuvants afin de faciliter sa conservation et d'homogénéiser son étalement et son absorption par le substrat. Nous avons préparé 4 formulations à partir de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* (L.), comme suit :

**-Formulation 1 :** L'huile essentielle obtenue a été formulée ainsi que son témoin positif en gel selon le protocole établi par Moussaoui et al. [18].

**-Formulation 2 :** L'huile essentielle obtenue a été formulée ainsi que le témoin positif par une substance le Monooléate de polyoxyéthylène sorbitane selon le protocole établi par Hamdani et Allem [19].

**-Formulation 3 :** L'huile essentielle obtenue a été formulée ainsi que le témoin positif par un solvant polaire organique (organosulfuré) le diméthylsulfoxyde selon le protocole établi par Daghbouche et al. [20].

**-Formulation 4 :** L'huile essentielle obtenue a été formulée ainsi que le témoin positif par un solvant organique, l'acétone selon le protocole établi par Daghbouche et al. [20].

#### 5. Mise en évidence de l'activité antifongique de l'huile essentielle du bigaradier

##### 5.1. Micro-organisme et conditions de culture

L'activité antimicrobienne (activité biocide et/ou biostatique) de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* (L.) a été évaluée sur une souche fongique qui provient de l'American Type Culture Collection ATCC, USA. Il s'agit de *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*, elle attaque principalement la plante au début de la floraison. La plante attaquée présente des symptômes de flétrissement et de jaunissement partiel, puis total du feuillage [21].

La souche fongique a été pré-cultivée avant son utilisation. La suspension fongique a été préparée en inoculant une boucle de la souche testée dans 3 ml de bouillon (milieu PDA) et incubée à 37°C pendant 48 h afin d'avoir une culture jeune. La turbidité correspond à une densité optique de 0,5 étalon de McFarland à 620 nm pour atteindre une concentration de  $5 \times 10^5$  CFU/ml.

##### 5.2. Mise en évidence de l'activité antifongique

La mise en évidence de l'activité antifongique de *Citrus aurantium* (L.) a été exprimé par deux méthodes à savoir ;

la méthode de diffusion par disques [22] et la méthode par micro atmosphère [23, 24].

Pour l'ensemble des formulations, les dilutions testées ont été préparés selon une gradation de concentration obéissant à une suite géométrique de raison  $r^2$  (200, 400, 800, 1600 et 3200  $\mu\text{l/ml}$ ) [25].

Les disques sont préparées à partir du papier wattman de 6 mm de diamètre, ensuite elles sont mises dans un tube à essai, stérilisés à l'autoclave 20 minutes à 120°C, puis stockés à une température ambiante.

Quelques colonies fongique ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine, puis disposées sur le centre d'une boîte de pétri préalablement coulée du milieu de culture spécifique pour les champignons (PDA) puis incubés à 27°C pendant 5 à 6 jours. Après incubation des disques mycéliens de 8mm de diamètre issu d'une culture âgée de 7 jours de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* ont été prélevé avec un emporte-pièce et inoculés au centre de chaque boîte de pétri précédemment coulé avec 15ml de PDA (1disque/boîte).

**- Pour la méthode par disque ;** on a utilisé une pince pour mettre 5 disques dans la boîte, à l'aide d'une micropipette on a imbibé chaque disque par 10  $\mu\text{l}$  d'huile essentielle formulée [22].

**- Pour la méthode par micro atmosphère ;** on a déposé les disques de papier sur le couvercle de la boîte de pétri puis on les a imbibé par 10  $\mu\text{l}$  sans que l'huile essentielle entre en contact avec notre milieu de culture (PDA) contenant le disque mycélien, la boîte est hermétiquement fermée [23, 24]. Après diffusion de l'HE durant 1 heure les boîtes ont été incubées à l'obscurité à une température de 27°C, durant 7 jours.

#### 6. Évaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle du bigaradier

##### 6.1. Cinétique de la croissance mycélienne

La cinétique de la croissance mycélienne correspond aux variations dans le temps, du diamètre du champignon avec différentes concentrations. La cinétique de croissance mycélienne a été évaluée toutes les 48 heures en mesurant la moyenne de cinq diamètres perpendiculaires passant par le milieu de la rondelle [26]. Cette lecture est toujours réalisée en comparaison avec les cultures témoins dans les mêmes conditions et en utilisant le logiciel Digimizer avec un support pour respecter le même pixel.

## 6.2. Croissance mycélienne

La croissance mycélienne a été évaluée à la fin de l'expérience, à savoir au bout de 168h (7 jours) d'incubation, en mesurant la moyenne de cinq diamètres sans prendre en compte le diamètre du disque. Cette lecture est toujours réalisée en comparaison avec les cultures témoins ayant démarré le même jour et dans les mêmes conditions [26].

## 6.3. Détermination de l'indice antifongique

D'après Sharma et Tripathi [27], le pourcentage d'inhibition de croissance  $I(\%)$  est exprimé par la réduction du diamètre de la colonie fongique par rapport au témoin, selon la formule suivante  $I(\%) = [(D_{\text{témoin}} - D_{\text{test}})] / D_{\text{témoin}} \times 100$ .  $D_{\text{témoin}}$ : témoin diamètre de la colonie témoin en (mm),  $D_{\text{test}}$ : diamètre de la colonie dans le test en (mm)

## 6.4. Détermination de la vitesse de croissance mycélienne (VC)

Selon Cahagnier et Richard-Molard [28], la vitesse de la croissance mycélienne de chaque concentration est déterminée par la formule suivante :  $VC = [D1/Te1] + [(D2 - D1)/Te2] + [(D3 - D2)/Te3] + \dots + [(Dn - Dn-1)/Ten]$ .  $D$ : diamètre de la zone de croissance journalière,  $Te$ : temps d'incubation.

## 7. Analyse statistique des données

Les résultats sont rapportés comme valeurs de trois répétitions (Moyenne  $\pm$  SE) sur la base d'un C.V. <15%. L'analyse de la variance (type GLM et type ANOVA) suivie du test de post-Hoc a été utilisée pour établir l'effet des dilutions et des formulations sur l'activité antifongique de l'huile essentielle du Bigaradier *Citrus aurantium* (L.), les différences ont été considérées comme significatives à  $p < 0,05$ . Les données ont été déroulées par le logiciel SYSTAT ver. 12 [29] et par le logiciel PAST ver. 1.37 [30].

## RÉSULTATS

### 1. Rendement et analyse de la composition chimique de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* (L.) par la CG/MS

L'huile essentielle de *Citrus aurantium* (L.), extraite par hydrodistillation-entraînement à la vapeur a exprimé un rendement de l'ordre de 0,57%.

D'après le tableau 1, on constate que les composés majoritaires de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* (L.), sont le Terpèneol et le Geraniolacetate avec des taux respectifs de 21% et de 18% suivit de l'Anthranilic acid. 1,5-dimethyl-1-vinyl-4-hexeryl ester et du Caryophyllene avec des taux de 12% et 11,66%, ainsi que le Phytol qui est moins disponible par rapport aux premiers composés cités avec un taux de concentration de 4,36%.

La proportion des différents groupes de composés de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* (L.) comporte une large proportion de Monoterpènes (39%). Les Sesquiterpènes viennent en seconde position avec des proportions moins élevées (23,52%). Cependant, les Alcools et les Alcaloïdes affichent des proportions ajustées respectivement à 10,76% et 12%.

### 2. Variation temporelle des zones d'inhibition de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* sous l'effet des différentes formulations de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* (L.)

Selon la figure 1, l'évolution temporelle du taux d'inhibition fongique sous l'effet des huiles essentielles formulées en gel (F1), au Tween (F2), au DMSO (F3), et à l'acétone (F4) appliquées par diffusion sur gel et par micro-atmosphère montre un effet fongicide plus important selon le degré de concentration des dilutions utilisées, obéissant à un gradient positif  $D1 > D2 > D3 > D4 > D5$ . L'activité fongicide et/ou fongistatique s'installe dès les 4 jours de confrontation des bioproduits au champignon. Elle s'accroît au-delà du 6 jours (Fig. 1).

La présentation graphique en BoxPlot des données expérimentales est avancée dans le but d'apprécier la variation du taux d'inhibition selon les deux méthodes d'administration des huiles essentielles en rapport avec les formulations. La comparaison des inhibitions sous l'effet des fortes doses annonce une similarité d'effet entre la formulation en gel ( $Q_1=0,29$ ,  $Q_2=1,28$ ,  $Q_3=1,47$ ) et la formulation au Tween ( $Q_1=0,31$ ,  $Q_2=1,31$ ,  $Q_3=2,00$ ). Tandis que les BoxPlot de la méthode de diffusion par micro-atmosphère, montrent qu'ils sont moins efficaces en termes d'inhibition dans les premiers jours mais ils affichent une inhibition maintenue au cours du temps.

La Figure 2, représente l'évolution mycélienne de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* enregistrant des taux d'inhibition plus imposant selon le degré de concentration des dilutions utilisées,

obéissant à un gradient positif D1>D2>D3>D4>D5 pour la formulation au DMSO, et la formulation à l'acétone. Le taux d'inhibition signalé sous l'effet de l'HE formulé au DMSO par la méthode de diffusion par disque se détache nettement du taux d'inhibition signalé sous l'effet de la même formulation par méthode de diffusion par micro-atmosphère en termes d'importance. L'efficacité des deux formulations (DMSO et acétone) apparaît dès 24h d'incubation. Sous l'effet de l'HE formulée avec l'acétone, l'activité fongicide du principe actif augmente graduellement dans le temps.

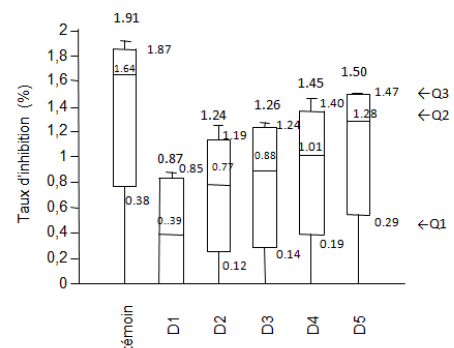
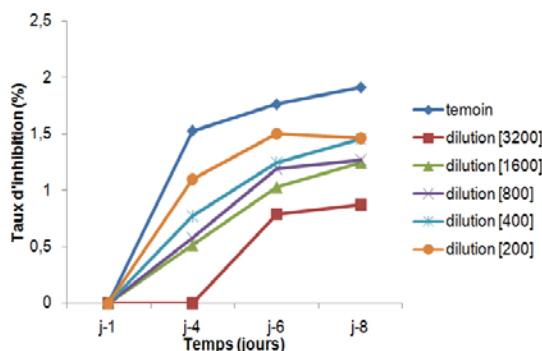
Elle affiche des taux d'inhibitions importantes jusqu'au 4<sup>ème</sup> jour d'incubation dans les deux méthodes.

Les boîtes graphiques en BoxPlot montrent que les taux d'inhibition se détachent clairement sous l'effet des différentes doses de la formulation du DMSO par la première méthode ( $Q_1=0$ ,  $Q_2=0,22$ ,  $Q_3=0,48$ ) et la méthode par micro-atmosphère ( $Q_1=0,10$ ,  $Q_2=0,66$ ,  $Q_3=1,50$ ). En revanche, les doses de l'huile essentielle formulée à l'acétone expriment une similarité dans les taux d'inhibition entre la première méthode testée ( $Q_1=0$ ,  $Q_2=0,22$ ,  $Q_3=0,51$ ) et la deuxième méthode ( $Q_1=0$ ,  $Q_2=0,17$ ,  $Q_3=0,39$ ).

Tableau 1: Composition chimique de l'HE de *Citrus aurantium L.*

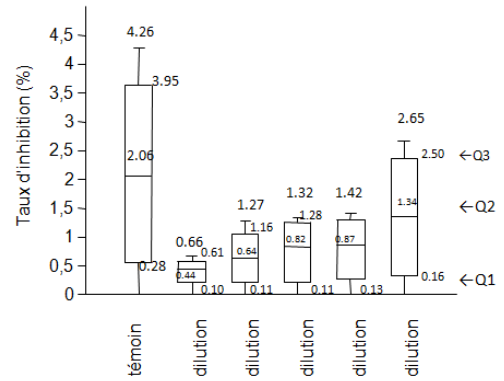
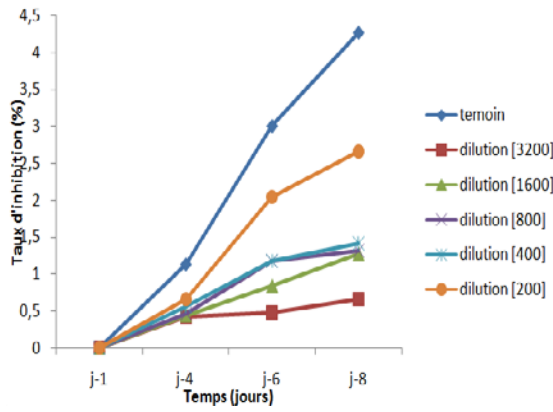
Composés	Familles	Formule brute	%
1 Terpénoïde	Monoterpènes	$C_{10}H_{18}O$	21
2 Anthranilic acid. 1,5-diméthyl-1-vinyl-4-hexéryl ester	Alcaloïdes	$C_7H_7NO_2$	12
3 2-Méthoxy-4-vinylphénol	Alcools	$C_9H_{10}O_2$	4,3
4 Nerolacétate	Ester D Alcool	$C_{12}H_{20}O_2$	2,1
5 Geraniolacétate	Monoterpènes	$C_{12}H_{20}O_2$	18
6 Caryophyllène	Sesquiterpènes	$C_{15}H_{24}$	11,66
7 Elixène	Sesquiterpènes	/	2,92
8 Nerolidol	Sesquiterpènes	/	1,48
9 Germacrène D-4-ol	Sesquiterpènes	$C_{15}H_{26}O$	3,96
10 A-cadinol	Sesquiterpènes	$C_{15}H_{26}O$	3,50
11 Phytol	Alcool Diterpènes	$C_{20}H_{40}O$	4,36
Total des substances identifiées en %			
Sesquiterpènes			23,52
Alcools			10,76
Monoterpènes			39
Alcaloïdes			12
Total			85,28

Méthode de diffusion par disque



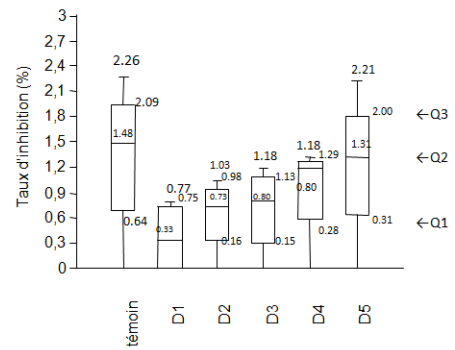
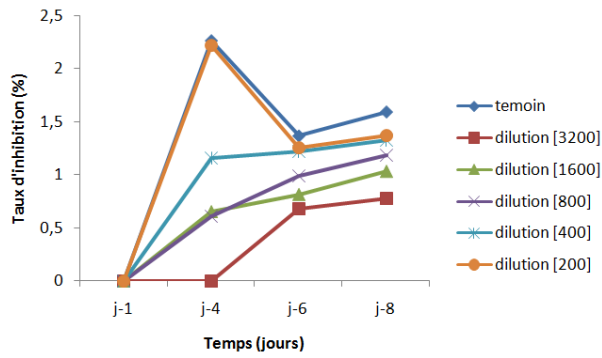


Méthode de diffusion par micro-atmosphère



Formulation au Tween (F2)

Par disque



Méthode de diffusion par micro-atmosphère

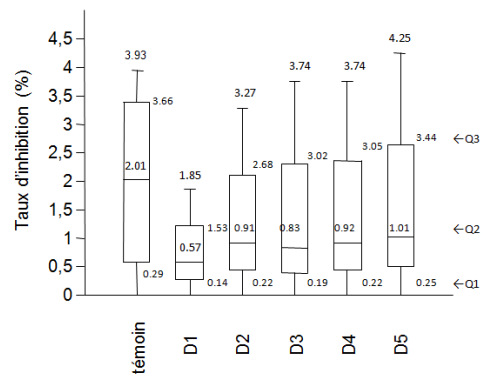
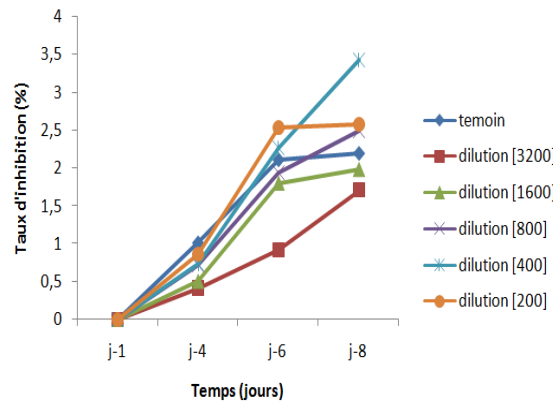


Figure 1: Variation des zones d'inhibition de *Fusarium oxysporum fsp lycopersici* sous l'effet des formulations en gel et au Tween

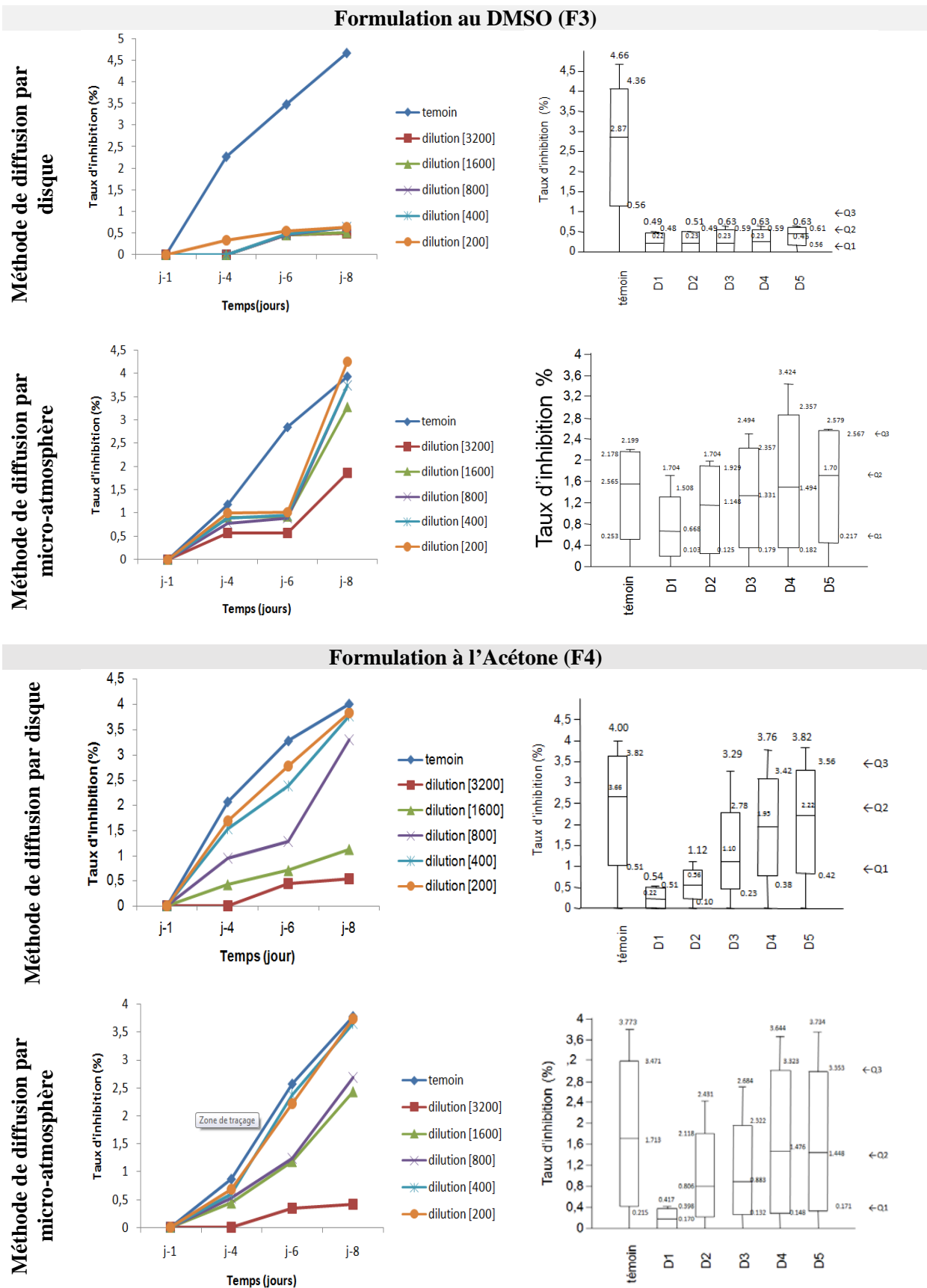


Figure 2: Variation des zones d'inhibition de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* sous l'effet des formulations au DMSO et à l'Acétone

### 3. Etude comparée de l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* (L.) sous l'effet des différentes concentrations et formulations

#### 3.1. Méthode de diffusion par disque

À partir des résultats obtenus, nous remarquons que le temps d'incubation enregistre un effet très significatif sur le taux d'inhibition de la souche *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* pour l'ensemble des traitements ( $p < 0,0001$ ) (Fig. 3). Le test de comparaison multiple Post-Hoc de Tukey, désigne pour les 4 formulations, la présence de 3 groupes homogènes relatifs aux paliers temporels d'activité fongicide. Le premier palier est signalé à T4 (4 jours) d'incubation montrant le taux d'inhibition le plus fort, affilié au groupe homogène (c). Le deuxième palier est remarquable après le T6 (6 jours) d'incubation montrant une inhibition modérée, affilié au groupe homogène (b). Enfin, le troisième palier est visible dès le T8 (8 jours) d'incubation exprimant le taux d'inhibition le plus faible, affilié au groupe homogène (a). Le même test indique la présence de 4 groupes homogènes relatifs aux formulations testées ainsi que leur témoin. Le premier palier est détecté chez le témoin montrant le taux de croissance mycélienne le plus élevé, affilié au groupe homogène (a). Le deuxième palier est remarquable chez la formulation 4 à savoir l'HE formulée à base d'acétone relatant le taux d'inhibition le moins important, affiliée au groupe homogène (b). Alors que le troisième palier représente un taux d'inhibition très important affecté au groupe homogène (c) qui

est partagé entre les formulations 1 et 2. Tandis que le quatrième palier est largement visible comportant les taux d'inhibitions les plus prononcés, affilié au groupe homogène (d). Enfin, le test de comparaison désigne pour les différentes concentrations testées la présence de 6 groupes. Le premier palier est signalé chez le témoin et chez la dernière concentration à savoir la concentration 200  $\mu\text{l/ml}$ , qui montre un taux d'inhibition le plus faible, affilié au groupe homogène (a). Le deuxième palier est visible chez les concentrations C4, C3 et C2 exprimant un taux d'inhibition qui se rapprochent entre les 3 concentrations, respectivement affilié au groupe hétérogène (ab, bc et cd). Le troisième palier est remarquablement visible dès chez la 1<sup>ère</sup> concentration exprimant le taux d'inhibition le plus important, affilié au groupe homogène (d) (Fig. 3).

La vision globale des potentialités fongicides des différents traitements montre à travers le test de Tukey que les fortes doses de l'huile essentielle des différentes formulations testées engendrent des taux d'inhibitions très similaires à l'exception de la formulation au DMSO qui se démarque des autres par sa forte inhibition au cours de l'évolution temporelle (Fig. 3).

L'analyse ANOVA nous a dressé les profils temporels des taux d'inhibition selon les différentes formulations testées par la méthode de diffusion par disque. L'effet de la formulation à base du DMSO est significativement différent car il affiche une inhibition quasi constante au cours du temps d'incubation (Fig. 4).

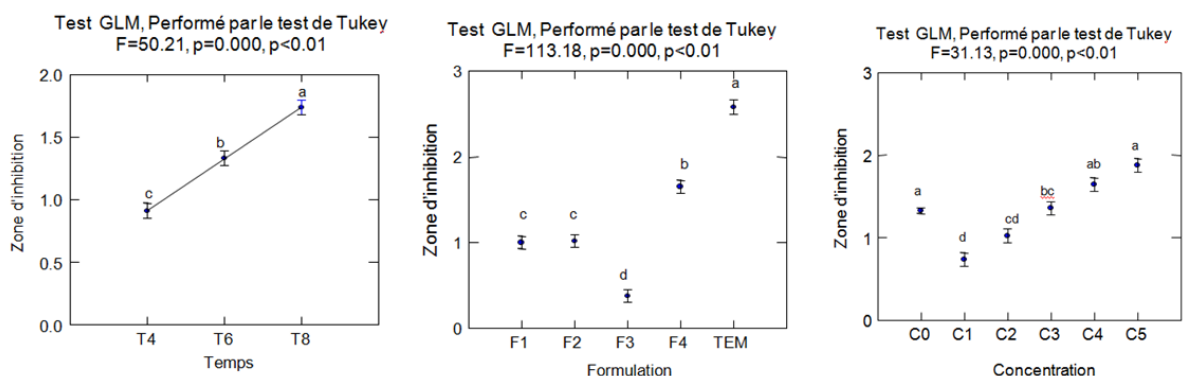


Figure 3: Effets du temps, des concentrations et des formulations sur le pouvoir antifongique de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* (L.) par la méthode de diffusion par disque

F1 : Formulation en gel, F2 : Formulation au Tween, F3 : Formulation au DMSO, F4 : Formulation à l'Acétone

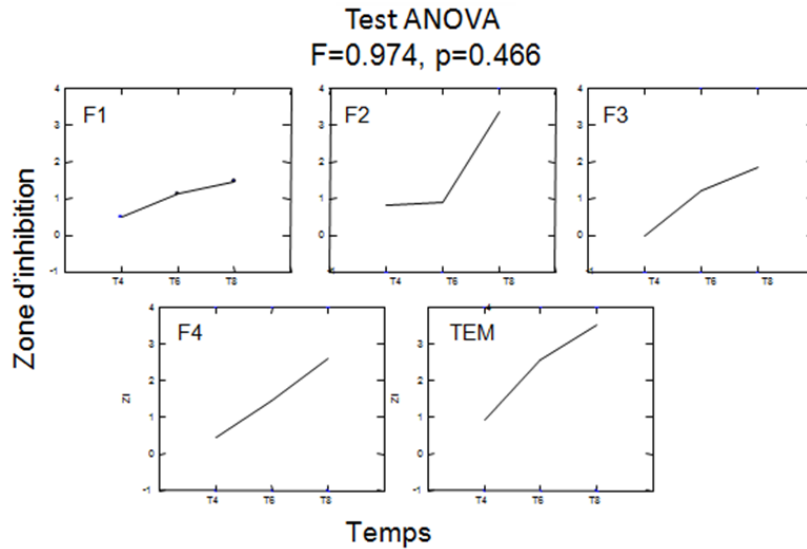


Figure 4: Evolution temporelle des zones d’inhibitions selon les formulations par la méthode de diffusion par disque

F1 : Formulation en gel, F2 : Formulation au Tween, F3 : Formulation au DMSO, F4 : Formulation à l’Acétone

3.2.

**Méthode de diffusion par micro-atmosphère**

Les résultats graphiques de l’analyse de la variance type GLM relatifs aux facteurs étudiés sont consignés dans la figure 5. Ils montrent que le temps d’incubation du champignon sous l’effet des huiles essentielles enregistre un effet très significatif sur le taux d’inhibition. Le test Post-Hoc de Tukey, désigne la présence de 3 groupes homogènes relatifs aux paliers temporels d’efficacité des différentes formulations par la méthode de micro-atmosphère. Le premier palier est signalé à T8 d’incubation dévoilant le taux d’inhibition le plus faible, affilié au groupe homogène (a). Le deuxième palier est remarquable pareillement chez T6 où l’incubation dévoile une inhibition plus

important, affiliée au groupe homogène (b) tandis que le troisième palier montre que T4 représente le taux d’inhibition le plus prononcé, affilié au groupe (c) (Fig. 5). Concernant, le facteur formulations, le test de comparaison signale la présence de 3 groupes homogènes. Le premier palier est signalé chez le témoin qui montre le taux initial de la croissance mycélienne, affilié au groupe homogène (a). Le deuxième palier montre une inhibition similaire chez les formulations 4 et 2 à savoir (acétone et Tween), affilié au groupe homogène (b). Le troisième palier est visible chez la formulation par gel et par le DMSO exprimant le taux d’inhibition le plus important, affilié au groupe homogène (c) (Fig. 5).

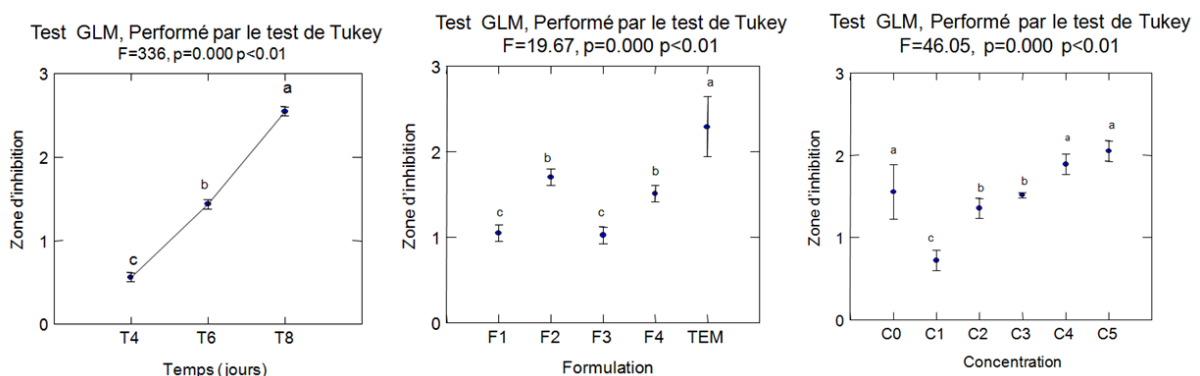


Figure 5: Effets du temps, des concentrations et des formulations sur le pouvoir antifongique de l’huile essentielle de *Citrus aurantium* (L.) par la méthode de diffusion par micro-atmosphère

F1 : Formulation en gel, F2 : Formulation au Tween, F3 : Formulation au DMSO, F4 : Formulation à l’Acétone

Le taux d'inhibition est significativement différent sous l'effet du *facteur concentration* des huiles essentielles formulées. Globalement, le Test de Tukey désigne la présence de 3 groupes homogènes d'efficacité à savoir : le premier palier qui est partagé entre 3 concentrations C0 (témoin), C4 (400 µl) et C5 (200 µl/ml) qui affiche les taux d'inhibition les plus faibles, affilié au groupe homogène (a). Le deuxième palier annonce un taux d'inhibition modéré chez les C3 et C2, affilié au groupe homogène (b). Enfin, le troisième

palier exprime la plus importante inhibition constaté chez la C<sub>1</sub> qui représente la concentration la plus élevée, affilié au groupe homogène (c) (Fig. 5).

L'analyse ANOVA nous a dressé les profils temporels des taux d'inhibition selon les différentes formulations testées par la méthode de diffusion par micro-atmosphère. L'effet de la formulation en gel est significativement différent car elle est durable dans le temps (Fig. 6).

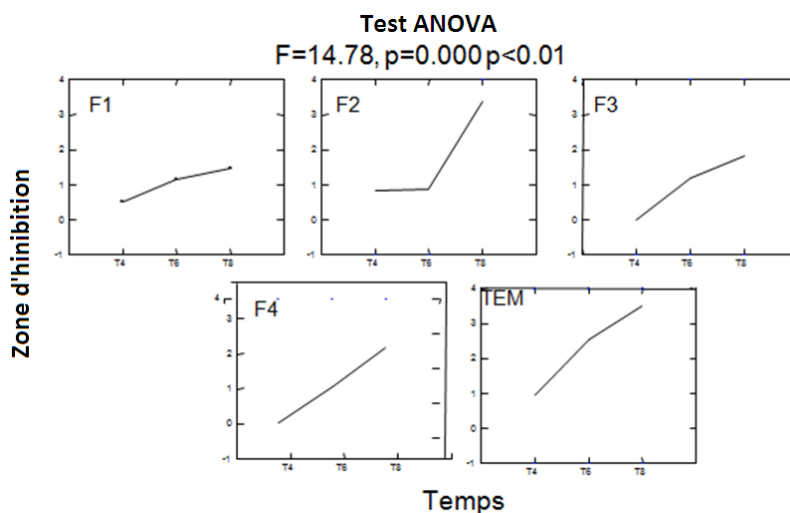


Figure 6: Evolution temporelle des zones d'inhibitions selon les formulations par la méthode de diffusion par micro-atmosphère

F1 : Formulation en gel, F2 : Formulation au Tween, F3 : Formulation au DMSO, F4 : Formulation à l'Acétone

#### 4.

##### *Etude comparée de l'indice d'inhibition des différentes formulations de l'huile essentielle de Citrus aurantium (L.) à l'égard de Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*

Dans l'esprit de mieux visualiser l'effet fongicide/et ou fongistatique des bioproduits formulés à base d'huile essentielle de *Citrus aurantium* (L.), nous avons été conduits à confronter les mêmes paliers de concentrations des différentes formulations. Cette dernière a permis d'avancer que certaines formulations affectent pareillement la croissance mycélienne. Par ailleurs, les formulations expriment des effets divergents sous mode de diffusion par disque et diffusion par micro-atmosphère (Tableau 2). La lecture individualisée des taux d'inhibitions selon la

méthode de diffusion par disque, fait ressortir le facteur formulation comme élément de restriction de la croissance mycélienne. Ce constat est confirmé par le rapprochement d'effet entre F1 et F2 pour les concentrations C1 et C2. Aussi, sous l'effet des concentrations C3, C4 et C5 nous signalons le rapprochement entre F1, F2 et F4 (groupe homogène identique). En revanche, selon la méthode de diffusion par micro-atmosphère, à la forte concentration C1, F1 se rapproche de F4 tandis que F2 se rapproche de F3. Concernant les concentrations moyennement faibles et faibles, le comportement des formulations présente une multitude de rapprochement (voir les groupes homogènes) (Tableau 2).

Tableau 2 : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne

	Concentrations	F1	F2	F3	F4	Test One-way ANOVA	
						F-Ratio	p (value)
Méthode de diffusion par disque	C1 (3200µl/ml)	54,30± 2,03 a	51,16±3,84 a	89,3±1,14 b	88,7±1,20 b	81,38	6,64×10 <sup>-10</sup>
	C2 (1600µl/ml)	34,63±2,63 a	34,86±2,33 a	88,98±0,21 c	76,6±1,80 b	203,5	5,96×10 <sup>-13</sup>
	C3 (800µl/ml)	33,25±6,26 a	25,68±5,78 a	86,44±1,74 b	31,34±3,54 a	36,46	2,21×10 <sup>-7</sup>
	C4 (400µl/ml)	23,74±3,92 a	16,86±3,63 a	86,32±1,64 b	21,48±2,56 a	114,8	4,95×10 <sup>-11</sup>
	C5 (200µl/ml)	23,40±6,95 a	13,76±2,63 a	86,26±1,55 b	20,3±3,14 a	67,62	2,63×10 <sup>-9</sup>
Méthode de diffusion par micro-atmosphère	C1 (3200µl/ml)	84,32±1,33 b	59,22±2,66 a	59,36±1,34 a	89,38±0,84 b	90,72	2,94×10 <sup>-10</sup>
	C2 (1600µl/ml)	69,92±1,51 d	28,7±3,23 a	52,88±2,26 c	38,18±1,50 b	64,64	3,67×10 <sup>-9</sup>
	C3 (800µl/ml)	68,94±3,01 c	18,3±3,05 a	40,68±2,25 b	31,72±1,63 b	70,4	1,95×10 <sup>-9</sup>
	C4 (400µl/ml)	66,6±2,04 c	18,16±3,04 a	42,18±3,62 b	22,66±1,01 a	5,55	8,2×10 <sup>-3</sup>
	C5 (200µl/ml)	37,64±3,28 b	9,74±0,93 a	38,62±3,67 b	10,14±1,54 a	38,47	1,52×10 <sup>-7</sup>

F1 : Formulation en gel, F2 : Formulation au Tween, F3 : Formulation au DMSO, F4 : Formulation à l'Acétone

### 5. Evaluation de la vitesse de croissance de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* sous l'effet des différentes formulations de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* (L.)

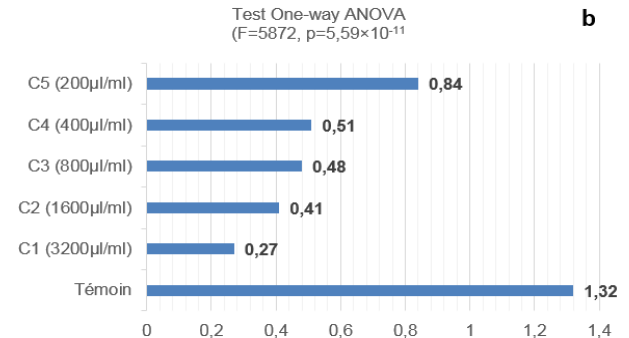
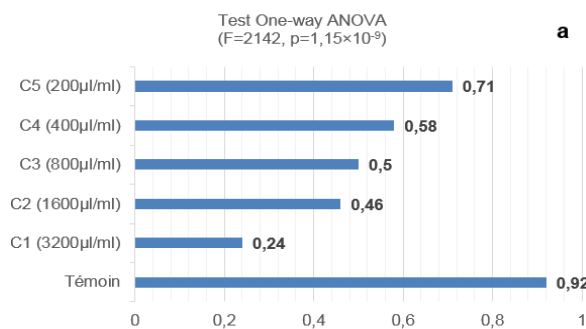
Dans le but d'appréhender l'activité biocide des bioproduits formulés, nous avons eu recours à l'estimation de la vitesse de croissance mycélienne. Cette dernière permis à travers le rythme d'évolution mycélienne de définir un certain nombre de paramètres de toxicité d'une matière active à savoir : (i) *effet Knock Down (effet choc)* (ii) *concentration létale ou inhibitrice* (Fig. 7). Par référence à la figure 7, et sur le plan degré de toxicité des

bioproduits formulés, es résultats montrent que chaque formulation s'individualise par son effet sur la croissance mycélienne. Cette caractéristique propre aux différentes formulations se voit distincte entre diffusion par disque et diffusion par micro-atmosphère. F1 est performante suivant les concentrations de l'huile essentielle pour les eux méthodes. F3 et F4 sont très performantes par diffusion par disque.

#### Méthode de diffusion par disque

#### Méthode de diffusion par micro-atmosphère

Formulation en gel à 10% (F1)



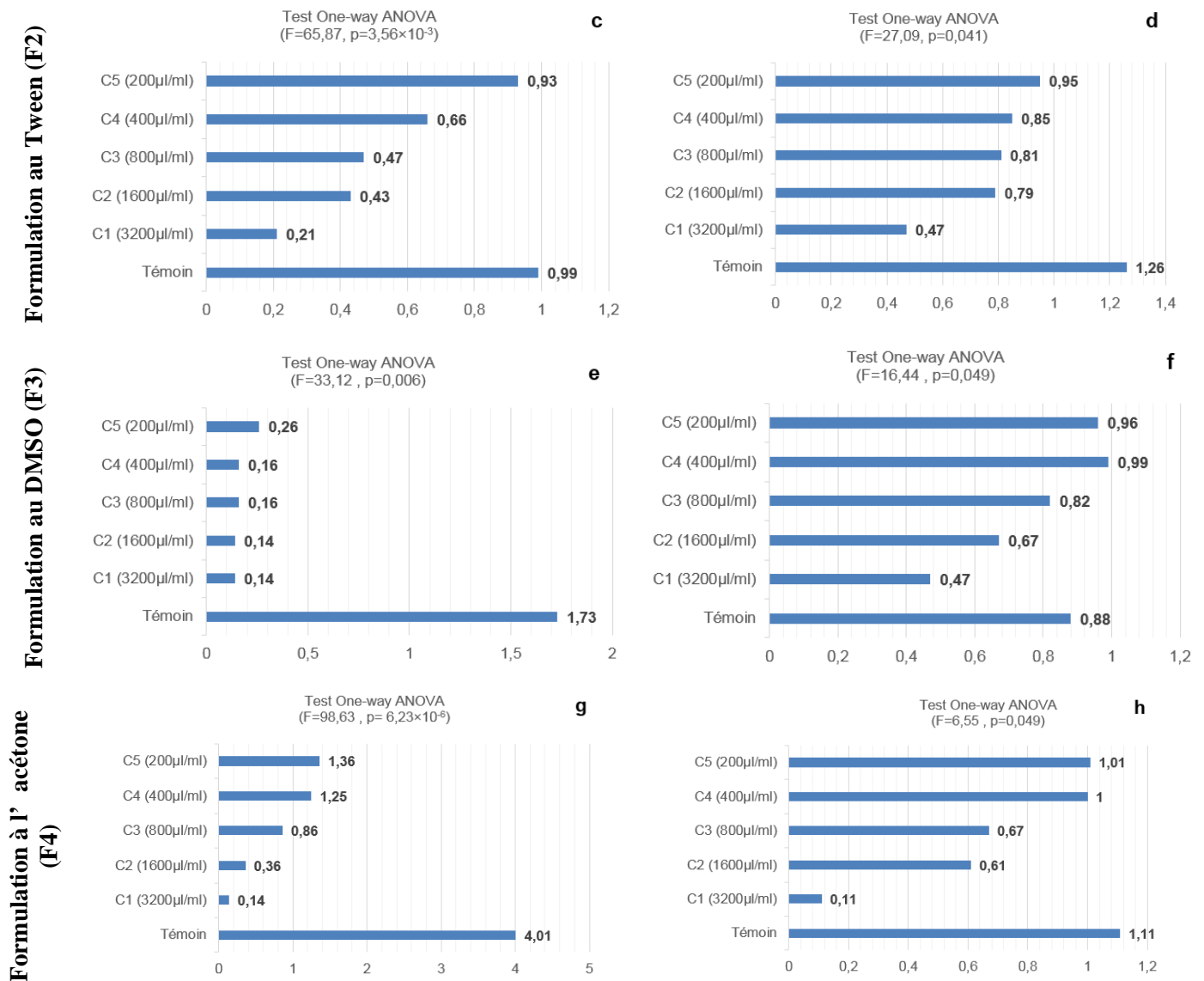


Figure 7: Variation de la vitesse de croissance de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* sous l'effet des différentes formulations et des modes d'administration

## DISCUSSION

La formulation permet de sécuriser, de réduire et de préserver les ressources phylogénétiques tout en protégeant le principe actif. Notre présent travail à porter sur les potentialités des formulations dans l'expression de l'activité antifongique, les résultats de l'évaluation de l'activité fongicide et/ou fongistatique nous ont permis de dégager les hypothèses suivantes :

### 1. Effet des dilutions sur l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* (L.)

La susceptibilité fongique à l'huile essentielle de *Citrus aurantium* (L.) montre des pourcentages d'inhibition élevés.

Les résultats ont montré aussi que toutes les formulations ont un fort pouvoir inhibiteur sur la croissance mycélienne, dont les concentrations allant de 800 µl/ml à 3200 µl/ml s'avèrent les plus importantes envers l'espèce représentative du genre *Fusarium* (*Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*). Ce qui nous permet d'avancer l'hypothèse sur la forte présence de composés volatils regroupant les monoterpènes comme composés majoritaire dans les concentrations les plus élevées. Il a été signalé que les monoterpènes représentent une activité anti bactérienne très importante, l'hypothèse avancée, est confirmée par plusieurs études qui relient le pouvoir antifongique des huiles essentielles des citruses à leur composition chimique.

Matasyoh et al. [31], annoncent que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est censée être associée à des composants phytochimiques tels que les monoterpènes.

Une réduction dans la concentration de l'huile essentielle entraîne une diminution dans le pouvoir inhibiteur de celle-ci avec toutes les espèces fongiques. Les huiles essentielles des citrus sont un mélange complexe de composés volatils qui présentent une activité antifongique en réduisant ou inhibant totalement la croissance fongique [33].

Caccioni et al. [34], ont déduit une corrélation positive entre l'activité antifongique et la teneur en monoterpènes. Singh et al. [35], rapportent que ces derniers sont reconnus comme de bons composés fongitoxiques

Les composés chimiques tels le limonène, caryophyllène oxide,  $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -pinène,  $\alpha$ -terpinéol et le citral ont des activités antifongiques et antibactériennes ; composés largement présents dans la composition chimique des huiles essentielles des *Citrus* [31].

Van Hung et al. [36], rapportent que la croissance mycélienne diminue avec l'augmentation de la concentration en huile essentielle de *Citrus reticulata*. Ils obtiennent un PIC de 50.9 % vis-à-vis de *Fusarium proliferatum*.

Cox et al. [37], ont montrés que la présence des monoterpènes dans les huiles essentielles est capable d'affecter l'intégrité cellulaire des champignons, ce qui entraîne une inhibition de la respiration et une altération de la perméabilité.

De copieuses études ont montrés que l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle est souvent le résultat de l'activité des monoterpènes plutôt que des sesquiterpènes [38]. Il a été prouvé que la même activité est apparemment liée à sa teneur élevée en alcools et en esters et d'autres composés mineurs entre autres le linalool, le terpinène-4-ol, le camphre, le trans-pinocarveol, le t- Cadinol, l' $\alpha$ -cadinol et le  $\beta$ -caryophyllène oxide qui agissant de manière synergique ou additive [39, 40].

## **2. Evaluation de l'efficacité des formulations sur les taux d'inhibitions de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*.**

Une efficacité variable a été enregistrée vis-à-vis de l'espèce fongique testée selon les deux méthodes d'application et selon les différentes formulations,

est principalement due à l'action synergique et solubilisant de certains adjuvants avec l'huile essentielle comme l'acétone et le DMSO, qui ont montré une performance remarquable lors de leurs utilisation dans la méthode de diffusion par disque. Tandis que pour l'application par la méthode de diffusion par micro-atmosphère, c'est la formulation en gel qui a donné un meilleur résultat. Par conséquent, on peut avancer l'hypothèse que les formulations testées constituent une synergie potentielle avec l'huile essentielle de *Citrus aurantium* (L.) et que ces dernières ne retiennent pas les composés volatils qui sont responsables de l'activité antifongique, de même le choix de la méthode d'évaluation des activités biologiques de certaines huiles essentielles agissent différemment vis-à-vis des souches fongiques. On se basant sur l'hypothèse avancée, nous pouvons l'accorder avec les travaux de plusieurs chercheurs qui ont mentionné que l'activité antifongique est le résultat du synergisme ou l'antagonisme des divers composés d'huile essentielle des *Citrus* [41, 42]. Aussi, Bajpai et al. [43], estiment que les performances antimicrobiennes dévoilées par les huiles essentielles pourraient être le résultat d'un certain équilibre quantitatif des divers composants.

Baser et Buchbauer [44], considèrent que le choix de la technique d'évaluation de l'activité antifongique peut influencer le résultat obtenu. Sharma et Tripathi [27], obtiennent deux Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) différentes pour l'huile essentielle de *Citrus sinensis* avec *Alternaria alternata*, et ceci lorsqu'ils emploient deux techniques différentes pour l'étude de la fongitoxicité de l'huile essentielle. Nakahara et al. [24], remarquent que l'huile essentielle de *Citronellae aetheroleum* était inactive vis-à-vis de neuf espèces de champignons avec la méthode de dilution, mais elle a inhibé la croissance de la totalité des espèces fongiques dans la méthode micro atmosphère. Les huiles essentielles des *Citrus* sont un mélange complexe de composés volatils qui présentent une activité antifongique en réduisant ou inhibant totalement la croissance fongique [33].

Ces résultats semblent valider certaines utilisations des huiles essentielles de *Citrus aurantium* (L.) en pharmacognosie et en agriculture biologique.



Les différences dans les niveaux de chémotypes et dans les activités biologiques ont montré l'importance de la formulation dans la promotion des agents antimicrobiens. Le large spectre des propriétés antifongiques des huiles essentielles de *Citrus aurantium* (L.) dévoilé par les différentes formulations leur permet d'être considérées comme des agents antimicrobiens efficaces dans le traitement de certaines infections et dans la lutte contre certains organismes nuisibles aux plantes. Les propriétés antifongiques dévoilées peuvent être significativement importantes pour les secteurs pharmaceutique et agricole, compte tenu de l'importance économique de la disponibilité du matériel végétal dans la production de produits antimicrobiens naturels avec des formulations combinées tout en prenant en compte des facteurs environnementaux influençant la composition et l'efficacité des huiles essentielles.

## CONCLUSION

L'ensemble des formulations ont montré un fort pouvoir inhibiteur sur la croissance mycélienne qui est proportionnel avec les concentrations et ceci avec l'espèce représentative du genre *Fusarium*. Cette démarche, nous a permis de prouver que l'action biocide est fortement liée à la forte présence en composés volatils regroupant les monoterpènes comme composés majoritaire dans l'huile essentielle de *Citrus aurantium* (L.) et la capacité de sa libération. Selon les taux d'inhibitions obtenues, l'efficacité a été démontrée pour toutes les formulations. Cette caractéristique propre aux différentes formulations se voit distincte entre diffusion par disque et diffusion par micro-atmosphère. La formulation en gel est performante suivant les concentrations de l'huile essentielle pour les deux méthodes. Tandis que les préparations au DMSO et à l'acétone sont très performantes par diffusion par disque.

À la lumière des résultats obtenus, le travail ouvre la voie à d'autres perspectives. Notamment, la proposition de formulations biofongicide commerciale et d'approfondir les recherches concernant la relation entre la composition chimique et l'activité antifongique des huiles essentielles.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Sharma N. et Tripathi A. (2008). Effects of *Citrus sinensis* (L.) Obseck epecarp essential oil one growth and morphogenesis of *Aspergillus Niger* (L.) Van Tieghem . *Microbiological Research*, 163(3): 337-344
- [2]. Isman MB. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protect*, 19:603–608
- [3]. Regnault- Roger C. (2012). Trends for Commercialization of Biocontrol Agent (Biopesticide) Products. *Plant Defense Biological control*. 12(6) : 139- 60
- [4]. Kassi FM., Badou OJ., Tonzibo ZF., Salah Z., Lndge A., et Kone D. (2014). Action du fongicide naturel NECO contre la cercosporiose noire (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) chez le bananier plantain (AAB) en Côte d'Ivoire. *J. Applied Biosciences*, 75 (8): 6183– 6191.
- [5]. Xue A .G., Chen Y., Voldeng H.D ., Fedak G ., Savard M .E ., Langle T ., Zhang J ., et Harman G .E. (2014). Concentration and cultivar effects on efficacy of CLO-1 biofungicide in controlling *Fusarium* head blight of wheat. *Biological Control*, 73(22): 2-7
- [6]. Laplace J.P. (2006). Agriculture et alimentation Réflexions croisées. *Cahiers Agricultures*, 15(4): 375 -78.
- [7]. Broydé H. et Doré T. (2013). Effets des pratiques agricoles sur la contamination des denrées par les mycotoxines issues de *Fusarium* et *Aspergillus spp.* *Cahier Agriculture*, 2(2): 182-94.
- [8]. Bagamboula C.F., Uyttendaele M., et Debevere J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbio.*, 2(1): 33- 42.
- [9]. Isman A. (2011). Instructional Design in Education: New Model. TOJET: *The Turkish Online Journal of Educational Technology*, 10(1).
- [10]. Mukhopadhyay M. (2000). *Natural extracts using Supercritical Carbon Dioxide*. 1Ed, CRC Press LLC, Boca Raton, Florida. 339p.
- [11]. Sawamura M. (2010). *Citrus essential oils flavor and fragrance*. Ed John Wiley. New Jersey, 398p.
- [12]. Quezel P. et Santa S. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, ed, C.N.R.S. Vol. 1, Paris. 1170p.
- [13]. Bruneton J. (1999). *Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – 3<sup>ème</sup> Ed* Techniques et documentations. Paris. pp: 227-310-312-313-314.494.
- [14]. Boussaada O. et Chemli R. (2007). Seasonal Variation of Essential Oil Composition of *Citrus aurantium* L. var. amara. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 10(2): 109-120.
- [15]. Proestos C., Serehi D. and Komaitis M. (2006). Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chemistry*, 95: 44-52.

- [16]. NIST/EPA/NIH. (2002). Mass Spectral Library Gaithersburg. National Institute of Standard and Technology
- [17]. Adams R.P. (2007). *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/mass Spectrometry*. 4th Edition Allured Publishing Corporation, Carol Stream.
- [18]. Moussaoui K., Ahmed Hadjlal O., Zitouni G. et Djazouli Z.E. (2014). Estimation de la toxicité des huiles essentielles formulées de Thym et d'Eucalyptus et d'un produit de synthèse sur le parasite de l'abeille tellienne *Varroa destructor* (Arachnida, Varroidae). *Revue Agrobiologia*, 4(1) :17-26
- [19]. Hamdani F.Z. et Allem R. (2017). Antifungal activity of the leaf essential oil of *Citrus* against *Alternaria alternata* and *Penicillium sp in vivo*. *Phytothérapie*, 15:263–266.
- [20]. Daghbouche S., Daghbouche A., Boulessnam A., Snoussi S.A. et Djazouli Z.E. (2017). Variation phénologique du contenu phytochimique et de l'activité antibactérienne de *Cytisus triflorus* l'Her. *Revue Agrobiologia*, 7(2): 548-561.
- [21]. Joffin N. (2013). *Les techniques de laboratoires utilisées en mycologie*, pp. 1-20.  
<http://www.techmicrobio.eu/index.php/microbio/mycologie/laboratoire>
- [22]. Aouni M., Pelen F. et Soulimani R. (2013). Étude de l'activité antimicrobienne d'un mélange de 41 huiles essentielles et domaines d'application. *Phytothérapie*, 11(4): 225-236.
- [23]. Inouye S., Takizawa T. et Yamaguchi H. (2001). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(5): 565–573.
- [24]. Nakahara K., Alzoreky N.S., Yoshihashi T., Nguyen H.T.T. et Trakoontivakorn G. (2003). Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cymbopogon nardus* (Citronella grass). *Japan Agricultural Research Quarterly*. 37(4) : 249-252.
- [25]. Kucukbay F., Yildiz B., Kuyumcu E. et Gunal S. (2011). Chemical Composition and Antimicrobial Activities of the Essential Oils of *Teucrium orientale var. orientale* and *Teucrium orientale var. puberulens*. *Chemistry of Natural Compounds*, 47(5): 833-836.
- [26]. Trong L. et Elsner S. (1986). *Etude de croissance mycélienne de 4 champignons d'origines africaine, océanienne et européenne utilisées dans les essais au CTFT-Nogent*. Kourou : CIRAD-CTFT, 12 p.
- [27]. Sharma N. et Tripathi A.; (2008). Effects of *Citrus sinensis* (L) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L). *Van Tieghem Microbiological Research*, 163(3): 337-344
- [28]. Cahagnier B. et Richard-Molard D. (1998). *Moisissures des aliments peu-hydratés, les moisissures. Collection sciences et techniques agroalimentaires*. Ed. : Lavoisier. pp: 39-41.
- [29]. SPSS, Inc. (2016). **SYSTAT 12.00 for windows, statistics and graphics**
- [30]. Hammer Øyvind, David A.T., Harper, et Paul D. Ryan. (2001). **Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis**. *Palaeontologia Electronica*, vol. 4, issue 1, art. 4: 9pp., 178kb .
- [31]. Matasyoh J .C., Kiplimo J. J., Karubiu N.M. et Hailstorks T.P. (2007). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Tarchoanthus camphorates*. *Food Chemistry*, 101(3): 1183–1187.
- [33]. Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernandez-Lopez J. et Perez-Alvarez J. (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus limon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*, 19(8): 1130–1138.
- [34]. Caccioni D.R.L., Guizzardi M., Biondi D.M., Renda A. et Ruberto G. (1998). Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Food Microbiology*, 4(3) :73–79.
- [35]. Singh P., Shukla R., Prakash B., Kumar A., Singh S., Mishra A.K. et Dubey N.K. (2010). Chemical profile, antifungal, antiaflatoxicogenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. *Food and Chemical Toxicology*, 48(12): 1734–1740.
- [36]. Van Hung P., Thi Lan Chi P. et Thi Lan Phi N. (2013). Comparison of antifungal activities of Vietnamese *Citrus* essential oils. *Natural Product Research Formerly Natural Product Letters*, 27(4-5): 506-508,
- [37]. Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warming J.R. et Wyllie S.G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* 88: 170–175.
- [38]. Haddouchi F., Lazoune H., Ahammer K.A., Carson C.F. et Riley T.V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 86, pp: 985-990.

- [39]. **Muanda FN. (2010).** Identification de polyphénols, Evaluation de leur Activité Antioxydante et Etude de leurs Propriétés Biologiques. Thèse de Doctorat. Université Paul Verlaine-Metz. 239p.
- [40]. **Milane H. (2004).** La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques, Thèse de Doctorat. Université Louis Pasteur Strasbourg. 263 p.
- [41]. **Sonboli A., Babakhani B. et Mehrabian A.R. (2006).** Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*. *Zeitschrift fur Naturforschung Section C. Biosciences*, 61(5): 160–164.
- [42]. **Deba F., Xuan T.D., Yasuda M. et Tawata S. (2007).** Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa*. *Food Control*, 19(2) : 346–352.
- [43]. **Bajpai V.K., Sharma A. et Baek K.H. (2013).** Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens. *Food Control.*, 3(2): 582-90.
- [44]. **Baser K.H.C. et Buchbauer G. (2010).** *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. Ed Taylor & Francis Group.994p.

## DIVERSITÉ DES MODALITÉS DE PRODUCTION APICOLES DANS LA PLAINE DE MITIDJA (ALGÉRIE)

OUAKLI Khalissa<sup>1\*</sup>, NEGGACHE Soumia<sup>1</sup>, MEFTI-KORTEBY Hakima<sup>1</sup> et BENCHERCHALI Mohamed<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université Blida 1, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département des Biotechnologies, B.P. 270, route de soumaa, Blida, Algérie

*Reçu le 17/08/2019, Révisé le 05/11/2019, Accepté le 16/12/2019*

### Résumé

**Description du sujet.** Le développement de l'apiculture en Algérie exige la connaissance des principaux problèmes que rencontrent les apiculteurs et plus particulièrement dans une zone propice à l'élevage apicole à savoir la région Centre.

**Objectifs.** Le présent article vise à souligner les particularités des types d'élevage apicoles dans la Mitidja (Algérie) et identifier ainsi leurs forces et leurs faiblesses pour pouvoir préconiser des recommandations pour chaque apiculteur ou groupe d'apiculteurs.

**Méthodes.** Une enquête menée chez 30 apiculteurs de la région a permis la réalisation d'une typologie. Celle-ci apporte un cadre d'analyse des particularismes observés au niveau des systèmes d'exploitation en identifiant un certain nombre de types de systèmes présents dans la Mitidja.

**Résultats.** L'analyse globale de ces élevages montre que la taille du parc rucher est de  $140 \pm 72,97$  ruches/apiculteur. Ce dernier assure une production annuelle de miel de l'ordre de  $1161 \pm 230,21$  kg/apiculteur, soit un rendement de  $13,36 \pm 10,34$  kg/ruche/an. La vente directe paraît être le circuit privilégié de commercialisation des produits de la ruche. Par ailleurs, l'analyse en composantes multiples (ACM) a permis d'identifier 05 classes d'apiculteurs : i) élevage apicole sédentaire, au nombre de ruches faible et à production faible ; ii) élevage apicole transhumant associé à l'agriculture, au nombre de ruche faible et à production moyenne ; iii) élevage apicole transhumant associé à l'agriculture, au nombre de ruche moyen et à production moyenne ; iv) élevage apicole transhumant associé à l'agriculture, au nombre de ruche important et à production de miel moyenne ; v) élevage apicole transhumant associé à l'agriculture, au nombre de ruches important et à production importante.

**Conclusion.** Les difficultés recensées sont globalement communes aux types d'apiculteurs identifiés comme le manque de cadre idéal, à savoir l'aménagement des espaces d'élevage de ruches au niveau des régions de grand potentiel. Les colonies d'abeille sont affaiblies par l'utilisation des pesticides, la propagation des maladies et les essaimage naturels incontrôlés

**Mots clés:** Modalité de production ; apiculture ; typologie ; bassin de Mitidja

### DIVERSITY OF BEEKEEPING PRODUCTION METHODS IN THE MITIDJA PLAIN (ALGERIA)

#### Abstract

**Description of the subject.** The development of beekeeping in Algeria requires knowledge of the main problems that beekeepers encounter and more particularly in an area favorable to beekeeping, namely the Center region.

**Objectives.** This article aims to highlight the particularities of the types of beekeeping in Mitidja (Algeria) and identify their strengths and weaknesses to be able to advocate recommendations for each beekeeper or group of beekeepers.

**Methods.** A survey of 30 beekeepers in the region led to a typology. This provides a framework for analyzing the particularities observed in the operating systems by identifying a number of types of systems present in Mitidja.

**Results.** The overall analysis of these farms shows that the size of the apiary park is  $140 \pm 72.97$  hives / beekeeper. The latter ensures an annual production of honey of the order of  $1161 \pm 230.21$  kg / beekeeper, a yield of  $13.36 \pm 10.34$  kg / hive / year. Direct selling seems to be the preferred channel for marketing bee products. In addition, multiple component analysis (MCA) identified 5 classes of beekeepers: (i) sedentary beekeeping, with low numbers of hives and low production; (ii) transhumant beekeeping associated with agriculture, low number of hives and medium production; (iii) transhumant beekeeping associated with agriculture, average hive number and medium production; (iv) transhumant beekeeping associated with agriculture, large hive numbers and medium honey production; v) Transhumant beekeeping associated with agriculture, the number of hives and significant production.

**Conclusion.** The difficulties identified are generally common to the types of beekeepers identified as the lack of an ideal setting, namely the development of hive breeding areas in regions of great potential. Bee colonies are weakened by pesticide use, spread of diseases and uncontrolled natural swarms.

**Keywords:** Modality of production ; beekeeping ; typology ; Mitidja Basin

\* Auteur correspondant: OUAKLI Khalissa, E-mail: ouakli-khalissa@hotmail.com

## INTRODUCTION

En Algérie, à l'instar de nombreuses productions agricoles, l'apiculture a connu un regain d'intérêt significatif ces dernières années. C'est du moins le constat qui se dégage du rythme de croissance de cette activité depuis la mise en œuvre des mesures incitatives diverses et le renforcement des aides octroyées aux apiculteurs [1]. Ainsi, en 2016, la production annuelle de miel avoisinait les 4000 tonnes et le cheptel apicole a connu un accroissement de 36000 colonies en 2000 à près d'un million de colonies en 2008, puis une augmentation de 30%, soit 1,3 million de colonies en 2016 [2]. Cependant, malgré les fortes potentialités en ressources naturelles et les investissements importants consentis dans ce domaine, la faiblesse de la production apicole est jugée importante [3, 4]. Les systèmes de productions très variés n'ont fait, à notre connaissance l'objet que de très peu d'étude. Or, la prise en compte de la diversité des systèmes de production est primordiale pour la réussite des opérations de recherche et de développement rural. Ces dernières sont d'autant plus efficaces qu'elles correspondent à des groupes d'exploitations homogènes [5]. Le présent article se propose de contribuer à identifier les systèmes de production apicole dans le bassin de la Mitidja à travers une étude typologique qui permettra de donner une vision de la situation locale, de souligner les particularités des types d'élevage existant, d'identifier les forces et les faiblesses et préconiser ainsi des recommandations pour chaque apiculteur ou groupe d'apiculteurs.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Trente (30) ruchers, de la plaine de la Mitidja ont fait l'objet d'une enquête en vue de décrire les systèmes apicoles de cette région et définir ainsi, leurs principales contraintes. La Mitidja est la plus grande plaine du sublittoral d'Algérie, elle s'étale sur une superficie de 200 000 ha. Elle est constituée globalement de terre cultivée (maraichage et verger fruitiers) et rives d'oued plantées, de friches et de jachères. Il est connu de la Mitidja sa richesse en verger d'agrumes, ces derniers offrent la miellée principale du printemps qui survient généralement le mois d'Avril et s'étend jusqu'au mois de Mai avec les variétés tardives. Dans les vergers non désherbés, sont présentes les espèces caractéristiques constituant la végétation naturelle de la Mitidja. La situation climatique favorable à la

couverture végétale abondante a permis l'extension de l'activité apicole dans cette zone avec une augmentation des effectifs.

Le choix des apiculteurs enquêtés est basé sur leur possession de l'agrément d'élevage et de leur caractère potentiel de production de miel. Les enquêtes ont été réalisées sous la forme d'un entretien personnel de plusieurs heures avec chaque apiculteur en se basant sur un questionnaire préalablement établi comportant des questions visant à décrire l'aspect humain et social (Age de l'apiculteur, l'expérience, statut juridique et l'affiliation), l'aspect économique (le nombre de ruche, les rendements de miel), et des questions concernant la conduite des ruchers (les pratiques d'élevage). Les données ainsi collectées ont fait l'objet d'une série d'analyses et traitements statistiques. Les analyses de la variance (ANOVA) ont été réalisées à l'aide du logiciel Statgraphics Centurion XVI version 16.1.1.18. Les analyses factorielles des correspondances multiples ACM (CORMU) suivies d'une Classification Hiérarchique Ascendante sont réalisées en vue de décrire les types d'exploitations présentes. Ces analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel SPAD version 6.5 (Coheris-SPAD, France).

## RÉSULTATS

### *1. Analyse descriptive des exploitations enquêtées*

73.33% des exploitations enquêtées sont des ruchers apicoles privés, détenus par des apiculteurs dont la moyenne d'âge est de l'ordre de  $51 \pm 8.83$  ans. 60% parmi eux présentent une ancienneté supérieure à 20 ans et 50% sont affiliés à des organisations professionnelles. Le nombre de travailleurs dans ces exploitations est évalué à  $1,11 \pm 0,6$  UTH et il est adapté à la taille du parc rucher et aux travaux à effectuer qui sont le plus souvent saisonniers et qui s'adaptent au cycle biologique de l'abeille. Par ailleurs, le nombre de ruche par apiculteur est de l'ordre de  $140 \pm 7,97$  ruches en moyenne avec toutefois, 63,33% des apiculteurs en détiennent moins de 100 ruches. Les produits de la ruche les plus réalisés sont : le pollen, les essaims et le miel. La production annuelle de ce dernier est de l'ordre de  $1161,46 \pm 23,21$  kg /apiculteur/an, soit  $13,36 \pm 1,34$  Kg de miel/ruche/an. Ce résultat est loin des recommandations en élevage apicole qui se veut rentable [3].

Néanmoins, il demeure supérieur à la moyenne nationale évaluée à 8 Kg/ruche/ an [6] .

Les faibles rendements de ce produit expliquent en partie son prix de vente élevé, vendu le plus souvent par circuit court. Les types de miel sont diversifiés par la pratique de la transhumance, constatée chez 73% des apiculteurs. Celle-ci connaît plusieurs destinations et emplacements comme les vergers du Nord (63%), les montagnes (33%), les forêts (23%) et le Sud du pays (40%). En outre, la diversité du cheptel apicole est illustrée par l'utilisation d'une seule race d'abeille (*Apis mellifera intermissa*), constatée chez 66.66% des apiculteurs et l'élevage des reines qui sert à compenser et anticiper les affaiblissements du cheptel n'est pratiqué que chez 30% des apiculteurs. A noter que le

repérage de ces dernières dans les colonies d'abeille par marquage est constaté chez 60% des apiculteurs enquêtés. Par ailleurs, l'essaimage artificiel demeure largement pratiqué (90%), cependant la perte de colonies lors des essaimage naturels est rencontrée chez 53% des apiculteurs. Cet état de fait relève essentiellement de la faible technicité des apiculteurs.

## 2. Typologie des exploitations

Les deux premiers axes de l'analyse factorielle des correspondances multiples (ACM) expliquent plus de 30 % de la variation totale de l'échantillon. La classification hiérarchique ascendante (CHA) a permis d'identifier 5 classes d'exploitation (Fig. 1).

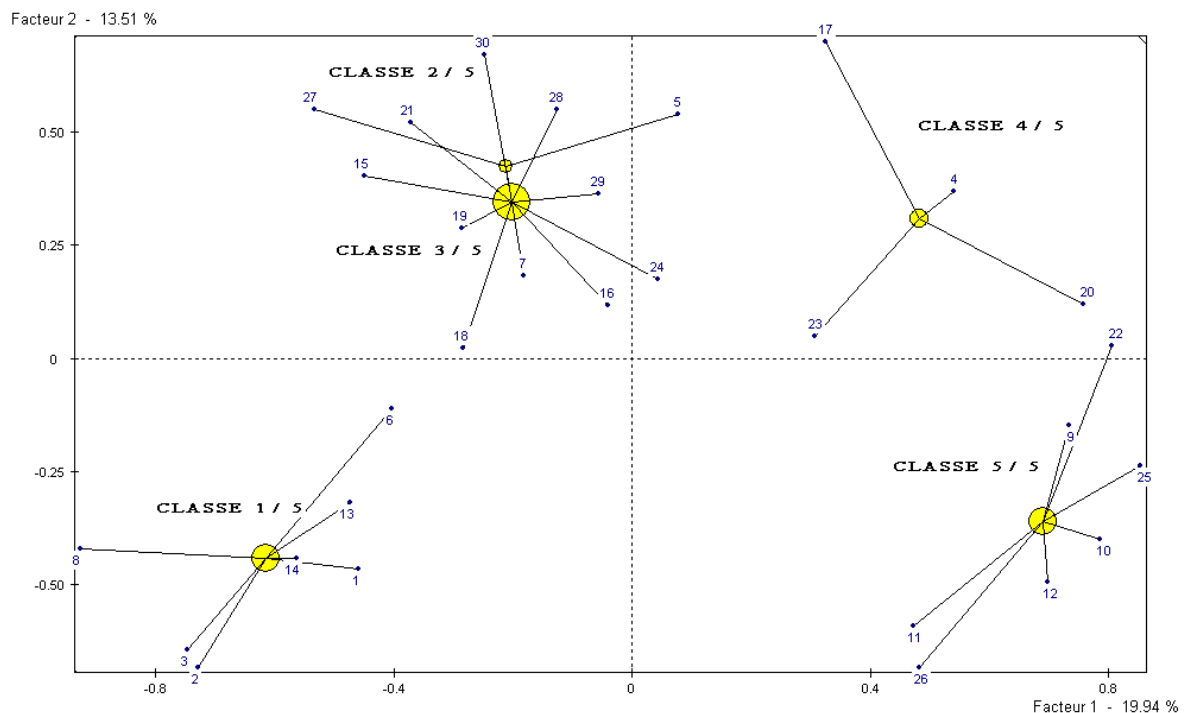


Figure 1 : Représentation selon les deux premiers axes de l'ACM des classes d'exploitations

### CLASSE 1 : Elevage apicole sédentaire, associé à l'agriculture, au nombre de ruches faible et à production de miel faible

Cette classe renferme 7 agro-apiculteurs sédentaires propriétaires de vergers et se caractérisent par un nombre de ruches réduit, de l'ordre de  $23,7 \pm 3,8$  ruches/apiculteur et une production de miel faible de l'ordre de  $305,1 \pm 17,1$  kg/an. Cette production est assurée par l'exploitation d'une seule race d'abeille *Apis mellifera intermissa*.

Les produits de la ruche de cette classe sont généralement de deux types : miel et pollen. Le miel est vendu à un prix relativement bas au niveau de l'exploitation. Par ailleurs, les ruchers de cette classe sont affectés par certaines maladies (fausse teigne et le varroa) et 71,42% parmi eux sont exposés au risque de l'utilisation des insecticides. En outre, 71% des apiculteurs de cette classe ont subi une perte des colonies d'abeille par essaimage naturel.

CLASSE 2 : Elevage apicole transhumant, au nombre de ruche faible et à production de miel moyenne

Cette classe renferme 3 apiculteurs installés dans des vergers d'agriculteurs privés et transhument vers les montagnes. Elle se caractérise par un nombre de ruches réduit, de l'ordre de  $43,33 \pm 2,54$  ruches/apiculteur et une production de miel moyenne de l'ordre de  $1170 \pm 37,02$  kg/an. Cette production est assurée par l'exploitation de deux races d'abeille : *Apis mellifera intermissa* et *Apis mellifera sahariensis*. Les produits de la ruche (miel et pollen) sont commercialisés sur le site de l'élevage et/ou dans des magasins de proximité et le miel est vendu à un prix relativement bas. La totalité des ruchers sont exposés aux risques des insecticides et sont attaqués par le varroa, la fausse teigne et 33,33% d'entre elles sont atteints de la loque américaine.

CLASSE 3 : Elevage apicole transhumant, au nombre de ruche moyen et à production de miel moyenne

La classe 3 est la plus importante en termes d'effectif, elle renferme 9 apiculteurs transhumants. En plus de leur déplacement dans les vergers du Nord, certains d'entre eux transhument également vers le Sud (44%), les montagnes et les forêts (44%). Cette classe se caractérise par un nombre de ruches moyen, de l'ordre de  $80,88 \pm 5,17$  ruches/apiculteur et une production de miel moyenne de l'ordre de  $696,44 \pm 37,13$  kg/an. Cette production est assurée par l'élevage d'une seule race d'abeille (*Apis mellifera intermissa*) et les produits de la ruche sont généralement de 3 types (miel, pollen et essaims). La commercialisation se fait sur les lieux des emplacements, vendu à un prix relativement moyen. Les ruchers de cette classe sont atteints de plusieurs types de maladies (la fausse teigne, la varroase, la nosémosse, la loque américaine et l'européenne) et 44% des apiculteurs de cette classe ont subi une perte de colonies d'abeille par essaimage naturelle.

CLASSE 4 : Elevage apicole transhumant, au nombre de ruche important et à production de miel moyenne

En plus des vergers du Nord, les apiculteurs de cette classe représentant 13,33% de l'échantillon, déplacent leurs ruchers vers les forêts (50%) et les zones du Sud (75%).

Ils se caractérisent par un nombre de ruches important de l'ordre de  $123,75 \pm 17,59$  ruches/apiculteur et une production de miel moyenne de l'ordre de  $1087,5 \pm 39,56$  kg/an. Celle-ci est assurée par l'exploitation de 02 races d'abeille (*Apis mellifera intermissa* et *Apis mellifera sahariensis*). Les produits de la ruche de cette classe sont diversifiés (miel, pollen, cire, propolis, essaims, gelée royale et reines) et leur vente se fait à travers les coopératives et les foires agricoles, les magasins de proximités et sur les sites internet. Le miel produit est vendu à un prix relativement élevé. Les ruchers de cette classe souffrent principalement de la varroase, la fausse teigne, la loque américaine et la nosémosse. De plus, les pertes de colonies d'abeilles par essaimage naturelle ont concerné 50 % des apiculteurs de cette classe.

CLASSE 5 : Elevage apicole transhumant associé à l'agriculture, au nombre de ruches important et à production de miel importante

Cette classe renferme 07 apiculteurs transhumants dont 57% sont propriétaires de vergers. Les principaux sites de transhumance sont les forêts et le Sud du pays (71%). Cette classe se caractérise par un nombre de ruches important, de l'ordre de  $384,28 \pm 27,46$  ruches/apiculteur et une production de miel importante, de l'ordre de  $2654,28 \pm 41,18$  kg/an. Ce dernier est vendu à un prix relativement élevé. 57,14% des apiculteurs de cette classe n'exploitent que la race *Apis mellifera intermissa* alors que 42,85% d'entre eux exploitent deux races d'abeille. La totalité du groupe produit du miel et de pollen et ils écoulent leurs produits à travers 5 points de vente différents (la vente sur place, coopérative, foire, local et site internet). La varroase est la maladie la plus fréquente chez ces apiculteurs et la perte des colonies d'abeille par essaimage a concerné 71% d'entre eux.

Ainsi, les différences constatées entre les classes d'apiculteurs identifiées se traduisent essentiellement par la taille du parc rucher/apiculteurs et leurs niveaux de production (tableau1). Le nombre d'UTH et le nombre de race d'abeille exploité sont comparatif. Par ailleurs, les pertes par essaimages naturelles sont beaucoup plus constatées dans les classes 1 et 5

Tableau 1 : Valeurs moyennes et écart type pour les différentes classes identifiées

CLASSE	1	2	3	4	5	TOTAL
N	7	3	9	4	07	30
AGE (Ans)	59,29±5,99a	53,00±4,59a	50,44±7,83a	44,25±5,31b	46,43±9,96b	5 ±1,02
UTH	0,39 ± 0,73b	0,33± 0,58b	0,61± 0,64b	0,68± 0,37b	3,04± 1,81a	1,11±1,46
RUCHE (N)	23,71±8,43e	43,33±5,17d	80,89±4,28c	123,75±16,5b	348,29±10,46a	140,3±6,97
MIEL (Kg/an)	305,14±19,48d	1170,00±70,48b	696,44±32,59c	1087,5±19,76b	2654,29±16,67a	1161,47±25,24
RACE (N)	1,00± 00a	1,67± 0,58a	1,22± 0,44a	1,75± 0,5a	1,43± 0,53a	1,33±0,48
P.E.N (%)	71	0	44	50	71	66

Les valeurs portant des lettres communes ne sont pas significativement différentes, N : nombre ; UTH : unité de travail humain ; P.E.N. : perte par essaimage naturel

## DISCUSSION

L'apiculture dans la Mitidja est pratiquée par des apiculteurs âgés de 51± 8,83 ans (34 à 80 ans) ayant une ancienneté de plus de 20 ans. Cette moyenne d'âge est proche de celle des apiculteurs de la région de Sousse (Tunisie) et qui est de 48,5±1,5 en moyenne (17–80 ans) [7]. L'éleveur représente l'élément central de l'élevage, il conditionne avec son savoir-faire la réussite de son exploitation [8]. Par ailleurs, l'affiliation des apiculteurs enquêtés à une organisation professionnelle (50% d'entre eux) est un indicateur de durabilité sociale, elle aide, à rompre leur isolement et à se tenir informé des évolutions de la profession [9]. Elle permet également selon le même auteur, de se constituer un réseau.

Le nombre moyen de ruche par apiculteur est de 140 ruches. Cependant 43% des apiculteurs en détiennent moins de 50 ruches (classe 1 et 2). Cette faiblesse du parc rucher est aussi constatée dans la région de Tizi Ouzou où 50% des apiculteurs ont moins de 50 ruches [10], et dans la région d'Ain Defla où 50% des apiculteurs ont moins de 100 ruches [4]. La majorité des apiculteurs enquêtés (93%) utilisent la méthode moderne pour l'extraction du miel. La production annuelle moyenne de ce dernier est de l'ordre de 1161,46±23,21 kg /rucher/an soit 13 Kg/ruche/an. Cependant, nombreux d'entre eux n'excèdent pas les 1000 Kg/rucher/an (classe 1 et 3). Ce résultat est proche de la productivité des ruches marocaines dont la moyenne varie entre 10 et 15 Kg [11]. Toutefois, il demeure faible comparativement à ceux observés dans d'autres pays : au Canada, 34,8 kg/ruche/an [12] et en France 21,1 kg/ruche/an [13]. Certains auteurs estiment que les faibles rendements en miel dans notre pays seraient dus en partie à l'absence d'une carte mellifère pour l'optimisation des ressources [3, 14].

La race d'abeille exploitée est l'*Apis mellifera intermissa* nommée la tellienne ou la race noire, cette dernière est choisie pour son aptitude à supporter les conditions climatiques difficiles et pour sa production élevée de miel, pollen et de gelée royale [15]. Par ailleurs, certains apiculteurs (classe 2 et classe 4) exploitent deux races d'abeilles : *Apis mellifera intermissa* et *Apis mellifera sahariensis*, cette dernière est nommée la race jaune, moins agressive que la tellienne mais elle ne supporte pas les conditions climatiques difficiles. La diversification des types de miel est obtenue par la pratique de la transhumance. Ainsi les miels d'agrumes et d'eucalyptus sont obtenus dans la zone du littoral et produits par l'ensemble des classes d'apiculteurs identifiées. Les miels de toutes fleurs, lavande, carotte sauvage et bruyère sont obtenus en zone de montagne et ils sont produits essentiellement par les apiculteurs de la classe 3. Les miels de sainfoin, romarin et jujubier sont obtenus dans les régions du Sud et sont produits essentiellement par les apiculteurs des classes 4 et 5. Enfin, les miels toutes fleurs et miellat sont obtenus en forêt et sont produits principalement par les apiculteurs des classes 3, 4 et 5. Néanmoins, les éleveurs d'abeilles sont confrontés à des obstacles souvent dus au manque de cadre idéal à savoir l'aménagement des espaces d'élevage de ruches au niveau des régions de grand potentiel. Ils ne disposent pas de foncier destiné à cet élevage, en dépit de leur engouement pour développer leur production locale. De plus, lors de la transhumance, les apiculteurs font face à plusieurs risques qui leur font perdre une grande partie de leurs ruches, voire la totalité, comme les incendies, le pillage et surtout l'utilisation des pesticides par les propriétaires des emplacements. Par ailleurs, l'essaimage naturel demeure un problème auquel sont confrontées les classes d'apiculteurs identifiés.



Cette situation relève essentiellement de leur manque de technicité. Ainsi, il faudra intervenir en amont et anticiper toute velléité d'essaimage car une ruche que l'on ne devise pas produira un à plusieurs essaims naturels et s'ils ne sont pas récupérés, ils seront donc perdus [16]. Le miel, pollen et essaims, sont les produits de la ruche les plus réalisés. La vente directe paraît être le circuit privilégié de commercialisation pour les agriculteurs possédant moins de 100 ruches (classe 1, 2 et 3). La valorisation des produits par filières courtes met en relation de proximité agriculteur et consommateur. Ces circuits apporteraient des réponses aux enjeux du développement durable [9]. La production de miel constitue une source potentielle non négligeable de revenus monétaires pour la population rurale [17], il est vendu à un prix relativement cher et qui est justifié par certains auteurs par sa rareté et sa faible production [18]. De son côté, la FAO estime que les prix élevés du miel sont la conséquence de l'absence d'un marché à terme de miel, et donc absence de repères pour comprendre et fixer les prix [19]. Par ailleurs, la production nationale est sous la pression d'une concurrence très forte exercée par les miels d'importation. Ces derniers proviennent de pays plus favorisés ou disposant d'une main-d'œuvre peu coûteuse [20]. En outre, toutes les classes identifiées sont confrontées aux maladies. Les plus fréquentes sont relatives aux attaques du varroa (100%), la fausse teigne (76.66%), la nosérose (30%), la loque européenne (13,33%) et la loque américaine (30%). Cette dernière est la plus dangereuse car si la maladie est identifiée, la ruche et son contenu doivent être détruits [21]. Par ailleurs, s'il apparaît quelques traces de loque européenne, l'apiculteur peut surmonter le problème en transférant la colonie dans une nouvelle ruche.

## CONCLUSION

L'ancienneté ancestrale de la pratique apicole, la superficie du pays avec ses différents étages bioclimatique des plaines du Tell, à l'immensité de son Sahara et de sa steppe, la douceur de son climat et sa diversité floristique sont autant d'atouts majeurs pour la production de miel en Algérie.

L'état des lieux dressé à travers l'enquête menée sur 30 apiculteurs de la Mitidja, laisse apparaître des niveaux de production similaires à nos pays voisins mais demeurent insuffisants

comparativement aux pays développés. Les modalités de cette production sont assurées par l'exploitation d'une seule race d'abeille (*Apis mellifera intermissa*) et la pratique de la transhumance constatée chez plus de 73% des apiculteurs. Par ailleurs, la typologie a identifié 5 types d'apiculteurs qui se différencient par des effectifs et des niveaux de production différents : *i*) élevage apicole sédentaire, au nombre de ruches faible et à production faible ; *ii*) élevage apicole transhumant associé à l'agriculture, au nombre de ruche faible et à production moyenne ; *iii*) élevage apicole transhumant associé à l'agriculture, au nombre de ruche moyen et à production moyenne ; *iv*) élevage apicole transhumant associé à l'agriculture, au nombre de ruche important et à production de miel moyenne ; *v*) élevage apicole transhumant associé à l'agriculture, au nombre de ruches important et à production importante.

Les difficultés auxquelles font face ces apiculteurs sont globalement communes aux types d'apiculteurs identifiés comme en premier lieu, le manque de cadre idéal à savoir l'aménagement des espaces d'élevage de ruches au niveau des régions de grand potentiel. Les colonies d'abeille sont affaiblies par l'utilisation des pesticides, la propagation des maladies et les essaimage naturels incontrôlés. La gestion apicole est déterminante pour la santé des abeilles, une politique publique de prophylaxie doit donc passer obligatoirement et largement par la formation des apiculteurs et de leurs accompagnateurs (responsables vétérinaires spécialisés, centres techniques, responsables d'associations apicoles). Mettre en place des politiques sanitaires implique de les développer au niveau de tout un territoire, avec la pleine collaboration et l'aide des associations apicoles. Par ailleurs, la mise en relation apiculteurs - agriculteurs à travers les organisations socio-professionnelles permettrait sans doute de débattre des problèmes relatifs à l'utilisation des pesticides et de l'intérêt de la pollinisation des abeilles dans les vergers. Ceci peut aboutir à la contractualisation des partenaires. Enfin, la concurrence des produits importés menace le marché national et les produits apicoles locaux. Face à cette situation, une démarche de qualité devient indispensable. Celle-ci peut se présenter sous forme de miels labélisés par des laboratoires accrédités.

L'organisation du marché local peut permettre une meilleure accessibilité des produits apicoles avec un prix raisonnable pour le consommateur. Enfin, l'optimisation de la production de miel dans une zone passe par la maîtrise des potentialités techniques de la zone, des facteurs climatiques au préalable, de l'importance de l'insertion de l'apiculture dans le secteur agricole, des circuits commerciaux des produits de la ruche et de l'impact de l'apiculture sur les autres activités économiques.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. **M.A.D.R. (2015)**. Statistiques agricoles série B. Ministère de l'agriculture et du développement rural. Alger. Algérie 64 P10(3): 1350-1369, June 2016. ISSN 1997-342X (Online), ISSN 1991-8631 (Print)
- [2]. **M.A.D.R. (2016)**. Statistiques agricoles série B. Ministère de l'agriculture et du développement rural. Alger. Algérie 64 P
- [3]. **Berkani M.L. (2007)**. Etude des paramètres de développement de l'Apiculture Algérienne. Thèse de Doctorat d'état en Science Agronomique, ENSA., El Harrach, Alger, 220P.
- [4]. **Ghalmi S. (2017)**. Etude des systèmes d'élevage apicole dans les wilayas d'Ain Defla, Boumerdès et Chelf, Mémoire d'Ingénieur d'état en Agronomie, ENSA, El Harrach, 119 p.
- [5]. **Pluvinaige J. et Moulin C. H. (2007)**. Analyse de la diversité des exploitations agricoles. GREP | « Pour » 2007/2 N° 194 | pages 106 à 114 ISSN 0245-9442
- [6]. **Recensement Générale de l'Agriculture. (2001)**. Rapport général des résultats définitifs Direction des Statistiques Agricoles et des Systèmes d'Information, Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural Alger, Algérie 2003. 123 P
- [7]. **Gargouri S., Aissa M., Hayouni A., Abdelghani A., Garrouche A., Hayouni M., Benzart M. (2018)**. Allergie au venin d'abeilles : enquête épidémiologique réalisée dans la région de Sousse, Tunisie ; ELSEVIER. Revue Française d'Allergologie Volume 58, Issue 3, April 2018, Page 296
- [8]. **Faye B. (2006)**. Les pasteurs sont des éleveurs "contemplatifs", Courade G. (Ed), 2006, « L'Afrique des idées reçues », Belin, Paris. Pp 281-287.
- [9]. **Vilain L. (2008)**. La méthode IDEA (édition 2008) Indicateurs de durabilité des exploitations agricoles. Educagri éditions. ISBN : 979-10-2750-039-0. 184 p.
- [10]. **Bourkache F. et Perret C. (2014)**. La filière apicole dans les Wilayates de Tizi-Ouzou et de Blida : une ressource territoriale en devenir. 2014. <halshs-01016660v3>
- [11]. **Moujanni A., Essamadi A. K., Terrab A. (2017)**. L'apiculture au Maroc : focus sur la production de miel. International Journal of Innovation and Applied Studies, ISSR Journals, 2017, 20 (1), pp.52-78. <<http://www.ijias.issr-journals.org/abstract.php?article=IJIAS-16-313-03>>. <hal-01464924>
- [12]. **Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ). (2018)**. Portrait-diagnostic sectoriel de l'apiculture au Québec. Bibliothèque et Archives Canada ISBN : 978-2-550-80615-8 [PDF]14P.
- [13]. **FranceAgriMer. (2017)**. Etablissement National des produits de l'agriculture et de la mer 2017. <http://www.franceagrimer.fr/>
- [14]. **Izeboudjen K. (2016)**. La politique de développement de la filière apicole au niveau national, régional et local, MADR, ALGER, 13P.
- [15]. **Khenfer A. et Fattal M. (2001)**. Les produits de la ruche, ministère de l'agriculture, Direction de la formation, de la recherche et de la vulgarisation, 23 P.
- [16]. **Benoit C. 2015**. Essaimage naturel et division des colonies : fiche essaimage, abeille provençale, Groupement d'éducation apicole et de l'environnement, 6P.
- [17]. **Ahouandjinou T.B., Yedomonhan H., Adomou A. C., Tossou M. G. et Akoegninou A. (2016)**. Caractéristiques techniques et importance socio-économique de l'apiculture au Nord-Ouest du Bénin : cas de la commune de Cobly. Int. J. Biol. Chem. Sci. [
- 18]. **Khenfer A. et Zitouni G. (2014)**. Miel et commercialisation, Ed Institut technique des Elevages ITELV, Birtouta, Alger, Algérie, 46 P.
- [19]. **F.A.O. (2016)**. Food and Agriculture Organization, en Fr : organisation pour l'alimentation et l'agriculture. Produire et transformer les produits apicoles dans les forêts communautaires. <http://www.fao.org/africa/news/detail-news/fr/c/881979/>
- [20]. **Duris D. (1968)**. Étude économique de quelques exploitations apicoles du bassin parisien. Les Annales de l'Abeille, INRA Editions, 1968, 11 (3), pp.131-149. <hal-00890268>
- [21]. **Peacock P. (2011)**. Apiculture : Mode d'emploi. Ed. Marabout, Paris, 144

## ECOLOGICAL ANALYSIS OF LOCUST FAUNA IN THREE REGIONS OF EASTERN ALGERIA (MILA, ALGERIA) BIODIVERSITY, INVENTORY AND CENSUS

BETINA Sara Imène \*<sup>1</sup>, BOUCHAIR Nadjat <sup>1</sup>, SAADALLAH Dalal<sup>1</sup> and HARRAT Abboud <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de biosystématique et écologie des arthropodes, Université Mentouri Constantine, route d'Ain-El-Bey, 25000 Constantine, Algeria

Reçu le 07/06/2019, Révisé le 18/08/2019, Accepté le 29/08/2019

### Abstract

**Description of the subject:** This study is a contribution to the knowledge of the locust fauna in Algeria in its eastern region while describing the species distributed in several places, the study of the ecology and the diversity of the Orthopteran insects is included.

**Objective :** A thorough knowledge of the composition of OrthopteroFauna in the Mila region and establish a complete list of locust species of this region.

**Methods :** The realization of an inventory of the locust fauna and the census of the species in three sites with different altitudes: Chigara, Sidi merouane and Sennaoua and the study of the diversity and the distribution through the tests and the ecological indices.

**Results :** the fauna census showed the presence of twelve species belonging to two families: Pamphagidae and Acrididae

**Conclusion :** The ecological and statistical analysis of the inventoried locusts revealed that the Sennaoua site is the most diversified.

**Keywords :** Locust fauna, richness, eastern Algeria, diversity indexes, inventory.

## ANALYSE ÉCOLOGIQUE DE LA FAUNE ACRIDIENNE DANS TROIS RÉGIONS DE L'EST ALGÉRIEN (MILA, ALGÉRIA). BIODIVERSITÉ, INVENTAIRE ET RECENSEMENT

### Résumé

**Description du sujet :** Cette étude est une contribution à la connaissance de la faune acridienne en Algérie dans sa région de l'est tout en décrivant les espèces répartis à plusieurs endroits, l'étude de l'écologie et la diversité est inclus.

**Objectifs :** Une connaissance approfondie de la composition de l'Orthoptérofaune dans la région de Mila et établir une liste complète que possible des espèces acridienne de cette région.

**Méthodes :** La réalisation d'un inventaire de la faune acridienne et le recensement des espèces dans trois sites à différent altitudes : Chigara, Sidi merouane et Sennaoua et l'étude de la diversité et la répartition à travers les tests et les indices écologique.

**Résultats :** le recensement de la faune a montré la présence de douze espèces appartenant à deux familles : Pamphagidae et Acrididae.

**Conclusion :** L'analyse écologique et statistique des acridiens inventoriés a révélé que le site de Sennaoua est le plus diversifié.

**Mots clés:** Faune acridienne, richesse, est algérien, indices de diversité, inventaire.

\* Auteur correspondant: BETINA Sara Iméne, E-mail : manoubetty@live.fr

## INTRODUCTION

Orthopteran insects are medium to large in size. They have a robust body, with a pronounced pronotum. In almost all species, the hind legs are highly developed and adapted to the jump. In principle, they have two pairs of wings, but there are species in which one or both pairs of wings are reduced or absent. Their mouthpiece is of the grinder type.

In North Africa, the problem of acrid pests has always been and remains one of the major concerns of farmers. Algeria, part of this region has not been spared. At the national level, extensive damage to various crops (olive trees, fruit trees and cereals) has been reported in different parts of the country; oases, highlands, mountains and meadows.

The objective of this work is to make a better knowledge of the Caeliferous richness as complete as possible in different biotopes of eastern Algeria. We have done this work in the Mila area by making an inventory of the locust fauna in three selected stations; the ecological analysis of the data is also included.

## MATERIALS AND METHODS

### 1. Study sites

In order to carry out the inventory of locusts and associated flora in the Mila region located in the east of Algeria and to identify the maximum number of species, we have chosen three study sites: Sennaoua, Sidi Merouane, and Chigara. The choice of sites is taken according to the relief, the altitude and the type of the vegetation. The Chigara site is located 30 km from the Mila region at 1000 m altitude, it is an area more or less mountainous, the herbaceous layer is the most dominant compared to the shrub layer. We find especially: *Olea europaea* and *Echinops spinosus*.

The Sidi merouane site is located 14 km from the wilaya of mila at 500 m altitude, the herbaceous layer does not exceed one meter in height. The dominant floras are: *Geranium sp*, *Daucus carota* and *Centaurea scabiosa*.

The Sennaoua site is located at 03 Km from the wilaya of Mila at 350 m altitude; it is a cultivated field. The grass layer does not exceed 40 Cm in height. This site is a little more diversified compared to the other two sites, we find: *Hordom minimum*, *Asphodelus albus*,

*Avena fatua*, *Ampelodesmos mauritanicus* and *Matricaria chamomilla*.

### 2. Sampling of locusts

Samples were taken during the spring of 2014, on average twice a month for each site from 9:30 am to 4 pm. We followed the transect method using surfaces of 250 m<sup>2</sup> (50 m x 5 m). This method allowed us to achieve 6 transects at each site respectively (prospective area = 1500 m<sup>2</sup>). We recorded the number of individuals in an area of 50 meters long. We used the filleting net for the capture of adults. Hunting and catching by hand are the best ways to have not winged locusts. Once the locust is caught, it is placed carefully in a plastic box on which the date and the place of capture are mentioned. As the temperature rises, species become more and faster so their capture becomes difficult. The inventory of locusts allows us to acquire knowledge about their diversity and establish a reference collection.

### 3. Locust preparation and conservation

To kill the locusts, it is only necessary to put them in the freezer at -15 ° C. After this operation, the fat individuals are emptied of their internal contents while preserving their genitals; an incision at the level of the membrane uniting the tergites and the abdominal sternites is practiced carefully with fine scissors and with the aid of a small forceps the viscera are taken out by the opening practiced. Once the general cavity of the insect is emptied, it is cleaned with cotton and filled with the same material. After identifying it, the locust is pricked with an entomological pin at the pronotum and placed in a collection box equipped with naphthalene.

### 4. Determination and identification of sampled species

We are based on the study of morphological characters for the identification of sampled species: the shape of the pronotum, the coloration of the membranous wings and the form of hind legs (Fig. 1). We have considered the phallic complex for the identification of Pamphagidae. We used the identification keys of [1], [2], [3], [4], [5], [6], [7]. The nomenclature has been updated using the website <http://orthoptera.speciesfile.org> and MNHN Paris website <http://acrinwafrica.mnhn.fr>

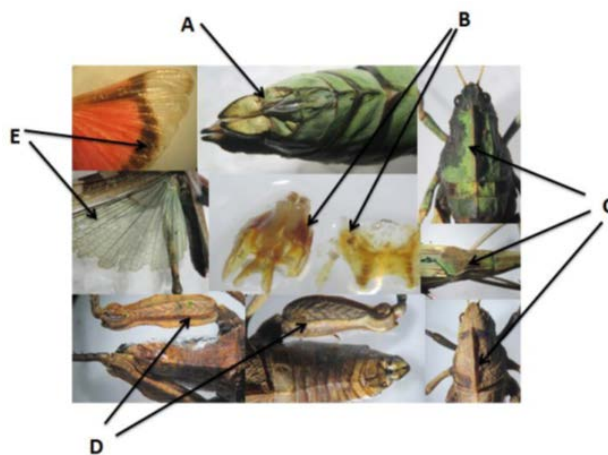


Figure 1 : Some parts of the locust's body helping to the identification  
 A: Back view of the female reproductive system, B: Dorsal view of the phallic complex (male genitalia), C: Dorsal view of the pronotum, D: Lateral view of the posterior femur, E: Lateral view of the hind wing

**5. Ecological and data analysis**

A thorough knowledge of Orthoptera insects is required in order to control them biologically and ecologically, it is in this directive that we have tried to identify several ecological parameters helping to know the type of distribution of the locust species inventoried in the sites of study such as the study of richness, the shannon and weaver index and the equitability, relative frequency and similarity of stands.

And with the help of SPSS ver 20 software, we made several tests to better know the diversity of the locust community of each site.

**RESULTS**

**1. Faunistic inventory**

The inventory of the locust fauna showed the presence of twelve species belonging to two families: the Pamphagidae and the Acrididae and that are divided into six sub-families (Table 1).

Table 1: Inventory of locust species in the three study sites

Family	Subfamily	Species	Chgr	Sd Mer	Sen
Pamphagidae	Pamphaginae	<i>Ocneridia volxemii</i> (Bolivar, 1878)	+	+	+
		<i>Pamphagus auresianus</i> (Burmeister, 1838)	-	+	+
		<i>Pamphagus cristatus</i> (Descamps & Mounassif, 1972)	-	-	+
		<i>Acinipe calabra</i> (Casta, 1836)	-	+	+
		<i>Tmethis pulchripennis</i> (Serville, 1839)	+	+	+
Acrididae	Cyrtacanthacridinae	<i>Anacridium aegyptium</i> (Linné, 1764)	+	+	+
	Gomphocerinae	<i>Dociopterus jagoi jagoi</i> (Soltani, 1983)	-	+	-
	Odipodinae	<i>Aiolopus strepens strepens</i> (Latreille, 1804)	+	+	+
		<i>Duroniella lucasii</i> (Bolivar, 1881)	-	-	+
		<i>Acrotylus patruelis patruelis</i> (Herrich-Schaeffer, 1758)	-	-	+
		<i>Thalpomena algeriana algeriana</i> (Lucas 1849)	-	-	+
	Truxalinae	<i>Truxalis nasuta</i> (Linné, 1758)	-	+	-

+ : Presence, - : Absence, Chgr : Chigara, Sd Mer : Sidi merouane, Sen : Sennaoua

**2. Normality test**

With 135 individuals collected in Chigara, 319 in Sidi merouane and 825 in Sennaoua. The normality of the species in all the sites was

**3. Ecological analysis**

During the whole spring period, 27 field trips were made with 9 outings for each site. The diversity expressed by the Richness,

tested through Shapiro-Wilk's law; the values recorded in Table 2 showed that all species follow Normal distribution ( $P > 0.05$ ).

the shannon and weaver index and the equitability showed that the site of Sennaoua reaches the highest values followed by sidi merouane and finally Chigara which receives the lowest values (Table 3).

Table 2: Normality test for inventoried species

Sites	Species	Sig
Chigara	4	<b>0.591</b>
Sidi merouane	8	<b>0.084</b>
Sennaoua	10	<b>0.102</b>

Table 3: Ecological parameters that showed diversity in the three sites

Site	Richness	Shannon and Weaver index	Equitability
Chigara	4	1.18	0.24
Sidi merouane	8	1.79	0.31
Sannaoua	10	2.22	0.33

According to Fig. 2, the relative frequency values of the locust species identified in the site of Sidi merouane shows that *Dociostaurus jagoi jagoi* is the most dominant in this site followed by the only species of Oedipodinae *Ailopus strepens strepens*, while the species of Pamphagidae are the least abundant.

For the Sennaoua site, the pamphagidae records more or less average values despite being represented by five species, whereas the Oedipodinae are the most abundant on the ground. The Oedipodinae are also the most abundant in Chigara (*Ailopus strepens strepens* 41%). In all the sites *Anacridium aegyptium* receives the lowest value since it is an autumnal species.

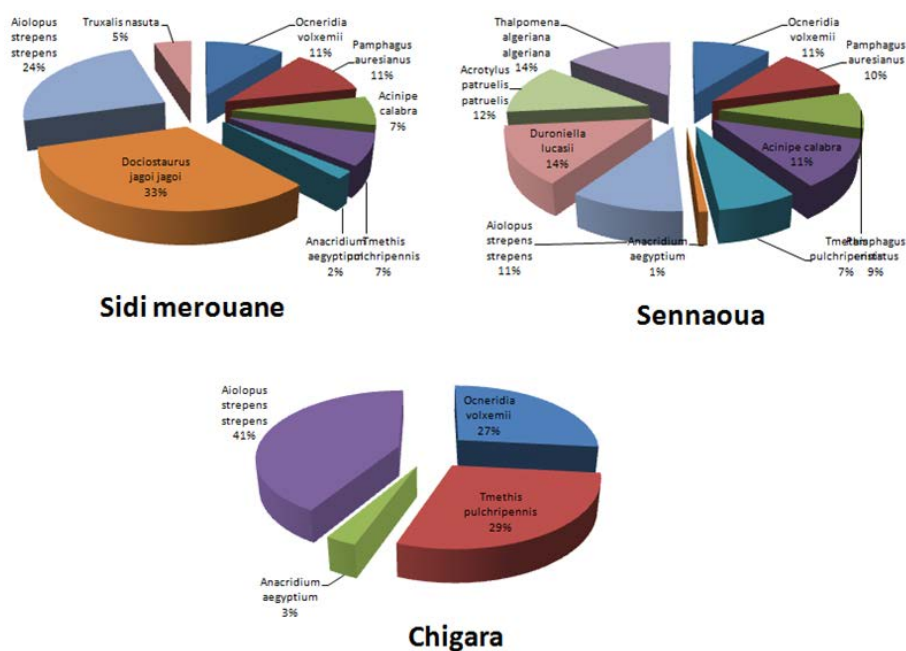


Figure 2: Relative frequency of locust species identified at the three sites

#### 4. Comparison between grasshopper colonies

The values of the similarity of the colonies between the sites are calculated and have shown that the locust composition of Sennaoua is very close to that of Sidi merouane ( $C = 0.66$ ) and far from the fauna of Chigara ( $C = 0.57$ ).

To go deeper in these results we must first measure the variation in the distribution of all species through the months, we note the suppression of the values recorded for the month of March which are considered as outliers according to the almost total disappearance of adults.

Statistical analysis using student test (t) showed that locusts are more abundant on land in the month of May compared to the month of April with a highly significant difference in Chigara and Sidi merouane with  $p = 0.036$ ,  $p = 0.040$  respectively and a very highly significant difference in Sennaoua ( $p = 0.005$ ).

The species *Ocneridia volxemii*, *Tmethis pulchripennis* and *Aiolopus strepens strepens* are present in all the sites, they are therefore considered as species with a large geographical distribution.

#### DISCUSSION

The Orthopterological fauna of Algeria remains little known, except for the gregarious or locust which are well studied and considered as species of economic interest such as *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg, 1815) [8] and [9], *Schistocerca gregaria* (Forsk., 1775) [10] and [11], and *Locusta migratoria* (Linnaeus, 1798) [12].

The census of locust fauna in the region of Mila revealed the presence of twelve species belonging to two families; Acrididae, and Pamphagidae and that are divided into six sub-families.

Several non-gregarious species have been the subject of much work based on ecology, biology, ethology and distribution to prevent access to the pest status of crops.

*Ocneridia volxemii* (Bolivar, 1878) is considered as species with a large geographical distribution, is a common phytophagic species in the framed cornfields [13]. According to [14], this species is characterized by its spectacular voracity; it is a graminivorous species. *Anacridium aegyptium* (Linnaeus, 1764) recorded the lowest values of the appearance on field with 17 individuals only on the total of study sites, it appears in Constantine [15], in the palm groves of Biskra [16], on the coastal plains of Jijel [17] and in the Tlemcen mountains [18].

*Tmethis pulchripennis* it is found in arid environments, with flat vegetation on stony or sandy soil. For *Aiolopus strepens strepens* it is common in mesohygrophilous environments, with one or two generations per year

The results obtained on the study of the specific richness according to the altitude, shows that the number of species decreases with the increase of the altitude (Fig. 3)

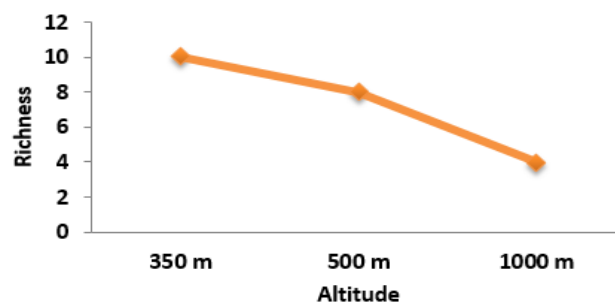


Figure 3: Variation of Richness as a function of altitude

The study of the diversity and distribution of species along elevation gradients and the understanding of the factors that influence this distribution are among the concerns of many ecologists and biogeographers, particularly with the mid-domain effect theory [19]. The Mila region is about 500 m above sea level, according to the mid-domain effect; there is peak diversity at 250 m altitude.

The sennaoua site is 300 m above sea level (near altitudinal gradient center) with a well-diversified flora composed of several species of Poaceae which is the main source of food for locusts compared to the other two sites which present a poor floristic richness.

In a similar work [20], we found that in the mountains of Aurès (2400 m), the site of Djerma (1200 m) presents the great diversity of Orthopteran insects .

#### CONCLUSION

The very short period of sampling reveals the little faunistic and ecological information about insects. So in order to complete these results, it is important to widen the sampling period. The spring period is considered as the first stage of the annual locust activity (Pamphagidae), the summer is for the Oedipodinae and the autumn for *Anacridium aegyptium*.

Other places with different climatic conditions are desired to be investigated and to better understand the current distribution of locusts, the study of their diet is desirable

## REFERENCES

- [1]. **Chopard., 1943** - Faune de l'empire français, Tome I, orthoptéroïdes de l'Afrique du Nord, éd. Librairie la rose, Paris, 450 p.
- [2]. **Louveaux & Benhalima., 1986** - Catalogue des Orthoptères Acridoidea d'Afrique du Nord-Ouest. Bull. Soc. Ent., France, 91(3-4) : pp.73-87.
- [3]. **Ihsan., 1988** - Systématique des Acridiens du Proche-Orient. Aspects physiologiques et ultrastructuraux d'une embryogénèse avec ou sans diapause chez *Locusta migratoria* L. Thèse de Doctorat. Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, 208 p.
- [4]. **Massa B, Lo Valvo, M & Lo Verde, G., 1993** - Le specie del genere Pamphagus Thunberg 1815 (Orthoptera, Pamphagidae), Estratto del bollettino del museo regionale di scienze naturali-Torino, 11(2), 445-486.
- [5]. **Defaut., 1999** - Détermination des orthoptères de France, G.E.R.D.A.T, 83 p.
- [6]. **Massa, B., 2013** - Pamphagidae (Orthoptera: Caelifera) of North Africa: key to genera and the annotated check-list of species. Zootaxa 3700 (3): 435–475.
- [7]. **Defaut & François., 2013** - The identification of the species and subspecies of the genus *Tmethis* Fieber 1853 in Maghreb (Caelifera, Pamphagidae, Thrinchinae). Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, Section Sciences de la Vie, 2013, n° 35, 95-102.
- [8]. **Benfekih L., Chara B., Doumandji-Mitiche B., 2002** - Influence of anthropogenic impact on the habitats and swarming risks of *Dociostaurus maroccanus* and *Locusta migratoria* (Orthoptera, Acrididae) in the Algerian Sahara and the semiarid zone. Journal of Orthoptera Research:11:243-250.
- [9]. **Chaouch A., Doumandji-Mitiche B., Allal-Benfekih L., 2014** - Food diet of *Dociostaurus maroccanus* Thunberg, 1815 (Orthoptera, Acrididae) in its gregarious state: a study in Sidi Belabbes region, Algeria. International Journal of Zoology and Research. 4(5):61-70.
- [10]. **Guendouz-Benrima A., Duranton JF., Benhammouda MEH., Mitiche BD., 2007** - Distribution des populations de Criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* Forsk 1775 (Insecta orthoptera) en période de rémission en Algérie de 1983 à 2000. Science Changements Planétaires Sécheresse :18(4):246-253.
- [11]. **Mahdjoubi D., Guendouz-Benrima A., Petit D., 2017** - Plant communities and solitary Desert Locust abundance in the Algerian Sahara, compared to other African countries. Phytocoenologia; 47(2):125-137.
- [12]. **Benfekih L., Petit D., 2010** - The populations of *Locusta migratoria cinerascens* (Orthoptera: Acrididae: Oedipodinae) in Algerian Sahara: life cycle. Annales de la Société Entomologique de France : 46(3-4):351-358.
- [13]. **Bounechada, M., & Doumandji, S., 2011** - Régime alimentaire et évolution de la consommation des feuilles de blé dur (*triticum durum*) chez *ocneridia volxemii* (insecta, orthoptera) dans la région de Sétif. Revue Agriculture, 2(2), 33-42.
- [14]. **Fellaouine, R., 1995** - Organisation spatiale et temporelle des relations entre *praephippiger pachygaster* (lucas, 1849) (Orthoptera, Tettigoniidae) et ses plantes hotes dans l'est algerien . thèse de Docteur Ingénieur. Université Paris Sud Centre d'Orsay, France, 89 p.
- [15]. **Harrat A & Moussi A., 2007** – Inventaire de la faune acridienne dans deux biotopes de l'est algérien. Sciences & Technologie C- (26) :99-105.
- [16]. **Moussi, A., Abba, A., Harrat, A., Petit, D., 2011** - Desert acridian fauna (Orthoptera, Acridomorpha): comparison between steppic and oasian habitats in Algeria. C. R. Biol., 334(2), 158-167.
- [17]. **Tekkouk, F., 2012** - Ecological study of four populations acridians (insecta-orthoptera) area of El-Aouana (Jijel-Algeria). Agricultural and Biology Journal of North America, 3(2), 57-68.
- [18]. **Defaut, B., et Benmammar-Hasnaoui, H., 2016** - Pré-inventaire des Orthoptéroïdes des monts de Tlemcen et des environs immédiats (Algérie nord-occidentale)(Orthoptera, Mantodea, Phasmida). Matériaux Orthoptériques et entomocénétiques 21 : 5-33.
- [19]. **Colwell R., Lees D., 2000** - The mid-domain effect: geometric constraints on the geography of species richness. Trends in Ecology and Evolution : 15:70-76.
- [20]. **Betina, S. I., Harrat, A., & Petit, D. 2017** - Analysis grasshopper diversity and associated factors involved in grasshopper diversity in arid Aurès mountains (Batna, Algeria). Journal of Entomology and Zoology Studies 2017; 5(5): 339-348



## INVENTAIRE DES COCHENILLES DES AGRUMES (CLÉMENTINIER ET ORANGER) DANS DEUX RÉGIONS DE LA MITIDJA (ALGÉRIE)

AROUA Khaoula <sup>1\*</sup>, KAYDAN Mehmet Bora <sup>2</sup>, BELGUENDOZ Rachida<sup>3</sup>, ACHIRI Tange Denis <sup>4</sup> et BICHE Mohammed <sup>1</sup>

1. Laboratoire de zoologie, École Nationale Supérieure Agronomique (Alger, Algérie)

2. Département de biotechnologie, Université de Çukurova (Adana, Turquie)

3. Département des Biotechnologies, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Blida (Algérie)

4. Département de protection des végétaux, Université de Cukurova (Adana, Turquie)

Reçu le 09/08/2019, Révisé le 21/09/2019, Accepté le 09/11/2019

### Résumé

**Description du sujet :** Les archives faunistiques sont rares et dispersés dans des documents taxonomique et biologique. Depuis fort longtemps, les agriculteurs et les autorités algériennes ont négligé les cochenilles attaquant les agrumes. La connaissance de la nocivité potentielle pour chaque espèce sera utile on programme de lutte antiparasitaire et de lutte intégrée

**Objectifs :** le but est de mettre à jour et de recenser ces espèces de cochenilles vivant sur les agrumes. L'étude a permis de rassembler les données obtenues à celles précédemment rapportés dans la littérature sur une période de 117 ans.

**Méthodes :** L'inventaire comprend des cochenilles collectées à partir d'échantillons de terrain dans la région de la Mitidja, [36°43'N 3°16'E] [36°33'N 2°47'E] et d'une enquête bibliographique.

**Résultats :** L'examen critique de la littérature sur les cochenilles des agrumes en Algérie a révélé la présence de 21 espèces. Dans le présent document, dix espèces de cochenilles ont été enregistrées. Ils appartiennent à quatre familles issues de deux zones zoogéographiques. Ils sont considérés comme des espèces cosmopolites. La famille des Diaspididae est la plus abondante avec 6 espèces regroupées dans 4 genres (*A. aurantii*, *C. dictyospermi*, *L. beckii*, *L. gloverii*, *P. pergandii*, *P. ziziphi*), suivie par les Coccidae avec 2 espèces dans 2 genres (*S. oleae*, *C. hesperidum*) et les Monophlebidae et les Pseudococcidae sont les moins représentés avec une espèce chaque une (*I. purchasi* et *Pl. citri*). Les genres des cochenilles d'agrumes dominants sont *Parlatoria*, *Aonidiella* et *Lepidosaphes*. Les espèces les plus enregistrés sur clémentinier, *P. ziziphi* et *P. pergandii* et sur oranger, *A. aurantii* et *L. beckii*.

**Conclusion :** l'Algérie possède une richesse faunistique élevées par rapport au nombre totale d'espèce enregistré dans les pays voisin.

**Mots clé :** archives faunistiques, cochenilles d'agrumes, Mitidja, enquête

## INVENTORY THE SCALE INSECT OF CITRUS FRUITS (CLEMANTINE AND ORANGE) IN TWO REGIONS OF MITIDJA (ALGERIA)

### Abstract

**Description of the subject:** Faunistic records are rare and scattered in taxonomic and biological documents. For a long time, farmers and Algerian authorities have neglected scale insect attacking citrus fruits. Knowledge of the potential damage to each species will be useful for both pest management and integrated pest management.

**Objectives:** The goal is to update and identify these species of scale insect living on citrus fruits. The study brought together the data obtained with those previously reported in the literature over the period of 117 years.

**Methods:** The inventory includes scale insect collected from field samples in the Mitidja region, [36°43'N 3°16'E] [36°33'N 2°47'E] and a bibliographic survey.

**Results:** A critical review of citrus scale insect literature in Algeria revealed the presence of 21 species. In this document, 10 species of mealybugs have been recorded. They belong to four families from two zoogeographic zones (which ones). They are considered cosmopolitan species. The family Diaspididae is the most abundant with 6 species grouped into 4 genera (*A. aurantii*, *C. dictyospermi*, *L. beckii*, *L. gloverii*, *P. pergandii*, *P. ziziphi*), followed by Coccidae with 2 species in 2 genera (*S. oleae*, *C. hesperidum*) and Monophlebidae and Pseudococcidae are the least represented with one species each (*I. purchasi* et *Pl. citri*). The genera of the dominant citrus scale insect are *Parlatoria*, *Aonidiella* and *Lepidosaphes*. The most recorded species on clementine, *P. ziziphi* and *P. pergandii* and on orange tree, *A. aurantii* and *L. beckii*.

**Conclusion:** Algeria has a high faunistic wealth compared to the total number of species recorded in neighboring countries.

**Keywords:** faunistic records, citrus scale insect, Mitidja, survey

\* Auteur correspondant : AROUA Khaoula, E-mail: arouakhaoula@gmail.com

## INTRODUCTION

Les études faunistiques sont importantes pour documenter les nouvelles données de répartition et informer les chercheurs des parasites exotiques potentiels [1].

Les cochenilles appelées, également, poux ou kermès ont été signalés en tant qu'espèces nuisibles attaquant un grand nombre de plantes hôtes à travers le monde [2, 3, 4 et 5]. Le commerce des arbres fruitiers et ornementaux semble être la voie habituelle de leur transfert. Dans de nombreux pays du monde, il existe une riche littérature sur cochenilles, notamment d'excellentes monographies régionales, des traités systématiques et plusieurs articles de synthèse [1]. En Algérie, malgré l'implication économique des cochenilles, très peu d'études ont été menées à ce jour pour fournir une liste de contrôle des espèces nuisibles à de nombreuses cultures stratégiques. À l'heure actuelle, la liste la plus complète de cochenilles présentes en Algérie pourrait être celle cataloguée dans la base de données en ligne «ScaleNet» [6, 7 et 8]. En conséquence, 178 espèces ont été identifiées. Comparée à celles enregistrées dans des pays voisins comme la Tunisie (69), le Maroc (173), France (410), l'Italie (381) et Sicile (150) [9 et 1].

Les cochenilles des agrumes apparaissent comme étant les deuxièmes ravageurs après la mouche méditerranéenne des fruits [10].

La famille des Margarodidae, Pseudococcidae, Coccidae et Diaspididae renferme le plus grand nombre d'espèces qui causent des préjudices à cette culture [11].

Nous présentons ici les résultats d'une enquête de terrain sur clémentinier et oranger dans la région de la Mitidja, en rapportant ces données à celles précédemment rapportées dans la littérature afin de fournir la liste la plus complète. Les archives historiques résument les caractéristiques de base de la biologie, la plante hôte, la nocivité potentielle pour chaque espèce présente dans les vergers agrumicoles d'Algérie.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Ce rapport comprend des cochenilles collectées à partir d'échantillons de terrain et d'une enquête bibliographique.

### 1. Enquête sur le terrain et échantillonnage

L'enquête a été réalisée dans deux sites d'étude faisant partie respectivement de la partie orientale et occidentale de la Mitidja de janvier à décembre 2018. Le premier est une exploitation privée localisée dans la commune de Rouiba [36°43'N 3°16'E], situé à 7 km de la Méditerranée et à une altitude de 17 m. Le deuxième est une exploitation localisée dans la commune d'Oued Alleug [36°33'N 2°47'E]. Elle se trouve à une altitude de 54 m. Les deux sites renferment plusieurs variétés d'agrumes. (Fig. 1).

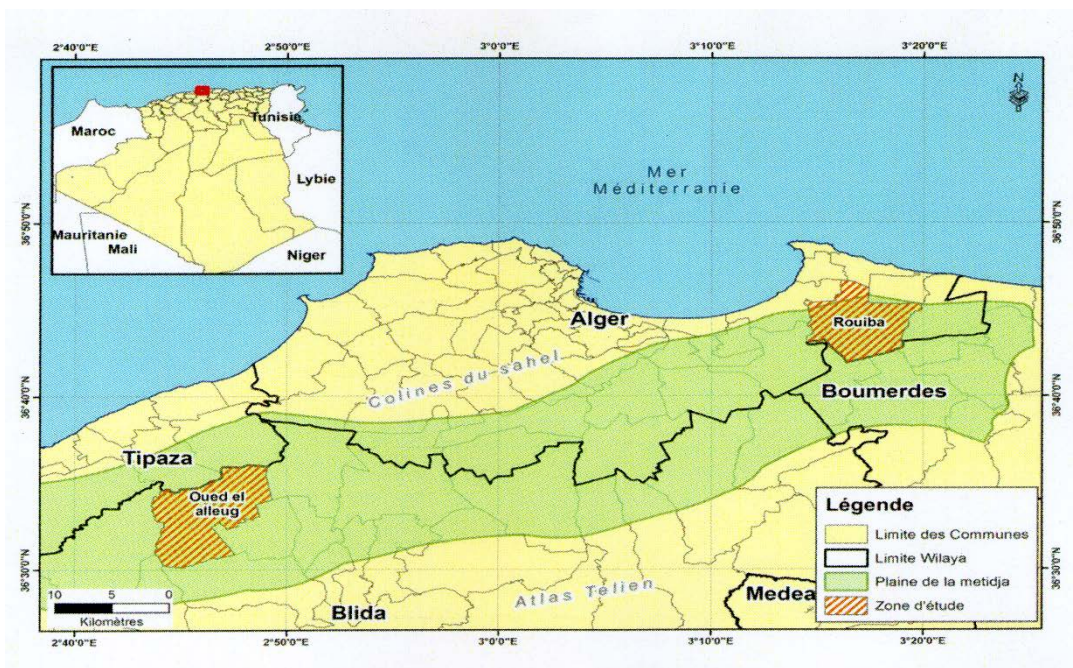


Figure 1: Localisation de la région d'étude dans la plaine de la Mitidja.

Dans les deux sites, l'échantillonnage est réalisé dans les deux vergers : le Clémentinier (*Citrus clementina*) et l'Oranger de la variété Washington Navel (*Citrus sinensis*). Les vergers d'étude sont divisés en 9 parcelles de 24 arbres chacune (soit un total de 216 arbres). A chaque sortie, nous échantillons sur 2 arbres d'agrumes infestés, de chaque parcelle d'échantillonnage, soit un total de 18 arbres sur lesquels, nous prélevons 2 rameaux de 20 cm de long et deux feuilles à hauteur d'homme pour chaque direction cardinale et au centre de l'arbre. Les échantillons récoltés sont placés dans des sachets en papier Kraft sur lesquels nous mentionnons tous les renseignements du prélèvement (le nom de l'agriculteur, l'emplacement, la variété d'agrumes et la date d'échantillonnage et région).

Au niveau du laboratoire, les cochenilles des feuilles et rameaux infestés sont récoltés soigneusement avec une épingle entomologique humectée de l'alcool pour que les espèces ne soient pas brisées et au moins 50 femelles pour chaque espèce de chaque échantillon ont été conservées, jusqu'à leur montages, dans de l'alcool 70°, accompagnés d'une étiquette portant les indications complètes. Les échantillons ont été étiquetés avec les coordonnées relatives. Tous les matériaux récupérés ont ensuite été acheminés vers le département de l'agriculture. Les spécimens ont été montés sur lame selon la méthode décrite dans Kosztarab et Kozar [12] et observé par microscopie optique et identifiés avec le premier auteur selon les clés décrites par Balachowsky [13 et 14]. et Miller et Davidson [4]. (Diaspididae); Williams [15] et Hodgson *et al.* (Pseudococcidae) [16] Unruh et Gullan [17 et 18] (Monophlebidae, genre *Icerya*). La confirmation d'identification des cochenilles ont été faite par (Prof. Mehmet Bora KAYDAN et Prof. Mohamed BICHE).

## 2. Analyse des données

Les espèces recensées sont listées et regroupées par famille et séparées par origine et plante hôte, avec les références correspondantes pour chaque espèce. L'origine des espèces est donnée selon Miller *et al.* et García Morales *et al.* [3 et 8].

## RÉSULTATS

### 1. Inventaire bibliographique sur les cochenilles des agrumes algérien

Le tableau 1 présente l'historique des occurrences des cochenilles dans les vergers d'agrumes en Algérie. Les espèces sont regroupées par famille et par espèce, en ajoutant l'origine, la plante hôte, le statut de l'organisme nuisible et les références.

Les précédentes études sur les cochenilles des agrumes ont été réalisées dans la région de Mitidja. La plupart de ces publications traitant que les cochenilles diaspidines, Les contributions les plus importantes sont celles de Balachowsky [13, 19, 20, 21 et 22], Saighi *et al.* [23], Biche [24] et Belguendouz [25] qui ont répertorié les cochenilles diaspidines des agrumes.

En conséquence, l'examen critique de la littérature sur les cochenilles des agrumes en Algérie a révélé la présence de 21 espèces dans 4 familles. La famille des Diaspididae est la plus abondante avec 12 espèces dans 7 genres (*Aonidiella aurantii*, *Aspidiotus nerii*, *Chrysomphalus aonidum*, *Ch. dictyospermi*, *Ch. pinnulifer*, *Fiorinia fioriniae*, *Lepidosaphes beckii*, *L. gloverii*, *L. ulmi*, *Parlatoria pergandii*, *P. ziziphi*, *Unaspis citri*), suivie par les Coccidae avec 6 espèces dans 5 genres (*Ceroplastes rusci*, *C. sinensis*, *Coccus hesperidum*, *Eucalymnatus tessellatus*, *Pulvinaria psidii*, *Saissetia oleae*) et les Pseudococcidae avec 2 espèces dans 2 genres (*Planococcus citri*, *Pseudococcus longispinus*), les Monophlebidae est la moins représenté avec une espèce *I. purchasi*.

### 2. Plantes hôtes et origine

Toutes les cochenilles sont des espèces polyphages, à l'exception de *P. ziziphi* qui est enregistré comme monophage sur *Citrus spp.* Quelques espèces polyphages telles que *C. hesperidum*, *C. sinensis* étaient rares dans les vergers des agrumes. *S. oleae* et *I. purchasi* sont dispersées à faible densité dans la Mitidja. Aussi, l'origine géographique des espèces signalées montre une forte dominance d'espèces paléarctiques avec 6 espèces suivies par les espèces Afrotropicales et Neotropicales avec 3 espèces, et les Australasian et Orientales avec 2 espèces. Il reste trois cochenilles d'origine inconnue, *P. pergandii*, *L. beckii* et *L. gloverii* (Tableau 1)

Tableau 1. Résumé des données d'archives réalisées sur les espèces de cochenilles d'agrumes enregistrées en Algérie sur *Citrus* sp.

Nom scientifique	Origine	Plante hôte majeure	Statut	Références
<b>Coccidae</b>				
<i>Ceroplastes rusci</i> Linnaeus, 1758	Afrotropicale	Polyphagous	Pas de données	[20, 26]
<i>Ceroplastes sinensis</i> Del Guercio 1900	Néotropicale	Polyphagous	Pas de données	[27]
<i>Coccus hesperidum</i> Linnaeus, 1758	Paléarctique	Polyphagous	Ravageur occasionnel	[20, 24, 28, 29, 30]
<i>Eucalymnatus tessellatus</i> Signoret, 1873	Néotropicale	Polyphages	Pas de données	[20, 29]
<i>Pulvinaria psidii</i> Maskell, 1893	Paléarctique	Polyphages	Pas de données	[20, 31, 32]
<i>Saissetia oleae</i> Olivier, 1791	Afrotropicale	<i>Olea europaea</i> , <i>Nerium oleander</i> , <i>Citrus</i> spp., polyphages	Ravageur occasionnel	[20,24, 29. 33, 30]
<b>Diaspididae</b>				
<i>Aonidiella aurantii</i> Maskell, 1879	Paléarctique	Polyphages	Ravageur clé	[23, 24, 30, 34]
<i>Aspidiotus nerii</i> Bouché, 1833	Afrotropicale	Polyphage, <i>Nerium oleander</i> , <i>Citrus</i>	Pas de données	[22, 23, 35, 36, 37, 38, 39]
<i>Chrysomphalus aonidum</i> Linnaeus, 1758	Néotropicale	Polyphage	Pas de données	[20, 29]
<i>Chrysomphalus dictyospermi</i> Morgan, 1889	Paléarctique	<i>Citrus</i> , Polyphage	Ravageur clé	[20, 22, 23, 24, 30]
<i>Chrysomphalus pinnulifer</i> Maskell, 1891	Orientale	Polyphage	Pas de données	[21, 22]
<i>Fiorinia fioriniae</i> Targioni Tozzetti, 1867	Australasienne	Polyphage	Pas de données	[29]
<i>Lepidosaphes beckii</i> Newman, 1869	Cryptogénique	Polyphage	Ravageur occasionnel	[23, 24, 25,30 40]
<i>Lepidosaphes gloverii</i> Pickard, 1869	Cryptogénique	<i>Citrus</i> spp., Polyphage	Important ravageur	[41, 42, 24, 43]
<i>Lepidosaphes ulmi</i> Linnaeus, 1980	Néarctique	Citrus	Ravageur mineur	[44]
<i>Parlatoria pergandii</i> Comstock, 1881	Cryptogénique	Citrus, Polyphage	Pas de données	[25, 35, 41, 45, 24]
<i>Parlatoria ziziphi</i> Lucas, 1853	Paléarctique	Citrus, Rutaceae	Ravageur clé	[24, 2530, 41, 46, 47, 48, 49, 50]
<i>Unaspis citri</i> Comstock, 1883	Orientale	Polyphage Citrus, Rutaceae Polyphage	Pas de données	[51, 52]
<b>Monophlebidae</b>				
<i>Icerya purchasi</i> Maskell, 1879	Australasienne	Polyphage	Ravageur occasionnel	[24,30]
<b>Pseudococcidae</b>				
<i>Planococcus citri</i> (Risso, 1813)	Paléarctique	Polyphage	Ravageur clé	[20, 24, 30, 43]
<i>Pseudococcus longispinus</i> (Targioni Tozzetti, 1868)	Australasienne	Polyphage	Pas de données	[20]

### 3. Étude du recensement

A la lumière des résultats, nous avons recensé 10 espèces appartenant à 8 genres dans quatre familles. Elles sont considérées comme des espèces cosmopolites. La famille des Diaspididae est la plus abondante avec 6 espèces dans 4 genres (*A. aurantii*, *Ch. dictyospermi*, *L. beckii*, *L. gloverii*, *P. pergandii*, *P. ziziphi*), suivie par les Coccidae avec 2 espèces dans 2 genres (*S. oleae*, *C. hesperidum*) et les Monophlebidae et les Pseudococcidae sont les moins représentées

avec une espèce chacune (*I. purchasi* et *Pl. citri*). Les genres des cochenilles d'agrumes dominants sont *Parlatoria*, *Aonidiella* et *Lepidosaphes* de la famille des Diaspididae et les *Coccus* de la famille des Coccidae. 10 espèces de cochenilles recensées dans les deux vergers d'oranger et 8 dans les deux vergers de clémentinier à Rouiba et Oued Alleug au cours de l'enquête. Leur position taxonomique et leur présence et absence est donnée dans le tableau 2.

Tableau 2 : Inventaire des espèces cochenilles recensées dans les deux vergers (clémentinier et oranger) à Rouiba et Oued Alleug (+ présence d'espèce).

Espèces	Rouïba		Oued Alleug	
	Clémentinier	Oranger	Clémentinier	Oranger
<b>Coccidae</b>				
<i>Coccus hesperidum</i> Linnaeus, 1758	+	+	+	+
<i>Saissetia oleae</i> Olivier, 1791	+	+	+	+
<b>Diaspididae</b>				
<i>Aonidiella aurantii</i> Maskell, 1879	+	+	+	+
<i>Chrysomphalus dictyospermi</i> Morgan, 1889	+	+	+	+
<i>Lepidosaphes beckii</i> Newman, 1869		+		+
<i>Lepidosaphes gloverii</i> Packard, 1869		+		+
<i>Parlatoria pergandii</i> Comstock 1881	+	+	+	+
<i>Parlatoria ziziphi</i> Lucas, 1853	+	+	+	+
<b>Monophlebidae</b>				
<i>Idioscopus purchasi</i> Maskell 1879	+	+	+	+
<b>Pseudococcidae</b>				
<i>Planococcus citri</i> Risso, 1813	+	+	+	+

### 4. Occurrence et abondance

Les cochenilles ont été observées dans les deux régions sur clémentinier et oranger inspectés (Fig. 2).

Sur clémentinier, une abondance relative de 72,80%, *P. ziziphi* suivie par *P. pergandii*, 38,12% et *Pl. citri* 5,57%. Les 5 autres espèces: *Ch. dictyospermi*, *C. hesperidum*, *S. oleae*, *A.aurantii*, *I. purchasi* étaient rares à très rares, occupant chacune entre 0, 12 % et 3,39 %. *P.ziziphi* a le plus important nombre d'occurrence (97, 30%) suivies par *P. pergandii* (78, 38 %) et *C. dictyospermi* (40,54%). Les 5 autres espèces, occupant chacune entre 10,81 % et 25,68 %.

Sur oranger, *A. aurantii* a les plus importants nombre abondance relative (54,17%) et d'occurrence (83, 78%) suivie par *L. beckii*, (AR : 26,64% et FO: 71, 62%) et *P. ziziphi* (AR : 9,06% et FO: 54,05%). Les 7 autres espèces: *Ch. dictyospermi*, *C. hesperidum*, *S. oleae*, *L.gloverii*, *P. pergandii*, *Pl. citri* and *I. purchasi* étaient rares à très rares,

occupant chacune entre (AR : 0,05% et 2,47%) et (FO : 10,81 % et 25,68 %).

### DISCUSSION

Selon les données recueillies lors d'enquêtes récentes (10 espèces) et selon archives algériennes (21 espèces), 21 espèces, appartenant à quatre familles dans quinze genres, ont été établies en Algérie sur des agrumes. La plupart d'entre eux sont des parasites polyphages.

Ce nombre montre une richesse faunistique élevées par rapport à les cochenilles des agrumes de Sicile (28 espèces) et de la Tunisie (18 espèces). Néanmoins, il semble être un nombre relativement important par rapport au nombre totale d'espèce enregistré dans les pays voisin possède une plantation importante des agrumes Maroc (12), Palestine occupée (9) [1, 30, 53].

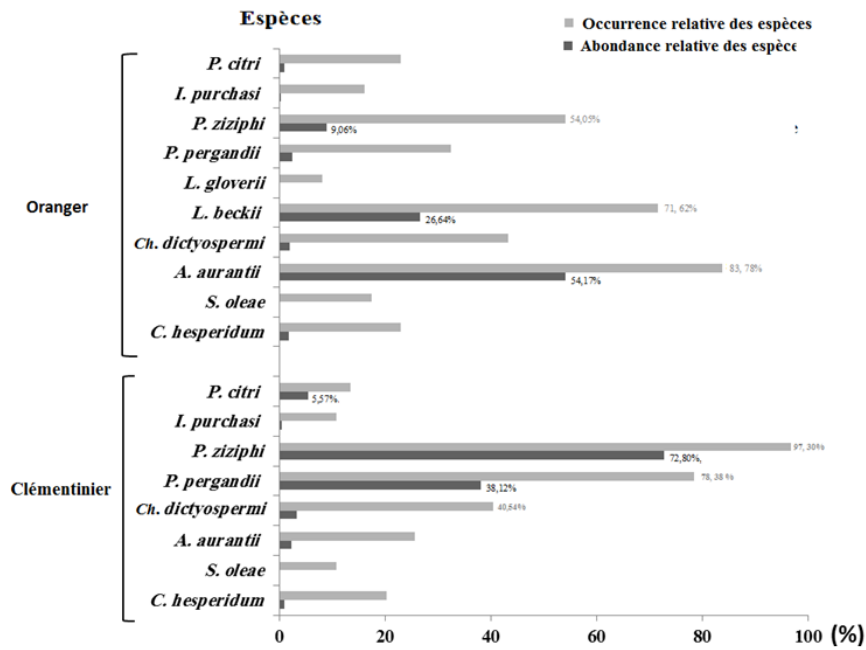


Figure 2: Totale occurrence et abondance relative des espèces de cochenilles présentes sur le clémentinier et l’oranger.

En Algérie et dans autres pays méditerranéens producteurs d'agrumes comme la Tunisie, l'Italie, l'Espagne, le Portugal et la Turquie les quatre espèces *A. aurantii*, *P. ziziphi*, *P.pergandii* et *Pl. citri* montrant une grande capacité d'adaptation à différents environnements. Des résultats similaires ont été obtenus par [1, 30].

Selon Jendoubi [1], les paramètres biologiques distinctifs des Coccidés rendent le contrôle chimique inefficace ou inutile pour les agriculteurs. Dans cette situation, il est obligatoire d’améliorer les techniques de surveillance sur le terrain afin d'empêcher la propagation de *Pl. citri* et autres diaspines *P. ziziphi* *A. aurantii* *L. beckii* le contrôle des premiers foyers apparus à Rouiba et Oued Alleug est obligatoire.

Dans les plantations d’agrumes Algériennes, le statut phytosanitaire d’*I. purchasi* n’est pas considérable. Mais on pays voisin comme la Tunisie le statut phytosanitaire de cette espèce est différent selon les régions [1]. Dans de nombreux pays méditerranéens tels que la Grèce, Palestine occupée, l'Italie, l'Espagne et la Turquie; elle est considérée comme un ravageur potentiel des agrumes ; les populations sont maintenues naturellement sous le seuil par son

prédateur, le coléoptère vedalia *Rodolia cardinalis* (Mulsant) (Coleoptera, Coccinellidae) [1, 30, 43].

**CONCLUSION**

Ce travail est le deuxième rapport traitant de la faune des cochenilles en Algérie après le travail cité dans le texte. Il est destiné à présenter des nouvelles sur l’occurrence, l’abondance relative, l’importance économique, la plantes hôtes, biogéographie des cochenilles d’agrumes, qui sont apparu dans cette région depuis la publication de la première contribution 1910. L’objet de notre travail était de faire un inventaire des cochenilles des agrumes, qui seront utiles on programme de lutte antiparasitaire et de lutte intégrée et aussi une base des références pour d’autres études faunistique et zoogéographiques de ce groupe d’insecte. Notre liste atteint au moins une grande connaissance, assez complète sur les cochenilles associées aux agrumes en Algérie. En conséquence, *P. ziziphi*, *P. pergandii*, et *Pl. citri* sont des organismes nuisibles importants sur clémentinier et *A. aurantii* *L. beckii*, *P. ziziphi* sont des organismes nuisibles importants sur oranger dans la région de Rouiba et Oued Alleug et dans les pays d’Afrique du Nord, montrant une grande capacité d'adaptation à différents environnements.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. **Jendoubi H. (2018)**. The scale insect fauna of citrus in Tunisia: A critical overview. *International Journal of Fauna and Biological Studies*, **5** (3): 169-178.
- [2]. **Cahuzac D. (1986)**. Les cochenilles des ligneux d'ornement. *Phytoma*, n°383, pp : 37-38.
- [3]. **Miller D.R., Miller G.L. and Watson G.W. (2002)**. Invasive species of mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae) and their threat to United States agriculture. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, **104** (4):825-836.
- [4]. **Miller D.R. and Davidson J.A. (2005)**. *Armored Scale Insect Pests of Trees and Shrubs*. Ed, Cornell University Press, Ithaca-New York, 442 p.
- [5]. **Pellizzari G. and Germain, J.F. (2010)**. Scales (Hemiptera, Superfamily Coccoidea). *BioRisk*, **4** (1), pp: 475-510.
- [6]. **García Morales M., Denno B.D., Miller D.R., Miller G.L., Ben-Dov Y. and Hardy N.B. (2017a)**. Scale Net Database: A literature-based model of scale insect biology and systematics. <http://scalenet.info/about/>. 01 May
- [7]. **García Morales M., Denno B.D., Miller D.R., Miller G.L., Ben-Dov Y. and Hardy N.B. (2017b)**. Scale Net Database: A literature-based model of scale insect biology and systematics. [http://www.idtools.org/id/scales/key\\_info.php](http://www.idtools.org/id/scales/key_info.php). 24 July
- [8]. **García Morales M., Denno B.D., Miller D.R., Miller G.L., Ben-Dov Y. and Hardy N.B. (2017d)** – Scale Net Database: A literature-based model of scale insect biology and systematics. <http://scalenet.info/catalogue/>. 01 January
- [9]. **García Morales M., Denno B.D., Miller D.R., Miller G.L., Ben-Dov Y. and Hardy N.B. (2017c)**. Scale Net Database: A literature-based model of scale insect biology and systematics. <http://scalenet.info/scalesplace/>. 5 July 2019.
- [10]. **Bénassy C. and Soria F. (1964)**. Observations écologiques sur les cochenilles diaspiques nuisibles aux agrumes en Tunisie. *Annales de l'INRAT*, **37**:193-222.
- [11]. **Gullan P.J. and Cook L.G. (2007)**. Phylogeny and higher classification of the scale insects (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea). *Zootaxa*, **1668**:413 - 425.
- [12]. **Kosztarab M. and Kozar F. (1988)**. *Scale insects of Central Europe*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 456 pp.
- [13]. **Balachowsky A.S. (1948)**. Les cochenilles de France, d'Europe, du nord de l'Afrique et du bassin Méditerranéen IV, Monographie des Coccoidea, classification, Diaspidinae (1ère partie). *Actualités Scientifiques et Industrielles, Entomologie Appliquée*, **1054**:243-394.
- [14]. **Balachowsky A.S. (1956)**. Les cochenilles du continent Africain Noir. V. 1 - Aspidiotini (1ère partie). *Ann. Musée Roy. Congo Belge (Sciences Zoologiques)*, Tervuren, **3**, pp : 1-142
- [15]. **Williams D.J. (2004)**. *Mealybugs of Southern Asia*. The Natural History Museum, London, UK and Southdene SDN.BHD., Kuala Lumpur, Malaysia. 896 pp.
- [16]. **Hodgson C.J., Abbas G., Arif M.J., Saeed S., and Karar H. (2008)**. *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Sternorrhyncha: Coccoidea: Pseudococcidae), an invasive mealybug damaging cotton in Pakistan and India, with a discussion on seasonal morphological variation. *Zootaxa*, **1913**: 1–35.
- [17]. **Unruh C.M. and Gullan P.J. (2008a)**. Identification guide to species in the scale insect tribe Iceryini (Coccoidea: Monophlebidae). *Zootaxa*, **1803**:1-106.
- [18]. **Unruh C.M. and Gullan P.J. (2008b)**. Molecular data reveal convergent reproductive strategies in iceryine scale insects (Hemiptera: Coccoidea: Monophlebidae), allowing the re-interpretation of morphology and a revised generic classification. *Systematic Entomology*; **33**:8-50
- [19]. **Balachowsky A.S. (1954)**. Les cochenilles paléarctiques de la tribu des Diaspidini. Ed. Institut Pasteur, Paris, Coll. " Mem. Sci. Inst. Pasteur", 450 p.
- [20]. **Balachowsky A.S. (1927)**. Contribution à l'étude des coccidés de l'Afrique mineure (1re note). *Annales de la Société Entomologique de France*, **96**: 175-207.
- [21]. **Balachowsky A.S. (1928)**. Contribution à l'étude des coccidés de L'Afrique mineure (3e note). *Chrysomphalus aonidum* L. - biologie - traitement. *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de l'Afrique du Nord*, **19**: 156-180.
- [22]. **Balachowsky A.S. (1932)** – Étude biologique des coccidés du bassin occidental de la Méditerranée. *Encyclopédie Entomologique*, XVP. LeChevalier & Fils Paris, 214 pp + LXVII.
- [23]. **Saighi H., Doumandji S. et Biche M. (2005)**. Les cochenilles diaspiques du Jardin d'Essai du Hamma (Alger) et leurs ennemis naturels (Hemiptera, Diaspididae). [Armoured scale insects from the Algiers botanical garden named Jardin d'Essai du Hamma and their natural enemies (Hemiptera, Diaspididae)]. *Bulletin de la Société Entomologique de France*, **110**(4-5): 429-928.
- [24]. **Biche M. (2012)**. Les principaux insectes ravageurs des agrumes en Algérie et leurs ennemis naturels. Ed. FAO., Regional Integrated Pest Management Programme in the Near East / GTFS/REM/070/ITA. 36p.
- [25]. **Belguendouz R. (2014)**. Relations plantes hôtes cochenilles diaspiques sur les agrumes (*Citrus* ssp) en Algérie: cas de *Parlatoria ziziphi* (Lucas, 1853) (Homoptera : Diaspididae). Thèse Doct., Ecol. Nat. Sup. Agron., 265 p.

- [26]. **Fetykó K. and Kozár F. (2012).** Records of *Ceroplastes* Gray 1828 in Europe, with an identification key to species in the Palaearctic Region. Bulletin of Insectology, 65(2): 291-295.
- [27]. **Hodgson C.J. and Peronti A.L.B.G. (2012).** A revision of the wax scale insects (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea: Ceroplastinae) of the Afrotropical Region. Zootaxa, 3372 : 1 – .
- [28]. **Kirkaldy G.W. (1902).** Hemiptera. Fauna Hawaiensis, 3: 93-174.
- [29]. **Mamet, R.J. (1943).** A revised list of the Coccoidea of the islands of the western Indian Ocean, south of the equator. Mauritius Institute Bulletin. Port Louis, 2: 137-170.
- [30]. **Franco C.J., Garcia Marí F., Ramos A.P. and Besri M. (2006).** Survey on the situation of citrus pest management in Mediterranean countries. Bulletin IOBC/wprs, 29(3): 335-346.
- [31]. **Ben-Dov Y. (1993).** A systematic catalogue of the soft scale insects of the world (Homoptera: Coccoidea: Coccidae). Sandhill Crane Press Gainesville, FL 536 pp.
- [32]. **CAB International (1994).** *Pulvinaria psidii* Maskell. Distribution Maps of Pests, Series A, Agricultural Map no. 59: 2 pp.
- [33]. **De Lotto G. (1965).** On some Coccidae (Homoptera), chiefly from Africa. Bulletin of the British Museum (Natural History) Entomology, 16: 175-239.
- [34]. **Belguendouz R., Biche M., Adda R. and Allal-Benfekih L. (2013).** Bio-ecology of a pest (*Aonidiella aurantii* Maskell) (Hemiptera, Diaspididae): spatio temporal relationship with its host plants *Citrus limon* and *C. sinensis* in Algeria region. American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture, 7 (1) : 14-20.
- [35]. **Newstead R. (1897).** New Coccidae collected in Algeria by the Rev. Alfred E. Eaton.. Transactions of the Entomological Society of London, 1897: 93-103
- [36]. **Signoret V. (1877).** Essai sur les cochenilles ou gallinsectes (Homoptères - Coccidés), 18e et dernière partie. [Essay on gall-forming scale insects (Homoptera - Coccoidea), 18th part.]. Annales de la Société Entomologique de France (serie 5) 6: 591-676
- [37]. **Delassus M., Bricchet J., Balachowsky A. S. et Lepigre A. (1927).** Les ennemis des cultures fruitières et les moyens de les combattre. Ed. Insectarium du jardin d'essai de Hamma, Coll. «Bibl. Colon. de l'Afr. du Nord» Alger, 233 p.
- [38]. **Doumandji S.E., 1985** – Les cochenilles diaspiques du caroubier, *Ceratonia siliqua* en Algérie. 1<sup>er</sup> Journ. etud. Sci., INES, Blida, 15 p.
- [39]. **Doumandji S. et Biche M. (1986).** Les cochenilles diaspiques de l'olivier, *Olea europea* en Algérie. Ann. Inst. Nat. agro., El Harrach, Vol. 10, n° 1, pp. 97 – 119
- [40]. **Belguendouz R. Biche M. et Allal L. (2011).** Evolution d'un hemiptère *Lepidosaphes beckii* (Hemiptera : Diaspididae) dans deux types d'habitats agrumicoles (le citronnier et l'oranger) dans la région de la Mitidja 2009-2010(Algérie). In the proceeding of 2011. CIRA de L'AFPP Conference, pp :110-119
- [41]. **Piguet P. (1960).** Les ennemis des animaux des agrumes en Afrique du Nord. Ed. Soc. Shell, d'Alger, p117.
- [42]. **Danzig E.M. and Pellizzari, G. (1998).** Diaspididae. *Catalogue of Palaearctic Coccoidea*. Plant Protection Institute, Hungarian Academy of Sciences Budapest, Hungary 526 pp.
- [43]. **Tena A. and Garcia Mari F. (2011).** Current situation of citrus pests and diseases in the Mediterranean basin. Bulletin IOBC/wprs; 62:365-378.
- [44]. **Merrill G.B. (1953).** A revision of the scale insects of Florida. Bulletin of the Florida State Plant Board 1: 1-143.
- [45]. **Balachowsky A.S. (1953).** Entomologie appliquée. Les cochenilles de France, d'Europe, du Nord de l'Afrique et du Bassin Méditerranéen. Ed. Hermann et Cie, Paris, Coll. « Act. Sci. et Ind », n°1202, T. VI, 926p.
- [46]. **Boisduval J.B.A. (1867).** Essai sur l'entomologie horticole. [Report on horticultural entomology.]. Donnad Paris 648 pp.
- [47]. **Taibi A., Gacemi A., Medjdoub Y., Medjdoub I. and Doumandji S. (2016).** *Citrus* infestation by the black scale, *Parlatoria ziziphi* Lucas (Homoptera: Diaspididae) in Tlemcen, Algeria. Journal of Entomological Research, 40(3): 217-221
- [48]. **Belguendouz R., Biche M. et Haddoum M. (2009).** Biologie du pou noir de l'oranger *Parlatoria ziziphi* (Hemiptera : Diaspididae) et l'impacte de son parasitoïde *Encarsia citrinus* (Hymenoptera – Aphelinidae) dans la régulation de son niveau d'infestation sur Clémentinier en Mitidja (Algérie). In the proceeding of 2009. AMMP Scholars Conference, pp : 699.
- [49]. **Belguendouz R. Biche M. et Seninet I. (2011).** Etude de la teneur en protéine et en phosphore des feuilles de jeunes plantes d'agrumes sous serre non éclairée avec la pullulation du pou noir de l'oranger *Parlatoria ziziphi* (Homoptera : Diaspididae) en Mitidja Algérie. In the proceeding of 2011. AFPP Conference, pp : 120-129.
- [50]. **Takarli F.,Belguendouz R. et Benrima A. (2015).** Etude de la dynamique des populations de *Parlatoria ziziphi* Lucas sur clémentinier dans la région de Mitidja. Rev. Agrobiologia, 7: 21-26.
- [51]. **Trabut L. (1910).** La défense contre les cochenilles et autres insectes fixés. Gouv. Gén. Algérie, Alger, 151 pp.
- [52]. **Borchsenius N.S. (1966).** A catalogue of the armoured scale insects (Diaspidoidea) of the world.Nauka, Moscow & Leningrad, 449 pp.
- [53]. **Longo S., Mazzeo G., Russo A. and Siscaro G. (1994).** *Aonidiella citrina*, a new pest of citrus in Italy. Informatore Fitopatologica, 34(12):19-25.



## DYNAMIQUE DES POPULATIONS ET DES INFESTATIONS DE LA MINEUSE SUD-AMÉRICAINE DE LA TOMATE *TUTA ABSOLUTA* SUR TROIS CULTURES MARAÎCHÈRES EN ALGÉRIE : INFLUENCE DE LA PLANTE-HÔTE ET DES VARIATIONS DE TEMPÉRATURE

ZAID Radouane<sup>1,2\*</sup> ; GAUTHIER Nathalie<sup>3</sup> et DJAZOULI Zahr Eddine<sup>1</sup>

1. Université de Blida 1, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Biotechnologie, Laboratoire de Biotechnologie des Productions Végétales, B.P. 270, Route de Soumaâ, Blida 09000, Algérie.

2. Université Djillali Liabes Sidi Bel Abbès, Faculté des Sciences de la Vie et de la Nature, Département des Sciences Agronomiques, Algérie.

3. CBGP, IRD, CIRAD, INRA, Montpellier SupAgro, Université Montpellier, Montpellier, France

Reçu le 14/07/2019, Révisé le 03/10/2019, Accepté le 28/10/2019

### Résumé

**Description du sujet :** Influence de la tomate, l'aubergine et la pomme de terre et des variations de température sur la dynamique des populations et des infestations de la mineuse *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera, Gelechiidae).

**Objectifs :** Étude de (i) la dynamique d'abondance des différents stades de *T. absoluta*, (ii) la préférence de l'espèce pour les trois cultures, (iii) la gradation de l'installation primaire et la structure d'âge des stades larvaires présents sur chaque plante-hôte, (iv) l'importance des variations thermiques sur les captures, l'abondance des stades larvaires et les niveaux d'infestations de chaque culture.

**Méthodes :** Les adultes mâles sont capturés au moyen de pièges à phéromones. Les stades larvaires sont dénombrés selon un protocole d'échantillonnage adapté à chaque plante-hôte. Les températures sont enregistrées durant toute la période expérimentale et pour chaque site.

**Résultats :** La dynamique d'abondance des formes biologiques de *T. absoluta* et les infestations engendrées sont plus importantes sur tomate et sont significativement influencées par les variations thermiques (températures maximales et températures minimales) et la plante-hôte considérée. Les abondances et les taux d'infestations sont d'autant plus élevés que les températures sont élevées. La tomate est chronologiquement la première culture attaquée.

**Conclusion :** Notre étude montre le rôle majeur des variations thermiques et de l'espèce de solanacée ciblée sur la dynamique des populations de *T. absoluta* et sur la dynamique d'infestations des plantes par les stades larvaires.

**Mots clés :** Dynamique des populations, ravageur des cultures, solanacées, taux d'infestations, *Tuta absoluta*, variations de température.

## POPULATION DYNAMICS AND INFESTATIONS OF THE SOUTH AMERICAN TOMATO LEAFMINER *TUTA ABSOLUTA* ON THREE VEGETABLE CROPS IN ALGERIA: INFLUENCE OF THE HOST PLANT AND TEMPERATURE VARIATIONS

### Abstract

**Description of the subject:** Influence of tomato, eggplant and potato and temperature variations on the population and infestation dynamics of the leafminer *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera, Gelechiidae).

**Objective:** Study of (i) the abundance dynamics of the different stages of *T. absoluta*, (ii) the species preference for the three crops, (iii) the gradation of the primary establishment plant and the age structure of the stages larvae present on each host plant, (iv) the importance of temperature variations on adult trapping, the abundance of larval stages and the levels of infestation of each crop.

**Methods:** Adult males are caught using pheromone traps. Larval stages are counted according to a sampling protocol adapted to each host-plant. Temperature variations are recorded over the entire experimental period and for each site.

**Results :** The dynamics of abundance of all *T. absoluta* biological forms and the resulting infestations are greater on tomato, and are significantly influenced by temperature variations (maximum and minimum temperatures) and the host-plant considered. Tomato is chronologically the first crop attacked.

**Conclusion :** Our study shows the major roles of temperature variations and of the targeted solanaceous species on the dynamics of *T. absoluta* populations and on the dynamics of plant infestations by the larval stages

**Keywords:** population dynamics, crop pests, solanaceae, infestation rates, *Tuta absoluta*, temperature variations.

\* Auteur correspondant : ZAID Radouane, E-mail : [zaid.redouane16@gmail.com](mailto:zaid.redouane16@gmail.com)

## INTRODUCTION

Les cultures maraîchères (ie. productions légumières dédiées à l'autoconsommation et la vente) constituent une priorité dans les programmes de production agricole de beaucoup de pays d'Afrique. En effet, les légumes sont des denrées alimentaires à hautes valeurs nutritionnelles et commerciales. Elles permettent d'améliorer la ration et l'équilibre alimentaires des populations, leur assurent des revenus complémentaires et permet aux états de bénéficier de recettes supplémentaires liées à l'exportation.

En Algérie, les cultures maraîchères occupent la 2<sup>ème</sup> place après les céréales [1], avec une production nationale de 13,2 millions de tonnes et un rendement moyen de 30 T/hectare [2]. Les cultures de la famille des solanacées (tomate, aubergine, poivron, pomme de terre, etc.) occupent une place prépondérante dans l'économie agricole légumière algérienne. Elles représentent 70% de la surface cultivée du pays où la tomate sous serre et de plein champ prend une place majeure. Cependant, la production de ses cultures est fortement contrainte par les conditions climatiques (température, régime des pluies) et de nombreux insectes déprédateurs et maladies affectant aussi bien la qualité que la quantité des produits.

La mineuse sud-américaine de la tomate *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera, Gelechiidae) est un des ravageurs majeurs des solanacées cultivées et sauvages dans le monde entier. Tous les stades larvaires de ce microlépidoptère creusent des galeries dans le mésophylle des feuilles, pénètrent dans les tiges, les boutons floraux ou les fruits affectant ainsi directement ou indirectement (eg. développement de maladies cryptogamiques) la croissance et la capacité photosynthétique et de production de la plante [3 ; 4 ; 5 et 6]. Les dégâts sur certaines cultures de solanacées (tomates, aubergines, poivrons, pommes de terre) sont tels que les pertes de production peuvent en l'absence de toutes mesures de contrôle atteindre des niveaux considérables [7 ; 8 et 5]. En Algérie, l'espèce *T. absoluta*, fut pour la première fois décrite en 2008 dans la région de Mostaganem [9]. Une décennie après, forte de ses capacités invasives bien connues [4 et 5], elle est installée dans toutes les wilayas productrices de légumes et surtout de tomates du pays [10 et 11].

Trouvant des conditions climatiques et de plantes-hôtes favorables à son développement, *T. absoluta* y a pullulé et induit de graves pertes agricoles obligeant la mise en œuvre de tous les modes de lutte disponibles pour contrôler ses populations. Les traitements chimiques, malgré les effets secondaires néfastes induits (santé humaine atteinte, biodiversité réduite), sont majoritairement utilisés mais pour une efficacité de plus en plus faible du fait notamment du développement de résistances des populations d'insectes aux molécules [12 ; 13 et 14]. Le développement d'une stratégie de lutte plus efficace et soucieuse de l'environnement et du vivant nécessite donc l'utilisation d'autres méthodes de lutte (eg. lutte biologique, piègeages lumineux ou à phéromones, etc.) mais aussi une bonne connaissance de la dynamique d'installation et d'infestation des populations de *T. absoluta* dans les cultures majeures attaquées.

Il a été largement démontré que les plantes-hôtes et les conditions climatiques, en particulier la température, sont des facteurs majeurs influençant les paramètres bio-démographiques (survie, temps de développement, fécondité, etc) et l'activité générale (vol, parasitisme, etc) de nombreuses espèces d'insectes et de *T. absoluta* notamment [15 ; 16 ; 17 ; 18 et 19]. Ainsi, des variations thermiques saisonnières et la diversité de solanacées présentes dans les zones maraîchères pourraient directement influencer les dynamiques d'abondance et d'infestation de *T. absoluta* et la pertinence des actions à mener (ie. Connaître le moment pour faire des lâchers précoces d'ennemis naturels sous serre). En conséquence, nous avons étudié le niveau et la temporalité des abondances des stades adultes et larvaires de *T. absoluta* dans les cultures de tomate, aubergine et pomme de terre ainsi que les taux d'infestations des cultures par les stades larvaires de façon à mieux connaître (i) l'ordre d'arrivée écologique et les pics populationnels de ce ravageur dans la zone maraîchère, (ii) quelle est la plante-hôte préférée, (iii) la gradation de l'installation primaire et la structure d'âge des stades présents sur chaque plante-hôte, (iii) l'importance des variations thermiques sur les captures d'adultes, l'abondance des stades larvaires et les niveaux d'infestations de chaque culture.

L'ensemble des résultats a été discuté dans le cadre d'une meilleure connaissance des populations présentes en Algérie, de la gestion de ses populations et du changement climatique.

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'étude de l'incidence des différents stades de *T. absoluta* sur trois cultures majeures en Algérie, est basée sur le dénombrement des individus de *T. absoluta* au cours d'une saison de production naturelle. Ainsi, l'abondance globale des adultes mâles et des stades larvaires, les taux d'infestation des plantes-hôtes et l'évolution des différents stades biologiques de l'insecte en fonction de l'influence des variables thermiques ont pu être déterminés.

### 1. Présentation des plantes-hôtes et de la station d'étude

En 2015, nous avons fait le suivi des effectifs des divers stades (adultes et larvaires) de *T. absoluta* sur trois cultures de solanacées c'est à dire sur une surface de 400 m<sup>2</sup> de tomate (*S. lycopersicum* L hybride Tavira) sous serre, de 400 m<sup>2</sup> d'aubergine (*S. melongena* Hybride Galine) sous serre et de 1000 m<sup>2</sup> de pomme de terre (*S. tuberosum* hybride Spunta) de plein champ, avec une distance approximative de 1km entre les sites. Les expériences ont été menées sur la station d'étude de l'Institut Technique des cultures Maraîchères et Industrielles (ITCMI) de Staoueli, commune du littoral situé à 29 km d'Alger (Algérie) (Fig. 1).

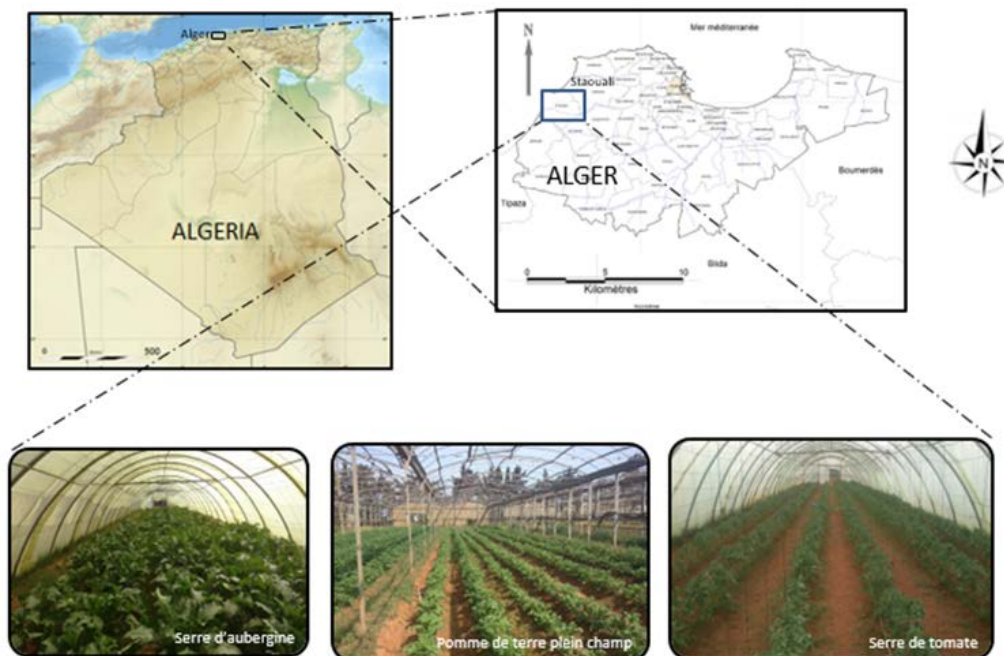


Figure 1 : Présentation de la station d'étude de l'ITCMI (Staoueli-Tipasa)

De façon à connaître les conditions climatiques de la zone d'étude lors de la période expérimentale, nous avons récupéré les températures de l'année d'étude au niveau de la station de météorologie de Staoueli (Alger). Ainsi, les températures moyennes hivernales ont varié de 13,9°C à 22,4°C, avec un minimum à 9,1°C en Février et des maxima observés en Juillet et Août avec des valeurs moyennes de 36,5°C et 35,8°C, respectivement. L'index climatique de Bagnouls et Gausson situe la région d'étude à l'étage semi-aride à hiver chaud, et révèle la présence d'une période sèche allant, de Mars à fin Décembre et d'une période humide le reste de l'année.

La température moyenne annuelle donnée est de 22,6°C avec une précipitation annuelle de 385,97mm.

### 2. Dénombrement des adultes par piégeage

Le dénombrement des adultes mâles en activité de vol dans chaque site expérimental (serre de tomate, serre d'aubergine, champ de pommes de terre) a été effectué du 11/01/2015 au 02/06/2015 pour la tomate, du 29/03/2015 au 02/06/2015 pour la pomme de terre et du 03/03/2015 au 02/06/2015 pour l'aubergine. Le piégeage des adultes mâles est effectué avec un piège de type Delta.

C'est un piège composé d'une plaque engluée et d'une capsule libérant une phéromone sexuelle spécifique attractive pour les mâles de *T. absoluta*. Le changement de la capsule à phéromone est effectué toutes les quatre semaines. Le nombre de pièges installé est de 1 piège pour chaque culture. Le prélèvement des mâles capturés est réalisé une fois par semaine, afin de suivre la dynamique temporelle de l'activité de vol des adultes de *T. absoluta*. Le dénombrement par piège se fait *de visu* en laboratoire.

### 3. Abondance des stades larvaires en cultures par échantillonnage des plants

Pour la tomate, les observations ont été réalisées sur l'ensemble des plants de la culture sous serre durant toute la durée de la campagne selon la méthode d'échantillonnage, légèrement modifiée, élaborée par Gomide *et al.* [20]. Hebdomadairement, pendant 21 semaines, une feuille choisie de façon aléatoire et en zigzag par étage foliaire (défini en fonction des bouquets floraux de la plante de tomate) et par plant a été prélevée faisant un total de 6 feuilles sur 6 étages foliaires/plant par semaine. Le nombre total de plantes échantillonnées étant de 60, un total de 360 feuilles a été observé sur l'ensemble des étages foliaires pour pouvoir procéder à des estimations de l'abondance des stades larvaires du déprédateur et détecter les premiers foyers de *T. absoluta*.

Pour la pomme de terre et l'aubergine, la même méthode d'échantillonnage a été suivie à l'exception du fait qu'une seule feuille par plant a été prélevée. Le nombre total de plants échantillonnés étant de 60 pour chaque culture, 60 feuilles pour la pomme de terre et 60 feuilles pour l'aubergine ont été prélevées.

Après prélèvement, le matériel végétal frais est mis dans des sachets en papier étiquetés (date et niveau d'étage foliaire), conservés au réfrigérateur à 4°C, pour être examiné sous loupe binoculaire et s'assurer de l'identification spécifique des larves, de leur stade de développement et les dénombrer. Ensuite, les taux d'infestation ont pu être calculés comme suit :  $Taux\ d'infestation\ (\%) = \frac{Nombre\ de\ feuilles\ infestées}{\Sigma\ des\ feuilles\ échantillonnées} \times 100$

### 4. Analyses statistiques des données

Les analyses de variance ont été réalisées sur des moyennes homogènes adoptées sur la base d'un coefficient de variance (C.V. <15%). Nous avons appliqué le modèle général linéaire (G.L.M.), aux formes larvaires de *Tuta absoluta* de manière à étudier l'influence du temps et des plantes-hôtes sur les abondances. Ce modèle G.L.M. permet d'étudier l'effet strict des différents facteurs sans faire intervenir les interactions entre facteurs (Temps x plantes-hôtes). La comparaison multiple a été appliquée entre les moyennes des taux d'infestations ainsi que de l'abondance globale des individus par le recours au test Post Hoc de Tukey. Les différences ont été considérées comme significatives à  $p < 0,05$ . L'analyse a été réalisée à l'aide du logiciel XLSTAT ver. 9.

Le test Chi2 ( $X^2$ ) est utilisé pour déterminer si la différence entre deux distributions de fréquences est statistiquement significative (seuil de significativité  $\alpha=0,05$ ) ou attribuable à l'erreur d'échantillonnage (le hasard) sous l'hypothèse nulle. Il a été utilisé pour comparer les données brutes de captures des adultes de *T. absoluta* obtenues aux diverses variations thermiques (minimales et maximales) observées lors de la période expérimentale et estimer l'importance des relations entre l'évolution du nombre de captures de *T. absoluta*, soit du phénomène de vol, et les fluctuations thermiques. Si la différence entre les deux distributions est réduite (valeurs faibles), l'hypothèse nulle sera acceptée. Si la différence est grande, l'hypothèse nulle sera rejetée. Dans ce dernier cas la différence est statistiquement significative entre les deux distributions et ne peut seulement être expliquée par le hasard, une différence réelle existe donc. Le test est réalisé grâce au logiciel Past ver 3.2. [21].

Pour estimer l'influence des conditions thermiques sur les effectifs de mâles capturés au piège, et les taux d'infestations, un ajustement de manière non-linéaire de la variable explicative (nombre d'adultes capturés par piège à phéromones ou taux d'infestation au niveau de chaque plante-hôte) à la variable dépendante (variations thermiques minimales ou maximales durant la période expérimentale) a été réalisé pour permettre l'obtention de courbes de régression polynomiale. Les profils ont été réalisés par le logiciel Past ver 3.2. [21].

Le degré de corrélation entre les deux variables analysées a été estimé au moyen du coefficient de régression  $R^2$  et du test d'Akaike IC (Akaike Information Criterion) lequel permet également la comparaison entre plusieurs modèles/hypothèses ( $T_{\text{Min}}$ /Capture des adultes,  $T_{\text{Max}}$ / Capture des adultes,  $T_{\text{Min}}$ /Taux d'infestation global,  $T_{\text{Max}}$ / Taux d'infestation global). Le meilleur modèle est celui possédant la valeur d'Akaike IC la plus faible et/ou de  $R^2$  la plus élevée ( $0 < R^2 < 1$ ). Les valeurs de d'Akaike IC et du  $R^2$  ont été obtenus par le logiciel Past ver 3.2. [21]

Des diagrammes synthétisant la significativité statistique des relations entre les paramètres capture de *T. absoluta* ou taux d'infestation et conditions minimales et maximales thermiques pour chaque plante-hôte ont été établis. L'épaisseur des flèches, les valeurs de Chi2 et les probabilités indiquent la significativité de la relation (seuil de significativité,  $\alpha = 0,05$ ).

Les barycentres ou abondances maximales des variations temporelles de captures (eg déclenchement, pic, déclin) d'adultes de *T. absoluta* et d'infestations par les stades larvaires ont été calculés conformément à Djazouli *et al.* (2009) [22]. Le barycentre temporel se déduit de la formule suivante :  $B = \frac{\sum (R_{Gi} \times A_{Bi})}{\sum A_{Bi}}$ , avec  $R_{Gi}$  = rang du mois de janvier à juin (culture tomate), de mars à juin (cultures de pomme de terre et d'aubergine),  $A_{Bi}$  = abondance au mois *i*.

L'ordre d'arrivée écologique des adultes et/ou des formes larvaires a été évalué par le test de Crosscorrelation et le paramètre (Lag) en se basant sur les barycentres calculés. La procédure a été réalisée par le logiciel Past ver 3.2. [21]

## RÉSULTATS

### 1. Dynamique de l'incidence de *T. absoluta*

Les résultats montrent une augmentation de l'abondance des stades larvaires de *T. absoluta* très marquée pour les trois plantes-hôtes (abondance globale augmentée d'un facteur approximatif de 3 à 6 selon la plante-hôte), régulière pour la pomme de terre et l'aubergine mais très variable pour la tomate. Les effectifs des divers stades larvaires ont graduellement augmenté dans le temps avec une précocité d'apparition et d'importance numérique dans le sens Tomate > Pomme de terre > Aubergine.

Les captures d'adultes mâles de *T. absoluta* au niveau des trois cultures présentent également une gradation temporelle positive avec un ralentissement de l'accroissement entre Avril et Mai pour la pomme de terre et l'aubergine. Au-delà du mois de Mai, les captures s'intensifient de nouveau pour atteindre un maximum au mois de Juin.

La dynamique temporelle du taux d'infestation des trois espèces de plante-hôte est comparable à celle des deux autres paramètres ; elle augmente au fil des mois. En outre, au vue des valeurs de taux d'infestation globale (Fig. 2), une résurgence d'infestation est comptabilisée au mois de Mai et persiste en Juin, à l'exception de la culture de tomate. Tous les paramètres mesurés à savoir l'abondance globale des stades larvaires, les captures d'adultes et les taux infestations présentent des valeurs maximales pour la culture de tomate sous serre de 400m<sup>2</sup> par rapport à l'aubergine sous serre de 400m<sup>2</sup> et de pomme de terre en plein champ (parcelle de 1000m<sup>2</sup>) (Fig. 2A, 2B et 2C).

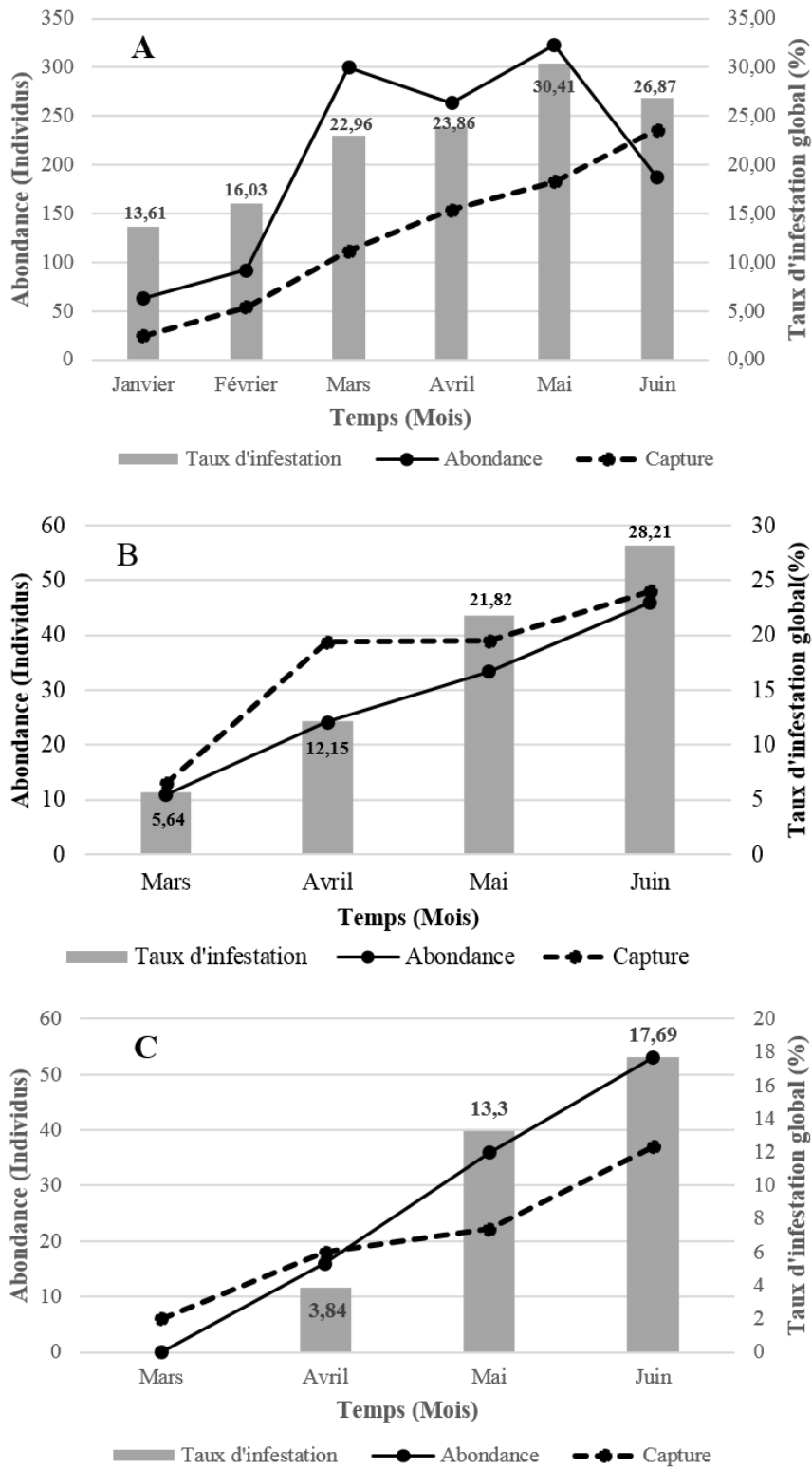
### 2. Influence des variations de température sur le nombre de captures

Tout d'abord, les valeurs minimales et maximales observées sous serre et en plein champ présentent quelques degrés d'écart (eg. températures minimales et maximales supérieures en plein champ), témoignant de l'importance des structures de cultures sur les conditions thermiques exercées sur l'insecte (Fig. 3). Ensuite, la complexité des courbes obtenues par la régression polynomiale premier degré (Fig. 3B), deuxième degré (Fig. 3A, 3C, 3D, 3E et 3F) provient vraisemblablement, du fait que la variable étudiée à savoir le nombre de captures est très sensible aux variations thermiques maximales et minimales et potentiellement d'autres facteurs.

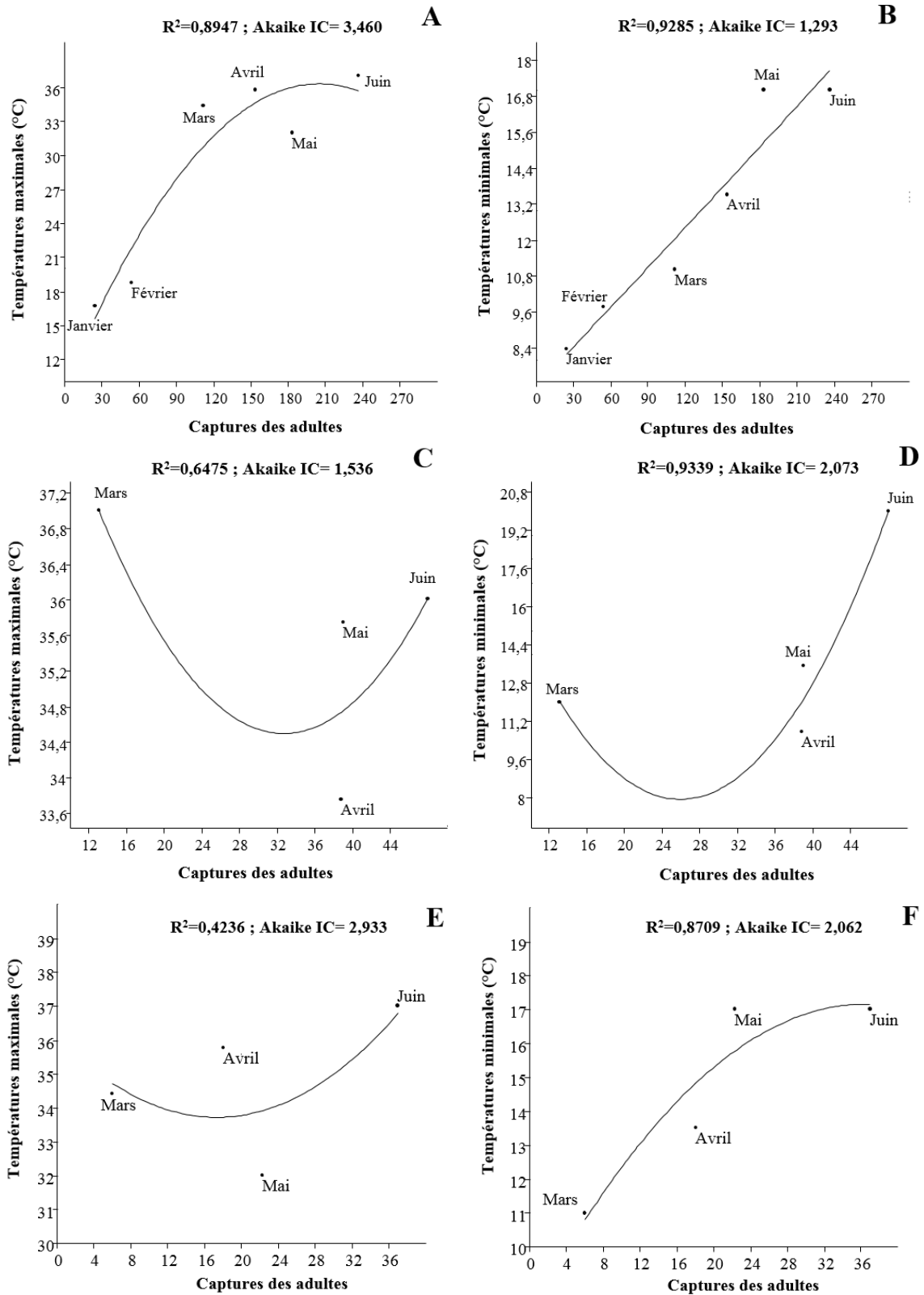
Les valeurs du coefficient de régression  $R^2$  sont globalement élevées témoignant de l'existence d'une relation entre les variables analysées, soit variations de températures et captures des mâles de *T. absoluta*. Les diverses courbes de régression polynomiales montrent que le nombre de captures des adultes est d'autant plus important que la température augmente (excepté cas de Mars, Fig. 3C).

Sur cultures de tomate et d'aubergine, la faible valeur de l'Akaike IC nous indique que les effectifs de mâles capturés sont conditionnés par les variations thermiques minimales et des températures basses (Fig. 3A, 3B, 3E et 3F).

Par contre, sur pomme de terre, la situation est moins tranchée et plutôt limitée par les températures maximales élevées (Fig. 3C et 3D)



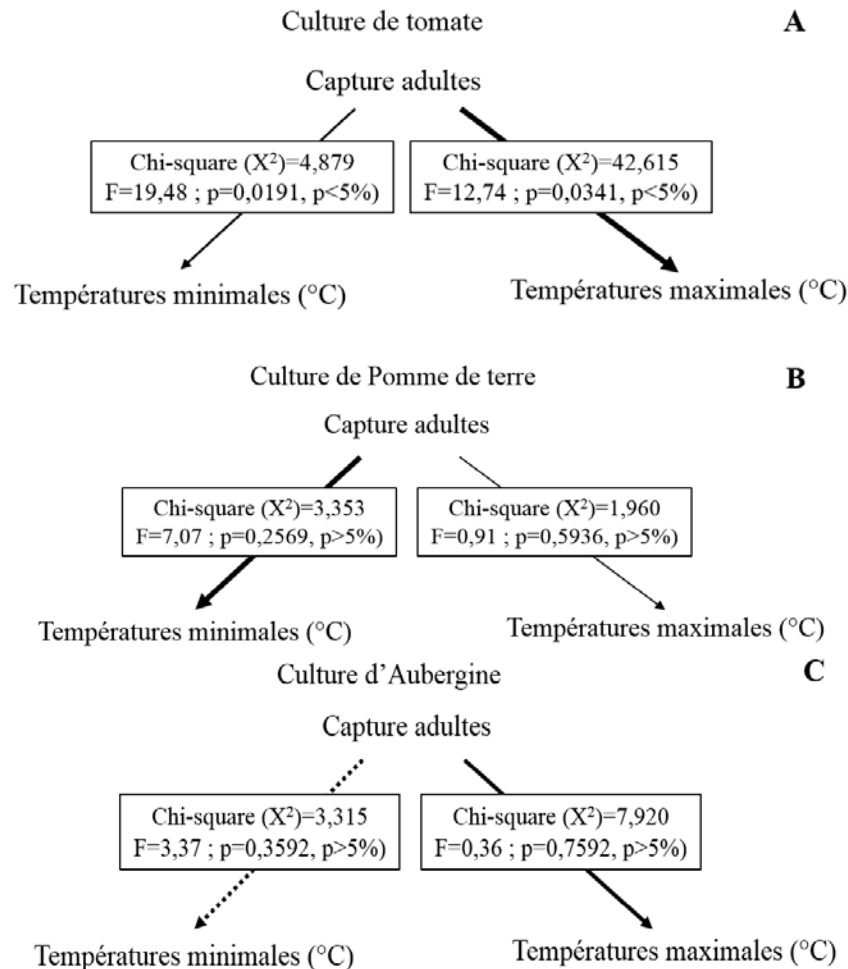
Figures 2 : Dynamique temporelle de *Tuta absoluta*  
 A : Culture de tomate ; B : Culture de pomme de terre ; C : Culture d'aubergine



Figures 3 : Captures des adultes de *Tuta absoluta* rapportées aux variations thermiques  
 A et B : Culture de tomate ; C et D : Culture de pomme de terre ; E et F : Culture d'aubergine

Les diagrammes synthétisent l'importance des relations entre les deux variables en donnant les valeurs de  $X^2$  (eg. significativité de la relation), de probabilité (eg. support de la relation), et l'épaisseur des flèches.

Ainsi, les captures de mâles sont significativement influencées par les variations des températures maximales sur culture de tomate (Fig. 4A), mais par les températures minimales sur cultures de pomme de terre et d'aubergine (Fig. 4B, 4C).



Figures 4 : Diagrammes récapitulatifs des relations entre captures des adultes de *Tuta absoluta* et les variations thermiques

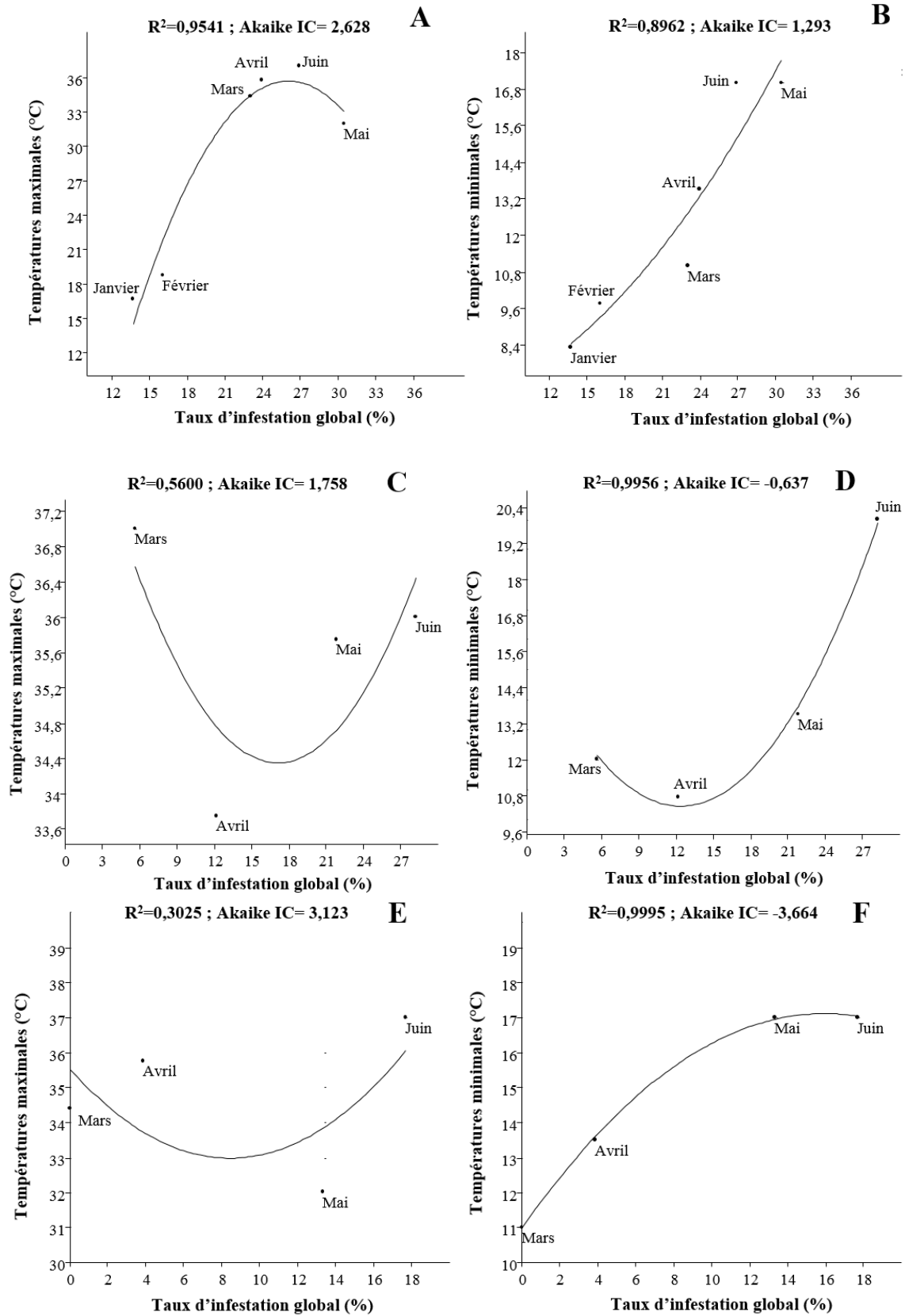
### 3. Influence des conditions de température sur la temporalité des captures

L'étude de l'évolution des captures de mâles de *T. absoluta* au cours de la période expérimentale et dans chaque culture doit permettre de mieux connaître la temporalité du phénomène de vol des adultes à savoir son déclenchement, pic et déclin. Ainsi, l'apparition des captures doit illustrer l'ordre d'arrivée écologique des adultes voliers sur les trois espèces hôtes.

Le Test Crosscorrélacion, au travers du paramètre « Lag » permet d'estimer le décalage temporel enregistré chez les adultes de *T. absoluta* (Tableau 1). Le pic de captures (barycentre) est enregistré vers la mi-Mai au niveau de la culture de tomate, vers la fin du mois de Mai au niveau de la culture de pomme de terre.

Le test donne un décalage d'environ 15 jours (Lag=0,41) entre les cultures de tomate et de pomme de terre, d'environ 20 jours (Lag=0,61) entre cultures de tomate et d'aubergine et de 6 jours (Lag=0,20) entre cultures de pomme de terre et d'aubergine (Tableau 1). Les captures débutent sur tomate.





Figures 5 : Taux d'infestation global par les stades larvaires de *Tuta absoluta* rapportés aux variations thermiques

A et B : Culture de tomate C et D : Culture de pomme de terre ; E et F : Culture d'aubergine

Tableau 1 : Décalage temporel entre les pics de captures d'adultes de *Tuta absoluta* selon les plantes-hôtes

Cultures	Barycentre (mois) (pic de capture maximal)	Test Crosscorrélation		
		Lag (mois) (Décalage temporel)	r	Probabilité
Tomate	4,47	0,41	0,9646	$2,62 \times 10^{-7}$
Pomme de terre	4,88			
Tomate	4,47	0,61	0,9520	$1,19 \times 10^{-6}$
Aubergine	5,08			
Pomme de terre	4,88	0,20	0,9705	$1,06 \times 10^{-7}$
Aubergine	5,08			

#### 4. Influence des variations de température sur les taux d'infestation des plantes-hôtes

Les régressions polynomiales relatives à la fluctuation du taux d'infestation global en fonction des variations thermiques donnent des valeurs de coefficient de régression ( $R^2$ ) très variables (0,302 à 0,999) mais des valeurs d'Akaike IC faibles voire négatives dans le cadre de la variation des températures minimales (Fig. 5D, 5F). Ces dernières valeurs indiquent que les variations de températures minimales influencent significativement les taux d'infestations des plants de pomme de terre et d'aubergine (Fig. 5D, 5F) et de façon moindre la tomate (Fig. 5B).

Les courbes polynomiales relatives aux taux d'infestation des plants de pomme de terre et d'aubergine à des températures élevées accompagnées de valeurs de coefficient de

régression faibles et de valeur Akaike IC fortes, indiquent l'existence d'une relation mais faible entre les deux variables (Fig. 5C, 5E). L'inversion de la courbe polynomiale concernant la tomate et les valeurs de  $R^2$  et d'Akaike IC élevées montrent que les taux d'infestation de cette plante-hôtes sont fortement dépendants des températures élevées (Fig. 5A).

Les diagrammes montrent l'existence d'une relation statistiquement significative et positive entre taux d'infestation et conditions thermiques pour les trois plantes-hôtes mais avec un effet plus marqué pour la tomate ( $X^2=18,541$ , Fig. 6A) par rapport à l'aubergine et la pomme de terre ( $X^2=2,447$  et  $X^2=9,585$ , Fig. 6B et 6C), respectivement.

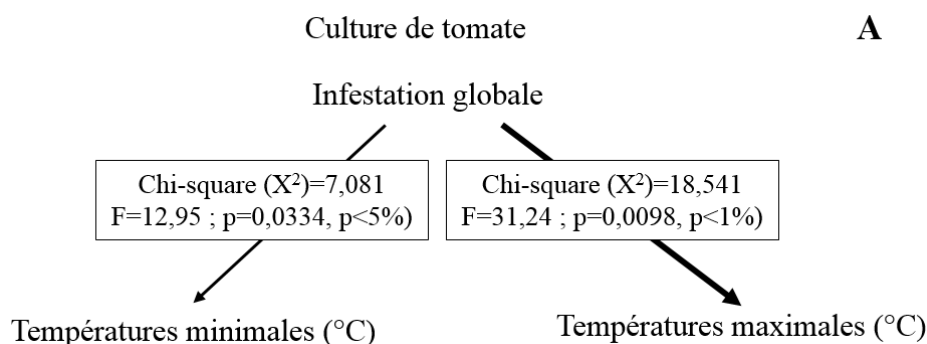


Figure 6 : Diagrammes récapitulatifs des relations entre le taux d'infestation global des plantes-hôtes par les stades larvaires de *Tuta absoluta* et les variations thermiques

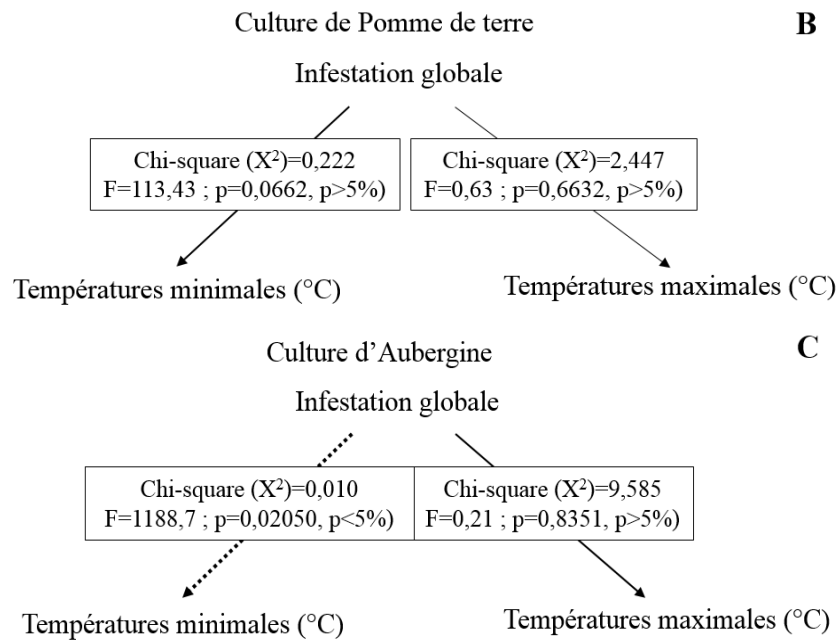


Figure 6 : Diagrammes récapitulatifs des relations entre le taux d'infestation globale des plantes-hôtes par les stades larvaires de *Tuta absoluta* et les variations thermiques

**5. Influence des conditions de température sur la temporalité des taux d'infestation globale**

Les valeurs du Lag obtenues mettent en évidence un décalage temporel important entre les pics d'infestation maximale observée sur tomate et les deux autres plantes-hôtes (Tableau 2). Les stades larvaires s'installent plus précocement sur tomate (pic d'infestation maximale fin Avril),

puis sur pomme de terre (pic début Juin) et enfin sur aubergine (pic mi-Juin). Le décalage temporel est de plus d'un mois entre la culture de tomate et celles de pomme de terre ( $\approx 1$  mois et 5 jours Lag=1,16) et d'aubergine ( $\approx 1$  mois et 15 jours Lag=1,49). Il est faible ( $\approx 10$  jours Lag=0,33) entre l'aubergine et la pomme de terre qui est la première culture infestée des deux.

Tableau 2 : Décalage temporel entre les pics d'infestation des plantes-hôtes par les stades larvaires de *Tuta absoluta*

Cultures	Barycentre (mois) (pic d'infestation maximale)	Test Crosscorrélacion		
		Lag (mois) (Décalage temporel)	r	Probabilité
Tomate	3,91	1,16	0,7274	$8,48 \times 10^{-3}$
Pomme de terre	5,07			
Tomate	3,91	1,49	0,7053	$8,01 \times 10^{-3}$
Aubergine	5,40			
Pomme de terre	5,07	0,33	0,9734	$6,26 \times 10^{-8}$
Aubergine	5,40			

**6. Structure d'âge des formes biologiques infestant les plantes-hôtes**

La structure d'âge des formes biologiques, c'est-à-dire l'abondance moyenne des divers stades larvaires de *T. absoluta* (L1 à L4) présents sur tomate, pomme de terre et aubergine, a été calculée pour toute la période expérimentale.

L'abondance moyenne des stades larvaires est nettement supérieure sur tomate quel que soit le stade larvaire considéré ; un rapport approximatif de l'ordre de 3 est apparent entre les plantes-hôtes par stades larvaires sauf dans la situation L1 entre tomate et pomme de terre. Les différences observées entre pomme de terre et aubergine ne semblent significatives que pour les premiers stades larvaires L1 (Fig.7).

L'abondance larvaire moyenne sur culture de tomate est significativement supérieure à celle observée sur pomme de terre et aubergine (ANOVA,  $p=2,79 \times 10^{-3}$ ,  $p < 1\%$ ) et quel que soit le stade larvaire (ANOVA,  $p < 1\%$ ) et le mois considérés (Tableau 3).

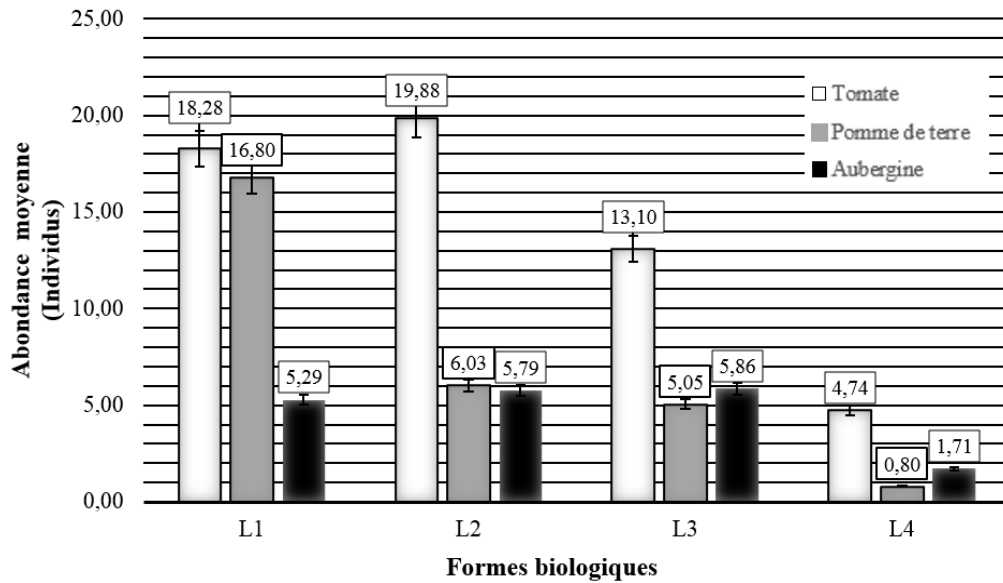


Figure 7 : Infestations des plantes-hôtes rapportées aux formes biologiques (stades larvaires) de *Tuta absoluta*

Tableau 3 : Abondances globales mensuelles de chaque stade larvaire de *Tuta absoluta* sur chaque plante-hôte

Plantes-hôtes	Périodes	L1	L2	L3	L4	Abondance globale
Tomate	Janvier	24,33	24,00	10,66	04,33	51,209 a
	Février	34,00	34,50	17,50	06,00	
	Mars	94,00	19,80	60,00	26,4	
	Avril	77,75	95,50	68,50	21,75	
	Mai	110,75	98,50	84,25	29,50	
	Juin	66,00	45,00	61,00	15,00	
	Abondance globale	67,80 a	69,55 a	50,31 a	17,16 a	
Pomme de terre	Mars	06,00	04,00	01,00	00,00	7,15 b
	Avril	12,75	06,75	04,13	00,50	
	Mai	20,25	05,08	06,50	01,50	
	Juin	30,00	09,00	07,00	00,00	
	Abondance globale	17,25 b	06,20 b	04,65 b	00,50 b	
Aubergine	Mars	00,00	00,00	00,00	00,00	6,56 b
	Avril	04,50	04,75	05,25	01,50	
	Mai	10,00	12,00	10,75	03,25	
	Juin	16,00	14,00	18,00	05,00	
	Abondance globale	07,62 b	07,68 b	08,50 b	02,43 b	
<i>F-ratio</i>		9,6	9,14	7,98	8,25	12,12
<i>p</i>		$3,86 \times 10^{-3}$	$4,57 \times 10^{-3}$	$7,21 \times 10^{-3}$	$6,47 \times 10^{-3}$	$2,79 \times 10^{-3}$

**DISCUSSION**

Notre étude montre clairement le rôle majeur des variations thermiques et de l'espèce de solanacées ciblée (tomate, pomme de terre ou aubergine) sur la dynamique des populations d'adultes et de larves de *T. absoluta* et sur la dynamique d'infestations des plantes par ses stades larvaires.

En outre, il apparaît que l'importance, la direction et la temporalité des relations mises

en évidence varient selon les variables comparées (variations minimales ou maximales de températures, mois d'observation versus abondance des mâles piégés et des stades larvaires dénombrés sur plante-hôte). Les relations du phytophage avec son environnement biotique et abiotique sont de ce fait complexe.

### 1. Rôle de la plante hôte dans la dynamique des populations de *T. absoluta*

Dans les agrosystèmes, système de production protégé ou de plein champ, un phytophage est confronté à de multiples facteurs biotiques (plante-hôtes, ennemis naturels, etc) et abiotiques (conditions climatiques, nature des sols, etc) lesquels influencent la dynamique spatio-temporelle de ses populations.

Le suivi de la dynamique d'abondance des différentes formes biologiques (adultes, stades larvaires) de *T. absoluta* et des dégâts associés sur solanacées a mis en évidence la nette préférence de ce ravageur pour les cultures de tomate en comparaison avec les cultures de pomme de terre et d'aubergine.

Les captures d'adultes, les effectifs de larves et les taux d'infestations globales y sont maximales. Les captures et les pics de populations apparaissent tout d'abord dans la serre de tomate puis en champ de pomme de terre et serre d'aubergine suggérant une attractivité supérieure de *T. absoluta* pour la tomate.

Selon l'hypothèse de préférence-performance [23 ; 24 ; 25 et 26], les préférences alimentaires des femelles sont positivement corrélées à la fitness de l'espèce c'est-à-dire qu'elles favorisent le développement complet et la meilleure survie de la progéniture. Chez *T. absoluta*, des études ont démontré que le temps de développement des stades juvéniles, la longévité des adultes correspondants et la fécondité des femelles étaient supérieurs sur tomate par rapport à la pomme de terre [27 et 28].

Les travaux de Sylla *et al.* [6] ont également mis en évidence la préférence des femelles de *T. absoluta* pour la tomate en tant que support de ponte en comparaison avec cinq autres espèces de solanacées parmi lesquelles l'aubergine et la pomme de terre paraissent des plantes-hôtes secondairement choisies. La préférence de la tomate dans l'espace et le temps démontrée dans notre étude semble refléter un choix optimal.

Dans une zone maraîchère où d'autres cultures sont produites, la tomate peut ainsi servir de foyer d'infestation pour les autres plantes-hôtes même secondaires cultivées à proximité [29 et 30]. Sur la station d'étude, les sites sont distants d'environ 1km, distance que peuvent parcourir les adultes soit passivement à la faveur des vents soit activement. En effet, des

observations en plein champ sur la capacité de dispersion des adultes ont clairement indiqué qu'ils pouvaient voler à 250 mètres en 2 heures et à 400 mètres durant toute une nuit à partir du point de lâcher [31]. Ces solanacées secondaires peuvent aussi servir de plantes alternatives lorsque la culture préférée est trop infestée (ie. dispersion pour limiter la surexploitation des ressources et la compétition entre les phytophages) ou au contraire lorsque la saison de production de tomate est terminée permettant ainsi le maintien des populations de *T. absoluta* dans la zone [29 et 30].

### 2. Influence des variations thermiques sur la dynamique des populations de *T. absoluta*

Les effectifs de *T. absoluta* (adultes, stades larvaires) et les niveaux d'infestation fluctuent au cours de la période de production de la culture. Les pics populationnels apparaissent mi-Mai dans la culture de tomate, fin Mai dans le champ de pomme de terre et début Juin sur la culture d'aubergine. Les abondances et taux d'infestations sont globalement d'autant plus élevés que les températures sont élevées mais avec quelques nuances.

Il est important de constater que les vols des adultes sous serre de tomate et d'aubergine sont conditionnés par les variations thermiques minimales et que les vols sur culture de pomme de terre en plein champ le sont par les températures maximales. Même si les variations de températures jouent un rôle indéniable dans nos observations, la question d'un rôle des structures de cultures (serre protégée *versus* plein champ) se pose du fait notamment des conditions de température différentes qui y règnent à période équivalente. Les températures enregistrées sur chaque site révèlent des températures supérieures en plein champ par rapport à celles des serres donc la pression de température exercée sur les insectes sur tomate n'était pas identique à celle sur aubergine que sur pomme de terre.

Les températures minimales influent fortement le taux d'infestation global sur les trois cultures même si *T. absoluta* est encore capable de se développer à des températures faibles ; seuil de développement de 14°C [32] voire même de 8°C [33]. L'influence des températures sur la dynamique générale des populations de *T. absoluta* a déjà été citée dans des travaux antérieurs, quelle que soit les zone géographique et climatique étudiées.

Au Brésil, Krechemer et Foerster [34] ont montré que les températures minimales et moyennes affectaient significativement l'abondance de la mineuse de la tomate. En région méditerranéenne, Cocco *et al.* [35 et 36] et Balzan et Moonen [37] ont mis en évidence une relation positive entre niveau de population et température, avec une croissance parfois exponentielle et incontrôlée des populations pendant les mois les plus chauds. Même si la température est un facteur majeur dans la dynamique générale des populations de *T. absoluta*, il ne faut pas oublier qu'il n'est pas seul. La pluie et son régime est un facteur pouvant également limiter l'occurrence et les niveaux de population du ravageur [38 ; 39 et 40].

### CONCLUSIONS

La dynamique générale des populations de *T. absoluta* mise en évidence dans notre étude montre son intérêt en protection des cultures et prévention des risques. La tomate, culture maraîchère d'importance en Algérie, est la plante-hôte principale (infestation maximale et chronologiquement la première) de *T. absoluta* pouvant être un foyer d'infestation pour d'autres plantes-hôtes. Les cultures de pommes de terre et l'aubergine sont des hôtes secondaires pouvant jouer un rôle essentiel dans le maintien et la propagation du ravageur durant toute l'année. Une vigilance accrue au niveau des cultures de tomate est de ce fait indispensable pour maintenir les infestations des cultures de solanacées en dessous d'un seuil de nuisibilité économiquement acceptable dans toute la zone maraîchère.

Dans le cadre d'une stratégie de protection intégrée, connaître l'évolution temporelle et les pics d'activités des adultes de *T. absoluta* dans les cultures de tomates grâce aux piégeages, permet de mieux cibler les lâchers d'ennemis naturels contre l'apparition des premiers stades larvaires de *T. absoluta*

L'influence des variations de température sur la dynamique générale des populations de *T. absoluta* démontrée par notre étude et bien d'autres, pose la question de l'évolution de son impact dans le cadre du changement climatique à venir.

En Algérie, conformément à la situation mondiale, les températures minimales et maximales sont en hausse sur tout le territoire depuis le début des années 80 [41 et 42], Sous l'hypothèse d'un changement climatique menant à une température moyenne de +2°C, *T. absoluta* constituerait probablement un risque encore plus important pour les cultures.

### REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Mr. Jean-Marie Ramel, expert entomologiste au laboratoire de la santé des végétaux (ANSES), Montpellier (France), pour son aide précieuse dans l'identification fiable de certains spécimens de *Tuta absoluta* prélevés sur les plantes-hôtes ciblées.

### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Safiddine F., Nebih D., Merah O. & Djazouli Z.E. (2019). Impact de différents types de vermicompost sur la réduction du nombre de galles de *Meloidogyne* et l'expression végétative des plants de tomate." *Revue Agrobiologia*, 9(1) : 1415-1427
- [2]. MADR. (2018). Données sur le site Algérie presse service. <http://www.aps.dz/economie/75536-culture-maraichere-une-production-nationale-de-plus-de-130-millions-de-quintaux-en-2017>
- [3]. Silva S.S. (2008). Fatores da biologia reprodutiva que influenciam o manejo comportamental de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Dissertation, Universidade Federal Rural de Pernambuco
- [4]. Desneux N., Wajnberg, E., Wyckhuys K.A.G., Burgio G., Arpaia S., Narváez-Vasquez C.A., González-Cabrera J., Ruescas D.C., Tabone E., Frandon J., Pizzol J., Poncet C., Cabello T. & Urbaneja A. (2010). Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta* : ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *Journal of Pest Science*, 83 : 197–215
- [5]. Biondi A., Narciso C. Guedes R., Wan F. & Desneux N. (2017). Ecology, Worldwide Spread, and Management of the Invasive South American Tomato Pinworm, *Tuta absoluta* : Past, Present, and Future. *Annual Review of Entomology*. 63 : 239–258
- [6]. Sylla S., Brévault T., Monticelli L.S., Diarra K. & Desneux N. (2019). Geographic variation of host preference by the invasive tomato leaf miner *Tuta absoluta* : implications for host range expansion. *Journal of Pest Science*, 92 : 1387- 96.

- [7]. Vargas H.C. (1970). Observaciones sobre la biología y enemigos naturales de la polilla del tomate, *Gnorimoschema absoluta* (Meyrick) (Lep., Gelechiidae). *Idesia*, 1 : 75-110
- [8]. Urbaneja A., González-Cabrera J., Arnó J. & Gabarra R. (2012). Prospects for the biological control of *Tuta absoluta* in tomatoes of the Mediterranean basin. *Pest Management Science*, 68 : 1215–1222
- [9]. Guenaoui Y. (2008). Nouveau ravageur de la tomate en Algérie : Première observation de *Tuta absoluta*, mineuse de la tomate invasive, dans la région de Mostaganem, au printemps 2008. *Phytoma- Déf Végétaux*, 617 :18–19
- [10]. Boualem M., Allaoui H., Hamadi R. & Medjahed M. (2012). Biologie et complexe des ennemis naturels de *Tuta absoluta* a` Mostaganem (Algérie). *EPPO Bull*, 42 : 268–274
- [11]. Allache F., Houhou M.A., Osmane I., Naili L. & Demnati F. (2012). Suivi de l'évolution de la population de *Tuta absoluta* Meyrick (Gelechiidae), un nouveau ravageur de la tomate sous serre à Biskra (sud-est d'Algérie). *Entomologie Faunistique – Faunistic Entomology*, 65 : 149–155.
- [12]. Haddi K., Berger M., Bielza P., Cifuentes D., Field L.M., Gorman K., Rapisarda C., Williamson M.S. & Bass C. (2012). Identification of mutations associated with pyrethroid resistance in the voltage-gated sodium channel of the tomato leaf miner (*Tuta absoluta*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42 : 506–513
- [13]. Campos M.R., Rodrigues A.R.S., Silva W.M., Silva T.B.M., Silva V.R.F. Guedes, R.N.C. & Siqueira, H.A. A. (2014). Spinosad and the tomato borer *Tuta absoluta* : a bioinsecticide, an invasive pest threat, and high insecticide resistance. *Plos One*, 9 (8) : e103235
- [14]. Silva J.E., Assis C.O.P., Ribeiro L.M.S. & Siqueira H.A.A. (2016). Field-Evolved Resistance and Cross-Resistance of Brazilian *Tuta absoluta* (Lepidoptera : Gelechiidae) Populations to Diamide Insecticides. *Journal of Economic Entomology*, 6 : 1–4
- [15]. Infante F. (2000). Development and population growth rates of *Prorops nasuta* (Hym., Bethyridae) at constant temperatures. *Journal of Applied Entomology*, 124 : 343–348
- [16]. Hoffman A.A., Sørensen J.G. & Loeschcke V. (2003). Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches. *Journal of Thermal Biology*, 28 : 175–216.
- [17]. Singer M.S., Rodrigues D., Stireman J. O. & Carriere Y. (2004). Roles of food quality and enemy-free space in host use by a generalist insect herbivore. *Ecology*, 85 : 2747–2753
- [18]. Zheng F.S., Du Y.Z., Wang Z.J. & Xu J.J. (2008). Effect of temperature on the demography of *Galerucella birmanica* (Coleoptera : Chrysomelidae). *Insect Science*, 15 : 375–380.
- [19]. Krechemer F.S., Foerster L.A. (2017). Development, Reproduction, Survival, and Demographic Patterns of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera : Gelechiidae) on Different Commercial Tomato Cultivars. *Neotropical entomology* 46 :694–700
- [20]. Gomide E.V.A., Vilela, E.F. & Picanço M. (2001). Comparação de procedimentos de amostragem de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera : Gelechiidae) em tomateiro estaqueado. *Neotropical Entomology*, 30, 697–705.
- [21]. Hammer O., Harper D. A.T. & Ryan P.D. (2001). PAST : Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*. 4 : 9
- [22]. Djazouli Z.E., Doumandji-Mitiche B. & Petit D. (2009). Spatio-temporal variations of functional groups in a *Populus nigra* L. entomocenosis in the Mitidja plain (Algeria). *Comptes Rendus Biologies*, 332 : 848–860
- [23]. Thompson J.N. (1988). Evolutionary ecology of the relationship between oviposition preference and performance of offspring in phytophagous insects. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 47 :3–14
- [24]. Jaenike J. (1990). Host specialisation in phytophagous insects. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 21 :243–273
- [25]. Gripenberg S., Mayhew P J., Parnell M. & Roslin T. (2010). A meta-analysis of preference-performance relationships in phytophagous insects. *Ecology Letters*, 13 :383–393
- [26]. Gómez Jiménez M.I., Sarmiento C.E., Díaz M.F., Chauta., Peraza A., Ramirez A. & Poveda K. (2014). Oviposition, larval preference, and larval performance in two polyphagous species: does the larva know best? *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 153 :24–33
- [27]. Pereyra P.C. & Sánchez N.E. (2006). Effect of two solanaceous plants on developmental and population parameters of the tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotropical Entomology*, 35 : 671–676.

- [28]. **Abbes K., Harbi A., Elimem M., Hafsi A. & Chermiti B. (2016).** Bioassay of three solanaceous weeds as alternative hosts for the invasive tomato leafminer *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) and insights on their carryover potential. *African Entomology*, 24 :334–342
- [29]. **Barrientos Z.R., Apablaza H.J., Norero A.S. & Estay P.P. (1998).** Temperatura base y constante termica de desarrollo de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Ciencia e Investigacion Agraria*, 25 :133–137
- [30]. **Urbaneja A., Desneux N., Gabarra R., Arnó J., González-Cabrera J., Mafra Neto A., Stoltman L., Pinto A. De S. & Parra J.R.P. (2013).** Biology, ecology and management of the tomato borer, *Tuta absoluta*. In : Peña JE (ed) Potential invasive pests of agricultural crops, CABI series. PP : 98–125.
- [31]. **Salama E.R., Abd H.S., Ismail I.A.K., Fouda M., Ebadah I. & Shehata I. (2015).** Some Ecological and Behavioral Aspects of the Tomato Leaf Miner *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera : Gelechiidae). *Journal of Balkan Ecology*, 6(3), 110-115.
- [32]. **Martins J.C., Picanco M.C., Bacci L., Guedes R.N.C., Santana Jr P.A., Ferreira D.O. & Chediak M. (2016).** Life table determination of thermal requirements of the tomato borer *Tuta absoluta*. *Journal of Pest Science*, 89 :897–908
- [33]. **Krechemer F.S. & Foerster L.A. (2015).** *Tuta absoluta* (Lepidoptera : Gelechiidae) : thermal requirements and effect of temperature on development, survival, reproduction and longevity. *European Journal of Entomology*, 112 :658–663
- [34]. **Krechemer F.S. & Foerster L.A. (2019).** Influence of biotic and abiotic factors on the population fluctuation of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) in an organic tomato farming. *International Journal of Tropical Insect Science*, 1-10
- [35]. **Cocco A., Deliperi S. & Delrio G. (2013).** Control of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera:Gelechiidae) in greenhouse tomato crops usin themating disruption technique. *Journal of Applied Entomology*, 137 :16–28.





# **AGROBIOLOGIA**

---

**LE LABORATOIRE DE RECHERCHE EN  
BIOTECHNOLOGIE DES PRODUCTIONS VÉGÉTALES**

**UNIVERSITÉ BLIDA 1**

**B.P 270 Blida 09000, Algérie**

**Site Université: [www.univ-blida.dz](http://www.univ-blida.dz)**

**Site web: [www.univ-blida/biotech.html](http://www.univ-blida/biotech.html)**

**[www.agrobiologia.net](http://www.agrobiologia.net)**