

PROJET DE FIN D'ÉTUDES
PRESENTE EN VUE D'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER SCIENCES ET TECHNIQUES
GESTION ET CONSERVATION DE LA BIODIVERSITE

Evaluation de l'activité aphicide, nématocide, antifongique et
antibactérienne du NPP®
Application dans le traitement des agrumes en pré-récolte

Présenté par : **BENNANI Ghita**

Encadré par : **Pr. REMMAL Adnane**
Pr. AMRANI Khalid

Soutenu le : 11 Juin 2018

Devant le jury composé de :

- **Pr. REMMAL Adnane**
- **Pr. AMRANI Khalid**
- **Pr. EL GHADRAOUI Lahssen**
- **Pr. CHAMI Najat**
- **Pr. MIKOU Karima**
- **Pr. DERRAZ Khalid**

Année Universitaire : 2017/2018

Faculté des Sciences et Techniques Fès

 **B.P. 2202 – Route d'Imouzzer FES**

 **212 (0)5 35 60 80 14 Fax : 212 (0)5 35 60 82 14**

www.fst-usmba.ac.ma

Avant-propos

Ce mémoire a été réalisé dans le cadre d'un projet d'initiation à la recherche pour l'obtention du diplôme de Master en Gestion et conservation de la biodiversité (GCB) à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès. La période de six mois passée dans le laboratoire de Biotechnologie (unité de la valorisation des plantes au sein de la faculté des sciences à Dhar El Mahraz Fes) a constitué pour moi une étape très importante dans la mesure où elle m'a permis d'affronter des situations pratiques reliées à mon domaine d'études et de me confronter aux questions concrètes qui sont traitées dans les programmes de recherche en laboratoire.

Dédicaces

A ma chère mère

Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'ont pas cessé de m'encourager.

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

A la mémoire de mon père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout Puissant, t'accorder Sa Clémence, Sa Miséricorde et t'accueillir dans Son Saint Paradis.

A mon frère Anass

Je te remercie pour ton soutien continu. Je suis chanceuse de t'avoir à mes côtés.

A mes grands parents

Aucune dédicace ne saurait exprimer tout ce que je ressens pour vous. Je vous remercie pour tout le soutien exemplaire et l'amour exceptionnel que vous me portez depuis mon enfance.

A mes oncles et tantes

Je vous remercie pour vos encouragements et je vous souhaite bonheur, santé et prospérité

A mes cousins, mes cousines

Je vous dédie ce travail. Que Dieu vous donne longue vie et maintient l'union de notre grande famille.

A ma chère amie Aayah

Je te remercie pour ton amitié chère à mon cœur et je te souhaite tout le bonheur du monde. Toute mon affection pour ton admirable famille, que je remercie beaucoup.

Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance et mes très vifs remerciements à mon encadrant le Professeur **Adnane Remmal**, responsable du laboratoire de Biotechnologie des plantes aromatiques, qui m'a accordé de son temps précieux pour faciliter le bon déroulement de mon stage au sein du laboratoire de biotechnologie. Je le remercie d'avantage de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce travail.

J'adresse mes plus vifs remerciements au Pr. **Najat Chami** professeur à la faculté des sciences Dhar ELMehraz, pour ses conseils précieux durant la rédaction de ce travail. Qu'elle trouve l'expression de ma très vive gratitude. Je tiens à lui exprimer aussi mes remerciements, encore une fois pour avoir accepté de juger ce travail.

J'exprime mes grands remerciements à Monsieur **Khalid AMRANI**, Professeur à la FST de Fès. Je tiens à l'assurer de ma profonde reconnaissance pour l'intérêt qu'il porte à ce travail, pour le temps consacré à la lecture de ce rapport et pour ses suggestions et ses remarques judicieuses.

Je tiens à remercier Pr. **Lahssen EL GHADRAOUI**, Pr. **Khalid DERRAZ** et Pr. **Karima MIKOU** de m'avoir honoré en acceptant de juger mon présent travail. Veuillez trouver ici le témoignage de mon respect le plus profond.

Mes vifs remerciements vont aussi aux étudiantes doctorantes **Mounia Oukhouia**, **Assia Houiat** pour leurs aides et conseils avisés.

Je voudrais remercier tous les membres du laboratoire de biotechnologie des plantes aromatiques Fatema-zahra, Mohammed, Ikram, Hamza, Ikram, Zakaria, Maroua, Youness, Imad, Ouajiba et Imane qui ont contribué à faire régner une ambiance chaleureuse et amicale dans le laboratoire.

Résumé

La filière agrumicole au Maroc est un secteur stratégique contribuant à l'équilibre de la balance commerciale. Cette dernière subit des pertes accrues qui sont généralement dues aux attaques par les ravageurs notamment les pucerons des agrumes et des attaques fongiques telle la fumagine. Pour lutter contre ces maladies, les agriculteurs ont recours à la surutilisation des produits chimiques néfastes pour l'environnement et la santé. Les huiles essentielles et leurs composés majoritaires sont considérés comme des alternatives aux produits chimiques.

Dans la première partie de ce travail, nous avons évalué *in vitro* l'efficacité d'une composition brevetée (NPP®) sur les pucerons. Ensuite, la deuxième partie a été consacrée à évaluer *in vivo* l'activité de NPP® sur les pucerons, les nématodes du sol et la charge microbienne au niveau des feuilles (bactérienne et fongique). Enfin, la dernière partie de ce travail a été dédiée à l'étude *in vitro* de l'effet antifongique du NPP® sur deux espèces de champignons microscopiques *Alternaria* et *Capnodium* responsables de la fumagine.

Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence la présence de deux espèces aphidiennes ; *Toxoptera aurantii* et *Aphis spiraecola*. L'évaluation *in vitro* de l'action du NPP® sur les pucerons des agrumes a montré qu'il possède une efficacité multiple ; il a un effet larvicide à partir de la concentration de 1 g/l, un effet insecticide à la concentration de 2g/l et une action préventive et curative sur les arbres infestés par les pucerons. En plus de cette action, le NPP® a montré une bonne efficacité contre les nématodes du sol et la flore bactérienne et fongique associée à ces arbres. Les tests effectués *in vitro* en utilisant la composition innovante NPP® sur deux souches fongiques isolées à partir des morceaux d'orange attaqués par la fumagine (*Alternaria sp* et *Capnodium sp*) ont montré que NPP® a une importante activité antifongique.

Mots clés : Agrumes, pucerons, effet larvicide, effet insecticide, fumagine, *Alternaria sp*, *Capnodium sp*, activité antifongique, les nématodes.

Abstract

The citrus industry in Morocco is a strategic sector contributing to the balance of the trade balance. The latter suffers increased losses which are generally due to attacks by pests including citrus aphids and fungal attacks such as sooty mold. To combat these diseases, farmers resort to the overuse of chemicals that are harmful to the environment and health. Essential oils and their major compounds are considered as alternatives to chemicals.

In the first part of this work, we evaluated *in vitro* the efficacy of a patented composition (NPP®) on aphids. Then, the second part was devoted to evaluate *in vivo* the activity of NPP® on aphids, nematodes and microbial load (bacterial and fungal). Finally, the last part was devoted to studying *in vitro* the antifungal effect of NPP® on two species of microscopic fungi *Alternaria* and *Capnodium* responsible for sooty mold.

The results obtained made it possible to highlight the presence of two aphid species; *Toxoptera aurantii* and *Aphis spiraecola*. *In vitro*, evaluation of the action of NPP® on citrus aphids has shown that it has multiple efficacy; it has a larvicidal effect from a concentration of 1 g /l, an insecticidal effect at a concentration of 2g /l and a preventive and curative action on the trees infested by aphids. In addition to this action, NPP® has shown good efficacy against nematodes and the bacterial and fungal flora associated with these trees. *In vitro* tests using the innovative NPP® composition on two fungal strains isolated from sooty molded orange pieces (*Alternaria sp* and *Capnodium sp*) have shown that NPP® has antifungal activity.

Keys words: *Citrus*, aphids, larvicidal effect, insecticidal effect, sooty mold, *Alternaria sp*, *Capnodium sp*, antifungal activity, nematodes.

LISTE DES ABREVIATIONS

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CMF : Concentration minimale fongicide

CIP : Concentration inhibitrice partielle

FAO: Food and agriculture organisation

mm: millimètres

T: tonnes

MAPM: Ministère de l’agriculture et de la pêche maritime

Sommaire

Introduction générale.....	1
I. Introduction bibliographique	2
1. Importance socio-économique du secteur agrumicole.....	2
1.1. À l'échelle internationale.....	2
1.2. À l'échelle nationale	2
1.3. Etat phytosanitaire des agrumes au Maroc	3
1.3.1. Stress abiotiques	3
1.3.2. Stress biotiques	3
1.3.2.1.Maladies virales	3
1.3.2.2.Maladies bactériennes	5
1.3.2.3.Maladies cryptogamiques	5
1.3.2.4.Maladies causées par les insectes et les ravageurs	7
2. Pucerons	9
2.1. Généralités sur les pucerons	9
2.2. Morphologie	9
2.3. Caractéristiques Bioécologiques des pucerons.....	10
2.4. Pucerons des agrumes.....	12
2.5. Dégâts causés par les pucerons.....	14
2.5.1. Dégâts directs	14
2.5.2. Dégâts indirects	15
2.6. Stratégies de protection des plantes.....	15
2.6.1. La lutte chimique.....	15
2.6.2. La lutte biologique	15
2.6.3. Les huiles essentielles	16
3. Fumagine.....	17
3.1. <i>Alternaria sp</i>	17
3.1.1. Observation macroscopique	17
3.1.2. Observation microscopique	18
3.2. <i>Capnodium sp</i>	18
3.3. Les moyens de lutte contre la fumagine	19
II. Matériel et méthodes	20

1.	Evaluation <i>in vitro</i> de l'action de NPP® sur les pucerons des agrumes ...	20
1.1.	Matériel biologique.....	20
1.2.	Identification des pucerons d'agrumes	20
1.3.	Traitement des pucerons	20
1.3.1.	Traitement des larves par pulvérisation	20
1.3.2.	Traitement des adultes par pulvérisation.....	21
1.3.3.	Effet répulsif du NPP®.....	21
1.3.3.	Taux de mortalité	22
2.	Evaluation <i>in vivo</i> de l'activité de NPP® sur les pucerons, la charge microbienne au niveau des feuilles et les nématodes du sol.....	22
2.1.	Taux d'infestation par les pucerons.....	23
2.2.	Charge bactérienne	23
2.3.	Charge fongique	23
2.4.	Dénombrement des nématodes du sol	23
3.	Evaluation <i>in vitro</i> de l'action de NPP® sur les moisissures impliquées dans la fumagine des agrumes.	24
3.1.	Isolement des moisissures responsables de la fumagine	24
3.2.	Purification et identification préliminaire des isolats responsables de la fumagine	25
3.3.	Préparation de la suspension des spores.....	25
3.4.	Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI), des concentrations inhibitrices partielles (CIP) et des concentrations minimales fongiques (CMF).....	26
4.	Analyse statistique	27
III.	Résultats	28
1.	Evaluation <i>in vitro</i> de l'action du NPP® sur les pucerons des agrumes	28
1.1.	Identification des pucerons d'agrumes	28
1.2.	Traitement des pucerons	29
1.2.1.	Traitement des larves par pulvérisation	29
1.2.2.	Traitement des adultes par pulvérisation.....	29
1.2.3.	Effet répulsif du NPP®.....	30
2.	Evaluation <i>in vivo</i> de l'activité du NPP® sur les pucerons, la charge microbienne au niveau des feuilles et les nématodes du sol.	31

2.1. Taux d'infestation par les pucerons.....	31
2.2. Charge bactérienne	32
2.3. Charge fongique	32
2.4. Dénombrement des nématodes du sol	33
3. Evaluation <i>in vitro</i> de l'action de NPP® sur les moisissures impliquées dans la fumagine des agrumes.....	34
3.1. Isolement et purification des souches fongiques responsables de la fumagine	34
3.2. Identification préliminaire des isolats responsables de la fumagine	34
3.3. Détermination des CMI, des CIP et des CMF	36
Discussion	39
Conclusion générale	44
Perspectives	44
Références Bibliographiques.....	45
Annexe.....	56

Liste des figures

Figure 1	Symptômes de la tristeza. A: l'éclaircissement en pointillé des nervures foliaires; B: la réduction de la taille des fruits ; C: la présence de dépressions logées dans le bois.	4
Figure 2	Symptômes de la psorose	4
Figure 3	Symptômes de l'exocortis. A : des écailles et des fissures dans l'écorce du porte-greffe ; B : un <i>arbre</i> nain infesté par <i>Citrus exocortis</i>	5
Figure 4	Lésion de gommose suintante	6
Figure 5	Lésions sombres sur fruit causée par la septoriose	6
Figure 6	Lésions brunes entourées d'un halo jaune sur une feuille attaquée par <i>Alternaria citri</i>	7
Figure 7	Aspect de la fumagine sur les feuilles de bigaradier.	7
Figure 8	Morphologie d'un puceron aptère (A) et ailé (B)	10
Figure 9	Cycle biologique complet d'un puceron	12
Figure 10	Principaux pucerons des agrumes au Maroc. A : <i>Toxoptera aurantii</i> ; B : <i>Aphis fabae</i> ; C : <i>Myzus persicae</i> ; D : <i>Aphis gossypii</i> ; E : <i>Aphis spiraecola</i>	14
Figure 11	Enroulement des feuilles d'agrumes infestées par des pucerons	14
Figure 12	Représentation des différents stades de développement des spores et conidiophores d' <i>Alternaria alternata</i>	18
Figure 13	A- des hyphes septés ; B- Des conidies	18
Figure 14	Traitement des larves avec différentes doses de NPP®	21
Figure 15	Traitement des adultes avec différentes doses de NPP®	21
Figure 16	Dispositif expérimental de l'effet répulsif de NPP®	22
Figure 17	Différentes étapes d'extraction des nématodes	24
Figure 18	Morceaux d'orange déposés sur milieu Sabouraud gélosé	24
Figure 19	Isolats purifiés	25
Figure 20	Aptère <i>Toxoptera aurantii</i>	28
Figure 21	Aptère <i>Aphis spiraecola</i>	28
Figure 22	Evolution du taux de mortalité des larves en fonction de la concentration de NPP® et en fonction du temps	29
Figure 23	Evolution du taux de mortalité des adultes en fonction de la concentration de NPP® et en fonction du temps	30

Figure 24	Evolution de taux de mortalité des adultes	30
Figure 25	Evolution du taux d'infestation	31
Figure 26	Pucerons ailés	32
Figure 27	Evolution de la charge bactérienne au niveau des feuilles pendant les 4 semaines de traitement.	32
Figure 28	Evolution de la charge fongique au niveau des feuilles pendant les 4 semaines de traitement.	33
Figure 29	Evolution de nombre de nématodes dans le sol entourant des arbres durant les 4 semaines de traitement	33
Figure 30	<i>Capnodium sp</i> sur milieu Sabauroud face verso	35
Figure 31	<i>Capnodium sp</i> sur milieu Sabauroud face recto	35
Figure 32	Observation microscopique des conidies de <i>Capnodium sp</i> Gx400	35
Figure 33	A : <i>Alternaria sp</i> sur milieu Sabauroud face verso ; B : <i>Alternaria sp</i> sur milieu Sabauroud face recto ; C : Observation microscopique des macroconidies d' <i>Alternaria sp</i> Gx400	36
Figure 34	Test de l'activité antifongique de la plus faible concentration du NPP® (0,25g/l) sur la croissance mycélienne d' <i>Alternaria sp</i> et de <i>Capnodium sp</i>	38

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Evolution de la production, l'exportation, la consommation intérieure et la transformation des agrumes au Maroc au cours de 2012 à 2017 (Maroc Citrus, 2018)	3
Tableau 2	Principaux Arthropodes ravageurs des agrumes au Maroc	8
Tableau 3	Principales espèces de pucerons inféodés aux <i>Citrus</i> recensées dans le monde	13
Tableau 4	Critères morphologiques d'identification des pucerons des agrumes	28
Tableau 5	Différents isolats obtenus	34
Tableau 6	Identification préliminaire des isolats suspects	34
Tableau 7	CMI et CMF de NPP® sur <i>Alternaria</i> et <i>Capnodium</i> en milieu gélosé	36
Tableau 8	Pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne en fonction de différentes concentrations de NPP® vis-à-vis des isolats de <i>Capnodium</i> et <i>Alternaria</i> par la méthode de contact direct en milieu gélosé après 5 jours d'incubation à 27 °C.	37

Introduction générale

Le mot « agrume » tient son nom du latin « *acrumen* » qui désignait dans l'antiquité des arbres à fruits acides (Benediste et Baches, 2002) appartenant au genre *Citrus* qui comprend certaines des cultures fruitières les plus cultivées au monde (Wu et coll., 2018). Mis à part leur richesse en vitamine C, les agrumes sont réputés pour leur richesse en polyphénols permettant de neutraliser les radicaux libres du corps et de prévenir l'apparition des maladies cardiovasculaires, de certains cancers et d'autres maladies chroniques (Rasul, 2012).

La filière agrumicole joue un rôle central dans la croissance du produit Intérieur Brut (PIB) agricole marocain et la balance commerciale agricole (Hamadach, 2010). Cependant, les agrumes souffrent depuis quelques années d'un déclin considérable du taux de croissance prévu à la fois pour la production et l'exportation. Parmi les causes de ce déclin, des ravageurs extrêmement variés et nombreux tels que les pucerons dont deux genres se montrent particulièrement dangereux : le puceron noir de l'oranger ; *Toxoptera* (Boyer de Fonscolombe, 1841) et le puceron vert des agrumes ; *Aphis* (Patch, 1914).

Les pucerons provoquent d'énormes dégâts pour les agrumes dans toutes les zones agrumicoles au niveau mondial car ils sont responsables de la transmission du virus de la tristeza sur *Citrus* (CTV) et dont les symptômes se manifestent par l'enroulement des feuilles, l'avortement des fleurs et la sécrétion du miellat qui favorise le développement de la fumagine.

En cas de pullulation des pucerons, plusieurs traitements chimiques sont nécessaires. Toutefois, la prise de conscience de leurs effets sur l'écosystème, les espèces non cibles, la santé humaine et l'apparition d'individus résistants chez les insectes cibles ont donc renforcé progressivement l'intérêt pour des méthodes alternatives de protection des cultures comme les Biopesticides à base d'huiles essentielles.

Le but de la première partie de ce travail est d'évaluer *in vitro* l'efficacité d'une composition brevetée (NPP®) sur différents stades de développement des pucerons.

Dans la deuxième partie, nous avons évalué *in vivo* l'activité de NPP® sur les pucerons, la charge microbienne au niveau des feuilles et les nématodes du sol.

La troisième partie sera consacrée à étudier *in vitro* l'effet antifongique de NPP® sur deux espèces de champignons microscopiques *Alternaria* et *Capnodium* responsables de la fumagine.

I. Introduction bibliographique

1. Importance socio-économique du secteur agrumicole

1.1. À l'échelle internationale

Du point de vue économique, les *Citrus* sont en tête des productions fruitières dans le monde (Tadeo et coll., 2008) avec une production mondiale en 2010 qui se situe autour de 100 millions de tonnes, répartis comme suit : 66,4 millions de tonnes pour les oranges, 17 millions de tonnes pour les mandarines, 10,34 millions de tonnes pour les citrons et limes et 6,23 millions de tonnes pour les pomelos (FAO, 2004).

D'après l'ONAGRI (2018), les principaux pays producteurs en 2016/2017 sont la Chine (29,5 millions de tonnes), le Brésil (19,2 millions de tonnes), l'Union Européenne (10,7 millions de tonnes), le Mexique (6,7 millions de tonnes), les Etats-Unis d'Amérique (4,6 millions de tonnes) et l'Egypte (3 millions de tonnes).

1.2. À l'échelle nationale

La filière agrumicole au Maroc est un secteur stratégique contribuant à l'équilibre de la balance commerciale avec une superficie qui avoisine actuellement les 105.000 ha et une production estimée annuellement à 1.300.000 tonnes dominée par trois principales variétés (la Maroc-Late, la Clémentinier et la Navel) représentant au cours du dernier quinquennat près de 80% de la production nationale (MAPM, 2011).

Le Maroc est l'un des grands producteurs à l'échelle mondiale car il occupe le septième rang avec une production de 2,3 millions de tonnes (l'ONAGRI, 2018). Ce secteur a connu depuis les années soixante un développement soutenu vu que le Maroc forme avec l'Espagne, la Palestine et l'Italie les principaux pays exportateurs de la région méditerranéenne (Zaouiet, 2010).

D'après l'Association des producteurs d'agrumes du Maroc (ASPAM), les prévisions concernant la récolte d'agrumes en 2017/2018 laissent entrevoir une production de 2,4 millions de tonnes d'agrumes au lieu des 2,33 millions de tonnes produites lors de la campagne précédente, soit une hausse de 70.000 tonnes grâce à l'entrée en production des nouveaux vergers plantés ces dernières années. Une bonne partie de cette production est destinée à l'export aux pays de l'Union européenne (40%), à la Russie (30 à 35%) et en Amérique du nord (15 à 17%).

Tableau 1 : Evolution de la production, l'exportation, la consommation intérieure et la transformation des agrumes au Maroc au cours de 2012 à 2017 (Maroc Citrus, 2018)

Campagne	Production (T)	Exportation (T)	Consommation intérieure (T)	Transformation (T)
2012/2013	1 493 900	385 200	1 068 700	40 000
2013/2014	2 200 000	584 750	1 560 250	55 000
2014/2015	1 906 000	461 450	1 391 550	53 000
2015/2016	2 035 000	520 500	1 466 500	48 000
2016/2017	2 300 000	650 000	1 600 000	50 000
Moyenne	1 986 900	520 380	1 417 400	49 200

1.3. Etat phytosanitaire des agrumes au Maroc

1.3.1. Stress abiotiques

Les agrumes sont confrontés à une combinaison de stress abiotiques tels que les vents chauds et secs, le gel, les trop fortes quantités d'eau ou la sécheresse, la salinité et l'alcalinité des sols (Chegrani-Conan, 2009 ; Dambier et coll., 2011).

1.3.2. Stress biotiques

Le stress biotique est fondamentalement défini comme étant une influence hostile exercée par des champignons, des insectes, des bactéries et des adventices qui tendent à influencer la physiologie et la croissance des végétaux.

1.3.2.1. Maladies virales

Les maladies virales sont les affections les plus graves et les plus destructrices des *Citrus* dans le monde entier. Au Maroc, les plus dangereuses et les plus rencontrées sont :

- La tristeza des agrumes est une maladie causée par *Citrus Tristeza virus* (CTV) qui appartient à la famille des *Closteroviridae*. Cette maladie se propage par le biais des pucerons ou du matériel végétal infecté et se traduit, outre le rabougrissement de l'arbre, par l'éclaircissement en pointillés des nervures foliaires, la présence de dépressions logées dans le bois, la réduction de la taille des fruits et parfois la mort de l'arbre quand il est greffé sur un porte-greffe sensible comme le bigaradier (Virus M.A., 1961; Bar-Joseph, 1989).



Figure 1- Symptômes de la tristeza. A: l'éclaircissement en pointillé des nervures foliaires; B: la réduction de la taille des fruits ; C: la présence de dépressions logées dans le bois. (Roistacher, 2006)

-La psorose est une maladie virale causée par *Citrus psorosis virus* (CPsV), espèce typique du genre *Ophiovirus* (Milne et coll., 2000). Les symptômes les plus caractéristiques sont la formation d'écaillés sur le tronc avec une nécrose des couches superficielles de l'écorce (Figure 2A) et des éclaircissements sous forme de petits tirets entre les nervures secondaires des jeunes feuilles (Figure 2B) visibles en transparence lors des fortes poussées végétatives de printemps et d'automne (Panno et coll., 2014).



Figure 2- Symptômes de la psorose (Milne, 2003)

-L'exocortis est une maladie virale causée par le viroïde de *Citrus exocortis* (*Citrus Exocortis* viroid, CEVd) appartenant au genre *Pospiviroid* (famille *Pospiviroidae*) (Semancik et Weathers, 1972). Les symptômes de la maladie sont caractérisés par une décoloration verte pâle des feuilles et la formation des écaillés et des fissures dans l'écorce du porte-greffe si celui-ci est sensible accompagnées de nanisme et d'une réduction remarquable de taille des fruits (Vogel et coll., 1974).



Figure 3- Symptômes de l'exocortis. A : des écailles et des fissures dans l'écorce du porte-greffe ; B : un arbre nain infesté par *Citrus exocortis* (Hardy et coll., 2008)

1.3.2.2. Maladies bactériennes

-Le chancre bactérien ou chancre citrique, causé par *Xanthomonas campestris* pv. *Citri*, se traduit par des petites taches aqueuses (Verniere et coll., 1992) qui brunissent ensuite pour se bomber et se transformer en lésions cratériformes entourées le plus souvent par un halo chlorotique. Les lésions sur rameaux et fruits ressemblent à celles observées sur feuilles. Elles restent localisées au niveau de l'épicarpe pour les fruits. (Villemot, 1994).

-La bactériose des agrumes, causé par *Pseudomonas syringae*, se traduit par des taches brunes aqueuses partant de l'aisselle du pétiole qui se dessèche. La feuille fane, s'enroule sur elle-même mais reste solidement attachée avant de se dessécher et noircir au niveau de la partie supérieure du rameau (Jacquemond et coll., 2013).

-Le stubborn est causé par *Spiroplasma citri* dont les arbres infectés sont plus ou moins rabougris en raison d'un raccourcissement des entre-nœuds et des feuilles plus courtes et plus larges présentant des marbrures et des chloroses. La plupart des fruits tombent alors qu'ils sont très petits et les quelques fruits qui pourraient atteindre la maturité sont difformes et anormalement mûris (Cacciola et coll., 2017).

1.3.2.3. Maladies cryptogamiques

Les maladies fongiques ou cryptogamiques sont des maladies causées par des champignons ou autres organismes filamenteux parasites.

-La gommose est une maladie cryptogamique due principalement à deux espèces de *Phytophthora* ; *P.citrophthora* et *P. parasitica*. Le symptôme le plus précis de l'affection, celui qui lui a valu son nom, est l'écoulement de gomme brune le long du tronc et la coloration brune du bois, de même que la mort de l'écorce (Resistants, 1974). Elle provoque un

jaunissement rapide des feuilles, un dessèchement des rameaux et une fructification anarchique.



Figure 4-Lésion de gommose suintante (Resistants, 1974)

-L'anthracnose ou le flétrissement des rameaux est une maladie cryptogamique causée par *Glomerella cingulata*. Cette maladie se manifeste par l'apparition sur les rameaux desséchés et sur les feuilles des organes reproducteurs du champignon sous forme de petites taches foncées, en relief et visibles à l'œil nu (Chapot et coll., 1964).

-La septoriose dont l'agent causal est *Septoria citri* produit des dépressions très fines colorées en brun orangé ou brun rosâtre (Biasi et coll., 2012).

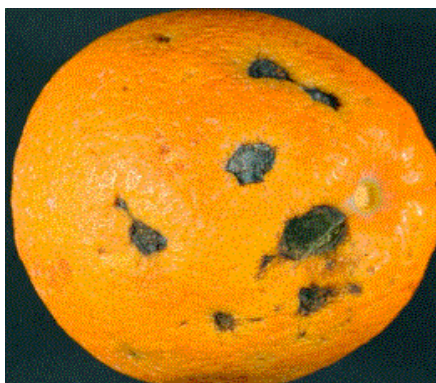


Figure 5- Lésions sombres sur fruit causée par la septoriose (Khanchouch et coll., 2017)

-L'infection florale à *Botrytis* provoque l'apparition sur les fleurs d'une moisissure grise qui détériore les étamines et les pétales, collant notamment ces derniers aux parois de l'ovaire avec pour conséquence la formation des protubérances faisant saillie sur le fruit (Fullerton et coll., 1999).

-L'alternariose est une maladie cryptogamique causée par *Alternaria citri* qui infecte le fruit et cause une décoloration noire interne et une macération du noyau du fruit. La contamination sur feuilles provoque de petites taches foncées entourées d'un halo plus clair (Jacquemond et coll., 2013).



Figure 6- Lésions brunes entourées d'un halo jaune sur une feuille attaquée par *Alternaria citri* (Ohtani et coll., 2009)

-La fumagine est produite par de nombreux champignons différents, notamment *Capnodium citri*. Elle forme des membranes veloutées noirâtres recouvrant en tout ou en partie les organes sur lesquels se développent les champignons.



Figure 7-Aspect de la fumagine sur les feuilles de bigaradier.

1.3.2.4. Maladies causées par les insectes et les ravageurs

Les plantes sont attaquées et endommagées par des insectes qui en consomment différentes parties (feuilles, racines, fleurs, fruits...) de façon plus ou moins sélective selon les espèces.

Tableau 2- Principaux Arthropodes ravageurs des agrumes au Maroc

Maladie	Agent causal	Symptômes
Cératite	<i>Ceratitis capitata</i>	une zone de décoloration qui hâte la maturité et provoque la chute prématurée du fruit (Dias et coll., 2017).
Pou rouge de Californie	<i>Aonidiella aurantii</i>	L'action toxique de la salive entraine le dessèchement des branches, la chute des feuilles et des fruits et la mort de l'arbre (Aubert, 1975).
Thrips californien	<i>Scirtothrips citri</i>	L'épiderme prend d'abord une teinte blanc nacré puis brunisse peu à peu (Bournier, 1970). Au niveau des fleurs, les thrips causent la déformation et l'avortement (Lambert, 1995).
Acarien	<i>Tetranychus urticae</i> (Koch) <i>Panonychus citri</i> (McGregor) <i>Eutetranychus orientalis</i>	Décoloration et jaunissement des feuilles causant un aspect moucheté et la chute des feuilles (Johnson et Lyon, 1991) ainsi la cumulation des fèces et de toiles sur les plantes (Attia et coll., 2010).
Mineuse des agrumes	<i>Phyllocnistis citrella</i>	Des mines sont de couleur blanchâtre puis deviennent sombre à cause des excréments des chenilles (Beattie et coll., 1995) La réduction de la croissance, des problèmes de développement sur des jeunes arbres (Grafton-Cardwell et coll., 2009) et la réduction de production des arbres matures (Jones, 2001).
Pucerons noir de l'oranger	<i>Toxoptera aurantii</i>	L'action de leur alimentation se manifeste par une déformation, un gaufrage des jeunes feuilles, qui s'enroulent sur elles-mêmes. Les fleurs attaquées avortent et tombent. (Praloran, 1971).
Puceron vert ;	<i>Aphis spireacola</i> van Der Goot	
Teigne du citronnier	<i>Prays citri</i>	Perforations des fleurs, des boutons floraux ou des très jeunes fruits. Sur citron, la chenille pénètre l'épiderme et creuse une galerie qui exsude de la gomme au niveau du trou de pénétration. (Cabi, 2001; Cabi, 2007).
Nématodes (slow decline)	<i>Tylenchulus semipenetrans</i>	Lorsque l'infestation est forte, les racines sont plus épaisses et plus courtes que les racines saines. Sur la partie aérienne, l'attaque traduit par un aspect chétif, les fruits restent petits et leur nombre est réduit et les reprises de végétation printanière sont moins rapides (Henri Chapot et coll., 1964).

2. Pucerons

2.1. Généralités sur les pucerons

Les pucerons sont des insectes piqueurs-suceurs appartenant à l'ordre des Hémiptères, sous-ordre des Homoptères. Ils constituent la super famille des *Aphidoidea* qui est divisée en trois familles : les *Phylloxeridae*, les *Adelgidae* et les *Aphididae* qui représentent de loin la famille la plus importante (Sullivan, 2008 ; Ortiz-Rivas, 2010 ; Martinez-Torres, 2010). Les pucerons au sens strict appartiennent à la famille des *Aphididae* qui compte environ 4700 espèces au niveau mondial (Remaudière et Remaudière, 1997; Blackman et Eastop, 2006). La grande diversité des pucerons est expliquée par une radiation évolutive parallèle à celle des Angiospermes et Gymnospermes au Crétacé (Peccoud et coll., 2010).

Répandus à très grande échelle, les pucerons sont retrouvés dans les régions tempérées, les climats tropicaux et dans les zones subarctiques (Strathdee et coll., 1993 ; Bale et coll., 1994).

2.2. Morphologie

Les pucerons sont des insectes dont la longueur du corps, comprise entre 2 et 5 mm, est partagée en trois régions bien différenciées : la tête, le thorax et l'abdomen.

La tête est généralement bien séparée du thorax chez les formes ailées, alors que chez les aptères elle est plus dans la continuité du corps. Elle contient le cerveau et porte les principaux organes sensoriels : une paire d'antennes de 3 à 6 articles de longueur variable (Fraval, 2006) insérées sur le front ou sur des protubérances appelées tubercules frontaux leur permettant d'explorer leur environnement de manière tactile et olfactive (Barta et Cagan, 2006), une paire d'yeux composés rouge brunâtre et des pièces buccales de type piqueur-suceur, constituant le rostre qui porte les stylets, leur permet de se nourrir du phloème de la plante hôte. Au niveau du canal commun, à l'extrémité distale du stylet maxillaire supérieur, se trouve une structure nommée acrostyle impliquée dans la transmission des virus (Uzest et coll., 2010).

Chez les ailés, le thorax est plus développé et plus sclérifié, surtout le mésothorax qui contient les muscles des ailes. Par contre, chez les aptères, ces segments sont de taille progressivement croissante. Le thorax, divisé en 3 segments (le mésothorax, le métathorax et le prothorax). Il porte les organes de locomotion : 3 paires de pattes composés de coxa, fémur, tibia, tarse et des griffes doubles au bout de tarses bi-articulés (Blackman et Eastop, 2000) et

une paire d'ailes à nervation qui peut être soit non ramifiée, ramifiée une seule fois ou ramifiée deux fois (Godin et Bovin, 2002).

L'abdomen, constitué de 10 segments, porte les organes de reproduction et d'excrétion. A l'extrémité postérieure, en prolongement du dernier segment, émerge une paire de cornicules sur la face dorsale qui permet d'excréter des défenses et des phéromones d'alerte. La face dorsale de l'abdomen peut également porter des soies de différents types, des plaques pigmentaires et des opercules, une cauda, juste en dessous duquel se trouve la plaque anale, l'anus d'où le miellat est excrété et enfin la plaque génitale. L'abdomen contient le système digestif et bien sur les organes reproducteurs internes (Miyazaki, 1987).

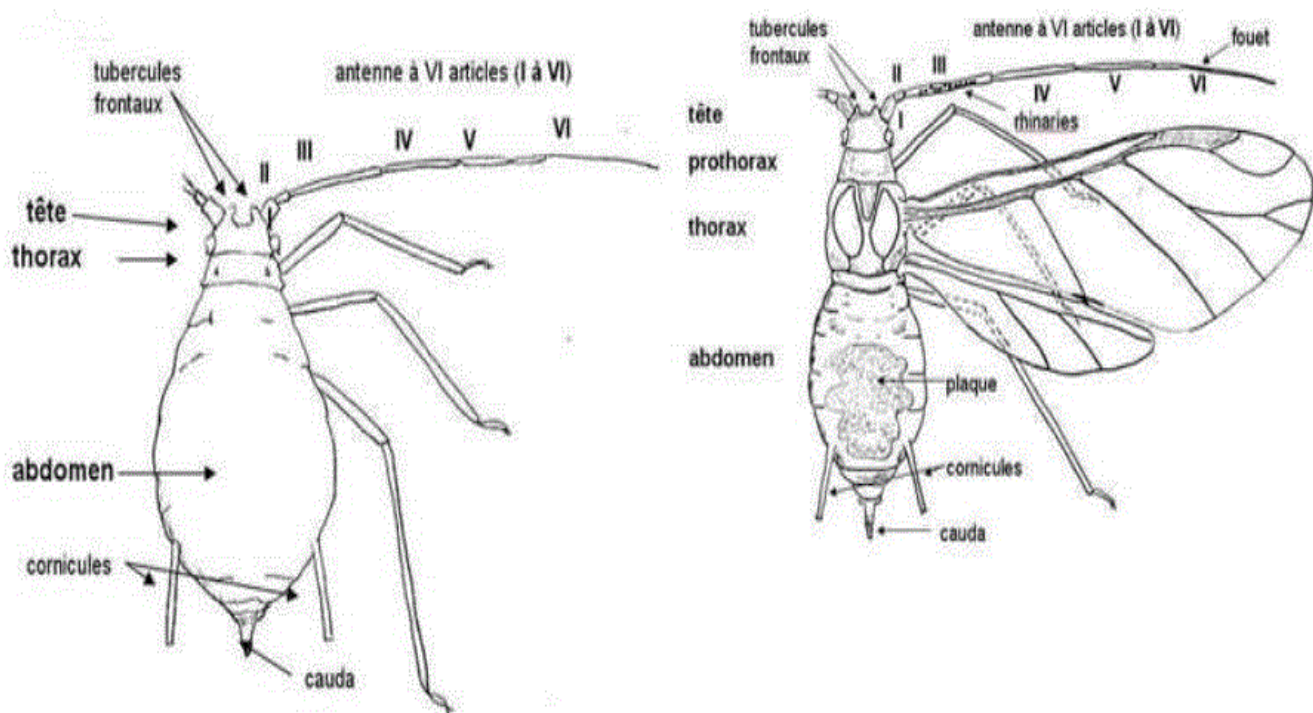


Figure 8-Morphologie d'un puceron aptère (A) et ailé (B) (Turpeau et coll., 2015)

2.3. Caractéristiques Bioécologiques des pucerons

Les pucerons sont hémimétaboles. Les œufs gris foncé ou noir, mesurant environ 0,5 à 1 mm de long, sont pondus en groupe ou isolément selon les espèces (Sutherland, 2006). La femelle parthénogénétique qui en est issue est appelée fondatrice. Le développement post-embryonnaire comporte quatre stades larvaires (Horsfall, 1924) séparés par des phases de mue. Les larves sont paurométaboles (mis à part l'absence d'ailes développées pour les futurs ailés), ont le même mode de vie, se nourrissent de la même manière et font les mêmes types de dégâts que les adultes.

Les pucerons ont un cycle de développement holocyclique qui se déroule entre le printemps et la fin de l'été, caractérisé par une alternance entre une génération amphisexuelle et des générations parthénogénétiques (Dixon, 1987) permettant aux pucerons de se multiplier très rapidement (Ahuja et coll., 2010).

Au cours de la phase parthénogénétique, les femelles sont exclusivement vivipares et en automne elles produisent des mâles et des femelles fécondables ovipares. Les œufs issus de la production sexuée sont résistants aux basses températures hivernales et éclosent le printemps suivant. Généralement, l'éclosion de l'œuf coïncide avec le débourrement des bourgeons.

Les pucerons sont plurivoltins et peuvent avoir, selon les conditions climatiques, jusqu'à 20 générations par an. La première génération fondatrigena n'est composée que par des adultes aptères suivies d'une succession des générations qui présentent des morphes adultes pouvant être ailés ou aptères (Miyazacki, 1987). Une humidité relative de l'air inférieure à 75% combinée avec une température entre 20°C et 30°C et une vitesse inférieure à 5 ou 6 km à l'heure constituent les conditions favorables pour le vol du puceron (Bonnemaison, 1950).

Les pucerons se divisent en deux groupes en fonction de leur cycle de vie: les espèces monœciques qui atteignent les mêmes espèces de plantes vivaces ou herbacées tout au long de l'année. Environ 10 % des espèces sont dites diœciques ou hétéroœciques c'est-à-dire qu'ils changent d'hôte et migrent d'un hôte primaire (souvent des plantes ligneuses en hiver) vers une ou plusieurs espèces secondaires (telles des plantes herbacées durant l'été) (Simon, 2007).

Selon les conditions environnementales, la longévité des adultes varie de 7 jours à trois mois et leur période reproductive dure environ 15 jours pour une descendance d'une trentaine à une soixantaine d'individus par femelle (Benoit, 2006). La température de développement de ces insectes est comprise entre 4°C et 22°C mais leur développement ralentit à nouveau au-delà de leur optimum thermique 22°C. Concernant la fécondité des pucerons, une femelle de puceron a besoin en moyenne de 120°C (soit dix jours à 12°C par exemple ou bien six jours à 20°C) (Hulle et coll., 1999 ; Rousselin, 2017).

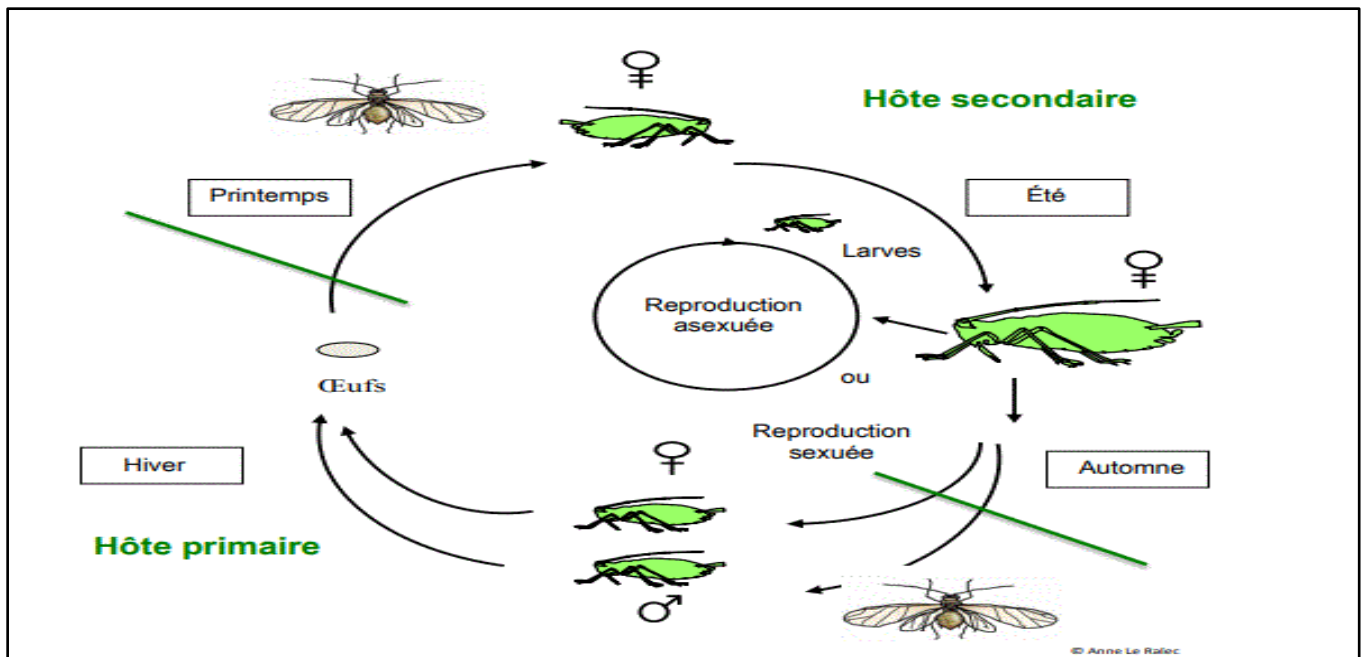


Figure 9-Cycle biologique complet d'un puceron (Navasse Y., 2016).

2.4. Pucerons des agrumes

Les agrumes dans le monde sont infestés par environ une vingtaine d'espèces de pucerons (Barbagallo et Patti, 1986).

Tableau 3 : Principales espèces de pucerons inféodés aux *Citrus* recensées dans le monde
(Barbagallo et Patti, 1986)

Aphides	Cycle de vie	Gamme de plantes hôtes	Zoogéographie
a)principales espèces : <i>Aphis citricola</i> VDB	Anholo et holocyclique	Polyphage (surtout les rosacées et les composées)	Cosmopolite
<i>Aphis gossypii</i> Glov	Anholo et holocyclique	Très polyphage	Cosmopolite
<i>Toxoptera aurantii</i> BDF	Anholocyclique	Polyphage	Cosmopolite
<i>Toxoptera citricidus</i> Kirk	Anholocyclique	Surtout sur rutacées	Hémisphère Sud et l'extrême Orient
b) Espèces minimales <i>Myzus persicae</i> Sulz	Anholo et holocyclique	Très polyphage	Cosmopolite
<i>Macrosiphum euphorbiae</i> Thom.	Anholocyclique	Très polyphage	Cosmopolite
<i>Aulocorthum solani</i> Kalt.	Anholocyclique	Polyphage	Sud-Est d'Asie et Australie
<i>Aulocorthum solani</i> Koch	Anholocyclique	Très polyphage	Sud-Est d'Asie et Australie
<i>Aphis craccivora</i> Koch	Anholocyclique	Polyphage (surtout légumineuse)	Cosmopolite
<i>Aphis fabae</i> Scop	Anholo et holocyclique	Polyphage (surtout légumineuse)	cosmopolite
<i>Toxoptera odinae</i> VDG	Holocyclique	Polyphage	Sud-Est d'Asie et Afrique
c) Espèces occasionnelles <i>Rhopalosiphum maidis</i> Fitch	Anholocyclique	Surtout graminées	Cosmopolite
<i>Hyadaphis coriandri</i> DAS	Anholocyclique	Surtout les ombellifères	Pays d'Afrique médit et Asie
<i>Aphis nertii</i> BDF	Anholocyclique	Surtout asclepiatacées et apocynacées	Asie
<i>Brachycaudus helichrysi</i> Kalt.	Anholo et holocyclique	polyphage	Cosmopolite
<i>Brachycaudus cardui</i> L.	Anholocyclique	Surtout les composés	Cosmopolite
<i>Pterochloroides persicae</i> Chol	Anholocyclique	Rosacées et prunoïdes	Holarctique nolar. Est eurasiatique

Les espèces de pucerons les plus répandues sur les agrumes au Maroc sont *Aphis spiraecola*, *Toxoptera aurantii*, *Aphis gossypii*, *Aphis fabae* et *Myzus persicae* dont seulement

les trois premières espèces sont considérées comme les plus importantes (Sekkat, 2008 ; Smaili et coll., 2008 ; Mazih, 2015).

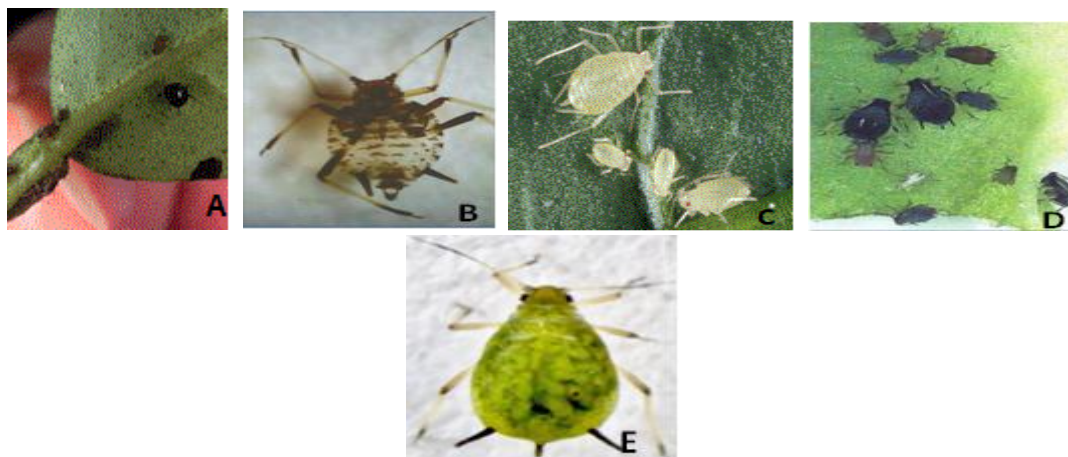


Figure 10- Principaux pucerons des agrumes au Maroc. A : *Toxoptera aurantii* (Halbert, 1996) B : *Aphis fabae*; C : *Myzus persicae* (Sulzer); D : *Aphis gossypii* (Hulle et coll., 1999) ; E : *Aphis spiraecola* (Marco, 2015)

2.5. Dégâts causés par les pucerons

2.5.1. Dégâts directs

Les pucerons occasionnent des dégâts directs tels que l'affaiblissement de la plante par la spoliation de sève élaborée, les dépigmentations, l'enroulement des feuilles, les crispations, l'induction de galles ou de chancres, l'avortement et le dessèchement des fleurs. Les fruits sont de taille plus petite et de forme bosselée. (Douglas, 2003 ; Lopes, 2007). Ces dégâts se traduisent par une réduction de la croissance de la plante et donc une perte de rendement (Diallo, 2017).



Figure 11- Enroulement des feuilles d'agrumes infestées par des pucerons

2.5.2. Dégâts indirects

Les dégâts indirects des pucerons sont essentiellement de deux ordres :

- ✓ Le miellat est un excrément liquide des pucerons riche en sucres et en acides aminés (Leroy et coll., 2009). Cette substance peut contrarier l'activité photosynthétique de la plante soit directement en occultant les stomates des feuilles soit en favorisant le développement des champignons saprophytes responsables de la fumagine (Lopes, 2007). Le miellat est à l'origine de la relation mutualiste entre les pucerons et les fourmis ; les premiers cherchant la protection et l'hygiène et les seconds, une source de sucres nécessaires à la survie de la colonie (Verheggen et coll., 2009 ; Fischer, 2016).
- ✓ Les virus contamineraient les pièces buccales des pucerons et seraient ainsi ultérieurement inoculés à de nouveaux hôtes sains (Blanc et coll., 2014). *Toxoptera citricida*, *Toxoptera aurantii*, *Aphis gossypii*, *Aphis spiraeicola* et *Myzus persicae* sont capables de transmettre différentes souches de virus de la tristeza des agrumes (CTV) (Turpeau et coll., 2012 ; Ghosh et coll., 2015).

2.6. Stratégies de protection des plantes

2.6.1. La lutte chimique

La lutte chimique s'appuie sur l'utilisation d'insecticides chimiques comme les organophosphorés, les carbamates mais aussi les pyréthrinoïdes (Roy et coll., 2013). L'utilisation intensive de produits chimiques provoque aussi bien un déséquilibre de l'écosystème parce qu'ils sont nocifs pour le reste de l'entomofaune qu'une résistance des pucerons à une grande variété d'insecticides, y compris le DDT, le parathion-méthyle et les pyréthroïdes (Nibouche et coll., 2002 ; Maugard et Baubet, 2004).

2.6.2. La lutte biologique

La lutte biologique contre les pucerons s'appuie sur l'utilisation d'insectes aphidiphages, tels que :

- ✓ Les coccinelles, les chrysopes et les syrphides (Leroy et coll., 2008). Les plus importantes espèces prédatrices des pucerons de la région du Gharb au Maroc sont les coccinelles et plus précisément *Adalia decempunctata*, *coccinella septempunctata*, la cécidomyie (*Aphidoletes aphidimyza*), le syrphe (*Episerphus balteatus*) et les chrysopes (*Chrysoperla carena*) (Smaili et coll., 2008).
- ✓ Les parasitoïdes aphidiphages sont des endoparasitoïdes koïnobiontes qui appartiennent généralement à la sous-famille des *Aphidiinae* (Hymenoptera:

Braconidae) et au genre *Aphelinus Dalman* (Hymenoptera: *Aphelinidae*) (Boivin et coll., 2012). Au Maroc, Sekkat (2007) a identifié deux espèces d'aphidiides parasitoïdes sur les pucerons d'agrumes, *Aphidius ervi Haliday* et *Lysiphlebus fabarum* (Marshall).

Les champignons qui appartiennent principalement aux divisions *Zygomycota* et *Ascomycota* peuvent également réguler les populations de pucerons mais seulement lorsque les facteurs climatiques nécessaires à la sporulation et à l'infection sont favorables (Powell et Pell, 2007).

2.6.3. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE) sont des mélanges des composés volatils naturels et complexes caractérisés par une forte odeur. Elles ont pour origine des plantes aromatiques et elles sont habituellement obtenues par évaporation ou distillation (Bekkali et coll., 2008). Les huiles sont aussi représentées par des métabolites secondaires produits par les végétaux supérieurs pour leur défense (Rauha et coll., 2000).

L'activité aphicide de l'huile essentielle d'*Ocimum canum* et de son composé majoritaire le terpinéol-4 évalués sur les adultes d'*Aphis gossypii* s'est avérée remarquable (Akantetou et coll., 2011). Des études effectuées par Bokobana et ses collaborateurs (2014) ont montré que la pipéritone, un des composés majoritaires de l'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus*, possède un potentiel très répulsif avec un pourcentage de répulsion de 84,6% vis-à-vis des pucerons *Aphis gossypii*.

Enfin, des hydrolats extraits de *Mentha suaveolens Ehrh.* et *Mentha pulegium L.* dont la composition chimique a révélé l'abondance de composés hydrophiles et oxygénés sous forme d'oxyde de pipériténone et de carvacrol ont un effet insecticide élevé sur *Toxoptera aurantii* (Zekri et coll., 2016).

3. Fumagine

La fumagine est une maladie colportée par différents genres de champignons incluant *Cladosporium Aureobasidium*, *Fumago*, *Antennariella*, *Limacinula*, *Alternaria* et *Capodium* qui se développent sur les substances sucrées du miellat sécrété par les insectes suceurs de sèves (Chomnunti et coll., 2014). Les spores des champignons sont généralement dispersées par le vent, la pluie ou les insectes (Nelson, 2008). En utilisant le miellat comme une source de nourriture, les champignons commencent à croître et au fur et à mesure que les colonies se développent, elles couvrent la surface des feuilles, les alentours des tiges, les branches et les fruits fusionnant souvent avec des colonies de la même ou d'autre espèce et elles forment une mince croûte noire similaire à de la suie. La fumagine est commune dans les régions chaudes à tropicales et la diversité des espèces est généralement plus élevée dans les climats plus chauds (Dhami et coll., 2013).

La fumagine a une large distribution et se produit sur les plantes sauvages et cultivées, y compris les plantes de serre. Même si la fumagine n'est qu'un dépôt superficiel, qui ne pénètre pas dans les tissus de la plante et qui ne cause pas de dégâts directs, elle provoque la réduction de la photosynthèse, du taux de croissance et donc le rendement.

Les deux genres de champignons les plus impliqués sont : *Alternaria* et *Capnodium*.

3.1. *Alternaria* sp

Alternaria est un champignon classé parmi les Deutéromycètes. Il comprend près de 275 espèces (Simmons, 2007) avec des modes de vie saprophytes et phytopathogènes qui peuvent affecter les cultures sur champ ou les produits végétaux pendant la récolte et en post-récolte (Logrieco et coll., 2009).

3.1.1. Observation macroscopique

La couleur des colonies varie du clair au foncé à une teinte olivâtre verdâtre à brune ou grisâtre, avec un aspect duveteux ou cotonneux, de légères variations de la croissance mycélienne avec des bordures régulière ou irrégulière, avec ou sans zones concentriques et une couleur grise à brune avec des variantes clairement visible à partir de la face inférieure des colonies (Pusz et coll., 2009 ; Rai et kumari et coll., 2009 ; Bessadat et coll., 2014).

3.1.2. Observation microscopique

Les conidies d'*Alternaria* sont septées avec cloisons transversales et longitudinales, les cellules sont multi nucléées de couleur foncée généralement piriformes ou ovotides de tailles variables selon les espèces (Pryor et Michailides, 2002). Les conidiophores sont bruns, septés et ont souvent l'aspect de « zigzags ». Ils portent des conidies simples ou ramifiées (Kwon-Chung, 1992).

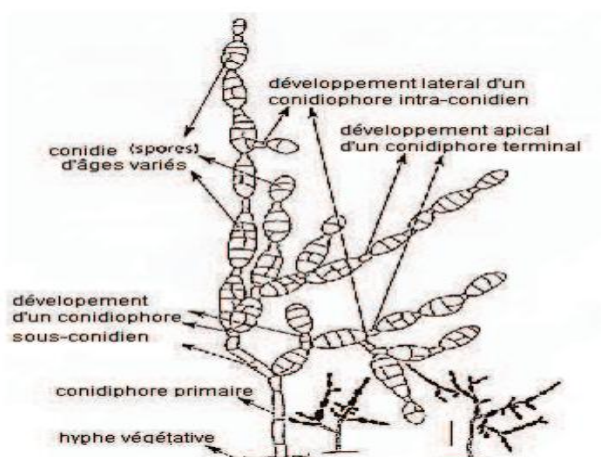


Figure 12- Représentation des différents stades de développement des spores et conidiophores d'*Alternaria alternata* (Simmons, 1999 ; Taralova et coll., 2011)

3.2. *Capnodium* sp

Capnodium a été introduit par Montagne (1849) à partir de *Fumago citri* Pers., il peut être reconnu par la croissance des mycéliums noirs sur la surface de l'hôte qui produit des colonies superficielles avec des hyphes ramifiés, septés et hyalines et brun foncé. Les conidies rondes et brunes avec des cloisons longitudinales et transversales étaient de longueur variable allant de 10 à 30 μm , communément trouvées en grappes composées de deux ou trois cellules et formant des microscélérotés (Kim, 2016).

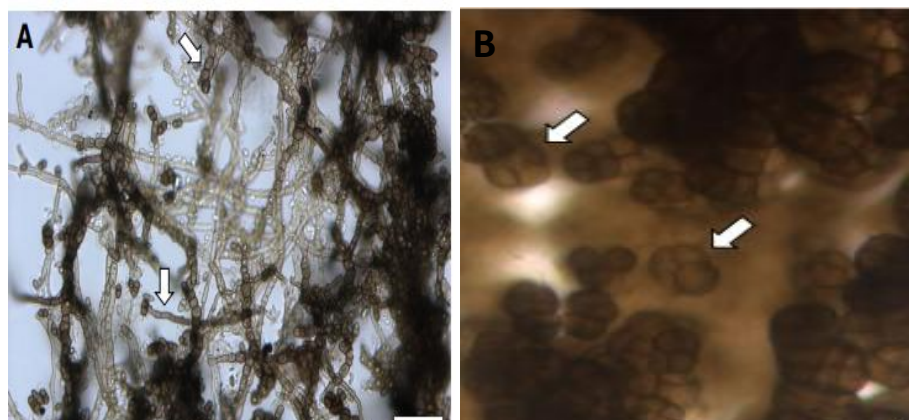


Figure 13- A- des hyphes septés ; B- Des conidies (Kim, 2016)

3.3. Les moyens de lutte contre la fumagine

La première étape dans le contrôle de la fumagine nécessite de rincer les surfaces collantes sur les feuilles avec un jet d'eau pour laver le miellat avant que les champignons ne poussent. Srivastava et Thakre (1996) ont montré que la gestion des moisissures en utilisant des fongicides est efficace et peut contrôler leur croissance et leur développement. Dalvi et ses collaborateurs (2002) ont montré qu'une solution de blanchiment avec 0,05-0,1% de NaOCl est efficace pour les enlever des peaux de fruits post-récolte.

L'huile essentielle de clou de girofle et l'huile essentielle de *Cymbopogon martinii* diluées à 0,1% ont permis de limiter le développement de fumagine à la surface des fruits et également de limiter l'intensité de couleur de fumagine sans aucune phytotoxicité observée à cette concentration (Ondet, 2008).

II. Matériel et méthodes

Description du produit traitant « NPP® »

Le NPP® est un produit innovant à base de substances naturelles développé et breveté par notre laboratoire en tant que biopesticide. Notre objectif pour le présent travail a été d'évaluer son efficacité sur les pucerons ainsi que son action fongicide sur les moisissures impliquées dans la fumagine des agrumes.

1. Evaluation *in vitro* de l'action de NPP® sur les pucerons des agrumes

1.1. Matériel biologique

Les essais ont été conduits dans le jardin de la faculté des Sciences Dhar El Mehraz Fès sur une période qui s'est étalée entre février et mai 2018. Il s'agit de divers arbres d'agrumes sans aucune protection phytosanitaire sur lesquelles des prélèvements de feuilles apparemment infestées ont été effectués. Les feuilles prélevées sont ensuite mises dans des sacs en plastique étiquetés et examinées au laboratoire sous la loupe binoculaire.

1.2. Identification des pucerons d'agrumes

La détermination des espèces aphidiennes s'est basée sur l'observation sous la loupe binoculaire des critères morphologiques distinctifs des espèces dont l'aspect général du corps (la coloration, la tête, les antennes, les cornicules et la cauda) (Leclant, 1978).

1.3. Traitement des pucerons

Pour lutter contre les pucerons, l'expérimentation est conduite en milieu semi-aéré avec des conditions de température et d'humidité favorables (température entre 20°C et 30°C et 60% d'humidité) et une photopériode de 12h de lumière et 12h d'obscurité.

1.3.1. Traitement des larves par pulvérisation

Les larves (n = 10) ont été récoltées sur des feuilles à l'aide d'un pinceau. Ces dernières ont été transférées sur la face inférieure d'une feuille préalablement décapée à l'aide d'une brosse fine. L'ensemble est ensuite enfermé dans des boîtes en plastique et pulvérisé au NPP® dilué dans de l'eau à quatre concentrations différentes (1g/l, 2 g/l, 3 g/l et 4g/l). Les larves témoins ont été pulvérisées à l'eau seule. La mortalité des larves a été dénombrée chaque jour pendant trois jours sous la loupe binoculaire. Pour chaque concentration testée, nous avons utilisé 2 boîtes (duplicate).



Figure 14- Traitement des larves avec différentes doses de NPP®

1.3.2. Traitement des adultes par pulvérisation

Des adultes aptères (n=10) ont été récupérés à l'aide d'un pinceau puis transférés sur une feuille préalablement nettoyée et enfermés dans des boîtes en plastique. Ces derniers ont été préalablement pulvérisés au NPP® dilué dans de l'eau. Quatre concentrations différentes (2g/l, 4 g/l, 6g/l et 8g/l) de NPP® ont été utilisées. Les boîtes témoins contenaient des adultes traités à l'eau seule. La mortalité des adultes a été dénombrée chaque jour pendant trois jours sous la loupe binoculaire. Pour chaque concentration testée, nous avons utilisé 2 boîtes (duplicate).

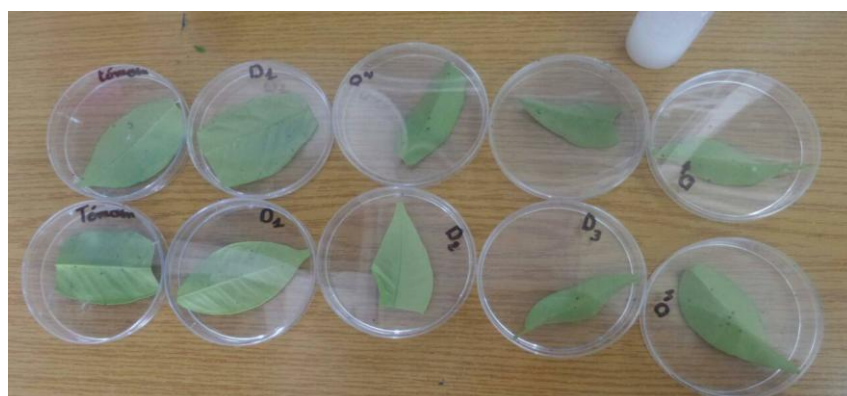


Figure 15- Traitement des adultes avec différentes doses de NPP®

1.3.3. Effet répulsif du NPP®

Les pucerons ont été récoltés et enfermés dans une boîte. Du papier filtre imprégné de quatre concentrations différentes de NPP® (1g/l, 2 g/l, 3 g/l et 4g/l) a été collé au couvercle de chaque boîte. Cette étape doit se faire rapidement pour éviter toute évaporation du produit. La boîte témoin contient du papier filtre imbibé à l'eau seulement.

Les résultats sont exprimés de manière qualitative par la migration ou non des pucerons et de manière quantitative par le taux de mortalité.

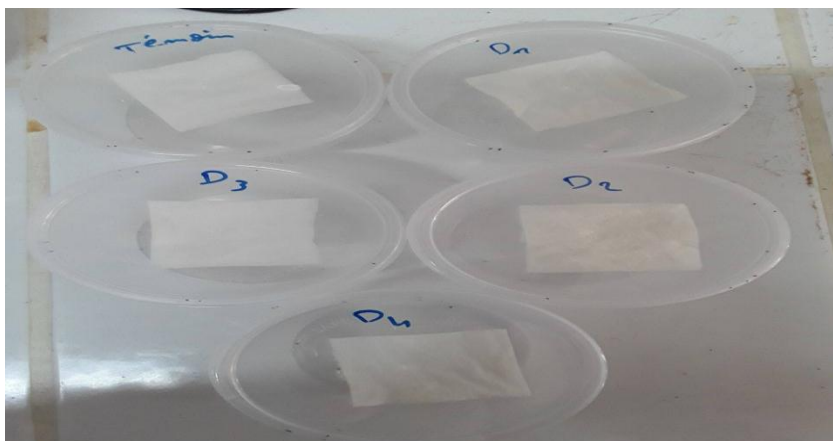


Figure 16- Dispositif expérimental de l'effet répulsif de NPP®

1.3.4. Taux de mortalité

Les taux de mortalité des insectes traités aux différentes concentrations de NPP® ont été évalués après 24 heures. Les insectes morts sont dénombrés sous la loupe binoculaire. Un insecte est considéré comme mort quand il ne réagit plus au contact d'une aiguille posée sur les antennes. Le pourcentage de mortalité est calculé et corrigé selon la formule suivante :

$$Mc = \frac{Me - Mt}{100 - Mt} \times 100$$

Où

Mc = mortalité corrigée en pourcentage

Me = mortalité de l'échantillon testé

Mt = mortalité dans le témoin non traité

2. Evaluation *in vivo* de l'activité de NPP® sur les pucerons, la charge microbienne au niveau des feuilles et les nématodes du sol

L'essai a été mené sur trois parcelles du jardin de la faculté. Le traitement a été appliqué chaque semaine pendant un mois par voie systémique (irrigation) ; le NPP® est alors absorbée par la plante puis il circule dans le système vasculaire de la plante et par pulvérisation à la concentration de 8g/l choisie sur la base des résultats de la première partie de ce travail.

- **Parcelle 1** : témoin de 4 arbres infestés et non traités
- **Parcelle 2** : le traitement sera appliqué de façon curative sur 4 arbres infestés par les pucerons par pulvérisation et par voie systémique au NPP® dilué dans 5 litres d'eau à la concentration de 8 g/l.

- **Parcelle 3 :** le traitement sera appliqué de façon préventive sur 4 arbres sains par pulvérisation et par voie systémique au NPP® dilué dans 5 litres d'eau à la concentration de 8 g/l.

2.1. Taux d'infestation par les pucerons

Selon Boussaad (2003), le taux d'infestation sur une branche donnée représente le rapport entre le nombre de feuilles infestées et le nombre total des feuilles observées exprimé en pourcentage d'après la formule suivante :

$$T.I. (\%) = \frac{\text{Nombre des feuilles infestées}}{\text{Nombre total des feuilles}} \times 100$$

2.2. Charge bactérienne

Des feuilles prélevées au hasard des arbres traités et non traités constituant 2 types d'échantillon ont été découpés. À 1 g de feuilles de chaque échantillon, nous avons ajouté 9 ml de sérum physiologique stérile (NaCl 0,9 %). Cette suspension est soumise à une agitation et ensuite à des dilutions au 1/10, 1/100 et 1/1000. Un volume de 100 µl de chaque dilution a été étalé sur le milieu gélosé Plate Count Agar (PCA). Les boîtes de Petri ont été incubées à 37°C pendant 24h. Les résultats sont exprimés en Log décimal UFC (unités formant colonies) par gramme de feuilles.

2.3. Charge fongique

Le dénombrement des levures et des moisissures a été réalisé de la même façon que pour la charge bactérienne mais sur milieu Sabouraud. Les boîtes de Petri ont été incubées à 25°C pendant 48h.

2.4. Dénombrement des nématodes du sol

Au niveau de chaque parcelle, des échantillons de sol de 750 à 1 000 g composés de quatre prises ont été effectués à l'aide d'une truelle. Les prélèvements ont été pris à une profondeur de 20 à 30 cm qui correspond à la profondeur exploitée par le système racinaire.

Le prélèvement des échantillons à analyser est suivi par une élimination des cailloux et des gros débris végétaux.

La méthode d'extraction des nématodes utilisée est fondée sur la migration des nématodes par géotropisme positif vers le milieu le plus humide (Caubel et coll., 1971). Sur une cuvette contenant de l'eau, on place une passoire émaillée recouverte de papier filtre au dessus duquel est déposé l'échantillon. Les nématodes migrent à travers le papier filtre pour atteindre l'eau dans la cuvette. Au bout de 48 h, les nématodes migrent alors dans l'eau de la cuvette et on laisse décanter l'eau de la cuvette dans un bécher pendant 2 heures au moins

pour un comptage ultérieur des juvéniles de deuxième stade (J2) dans des boîtes transparentes quadrillées.



Figure 17- Différentes étapes d'extraction des nématodes

3. Evaluation *in vitro* de l'action de NPP® sur les moisissures impliquées dans la fumagine des agrumes.

3.1. Isolement des moisissures responsables de la fumagine

Des morceaux de fruit attaqué par la fumagine sont coupés à l'aide d'un scalpel stérile. Après trempage dans l'eau de Javel (12°) puis rinçage à l'eau distillée stérile, trois fragments ont été déposés sur des boîtes de Petri contenant le milieu Sabouraud gélosé. Les boîtes ainsi préparées sont incubées à 27°C pendant 5 jours.

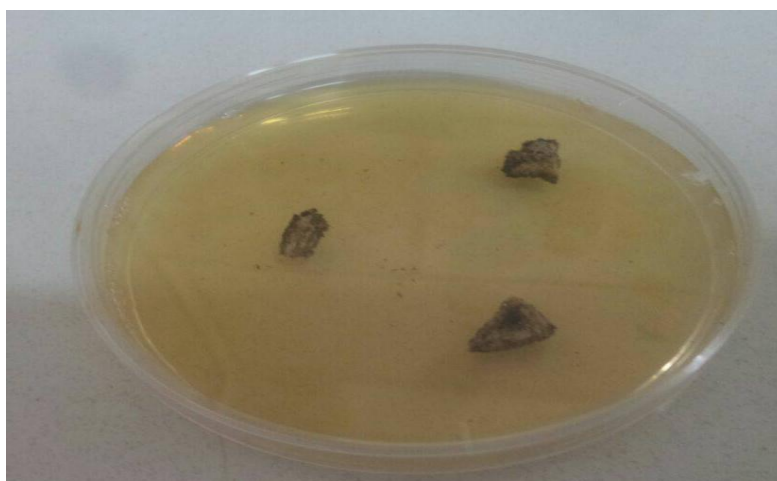


Figure 18- Morceaux d'orange déposés sur milieu Sabouraud gélosé.

3.2. Purification et identification préliminaire des isolats responsables de la fumagine

La purification des isolats responsables de la fumagine a été réalisée par repiquage à partir des boîtes présentant des thalles suffisamment espacés afin d'éviter toute contamination et d'obtenir des isolats uniques. Sous conditions aseptiques, des spores de chaque isolat sont détachés grâce à une anse stérile puis déposés au centre d'une boîte de Petri contenant le milieu Sabouraud gélosé. Les boîtes sont ensuite incubées à 27°C pendant 4 à 5 jours.

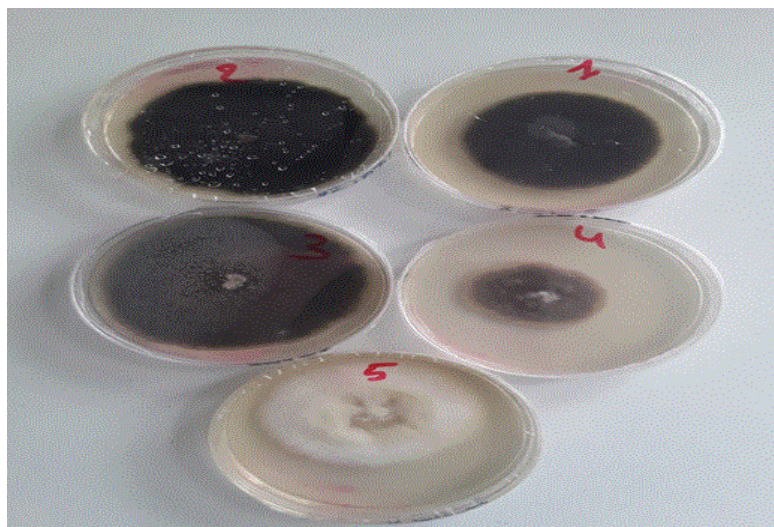


Figure 19- Isolats purifiés

L'identification préliminaire des moisissures s'est basée sur les caractères morphologiques macroscopiques (aspect et couleur du thalle) et sur les caractères morphologiques microscopiques (mycélium, forme des spores) (Sutton, 1980 ; Woudenberg, et coll., 2013).

3.3. Préparation de la suspension des spores

La suspension des spores obtenue à partir d'une culture de 7 jours sur milieu Sabouraud gélosé à 27°C a révélé l'existence de deux souches.

Les deux types de spores ont été détachés à l'aide d'une anse stérile, puis transférés dans un tube contenant 5 ml du NaCl stérile à 0,9 % et bien mélangé au vortex afin de détacher les spores. Le nombre de spores dans la suspension mère est déterminé sur une cellule de Malassez et ajusté pour avoir un inoculum de l'ordre de 10^6 spores/ml (Neimann et Baayen, 1989).

3.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI), des concentrations inhibitrices partielles (CIP) et des concentrations minimales fongicides (CMF)

Les CMI du NPP® ont été déterminées selon la méthode rapportée par Remmal et ses collaborateurs (1993 a). Dans des flacons contenant 20 ml du milieu Sabouraud, différents volumes de NPP® (5 µl, 10 µl, 20 µl, 40 µl, 80 µl) sont ajoutés, permettant d'obtenir les concentrations finales suivantes : 0,25 g/l, 0,5 g/l, 1 g/l, 2g/l et 4g/l. Le mélange a été coulé dans des boîtes de Petri puis inoculé de trois gouttes calibrées d'un volume de 100µl d'une suspension mère de 10⁶ spores/ml (ceci pour les deux souches identifiées). Le témoin positif ne contient que la suspension des spores et le milieu de culture. Après séchage des gouttes déposées, les boîtes de Petri sont incubées à 27°C. L'essai est réalisé en triplicate. Les CMI de NPP® sur les deux souches ont été notées et la vitesse de croissance est suivie en mesurant le diamètre des thalles après 5 jours d'incubation à 27 °C.

La croissance mycélienne en milieu gélosé a été calculée en mesurant le diamètre des thalles en vue de déterminer les concentrations inhibitrices partielles (CIP). Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne est calculé selon la formule de Dohou et ses collaborateurs (2004):

$$PI = \frac{(C - T)}{C} \times 100$$

Où

C= Diamètre radial moyen de 3 valeurs issues de la croissance mycélienne du champignon testé sur milieu témoin.

T= Diamètre moyen de 3 valeurs issues de la croissance mycélienne en présence de NPP®.

La détermination de la CMF a été faite selon la méthode du cylindre d'agar. Dans cette méthode, à partir des boîtes contenant les concentrations de NPP® où il n'y a pas eu de croissance notée à l'œil nu à la fin de l'incubation (CMI), des cylindres d'agar d'environ 6 mm de diamètre sont prélevés aseptiquement. Ensuite, ces cylindres sont déposés inversés sur de nouvelles boîtes de Petri contenant le milieu Sabouraud puis incubées à 27°C pendant 3 jours. La CMF correspond à la plus faible concentration de l'agent antifongique pour laquelle nous n'avons pas observé de croissance fongique en comparaison avec le témoin.

4. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés par la valeur moyenne et l'écart type. La significativité des résultats a été vérifiée par le test de Student ou d'ANOVA (analyse de variance) en utilisant le test de comparaison Tukey's Multiple (Graph Pad Prism, version 5.03). Le degré de significativité choisi est de 5% à $P < 0,05$.

III. Résultats

1. Evaluation *in vitro* de l'action du NPP® sur les pucerons des agrumes

1.1. Identification des pucerons d'agrumes

L'identification des pucerons a relevé la présence de deux espèces ; l'espèce *Aphis spiraecola* qui est majoritaire et l'espèce *Toxoptera aurantii* qui est très peu représentée avec quelques individus seulement. Les différentes espèces aphidiennes identifiées sont représentées dans le tableau 4.

Tableau 4- Critères morphologiques d'identification des pucerons des agrumes

Espèce	Corps	Description
<i>Toxoptera aurantii</i>	 Figure 20 -Aptère <i>Toxoptera aurantii</i>	L'aptère est ovale, noire brillant. Les antennes sont courtes de couleur claire et foncée alternées. Les cornicules allongés et la cauda sont noires. La surface latéro-ventrale de l'abdomen est striée près des cornicules.
<i>Aphis spiraecola</i>	 Figure 21- Aptère <i>Aphis spiraecola</i>	L'adulte aptère de couleur vert jaunâtre avec une tête brune et des antennes et des pattes principalement pâles. Les cornicules sont droites, noires un peu plus longues que la cauda. Cette dernière est de couleur noire.

1.2. Traitement des pucerons

1.2.1. Traitement des larves par pulvérisation

La figure 22 représente le taux de mortalité des larves en fonction du temps et des différentes doses de NPP®. Les résultats obtenus montrent clairement les propriétés larvicides de NPP® puisque le taux de mortalité varie significativement ($P < 0.001$) en fonction des doses utilisées et de la durée d'exposition par rapport aux témoins.

Les taux de mortalité permettent de noter que le NPP® agit après 24h en provoquant une mortalité respective de 15%, 30%, 55% et 95% pour les concentrations 1g/l, 2g/l, 3g/l et 4g/l. La figure 22 montre que les taux de mortalité des pucerons augmentent au fur et à mesure que la concentration du NPP® augmente. 72 heures après le début des traitements, le NPP® occasionne une mortalité totale à la concentration la plus forte (4g/l) et une mortalité entre 65 et 75% pour les concentrations inférieures.

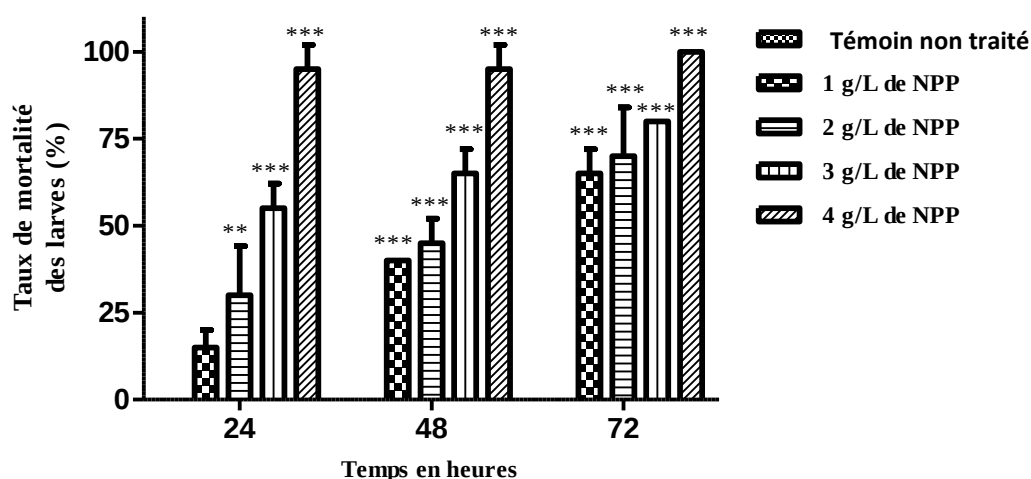


Figure22- Evolution du taux de mortalité des larves en fonction des doses de NPP® après 24, 48 et 72h de traitement.

*** : $p < 0.001$: différence hautement significative

** : $p < 0,01$: différence très significative

1.2.2. Traitement des adultes par pulvérisation

Les résultats représentés sur la figure 23 montrent un effet plus prononcé du NPP® sur les pucerons adultes. En effet, le taux de mortalité varie en fonction des doses testées et de la durée d'exposition par rapport aux témoins.

Mais après 24h du traitement, on note une augmentation du taux de mortalité de 60%, 75% et 90% aux concentrations respectives de 4g/l, 6g/l et 8g/l. Après 72h de traitement, les taux de mortalités sont encore plus importants.

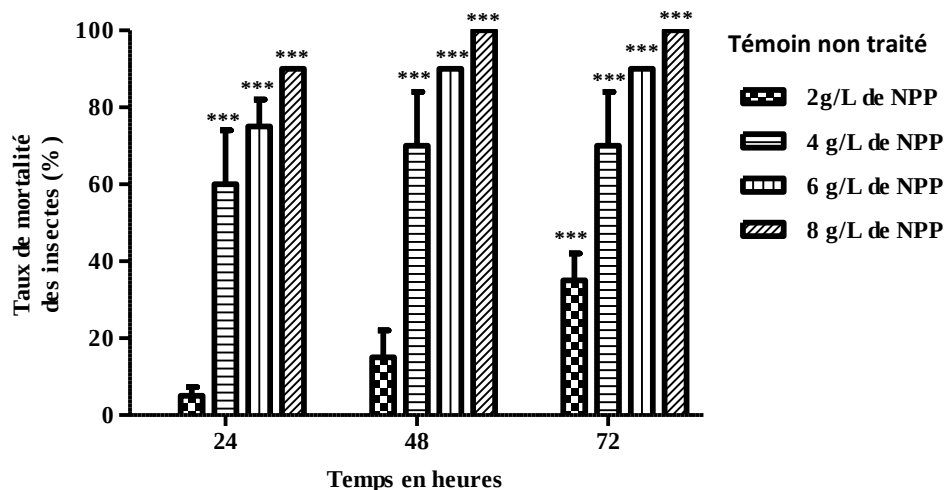


Figure 23- Evolution du taux de mortalité des adultes en fonction de la concentration de NPP® et en fonction du temps
 *** : $p < 0.001$: différence hautement significative

1.2.3. Effet répulsif du NPP®

Les résultats représentés sur la figure 24 montrent que plus la concentration de NPP® augmente, plus le taux de mortalité augmente. L'effet répulsif du NPP® sur les adultes a été suivi systématiquement par l'effet insecticide. A la dose 4g/l de NPP®, on obtient un taux de mortalité qui avoisine les 80%.

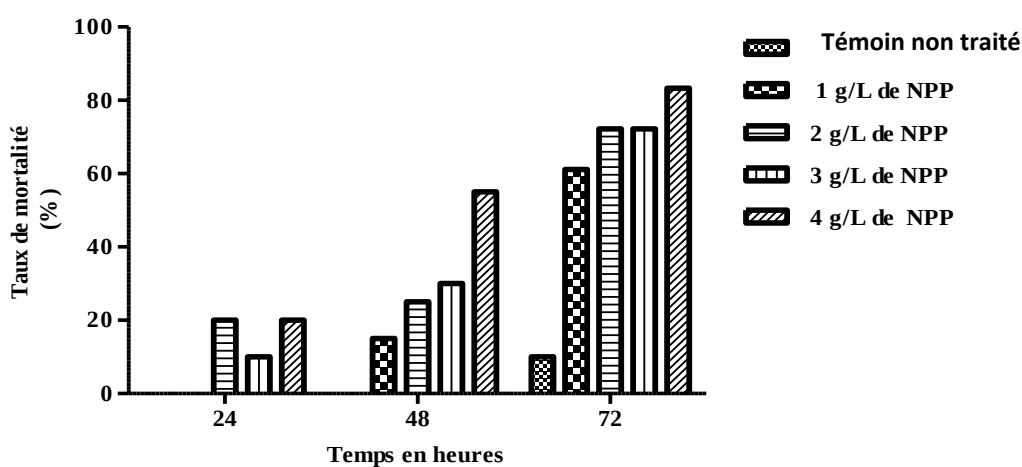


Figure 24- Evolution du taux de mortalité des adultes

2. Evaluation *in vivo* de l'activité du NPP® sur les pucerons, la charge microbienne au niveau des feuilles et les nématodes du sol

2.1. Taux d'infestation par les pucerons

La figure 25 représente l'évolution du taux d'infestation des 3 parcelles durant les 4 semaines de traitement. Le taux d'infestation des arbres non traités montre une augmentation de l'infestation d'une semaine à l'autre. Il atteint un maximum de 70% après quatre semaines.

Les résultats montrent une très bonne efficacité du traitement curatif au NPP® si bien qu'à la quatrième semaine, le taux d'infestation a été quasiment nul.

En ce qui concerne le traitement préventif, l'attaque a été généralement faible par rapport aux arbres non traités et seulement quelques jeunes pousses pour les quatre arbres traités ont été infestées. Le taux d'infestation n'a atteint que 2,5% durant la deuxième et la troisième semaine. A la quatrième semaine, les arbres n'étaient plus infestés.

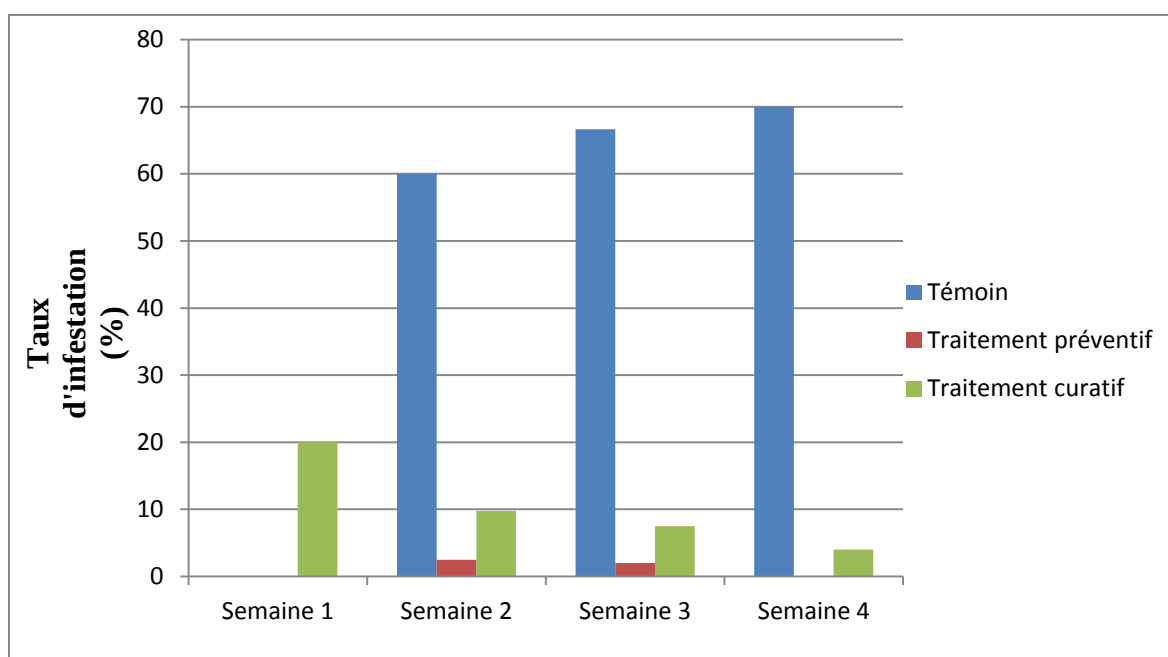


Figure 25-Evolution du taux d'infestation

En général, le traitement contre les pucerons des agrumes a donné un bon résultat car d'une part, il permet de prévenir l'attaque et d'autre part de lutter contre les autres ravageurs des agrumes. L'observation des populations de pucerons montre l'apparition d'individus ailés (Figure 26).



Figure 26- Pucerons ailés

2.2. Charge bactérienne

Les résultats des analyses microbiologiques des feuilles des arbres traités et non traités sont représentés sur la figure 27.

D'après ces résultats, on constate que la charge bactérienne augmente au niveau des feuilles des arbres non traités de 3,58 à 4,78 unités Log des UFC/g de feuilles après les quatre semaines de traitement

La charge bactérienne des feuilles traitées a diminué au cours de la deuxième semaine et s'annule à partir de la troisième semaine de traitement.

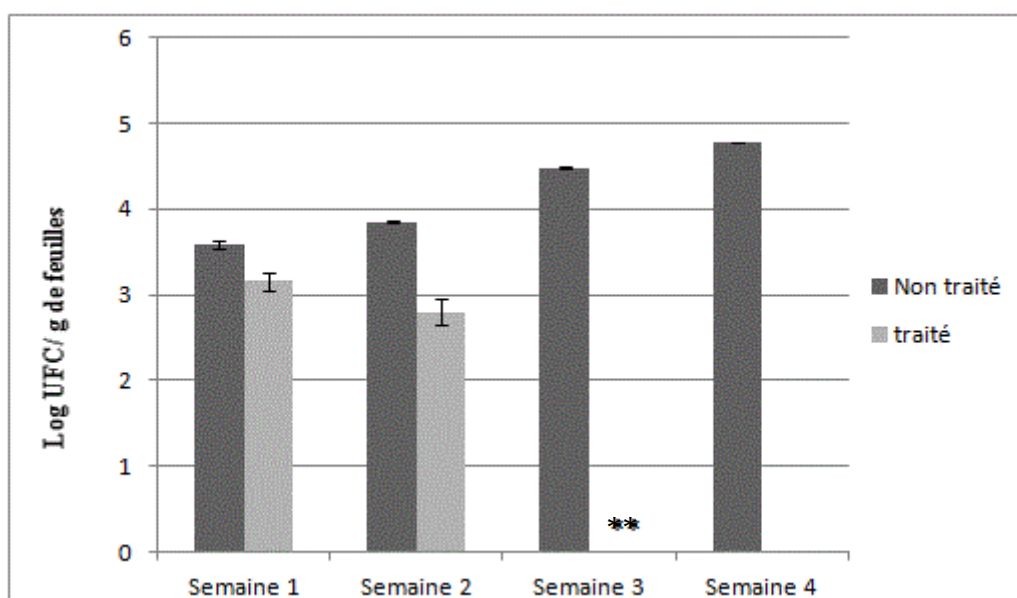


Figure 27- Evolution de la charge bactérienne au niveau des feuilles pendant les 4 semaines de traitement.

2.3. Charge fongique

La figure 28 illustre les résultats de la charge fongique des feuilles des arbres traités et non traités. En effet, cette flore présente une augmentation de 3,69 à 5,17 Log UFC/g de

feuilles après les quatre semaines de traitement. Pour les arbres traités, la charge fongique a diminué depuis la première à la deuxième semaine pour s'annuler complètement dès la troisième semaine du traitement.

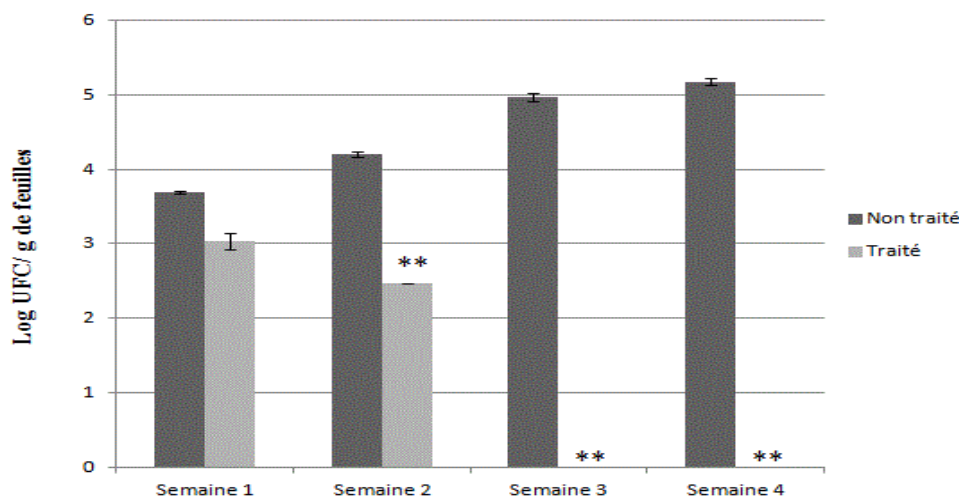


Figure 28- Evolution de la charge fongique au niveau des feuilles pendant les 4 semaines de traitement.

2.4. Dénombrement des nématodes du sol

L'évolution du nombre de nématodes est illustrée sur la figure 29. La parcelle non traitée présente des niveaux élevés de nématodes avec 554 nématodes/100ml de sol durant la première semaine et elle a été maintenue durant les semaines suivantes.

Le traitement au NPP® a entraîné une diminution du nombre de nématodes avec un taux respectif de réduction de 60,53%, de 91,99%, de 94,49%, et de 98% après la première semaine, la deuxième semaine, la troisième semaine et la quatrième semaine de traitement.

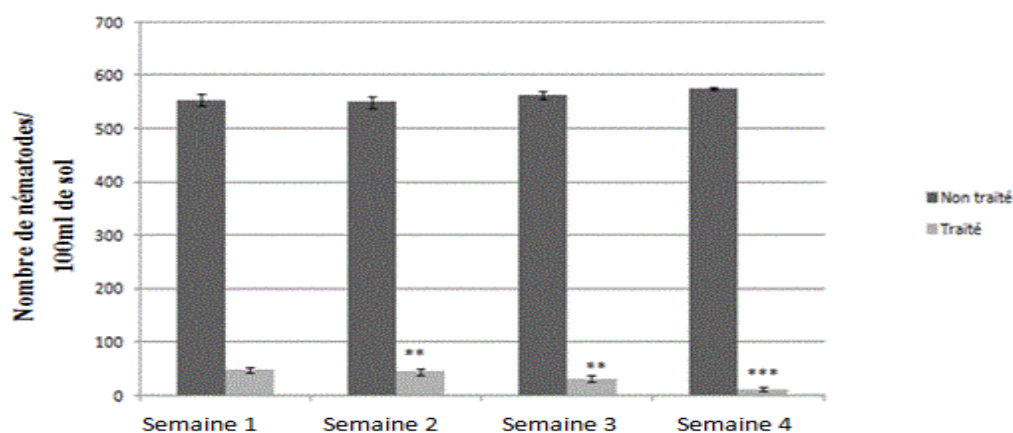


Figure 29- Evolution de nombre de nématodes dans le sol entourant des arbres durant les 4 semaines de traitement.

3. Evaluation *in vitro* de l'action de NPP® sur les moisissures impliquées dans la fumagine des agrumes.

3.1. Isolement et purification des souches fongiques responsables de la fumagine

Quatre isolats ont été obtenus à partir des morceaux d'orange infectés par la fumagine (Tableau 5). Ces isolats ont fait l'objet d'une identification préliminaire.

Tableau 5 – Les différents isolats obtenus

Isolats	Identification
1	<i>Capnodium sp</i>
2	<i>Capnodium sp</i>
3	<i>Alternaria sp</i>
4	<i>Alternaria sp</i>

3.2. Identification préliminaire des isolats responsables de la fumagine

Nous avons pu identifier quatre isolats : deux isolats appartenant au genre *Capnodium* et deux autres isolats appartenant au genre *Alternaria*. Les résultats d'identification sont représentés sur le tableau 6 et sur les figures 30, 31, 32 et 33.

Tableau 6- Identification préliminaire des isolats

Isolats	Identification	Caractères macroscopique	Caractères microscopiques
1, 2	<i>Capnodium sp</i>	Texture et topologie : Cotonneuse Couleurs : vert grisâtre	Hyphes : septés Conidie : rondes et multicellulaires (constituer de deux à trois cellules attachées)
3, 4	<i>Alternaria sp</i>	Texture et topologie : poudreuse surélevée Couleurs : Brun olivacée à brun noire	Hyphes : septés Conidie : en chaine sous forme de bouclier, unicellulaire Conidiophore : présente

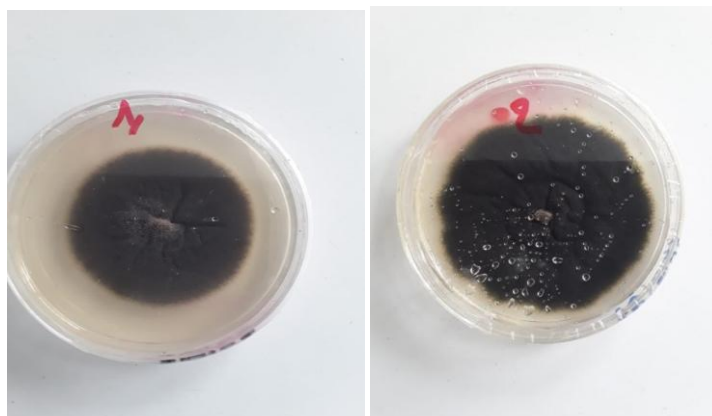


Figure 30- *Capnodium sp* sur milieu Sabauroud face verso

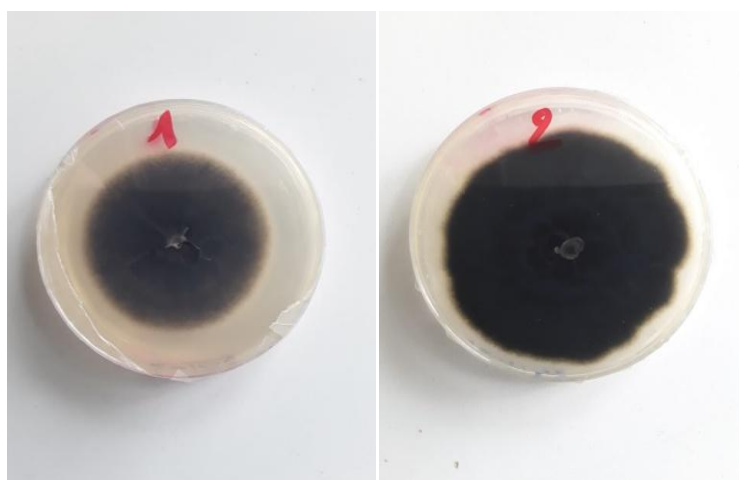


Figure 31- *Capnodium sp* sur milieu Sabauroud face recto

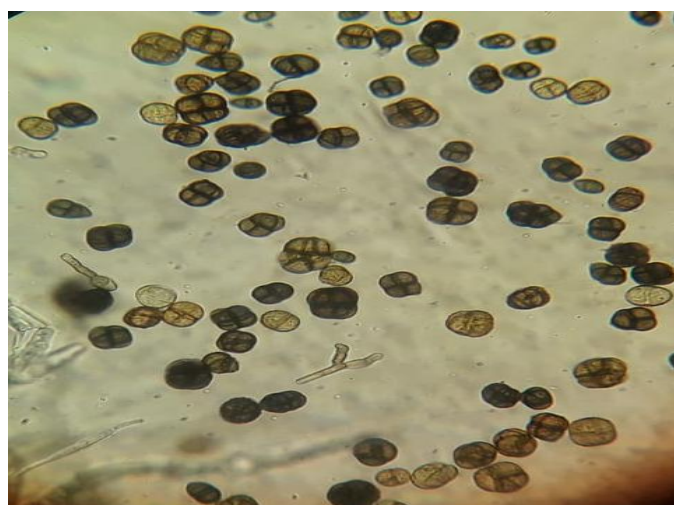


Figure 32- Observation microscopique des conidies de *Capnodium sp* Gx400

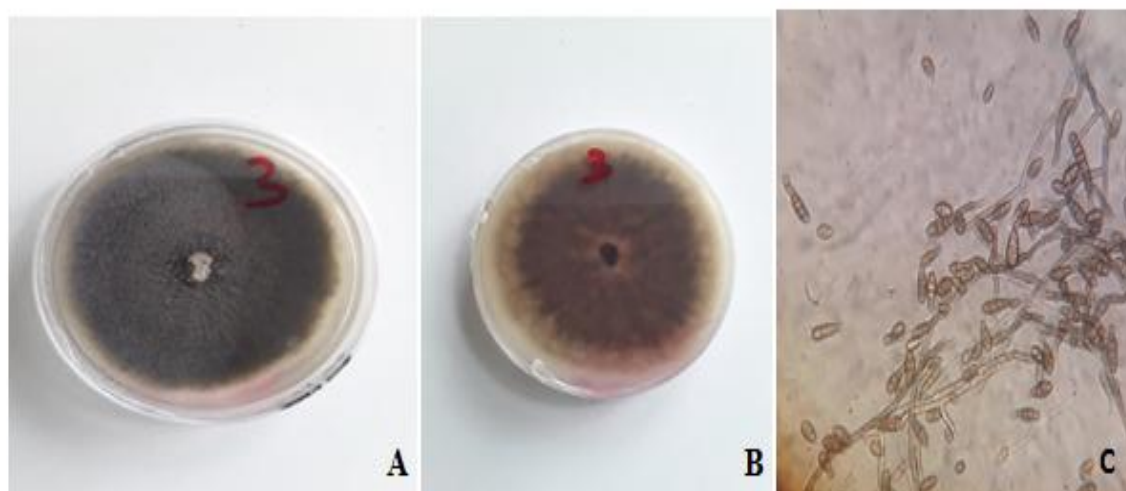


Figure 33- A : *Alternaria sp* sur milieu Sabauroud face verso ; B : *Alternaria sp* sur milieu Sabauroud face recto ; C : Observation microscopique des macroconidies d'*Alternaria sp* Gx400

3.3. Détermination des CMI, des CIP et des CMF

Les valeurs des CMI et des CMF obtenues avec le NPP® sur *Alternaria sp* et *Capnodium sp* sont résumées dans le tableau 7.

Tableau 7-CMI et CMF de NPP® sur *Alternaria* et *Capnodium* en milieu gélosé

Isolats	<i>Alternaria sp</i>		<i>Capnodium sp</i>	
Concentration de NPP®	CMI (g/l)	CMF (g/l)	CMI (g/l)	CMF (g/l)
	0,5	0,5	0,5	0,5

Concernant *Alternaria sp*, on remarque que le NPP® a montré un effet antifongique avec une valeur de CMI égale à 0,5g/l qui est égale à la CMF. Les mêmes valeurs de CMI et de CMF ont été obtenues pour *Capnodium sp*.

✓ Pourcentage d'inhibition de la croissance de *Capnodium sp* et d'*Alternaria sp*.

Le tableau 8 illustre l'évolution du pourcentage de réduction d'*Alternaria sp* et de *Capnodium sp* en fonction des différentes concentrations de NPP® utilisées.

Tableau 8- Pourcentages de réduction de la croissance mycélienne en fonction de différentes concentrations de NPP® vis-à-vis des isolats de *Capnodium* et d'*Alternaria*.
Les données affichées sur le tableau représentent la moyenne de 3 valeurs (n = 3) ± écart-type.
Les résultats montrent une différence hautement significative à p <0,001.

<i>Concentrations testées</i>						
<i>Espèces</i>	<i>Témoin</i>	<i>0,25g/l***</i>	<i>0,5g/l***</i>	<i>1g/l***</i>	<i>2g/l***</i>	<i>4g/l***</i>
<i>Pourcentage de réduction de Capnodium sp</i>	<i>0,00±0,00</i>	<i>67,73%±2,19</i>	<i>100%±0,00</i>	<i>100%±0,00</i>	<i>100%±0,00</i>	<i>100%±0,00</i>
<i>Pourcentage de réduction de Alternaria sp</i>	<i>0,00±0,00</i>	<i>41,92%±4,41</i>	<i>100%±0,00</i>	<i>100%±0,00</i>	<i>100%±0,00</i>	<i>100%±0,00</i>

Par ailleurs, les résultats présentés sur le tableau 8 montrent une différence hautement significative (p<0,001) entre les témoins non traités et les différentes concentrations de NPP® et ce, pour les deux espèces.

Pour *Alternaria sp*, une réduction de la croissance mycélienne de 40% a été notée à la concentration de 0,25g/l. Le pourcentage d'inhibiton de la croissance a atteint 100% dès 0,5g/l.

Concernant *Capnodium sp*, une réduction de la croissance mycélienne de 67% a été notée à la concentration de 0,25g/l. Le pourcentage d'inhibiton de la croissance a atteint 100% dès 0,5g/l.

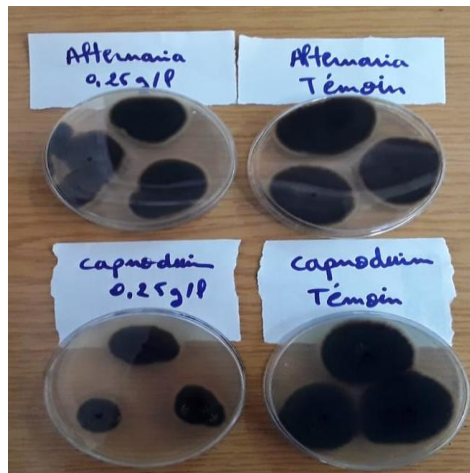


Figure 34 : Test de l'activité antifongique de la plus faible concentration du NPP® (0,25g/l) sur la croissance mycélienne d'*Alternaria sp* et de *Capnodium sp*

Discussion

1. Evaluation *in vitro* de l'activité insecticide du NPP® sur les pucerons des agrumes

L'identification des espèces aphidiennes s'est basée sur l'observation sous la loupe binoculaire des critères morphologiques distinctifs des espèces dont l'aspect général du corps (la coloration, la tête, les antennes, les cornicules et la cauda). Les résultats de cette identification ont révélé la présence de deux espèces de pucerons aptères : *Toxoptera aurantii* et *Aphis spiraecola*, avec une dominance de l'espèce *Aphis spiraecola*.

Nous avons testé le NPP® sur différents stades de développement des pucerons :

Le stade larvaire

Sur les larves témoins non traitées, aucune mortalité n'a été observée ce qui nous permet de dire que dans nos conditions expérimentales il n'y avait pas de facteurs pouvant provoquer la mortalité spontanée au sein de ce lot (figure 22). Pour les lots traités avec des doses croissantes de NPP®, un taux de mortalité variant entre 60% et 100% pour les doses respectives 1g/l et 4g/l a été noté après 72h. Ceci permet de dire que le NPP® a été capable d'assurer un effet larvicide quelque soit la dose utilisée. Ces résultats sont en concordance avec les résultats obtenus par Akantetou et ses collaborateurs (2011) qui ont traité à l'huile essentielle de Basilic blanchâtre contre une autre espèce de puceron *Aphis gossypii* qui attaque le melon et le cotonnier.

Le stade adulte

Après traitement des pucerons adultes aux doses croissantes de NPP®, une différence hautement significative a été notée entre les adultes témoins et ceux traités (figure 23). L'effet insecticide de NPP® est croissant parallèlement aux concentrations utilisées. Le taux de mortalité évolue après 48h pour atteindre 35%, 70%, 90% et 100% pour les concentrations respectives 1g/l, 2g/l, 3g/l et 4g/l de NPP®.

Cet effet insecticide est lié principalement à la présence des huiles essentielles dans la composition de NPP®. Les huiles essentielles sont des métabolites secondaires produits par les plantes comme moyen de défense contre les ravageurs phytophages (Cseke et Kaufman, 1999). Elles agissent directement sur la cuticule des insectes et acariens. Le rôle de la cuticule est de prévenir les pertes hydriques. Elle est sécrétée par l'épiderme et comporte plusieurs couches dont la couche externe, composée de cires donnant les propriétés hydrofuges à la cuticule (Isman, 2000). La nature lipophile des huiles essentielles peut dégrader la couche cireuse et causer des pertes en eau. Les trachées et les

sacs aériens des insectes sont également enduits de cette couche cireuse et sont par conséquent affectées par l'huile essentielle ce qui peut entraîner l'asphyxie des insectes (Chiasson et Beloin, 2007).

Les pucerons adultes mis en contact avec le NPP® par simple effet vapeur montrent un effet répulsif du NPP® à partir de la concentration 1g/l qui a été suivi systématiquement par l'effet insecticide (figure 24). En effet, les travaux de Bokobana et ses collaborateurs (2011) ont montré un effet répulsif important de l'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* sur *Aphis gossypii*.

2. Evaluation *in vivo* de l'activité de NPP® sur des bigaradiers

Le traitement *in vivo* a été effectué une fois par semaine pendant le mois d'avril par la voie systémique et par pulvérisation à une concentration de 8g/l de NPP®. Les résultats obtenus montrent une différence très significative entre les arbres témoins non traités et les arbres traités en préventif et ceux traités en curatif. Cette différence a été enregistrée pour le taux d'infestation par les pucerons, la charge bactérienne et la charge fongique des feuilles ainsi que la charge en nématodes du sol (figure 25, 27, 28, 29)

Taux d'infestation par les pucerons

Durant le test sur les arbres traités, nous avons remarqué en plus de la mortalité des adultes aptères (Figure 25), l'apparition d'individus ailés (Figure 26). Ces individus apparaissent lorsque les conditions du milieu deviennent défavorables (présence de certaines substances chimiques, qualité nutritive anti-appétante...) (Lambert et coll., 2006 ; Pavela et coll., 2009).

La composition du NPP® a été administrée par deux voies (systémique et foliaire). La voie systémique qui permet de remonter les principes actifs de NPP® avec la sève et étant donné que les pucerons se nourrissent de cette sève ils vont se retrouver en contact directs avec ces principes actifs.

La charge microbienne au niveau des feuilles

Le dénombrement des bactéries et des champignons sur la surface des feuilles des arbres traités et des arbres non traités a montré d'une façon évidente que le traitement au NPP® provoque une très forte baisse de la charge microbienne à la surface des feuilles (figure 27, 28). Nos résultats sur l'effet antifongique du NPP corroborent ceux obtenus par Wang et ses collaborateurs (1999) qui ont montré que l'huile essentielle de verveine a une action antifongique importante sur plusieurs espèces de champignons et de moisissures.

Chami et ses collaborateurs (2005) ont montré que l'activité fongicide des huiles essentielles est fortement liée aux monoterpènes et plus précisément aux phénols tels que le thymol, le carvacrol et l'eugénol. Ces composants majoritaires sont également responsables des propriétés antibactériennes.

Dénombrement des nématodes du sol

Concernant les nématodes, les résultats obtenus (figure 29) montrent une diminution du nombre de nématodes pouvant atteindre 98% après la quatrième semaine sur les arbres traités au NPP® par rapport aux témoins. Ceci permet de penser que le NPP® aurait aussi un rôle important dans la lutte contre les nématodes du sol. Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus par Sangwan et ses collaborateurs (1990) qui ont utilisé les huiles essentielles de différentes espèces végétales appartenant aux familles *Labiatae* (*Ocimum basilicum*, *Ocimum sanctum* et *mentha piperata*), *Myrtaceae* (*Callistemon lanceolatus* et *Eugenia caryophyllata*) et *gramineae* (*Cymbopogon caesius*) et leurs principaux constituants (les monoterpénoïdes, le linalol, l'eugénol, le menthol, le cinéole et le géraniol) contre les juvéniles de deuxième stade du nématode des agrumes *Tylenchulus semipenetrans*.

3. Evaluation *in vitro* de l'activité antifongique de NPP® sur les moisissures impliquées dans la fumagine des agrumes :

Sachant que la fumagine se développe sur des feuilles qui ont été préalablement piquées par des insectes, notamment les pucerons qui secrètent du miellat nutritif pour les moisissures (Sekkat A., 2015), nous avons travaillé sur cette maladie.

Isolement des moisissures responsables de la fumagine des agrumes.

Dans notre contexte, il n'y avait pas de raisons pour chercher à utiliser des méthodes sophistiquées (microscopie développée, biologie moléculaire, galerie API) ni pour l'isolement, ni pour l'identification des germes isolés. Nous avons alors utilisé les méthodes les plus simples, d'ailleurs utilisées par d'autres laboratoires. Effectivement, les germes que nous avons isolés sont : *Capnodium sp* (2 isolats) et *Alternaria sp.* (2 isolats). Pour des raisons de commodité, nous avons choisi de travailler sur un seul isolat de chaque espèce.

Test *in vitro*

Notre laboratoire a déjà montré que la méthode la plus fiable, sur le plan qualitatif et quantitatif, pour évaluer l'action des HE sur les moisissures est la méthode de contact direct (Bouddine et coll., 2012). L'utilisation de cette méthode sur les isolats de *Capnodium sp* et *Alternaria sp* sélectionnées a donné des résultats qui montrent que ces moisissures sont sensibles à la concentration 0,5g/l de NPP®. Les CMI obtenues sont

comparables à celles que Bouddine et ses collaborateurs (2012) ont déjà obtenues avec des moisissures du genre *Aspergillus sp* et *Candida sp*, avec des moisissures du genre *Fusarium sp* (Oukhouia et coll., 2017) et avec des levures (Bennis et coll., 2004a; Chami et coll., 2005).

Si les CMI et les CMF reflètent une action d'inhibition totale de croissance, il ne faut pas négliger l'action d'inhibition partielle qui apparaît à travers le tableau représentant les pourcentages de réduction en fonction du temps et de la concentration de NPP® utilisés (Tableau 8). En effet, le tableau 8 montre que même à des concentrations infra-inhibitrices, le NPP® continu d'exercer une action antifongique, qui consiste à retarder l'apparition des mycéliums et leur croissance et même leur sporulation.

Conclusion générale

Les résultats obtenus dans le présent travail nous permettent de considérer que le NPP® est un produit utile dans la lutte contre des maladies parasitaires, fongiques et bactériennes très fréquentes en agrumiculture.

La première partie a été consacrée à évaluer *in vitro* l'action de NPP® sur les pucerons des agrumes. Les résultats obtenus nous ont permis d'identifier deux espèces *Toxoptera aurantii* et *Aphis spiraecola* ainsi que l'effet larvicide et insecticide sur les différents stades (larves et adultes).

La deuxième partie avait pour but d'évaluer *in vivo* l'effet du NPP® sur les pucerons, les nématodes du sol et la charge microbienne au niveau des feuilles en utilisant une concentration de 8 g/l en foliaire et 8 g/l en systémique. Les deux tests effectués, préventif et curatif, ont montré que la composition innovante NPP® présente un effet prononcé aphicide et un effet aussi bien sur la charge bactérienne et fongique que sur les nématodes.

La dernière partie a été consacrée à l'isolement des moisissures causant la fumagine à partir des morceaux d'orange. Les résultats de l'identification préliminaire ont montré deux genres de moisissures (*Alternaria* et *Capnodium*). Les tests *in vitro* visant à étudier l'activité antifongique ont montré que le NPP® présente une importante activité antifongique.

Perspectives

- ✓ Continuer à étudier l'action de NPP® sur les pucerons et la fumagine et d'autres maladies des agrumes.
- ✓ Faire une recherche fondamentale pour comprendre le mécanisme d'action responsable des effets bénéfiques du NPP® sur les plantes.
- ✓ Tester le NPP® sur d'autres plantations d'arbres ou arbustes à intérêt économique pour le Maroc.

Références Bibliographiques

- Ahuja I., Rohloff J., Bone A.M., 2010. Defence mechanisms of Brassicaceae : implications for plant-insect interactions and potential for integrated pest management. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 30 :3111-348
- Akantetou, P. K., Koba, K., Nenonene, A. Y., Poutouli, W. P., Raynaud, C., & Sanda, K., 2011. Évaluation du potentiel insecticide de l'huile essentielle de *Ocimum canum* Sims sur *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae) au Togo. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 5(4), 1491-1500.
- Attia Sabrine, Grissa Kaouthar Lebdi, Gharbi-Gammar Zeineb, Maileux Anne-Catherine, Lognay Georges , 2010. Contrôle de *Tetranychus urticae* par les extraits de plantes en vergers d'agrumes. In : *Entomologie Faunistique*, Vol. 63 , no. 4, p. 229-235
- Aubert B., 1975. La lutte aménagée contre les ravageurs des agrumes en Afrique du Sud et ses applications possibles pour les Mascareignes. *Fruits*, vol. 30, n 3, p. 149-159.
- Bakkali. F , Averbeck. S, Averbeck. D, Idaomar. M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46, 446–475.
- Bale, J.S., Strathdee, A.T. et Strathdee, F.C., 1994. Effects of low temperature on the arctic aphid *Acyrtosiphon brevicornis*. *Funct. Ecol.*, Vol. 8, p. 621-626.
- Barbagallo S. Et Patti I., 1986. The *Citrus* aphids, behaviour, damages and integrated control. *Com. Euro. Com* : 67-75
- Barta M., Cagan L., 2006. Aphid-pathogenic entomophthorales (their taxonomy, biology and ecology). *Biologia, Bratislava, Section Zoology*, 61, Suppl. 21 : 543-616 .
- Bar-Joseph, M., Marcus, R., & Lee, R. F., 1989. The continuous challenge of *citrus tristeza virus* control. *Annual Review of Phytopathology*, 27(1), 291-316.
- Beattie G.A.C., Somsook V., Watson D.M., Clift A.D., Jiang L., 1995. Field evaluation of *Steinernema carpocapsae* (Weiser) (Rhabdida: Steinernematidae) and selected pesticides and enhancers for control of *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae). *J. Austral. Entomol. Soc.*, 34 (4), 335-342. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1440-6055.1995.tb01351.x/pdf>.
- Benediste A. Et Baches M., 2002 – Agrumes. Ed. Ugen Ulmer, PARIS, n° 132, 96 p.
- Bennis, S., Chami, N., Chami, F., Bouchikhi, T. and Remmal, A., 2004. "Surface Alteration of *Saccharomyces Cerevisiae* Induced by Thymol and Eugenol," *Letters in Applied Microbiology*; 38 454-458.

- Benoit R., 2006. Biodiversité et lutte biologique- Comprendre quelques fonctionnements écologiques dans une parcelle cultivée, pour prévenir contre le puceron de la salade. Certificat d'Etude Supérieures en agriculture Biologique. ENITA C. 10 :1-25
- Bessadat, N., Simoneau, P., Benichou, S., Setti, B., Kihal, M., & Henni, J. E., 2014. Morphological, physiological and pathogenic variability of small-spore *Alternaria* causing leaf blight of Solanaceae in Algeria. *African Journal of Microbiology Research*, 8(37), 3422-3434.
- Biasi, A., De Patrizio, A., Faedda, R., Schena, L., Pane, A., Cacciola, S. O., & di San Lio, G. M., 2012. *SEPTORIA CITRI* IS A COMMON PATHOGEN OF CITRUS IN SOUTHERN ITALY. *Journal of Plant Pathology*, 94(4).
- Blanc, S., Drucker, M., & Uzest, M., 2014. Localizing viruses in their insect vectors. *Annual review of phytopathology*, 52, 403-425.
- Blackman, R.L. et Eastop, V.F., 1985. Aphids on the world's crops : an identification guide. Chichester (USA) : Ed° John Wiley & Sons, 466 p.
- Blackman R.L. Et Eastop V.F., 2000- Aphids on the world's crops. An identification and information guide. 2nd Ed. New york. : John Wiley et Sons Publishers, 466p.
- Blackman, R.L. et V. F. Eastop, 2006. Aphids on the World's Herbaceous Plants And Shrubs. John Wiley & Sons Inc. Boivin, G., Hance, T., & Brodeur, J., 2012. Aphid parasitoids in biological control. *Canadian Journal of Plant Science*, 92(1), 1-12.
- Bokobana, E. M., Koffi, K. O. B. A., Poutouli, W. P., Akantetou, P. K., NADIO, N. A., Laba, B. & SANDA, K., 2014. Évaluation du potentiel insecticide et répulsif de l'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng. sur *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae), ravageur du cotonnier au Togo. *Sciences de la vie, de la terre et agronomie*, 2(2)
- Bonnemaison L., 1950- Facteurs d'apparition des formes ailées chez les pucerons vecteurs des maladies à virus de la pomme de terre et méthodes générales de protection des plantes de sélection. Ed. S.E.P., Paris, 12p.
- Bouddine, L., Louaste, B., Achahbar S., Chami, N., Chami, F., and Remmal, A., 2012. Comparative study of the antifungal activity of some essential oils and their major phenolic components against *Aspergillus niger* using three different methods. *African Journal of Biotechnology* 11, 14083–14087.
- Bournier, A., 1970. The most important forms of thysanopteran injuries on cultivated plants. *Annales de Zoologie et Ecologie Animale*, 2: 237-259.
- Boussad, F., 2003. Essai faunistique dans trois parcelles de légumineuses à Oued Smar (Mitidja), Tarihant et Timizart–Loghbar (Tizi Ouzou)–Dégâts dus aux insectes sur fève à

l'institut technique des grandes cultures (Oued Smar). *Mémoire Ingénieur, Inst. nati. agro., El Harrach.*

-Boussaad L., 2003. Situation des ravageurs des agrumes et de leurs ennemis naturels en verger biologique, sous protection intégrée et conventionnel dans la région de Marrakech. Workshop International: Apport des Biotechnologies en production intégrée, 13 Décembre 2003, 73 p.

-Boyer de Fonscolombe B.E.L.J.H., 1841. Description des pucerons qui se trouvent aux environs d'Aix. *Annales de la société entomologique de France* 10 : 157-198.

-CABI (CAB International), 2001. *Crop Protection Compendium*. Wallingford, UK: CABI Publishing.

-CABI, 2007. *Crop Protection Compendium*. Prays citri Millière, citrus flower moth. Available from: <http://www.cabicompendium.org/cpc/datasheet.asp?CCODE=PRAYCI&COUNTRY=0> as last updated on 16 May 2003 (accessed on 13 March 2018).

-Cacciola, S. O., Bertaccini, A., Pane, A., & Furneri, P. M., 2017. *Spiroplasma spp.*: A Plant, Arthropod, Animal and Human Pathogen. In *Citrus Pathology*. InTech.

-Caubel, G., Ritter, M., Rivoal, R., & Bossis, M., 1971. Observations relatives à des attaques du nematode *Meloidogyne naasi* Franklin sur céréales et graminées fourragères dans l'ouest de la France en 1970. *Paris Acad Agr Fr Compt Rend Hebd Seances*.

-Chami, F., 2005. Evaluation in vitro de l'action antifongique des huiles essentielles d'origan et de girofle et de leurs composés majoritaires in vivo: Application dans la prophylaxie et le traitement de la candidose vaginale sur des modèles de rat et de souris immunodéprimés.

-Chami, F., Chami, N., Bennis, S., Bouchikhi, T. and Remmal, A., 2005. "Oregano and Clove Essential Oils Induce Surface Alteration of *Saccharomyces Cerevisiae*, *Phytotherapy Research*, 19 (5) 405-408.

-Chegrani-Conan, C., 2009. Les agrumes : citron, orange, pamplemousse... Anagramme., Paris: Anagramme.

-Chiasson, H., et Beloin, N., 2007. Les huiles essentielles, des biopesticides" Nouveau genre. *Bulletin de la Société d'Entomologie du Québec*, 14(1), 3-6.

-Chomnunti, P., Hongsanant, S., Aguirre-Hudson, B., Tian, Q., Peršoh, D., Dhami, M. K. & Hyde, K. D., 2014. The sooty moulds. *Fungal Diversity*, 66(1), 1-36.

-Cseke, L.J. et P.B. Kaufman, 1999. How and why these compounds are synthesized by plants. Pages 37-90 in P.B. Kaufman, L.J. Cseke, S. Warber, J.A. Duke et H.L. Briemann (eds.), *Natural Products from Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL.

- Dalvi, M. B., Godse, S. K., Shinde, A. K., & Patil, B. P., 2002. Evaluation of cleaning agents for sooty mould (*Capnodium* species)-affected mango (*Mangifera indica*) fruits. *Indian journal of agricultural science*, 72(4), 223-224.
- Dambier D., Benyahia H., Pensabene-Bellavia G., Kaçar Y.A., Froelicher Y., Belfalah Z., Lhou B., Handaji N., Printz B., Morillon R., Yesiloglu T., Navarro L. & Ollitrault P., 2011. Somatic hybridization for citrus rootstock breeding : An effective tool to solve some important issues of the Mediterranean citrus industry. *Plant Cell Reports* 30, 883 - 900.
- Dhami, M. K., Weir, B. S., Taylor, M. W., & Beggs, J. R., 2013. Diverse honeydew consuming fungal communities associated with scale insects. *PloS one*, 8(7), e70316.
- Diallo, A., Sall-Sy, D., Bordat, D., & Diarra, K., 2017. Assessment of a cabbage/pak choï crop association to manage aphid and parasitoid populations on cabbage crops in Senegal. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 11(4), 1542-1550.
- Dias, N. P., Nava, D. E., Garcia, M. S., Silva, F. F. & Valgas, R. A., 2017. Oviposition of fruit flies (Diptera: Tephritidae) and its relation with the pericarp of citrus fruits. *Brazilian Journal of Biology*, (AHEAD), 0-0.
- Dixon A .F.G., 1987. Parthenogenetic reproduction and the rate of increase in aphids In: Minks AK et Harrewijn P, Aphids Their biology, natural enemies and control Elsevier.
- Dohou N., Yamani K., Badoc A. et Douira A., 2004. Activité antifongique d'extraits de thymelaelythroïdes sur trois champignons pathogènes du riz. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*. 143: 31-38.
- Douglas A. E., 2003. The nutritional physiology of aphids. *Advances in Insect Physiology*, 31: 73- 140. Hardy, S., Donovan, N., & Barkley, P. B. (2008). *Citrus exocortis*. *Primefact*, 772, 1-3.
- FAO, 2004. <http://www.fao.org/docrep/007/y5143f/y5143f10.htm> consulté le 17 Mars 2018-05-11
- Fraval A., 2006. Les Pucerons. *Insectes* 3 N 141
- Fischer, C. , 2016. *Etude des sémiochimiques volatils impliqués dans le mutualisme fourmis-pucerons* (Doctoral dissertation, Université de Liège, Liège, Belgique).
- Fullerton, R. A., Harris, F. M., & Hallett, I. C., 1999. Rind distortion of lemon caused by *Botrytis cinerea* Pers. *New Zealand journal of crop and horticultural science*, 27(3), 205-214.
- Ghosh, A., Das, A., Lepcha, R., Majumdar, K., & Baranwal, V. K., 2015. Identification and distribution of aphid vectors spreading *Citrus tristeza virus* in Darjeeling hills and Dooars of India. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 18(3), 601-605

- Godin C. Et Bovin G., 2002. Guide d'identification des pucerons dans les cultures maraichères au Québec.
- Grafton-Cardwell EE, Morse JG, O'Connell NV, Phillips PA, Kallsen CE, Haviland DR., 2009. [Citrus leafminer](#). University of California IPM Online. (12 April 2016)
- Hamadache, H., 2010. La filière agrumicole marocaine à l'aube du programme Plan Maroc Vert.
- Hardy, S., Donovan, N., & Barkley, P. B., 2008. Citrus exocortis. *Primefact*, 772, 1-3.
- Henri Chapot & Vittorio L. Delucchi, 1964. Maladies, troubles et ravageurs des agrumes au Maroc. Institut national de la recherche agronomique, 1964 - 339 pages
- Horsfall J.L., 1924. Life history studies of Myzus persicae Sulzer. Pennsylvania Agric Exp Stn Bull 185: 1-16.
- Hullé, M., 1999. Les pucerons des plantes maraichères: cycles biologiques et activités de vol. Editions Quae.
- Hulle. M., Turpeau-Ait Ighil. E., Robert. Y., & Monet. Y., 1999. Les pucerons des plantes maraichères. Cycle biologique et activités de vol. Ed A.C.T.A. I.N.R.A. Paris.
- Isman, M. B., 2000. Plant essential oils for pest and disease management. Crop protection, 19(8), 603-608
- Jacquemond C., Curk F., Heuzet M., 2013. Les clémentiniers et autres petits agrumes. Editions Quae, 363 p.
- Jean Peccoud, Jean-Christophe Simon , Carol von Dohlen, Armelle Coeur d'acier, Manuel Plantegenest , Flavie Vanlerberghe-Masutti , Emmanuelle Jouselin, 2010. Evolutionary history of aphid-plant associations and their role in aphid diversification. Comptes Rendus Biologies, 333(6-7), p.474-487.
- Johnson WT & Lyon H.H., 1991. Insects That Feed on trees and Shrubs(2nd), Comstock Publishing/Cornell University Press, Ithaca, P. 468-470.
- Jones J., 2001. [Citrus leafminer](#). Arizona Crop Information Site. (12 April 2016)
- Khanchouch, K., Pane, A., Chriki, A., & Cacciola, S. O., 2017. Major and Emerging Fungal Diseases of Citrus in the Mediterranean Region. In *Citrus Pathology*. InTech.
- Kim, K. W. 2016. Ultrastructure of the epiphytic sooty mold Capnodium and surface-colonized walnut leaves. *European journal of plant pathology*, 146(1), 95-103.
- Kwon JH, Kang SW, Kim JS, Park CS., 2001. Scab of Tea (Thea sinensis) Caused by *Cladosporium herbarum* in Korea. J. Plant Pathol J.17:350-353.
- Lambert L., 1999. S.O.S Thrips, Cultures en serres. Bulletin d'information permanent N 1, Ed. Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation, Québec, 5p.

- Leclant F., 1978. Les pucerons des plantes cultivées, clef d'identification, grandes cultures. Ed. Association coord. Tech. Agri. (A.C.T.A), Paris, 63p.
- Leroy P., Capella Q. et Haubruge E., 2009. L'impact du miellat de puceron au niveau des relations tritrophiques entre les plantes-hôtes, les insectes ravageurs et leurs ennemis naturels. *Biotechnol, Agron. Soc. Environ.* 13(2):325-334
- Leroy, P., Francis, F., Verheggen, F., Capella, Q., Fagel, Q., & Haubruge, E., 2008. La coccinelle à deux points (*Adalia bipunctata*), le chrysope commun (*Chrysoperla carnea*) et le syrphpe ceinturé (*Episyrphus balteatus*), nos principaux prédateurs indigènes plutôt que la coccinelle asiatique (*Harmonia axyridis*) exotique et invasive dans nos écosystèmes. *L'Erable du CNB*.
- Logrieco, A., Moretti, A., & Solfrizzo, M., 2009. Alternaria toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. *World Mycotoxin Journal*, 2(2), 129-140.
- Lombaert, E., Boll, R., et Lapchin, L., 2006. Dispersal strategies of phytophagous insects at a local scale: adaptive potential of aphids in an agricultural environment. *BMC evolutionary biology*, 6(1), 75.
- Lopes, Christelle, 2007. Dynamique d'un système hôte-parasitoïde en environnement spatialement hétérogène et lutte biologique Application au puceron *Aphis gossypii* et au parasitoïde *Lysiphlebus testaceipes* en serre de melons (Doctoral dissertation, AgroParisTech).
- MAPM, 2011. Statistique du ministère de l'agriculture et de la pêche maritimes, MAPM, Rabat (MR).
- Marco, F. G., 2015. *Integrated Pest Management of Aphis spiraecola (Hemiptera: Aphididae) in clementines: enhancing its biological control* (Doctoral dissertation).
- Maroc Citrus, la Fédération Interprofessionnelle Marocaine des Agrumes. <http://maroc-citrus.com/statistiques-2/>. Consulté le 18 mai 2018
- Maugard F, Baubet O., 2004. Bilan de la santé des forêts en 2003. Le puceron lanigère du peuplier accentue sa présence dans le Sud-Ouest et étend sa zone d'épidémie vers le Nord. Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et de la Ruralité, Paris.
- Mazih, A., 2015. Status of citrus IPM in the southern Mediterranean basin Morocco, North Africa. *Acta Horti*, 1065, 1079-1104.
- Milne R.G., García M.L. and Grau O., 2000. Genus Ophiovirus. *Citrus psorosis virus* (CPsV). In: Report of the International Committee on Taxonomy of Virus, Academic Press, San Diego, CA, USA, 7, 943-952.

- Milne, R. G., García, M. L., & Moreno, P., 2003. Citrus psorosis virus. *AAB descriptions of plant viruses*, (401).
- Miyazacki M., 1987. Forms and morphs of aphids In: Minks AK et Harrewijn P, Aphids, their biology, natural enemies and control Elsevier, Amsterdam.
- Montagne, C., 1849. *Capnodium*, novum *Fungorum* genus. *Annals and Magazine of Natural History*, 3(18), 520-520.
- Müller, C. B., Williams, I. S., & Hardie, J., 2001. The role of nutrition, crowding and interspecific interactions in the development of winged aphids. *Ecological Entomology*, 26(3), 330-340.
- Navasse, Y., 2016. Spécialisation parasitaire chez les *Aphidiinae*: existe-t-il des parasitoïdes de pucerons généralistes? (Doctoral dissertation, Rennes 1).
- Neimann C.J., and Baayen R.P., 1989. Inhibitory effects of Pnenylserine and Salicylic Acid on Phytoalexin Accumulation in Carnation Infected by *Fusarium. oxysporum f.sp. dianthi*. Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent 54/2a, pp. 435-438.
- Nelson S., 2008. Sooty molds. *Plant Dis* 52:1–6.
- Nibouche, S., Babin, R., Beyo, J., & Escalon, L., 2002. Sensibilité aux organophosphorés et aux carbamates chez le puceron# *Aphis gossypii*# Glover et l'aleurode# *Bemisia tabaci*##(Gennadius) au Nord Cameroun.
- Ohtani, K., Fukumoto, T., Nishimura, S., Miyamoto, Y., Gomi, K., & Akimitsu, K., 2009. Alternaria pathosystems for study of citrus diseases. *Tree For. Sci. Biotechnol*, 3, 108-115.
- ONAGRI, 2018. Un regard sur le marché mondial et Tunisien des Agrumes. <http://www.onagri.nat.tn/uploads/veille/Note-veille-Agrumes-f.pdf>
- Ondet Sophie-Joy, 2008. Limiter Le Developpement De Fumagine Sur Miellat De *Metcalfa Pruinosa*. Test d'efficacité d'huiles essentielles à 0.1% sur fumagine en verger. ARBORICULTURE fiche 3.01.05.10 AB
- Ortiz-Rivas B et Martinez-Torres D., 2010. Combination of molecular data support the existence of three main lineages in the phylogeny of aphids (Hemiptera : Aphididae) and the basal position of the subfamily Lachninae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55 : 305-317.
- Oukhouia M, Sennouni CI, Jabeur I, Hamdani H, Remmal A., 2017. In-vitro Study of Anti-Fusarium Effect of Thymol, Carvacrol, Eugenol and Menthol. *J Plant Pathol Microbiol* 8: 423.

- Panno, S., Davino, S., Tuttolomondo, P., Iacono, G., Davino, M., Rubio, L., & Galipienso, L., 2014. Cítricos ornamentales como vector de enfermedades: riesgos para el comercio internacional. *Actas de Horticultura*, 68, 25-33.
- Patch, E. M., 1914. *Maine aphids of the rose family* (Vol. 233). Maine Agricultural Experiment Station.
- Pavela, R., Vrchotová, N., et Šerá, B., 2009. Repellency and toxicity of three Impatiens species (Balsaminaceae) extracts on *Myzus persicae* Sulzer (Homoptera: Aphididae). *Journal of Biopesticides*, 2(1), 48-51.
- Peccoud, J., Simon, J. C., von Dohlen, C., Coeur d'acier, A., Plantegenest, M., Vanlerberghe-Masutti, F., & Jousselin, E., 2010. Evolutionary history of aphid-plant associations and their role in aphid diversification. *Comptes Rendus Biologies*, 333(6-7), 474-487.
- Powell W. & Pell J. K., 2007. Biological control. In: van Emden H. F. & Harrington R. (eds.), *Aphids as Crop Pests*, Ed. CAB International (UK), 469 - 513.
- Praloran J.-C., 1971. Les agrumes. Ed. G.-P. Maisonneuve et Larose (Paris), 565 p.
- Pryor, B. M., & Michailides, T. J., 2002. Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *Alternaria* late blight of pistachio. *Phytopathology*, 92(4), 406-416.
- Pusz, W., 2009. Morpho-physiological and molecular analyses of *Alternaria* isolated from seeds of *Amaranthus*. *Phytopathologia*. 54 :5-14
- Rai, P. K., & Kumari, L., 2009. Variability in *Alternaria alternata* infecting periwinkle (*Catharanthus roseus*). *Progressive Agriculture*, 9(2), 269-272.
- Rasul Suleria, H. A., Sadiq Butt, M., Muhammad Anjum, F., Saeed, F., Batool, R., & Nisar Ahmad, A., 2012. Aqueous garlic extract and its phytochemical profile; special reference to antioxidant status. *International journal of food sciences and nutrition*, 63(4), 431-439.
- Rauha J-P, Remes S, Heinonen M., 2000. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int J Food Microbiol* 56: 3.
- Remaudière, G., et M. Remaudière, 1997. *Catalogue des Aphididae du monde*. Editions Quae.
- Remmal A., Tantaoui-Elaraki A., Bouchikhi T. & Ettayebi, M., 1993a. Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar Medium. *J. Essent. Oil. Res.* 5: 1179-184.
- Resistants, D. P. G., 1974. La gommose à *Phytophthora* des agrumes au Maroc. *Al-Awamia*, 51, 83-127.

- Roistacher C.N., 2006. EcoPort slide shows on the internet related to citrus and citrus diseases. <http://ecoport.org/ep?SearchType=domainContents&id=9&type=group>
- Rousselin, A., Sauge, M. H., & Jordan, M. O., 2017. Dispositif de de caractérisation simultanée de l'abondance de pucerons et de la croissance végétative d'arbres fruitiers. *Cahier des Techniques de l'INRA*, (90), 1-6.
- Roy, L., Fontaine, S., Hullé, M., Caddoux, L., Brazier, C., Morignat, E. & Simon, J. C., 2013. La résistance aux insecticides chez le puceron vert du pêcher. *Les cahiers de la Recherche. Santé, Environnement, Travail*, (3), 24-26.
- Sangwan, N. K., Verma, B. S., Verma, K. K., & Dhindsa, K. S., 1990. Nematicidal activity of some essential plant oils. *Pest Management Science*, 28(3), 331-335.
- Sekkat, A., 2008. Les pucerons des agrumes au Maroc. Symposium Méditerranéen sur la protection Phytosanitaire des agrumes. 9-11 juin 2008-Kenitra/Rabat-Maroc
- Sekkat, A., 2015. Les pucerons du Maroc: abrégé bioécologique des espèces évoluant sur les cultures. *Revue Marocaine de Protection des Plantes*, (7).
- Semancik J.S., Weathers L.G., 1972. Exocortis disease: An infectious free nucleic acid plant virus with unusual properties. *Virology*, 47, 456 – 466.
- Simmons, E. G., 1999. *Alternaria* themes and variations (236-243): host-specific toxin producers. *Mycotaxon*, 70, 325-369.
- Simmons, E. G., 2007. *Alternaria: An Identification Manual*(No. PA 632.488 S56.)
- Simon J.C., 2007. Quand les pucerons socialisent. *Biofuture* 297 : 38
- Smaili,C., A. Blenzar & J.A. Boutaleb., 2008. Facteurs de mortalité du puceron noir de l'oranger *Toxoptera aurantii* Boyer de Fonscolombe (Hom., Aphididae) sur agrumes dans la région nord du Gharb.
- Srivastava, V. K., & Thakre, R. P., 1996. Management of sooty mould of 'Nagpur' mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco) by chemical fungicides. *Pestology*, 20(8), 20-23.
- Strathdee, A.T., Bale, J.S., Hodgkinson, I.D., Block, W.C., Webb, N.R. et Coulson, S.J., 1993. Identification of three previously unknown morphs of *Acyrtosiphon svalbardicum* - Heikineimo (Hemiptera: Aphididae) on Spitsbergen. *Entomologia scandinavica*, Vol. 24, N°1, p. 43-47.
- Sutherland C. A., 2006. Aphids and their relatives. ED, college of Agriculture and Home Economics. New Mexico
- Sullivan D.J., 2008. Aphids (Hemiptera : Aphididae). *Encyclopedia of Entomology* pp 191-215

- Sutton BC., 1980 ; The Coelomycetes, fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Kew, Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute.
- Tadeo F. R., Cercós M., Colmenero-Flores J. M., Iglesias D. J., Naranjo M. A., Ríos G., Carrera E., Ruiz-Rivero O., Lliso I., Morillon R., Ollitrault P. & Talon M., 2008. Molecular physiology of development and quality of *Citrus*, *Advances in Botanical Research* 47, 147 - 223.
- Taralova, E. H., Schlecht, J., Barnard, K., & Pryor, B. M., 2011. Modelling and visualizing morphology in the fungus *Alternaria*. *Fungal biology*, 115(11), 1163-1173.
- Turpeau E., Hulle M. Et Chaubet B., 2012 - Encyclop'Aphid, Ed. INRA.
- Turpeau E., Hulle M. & Chaubet B., 2015. La morphologie des pucerons et les critères d'identification. Disponible sur le site <https://www6.inra.fr/encyclopedia-pucerons/Quest-ce-qu-un-puceron/Morphologie>. Consulté le 23 février 2017.
- Uzest M, Gargani D, Dombrovsky A, Cazevielle C, Cot D, Blanc S., 2010. The "acrostyle": a newly described anatomical structure in aphid stylets. *Arthropod Struct. Dev.* 39(4):221–29
- Verheggen, F., Diez, L., Detrain, C., & Haubruge, É., 2009. Mutualisme pucerons-fourmis: étude des bénéfices retirés par les colonies d'*Aphis fabae* en milieu extérieur. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 13(2), 235.
- VERNIERE, C., 1992. Le chancre bactérien des agrumes (*Xanthomonas campestris* pv. *citri*) : étude épidémiologique et écologique dans le cadre de l'île de la Réunion. Thèse de Doctorat d'Université. Université de Paris Sud-Orsay, 140 p.
- Vernière, C., Nacibide, F., & Pruvost, O., 2015. Situation sanitaire des agrumes à la Réunion.
- Villemot, I., 1994. Détection de# *Xanthomonas campestris*# pv. *citri*, agent du chancre bactérien des agrumes, par NESTED-PCR: Optimisation de la technique et mise au point d'un protocole quantitatif, application dans le cadre d'une étude d'écologie microbienne.
- VIRUS, M. A., 1961. Maladies et troubles divers affectant les citrus au Maroc.
- Vogel, R., Blondel, L., & Bové, J. M., 1974. Influence de l'Exocortis sur le développement et la production du clémentinier greffé sur# *Poncirus trifoliata*. *Fruits*, 29(5), 367-373.
- Wang F., Yang D., Ren S., Zhang H. and Li R., 1999. Chemical composition of essential oil from leaves of *listea cubeba* and its antifungal activities. *Zhong. Yao. Cai.* 22(8): 400-402.
- Woudenberg, J. H. C., Groenewald, J. Z., Binder, M., & Crous, P. W., 2013. *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology*, 75, 171-212.
- Wu, G. A., Terol, J., Ibanez, V., López-García, A., Pérez-Román, E., Borredá, C., ... & Curk, F., 2018. Genomics of the origin and evolution of *Citrus*. *Nature*, 554(7692), 311.
- Zaouiet. J, 2010. Formation nationale sur la culture d'agrumes.

-Zekri, N., Handaq, N., El Caidi, A., Zair, T., & El Belghiti, M. A., 2016. Insecticidal effect of *Mentha pulegium* L. and *Mentha suaveolens* Ehrh. hydrosols against a pest of citrus, *Toxoptera aurantii* (Aphididae). *Research on Chemical Intermediates*, 42(3), 1639-1649.

Annexe

Eau physiologique 9‰

NaCl9 g

Eau distillée1litre

La composition de milieu de culture :

Le milieu PCA :

Tryptone.....5 g/l,

Extrait de levure.....2,5 g/l,

Glucose 1 g/l, Agar agar bactériologique..... 12 g/l.

Un volume de 20,5 g/l de poudre est mis en suspension dans un litre d'eau distillée, stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 15 min.

Le milieu Sabouraud gélosé:

Extrait de viande.....10 g/l,

Glucose.....20 g/l,

Agar bactériologique.....15 g/l,

Chloramphénicol.....0,5 g/l,

Un volume de 45,5 g/l de poudre est mis en suspension dans un litre d'eau distillée, stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 15 min.

