

REPUBLIQUE DU CAMEROUN
Paix - Travail - Patrie

Université de Yaoundé I
The University of Yaounde I



REPUBLIC OF CAMEROON
Peace-Work-Fatherland

Faculté des Sciences
Faculty of Science

Département de Biochimie
Department of Biochemistry

LABORATOIRE DE PHYTOPROTECTION ET DE VALORISATION DES RESSOURCES VEGETALES
LABORATORY OF PHYTOPROTECTION AND VALORIZATION OF PLANTS RESOURCES

Effets des traitements de semences couplés à l'utilisation des extraits de *Cymbopogon citratus* & *Oxalis barrelieri* comme éliciteurs pour le contrôle de *Bipolaris oryzae* & *Fusarium Moniliforme* et l'amélioration des rendements de production du riz (*Oryza sativa* L.)

*Thèse présentée et soutenue en vue de l'obtention du diplôme de
Doctorat/PhD en Biochimie*

Par:

FOUELEFACK François Romain
Matricule: 00Z158
DEA en Biochimie



Devant le jury composé de :

Président : MOUNDIPA FEWOU Paul, *Professeur, Université de Yaoundé I.*

Rapporteurs : NKENGFACK Augustin Ephrem, *Professeur, Université de Yaoundé I.*
NGUEFACK Julienne, *Maître de Conférences, Université de Yaoundé I;*

Membres : BOUDJEKO Thaddée, *Maître de Conférences, Université de Yaoundé I;*
NGAKOU Albert, *Maître de Conférences, Université de Ngaoundéré;*
NIEMENAK Nicolas, *Maître de Conférences, Université de Yaoundé I.*

Année 2018

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE



UNIVERSITY OF YAOUNDE I
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY

ATTESTATION DE CORRECTION DE LA THESE DE
DOCTORAT/Ph.D

Nous, membres du Jury de thèse de Doctorat/Ph.D de Monsieur **FOUELEFACK François Romain** (Matricule 00Z158) préparée sous la co-direction des Professeurs **NKENGFACK Augustin Ephrem** et **NGUEFACK Julienne** et intitulée "**Effets des traitements de semences couplés à l'utilisation des extraits de *Cymbopogon citratus* & *Oxalis barrelieri* comme éliciteurs pour le contrôle de *Bipolaris oryzae* & *Fusarium Moniliforme* et l'amélioration des rendements de production du riz (*Oryza sativa* L.)**" soutenue le 24 Octobre 2018 en vue de l'obtention du titre de Docteur/Ph.D en Biochimie,

Attestons que toutes les corrections demandées par le Jury de soutenance ont été effectuées.

En foi de quoi la présente attestation lui est établie et délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Examineurs

Prof. Dr Albert Ngakou
16/09/2020


Nicolas NIEMENAK
Professeur
Plant Biotechnology


Pr. BOUDJEKO Thaddée, Ph.D
Maître de Conférences
Université de Yaoundé 1

Président du Jury


Moundipa Fernou Paul D3C.D. Etat
Professeur
Enzymology-Toxicology



Liste Protocolaire

Universite de Yaoundé I Faculté des Sciences Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		The University of Yaoundé I Faculty of Science Division of Programming and follow-up of Academic Affairs
LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS	LIST OF PERMENENT TEACHING STAFF	

ANNEE ACADEMIQUE 2017/2018

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION: 30 Septembre 2018

ADMINISTRATION

DOYEN: AWONO ONANA Charles, Professeur

VICE-DOYEN / DPSAA: DONGO Etienne, Professeur

VICE-DOYEN / DSSE: AJEAGAH Gideon AGHAI, Maître de Conférences

VICE-DOYEN / DRC: ANGUE Monique epe ABOSSOLO, Maître de Conférences,

Chef Division Affaires Académiques, Scolarité et Recherche: MBAZE MEVA'A Luc
Léonard, Professeur

Chef Division Administrative et Financière: NDOYE FOE Marie C. F., Maître de
Conférences

1- DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (38)			
N°	NOMS ET PRENOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
2	BENG née NINTCHOM PENLAP V.	Professeur	En poste
3	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
4	MBACHAM Wilfried	Professeur	En poste
5	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
6	BELINGA née NDOYE FOE Marie C. Florentine	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
7	BIGOGA DIAGA Jude	Maître de Conférences	En poste
8	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
9	FOKOU Elie	Maître de Conférences	En poste
10	KANSCI Germain	Maître de Conférences	En poste
11	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
12	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
13	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
14	WAKAM née NANA Louise	Maître de Conférences	En poste
15	ATOGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
16	EFFA ONOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
17	ACHU Merci BIH	Chargé de Cours	En poste

18	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
19	DJOKAM TAMO Rosine	Chargé de Cours	En poste
20	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Chargé de Cours	En poste
21	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargé de Cours	En poste
22	EWANE Cécile Annie	Chargé de Cours	En poste
23	KOTUE TAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
24	EVEHE BEBANDOUÉ Marie – Solange	Chargé de Cours	<i>En disponibilité</i>
25	LUNGA Paul KAILAH	Chargé de Cours	En poste
26	MBONG ANGIE MOUGANDE Mary Ann	Chargé de Cours	En poste
27	MOFOR née TEUGWA Clautilde	Chargé de Cours	<i>IA4/MINESUP</i>
28	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
29	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste
30	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Chargé de Cours	En poste
31	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargé de Cours	En poste
32	BEBOY EDJENGUELE Sara Nathalie	Chargé de Cours	En poste
33	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
34	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
35	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
36	BEBEE FADIMATOU	Assistant	En poste
37	MBOUCHE FANMOE Marcelline Joëlle	Assistant	En poste
38	TIENTCHEU DJOKAM Léopold	Assistant	En poste
2- DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (B.P.A.) (43)			
1	BILONG BILONG Charles Félix	Professeur	Chef de Département
2	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
3	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
4	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
5	MIMPFOUNDI REMY	Professeur	En poste
6	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
7	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
8	NOLA Moïse	Professeur	En poste
9	TAN Paul Vernyuy	Professeur	En poste
10	TCHUEM TCHUENTE Louis	Professeur	<i>Coord. Progr. MINSANTE</i>
11	AJEAGAH Gidéon AGHAINDOUM	Maître de Conférences	En poste
12	DJIETO Lordon Champlain	Professeur	En poste
13	DZEUFIET DJOMENI Paul Désiré	Maître de Conférences	En poste
14	ESSOMBA née NTSAMA MBALLA	Maître de Conférences	<i>VDRC/Chef dépt FMSB</i>
15	FOTO MENBOHAN Samuel	Maître de Conférences	<i>CT2 MIN. ENERGIE</i>
16	KAMGANG René	Maître de Conférences	<i>C.E. MINRESI</i>
17	KEKEUNOU Sévilor	Maître de Conférences	En poste
18	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste

19	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Maître de Conférences	En poste
20	ALENE Désirée Chantal	Chargé de Cours	En poste
21	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
22	BILANDA Danielle Claude	Chargé de Cours	En poste
23	DJIOGUE Séfirin	Chargé de Cours	En poste
24	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargé de Cours	En poste
25	JATSA MEGAPTCHE Hermine	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
26	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
27	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
28	MONY NTONE Ruth	Chargé de Cours	En poste
29	LEKEUFACK FOLEFACK Guy Benoît	Chargé de Cours	En poste
30	NGOuateu KENFACK Omer BEBE	Chargé de Cours	En poste
31	NGUEGUIM TSOFACK Florence	Chargé de Cours	En poste
32	NGUEMBOCK	Chargé de Cours	En poste
33	TOMBI Jeannette	Chargé de Cours	En poste
34	ATSAMO Albert Donatien	Assistant	En poste
35	ETEME ENAMA Serge	Assistant	En poste
36	KANDEDA KAVAYE Antoine	Assistant	En poste
37	KOGA MANG'Dobara	Assistant	En poste
38	MECHI DONGFACK Mireille Flore	Chargé de Cours	En poste
39	MOUNGANG NGAMENI Luciane	Assistant	En poste
40	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
41	NJUA Clarisse YAFI	Assistant	En poste
42	TADU Zéphirin	Assistant	En poste
43	YEDE	Assistant	En poste
3-DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VEGETALES (B. P. V.) (27)			
1	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
2	AMBANG Zachée	Maître de Conférences	Vice-Doyen/FSE
3	BELL Joseph Martin	Professeur	En poste
4	DJOCGOUE Pierre François	Maître de Conférences	En poste
5	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
6	MOSSEBO Dominique Claude	Maître de Conférences	En poste
7	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	<i>CE / MINRESI</i>
8	ZAPFACK Louis	Maître de Conférences	En poste
9	ANGONI Hyacinthe	Chargé de Cours	En poste
10	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
11	MAHBOU SOMO TOUKAM Gabriel	Chargé de Cours	En poste
12	MALLA Armand William	Maître de Conférences	En poste
13	MBARGA BINDZI Marie Alain.	Maître de Conférences	<i>Inspecteur académ. N°1 MINESUP</i>
14	MBOLO Marie.	Chargé de Cours	<i>Coordo. Programme MINFOF</i>
15	NGALLE Hermine BILLE	Chargé de Cours	En poste
16	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Chargé de Cours	En poste
17	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy Léonard	Maître de Conférences	En poste
18	NGOUO Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste

19	NSOM ZAMO Annie Claude ép. Pial	Chargé de Cours	<i>Expert national./UNESCO</i>
20	TONFACK Libert Brice	Chargé de Cours	En poste
21	TSOATA Esaïe	Chargé de Cours	En poste
22	DJEUANI Astride Carole	Assistant	En poste
23	GONMADGE Christelle	Chargé de Cours	En poste
24	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Assistant	En poste
25	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Assistant	En poste
26	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Assistant	En poste
27	ONANA Jean Michel	Chargé de Cours	En poste
4-DEPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (C.I.) (34)			
1	KETCHA MBADCAM Joseph	Professeur	Chef de Département
2	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
3	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>Doyen/ UDS</i>
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Directeur Cabinet PM</i>
5	LAMINSI Samuel	Professeur	En poste
6	MELO née CHINJE Uphie F.	Professeur	<i>Directeur Mipromal.o</i>
7	AGWARA ONDOH Moïse	Maître de Conférences	<i>Insp Génér.MINPMEA</i>
8	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée mission P.R.</i>
9	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
10	ELIMBI Antoine	Maître de Conférences	En poste
11	NANSEU Charles Péguy	Maître de Conférences	En poste
12	NENWA Justin	Maître de Conférences	En poste
13	NDIKONTAR Maurice KOR	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen/Ubda</i>
14	NGOMO Horace MANGA	Maître de Conférences	<i>S.G. MINESUP</i>
15	YOUNANG Elie	Maître de Conférences	En poste
16	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste
17	BAIZOUMI ZOUA	Chargé de Cours	<i>Chef Cellule MINTOUR</i>
18	CHEUMANI YONA Arnaud	Chargé de Cours	En poste
19	EMADACK Alphonse	Chargé de Cours	En poste
20	GWET Simon – Pierre	Chargé de Cours	En poste
21	KAMGANG YOUBI Georges	Chargé de Cours	En poste
22	KEUMEGNE MBOUGUEM Jean Claude	Chargé de Cours	En poste
23	KONG SAKEO	Chargé de Cours	C. M. Au P. M.
24	NDI Julius NSAMI	Chargé de Cours	En poste
25	NJIOMOU Chantale épouse DJANGANG	Chargé de Cours	En poste
26	NJOYA Dayirou	Chargé de Cours	En poste
27	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargé de Cours	En poste
28	PABOUDAM GBAMBIE Awaou	Chargé de Cours	En poste
29	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste
30	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Assistant	En poste
31	KENNE DEDZO Gustave	Assistant	En poste
32	MBEY Jean Aimé	Assistant	En poste
33	NCHIMI NONO Katia	Assistant	En poste
34	NDOSIRI Bridget NDOYE	Assistant	En poste
5-DEPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (C.O.) (33)			
1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen/ DPSAA

2	GHOGOMU TIH ROBERT RALPH	Professeur	<i>Directeur I.B.A. Foumban</i>
3	MBAFOR Joseph	Professeur	En poste
4	NGADJUI TCHALEU B.	Professeur	<i>Chef de dépt FMBS</i>
5	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	<i>Chef de dépt. UDs</i>
6	NKENGFAK Augustin Ephraïm	Professeur	Chef de Département
7	NYASSE Barthélemy	Professeur	<i>Vice- Recteur UBda</i>
8	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur au MINESUP</i>
9	WANDJI Jean	Professeur	En poste
10	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	<i>CS Rectorat/ UYI</i>
11	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
14	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
15	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
16	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>VRCIE UYII</i>
17	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
18	TCHUENDEM KENMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
19	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
20	AMBASSA Pantaleon	Chargé de Cours	En poste
21	EYONG Kenneth OBEN	Chargé de Cours	En poste
22	FOTSO WABO Ghislain	Chargé de Cours	En poste
23	KAMTO Eutrophe Ledoux	Chargé de Cours	En poste
24	MKOUNGA Pierre	Chargé de Cours	En poste
25	NGO MBING Joséphine	Chargé de Cours	En poste
26	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Chargé de Cours	En poste
27	NOTE LOUGBOT Olivier	Chargé de Cours	En poste
28	OUAHOUE WACHE Blandine Marlyse	Chargé de Cours	En poste
29	TABOPDA KUATE Turibio	Chargé de Cours	En poste
30	TAGATSING FOTSING Maurice	Chargé de Cours	En poste
31	ZONDEGOUNBA Ernestine	Chargé de Cours	En poste
32	NGINTEDO Dominique	Assistant	En poste
33	NGOMO Orléans	Assistant	En poste
6-DEPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (28)			
1	TCHUENTE Maurice	Professeur	<i>PCA UYDE II</i>
2	FOTSO Pauline Laure	Professeur	<i>Député à l'Assemblée National.e</i>
3	FOUDA NDJODO Marcel	Professeur	<i>IGA-MINESUP/Chef Dpt ENS</i>
4	ATSA ETOUNDI Roger	Maître de Conférences	<i>Chef Division MINFOPRA</i>
5	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
6	CHEDOM FOTSO Donatien	Chargé de Cours	En poste
7	KOUOKAM KOUOKAM Etienne Appolin	Chargé de Cours	En poste
8	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
9	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
11	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste

12	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste
13	ABESSOLO ALO'O Gislain	Assistant	En poste
14	AMINOU Halilou	Assistant	En poste
15	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
16	DJAM Xaviera Youth KIMBI	Assistant	En poste
17	DJOUWE MEFFEJA Merline Flore	Assistant	En poste
18	EBELE Serge	Assistant	En poste
19	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
20	KAMDEM KENGNE Christiane	Assistant	En poste
21	KAMGUEU Patrick Olivier	Assistant	En poste
22	KENFACK DONGMO Clauvice Viliane	Assistant	En poste
23	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Assistant	En poste
24	MAKEMBE S. Fritz Oswald	Assistant	En poste
25	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistant	En poste
26	MONTHÉ DJIADEU Valéry Martial	Assistant	En poste
27	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
28	TAPAMO KENFACK Hyppolite	Assistant	En poste
7-DEPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (35)			
1	BEKOLLE David	Professeur	<i>Vice-Recteur UN</i>
2	BITJONG NDOMBOL	Professeur	En poste
3	DOSSA COSSY Marcel	Professeur	En poste
4	AYISSI Raoult Domingo	Maître de Conférences	En poste
5	EMVUDU WONO Yves S.	Maître de Conférences	<i>Chef dept info Chef Cellule. MINESUP</i>
6	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
7	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	En poste
8	TCHAPNDA NJABO Sophonie Blaise	Maître de Conférences	En poste
9	TONGA Marcel	Maître de Conférences	En poste
10	WAMON François	Maître de Conférences	Chef de Département
11	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	En poste
12	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
13	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
14	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste
15	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
16	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
17	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste
18	MBEHOU Mohamed	Chargé de Cours	En poste
19	MBELE BEDIMA Martin	Chargé de Cours	En poste
20	MBIANDA Gilbert	Chargé de Cours	En poste
21	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
22	NGUEFACK Bertrand	Chargé de Cours	En poste
23	NGUIMTSA Charles	Chargé de Cours	En poste
24	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
25	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
26	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
27	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste
28	TIAYA TSAGUE N. Anne- Marie	Chargé de Cours	En poste

29	BOGSO Antoine M	Assistant	En poste
30	DJIADEU NGAHA Michel	Assistant	En poste
31	DOUANLA YONTA Hermann	Assistant	En poste
32	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
33	NIMPA PEFOUKEU Romain	Assistant	En poste
34	TANG AHANDA Barnabé	Assistant	<i>Chef Serv. MINPLAMAT</i>
35	TETSADJIO TCHILEPECK Mesmin Erick	Assistant	En poste
8-DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MB) (13)			
1	ETOA François-Xavier	Professeur	Recteur UD/Chef de Département
2	ESSIA NGANG Jean Justin	Maître de Conférences	<i>Chef de Division recherche IMPM</i>
3	NYEGUE Maximilienne Ascension	Maître de Conférences	En poste
4	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
5	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste
6	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
7	BOYOMO ONANA	Chargé de Cours	En poste
8	ENO Anna Arey	Chargé de Cours	En poste
9	ESSONO OBOUGOU Germain Gabriel	Chargé de Cours	En poste
10	RIWOM Sara Honorine	Chargé de Cours	En poste
11	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
12	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargé de Cours	En poste
13	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste
9-DEPARTEMENT DE PHYSIQUE (PH) (39)			
1	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	Vice-Doyen/DRC
2	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	Chef de Département
3	NJOMO Donatien	Professeur	En poste
4	TABOD Charles TABOD	Professeur	<i>Doyen/Ubda</i>
5	WOAFO Paul	Professeur	En poste
6	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	En poste
7	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
8	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
9	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	<i>Dir.Gén. B. MEKIM</i>
10	BEN- BOLIE Germain Hubert	Maître de Conférences	En poste
11	DJUIDJE KENMOE Gemaine épse ALOYEM KAZE	Maître de Conférences	En poste
12	EKOBENA FOUA Henri Paul	Maître de Conférences	<i>Chef Dépt UN</i>
13	NANA NBENDJO Blaise	Maître de Conférences	En poste
14	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Maître de Conférences	<i>Chef Serv. MINRESI</i>
15	NOUAYOU Robert	Maître de Conférences	En poste
16	OUMAROU BOUBA	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
17	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
18	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste
19	BODO Bernard	Chargé de Cours	En poste
20	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
21	EYEBE FOUA Jean Sire	Chargé de Cours	En poste
22	FEWO Serge Ibraïd	Chargé de Cours	En poste

23	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	En Poste
24	HONA Jacques	Chargé de Cours	En poste
25	MBANE BIOUELE	Chargé de Cours	En poste
26	MBINACK Clément	Chargé de Cours	En Poste
27	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
28	NDOP Joseph	Chargé de Cours	En poste
29	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	<i>Dir.acad/Univ.Int.Etat Cam-Congo</i>
30	SAIDOU	Chargé de Cours	En poste
31	SIMO Elie	Chargé de Cours	En poste
32	TABI Conrad Bertrand	Chargé de Cours	En poste
33	TCHOFFO Fidèle	Chargé de Cours	En poste
34	VONDOU DERBETINI Appolinaire	Chargé de Cours	En Poste
35	WAKATA née BEYA Annie	Chargé de Cours	<i>Chef Serv. MINESUP</i>
36	WOULACHE Rosalie Laure	Chargé de Cours	En poste
37	ABDOURAHIMI	Assistant	En Poste
38	CHAMANI Roméo	Assistant	En Poste
39	ENYEGUE A NYAM Françoise épouse BELINGA	Assistant	En Poste
10- DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (S.T.) (42)			
1	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
2	BITOM Dieudonné Lucien	Professeur	<i>Doyen / UN</i>
3	NDJIGUI Paul-Désiré	Professeur	<i>Chef de dépt CSMM</i>
4	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Maître de Conférences	En poste
5	KAMGANG Pierre	Maître de Conférences	En poste
6	MEDJO EKO Robert	Maître de Conférences	<i>Dir/IUT Bois Mbal.mayo</i>
7	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/MINMIDT</i>
8	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Maître de Conférences	En poste
9	NGOS III Simon	Maître de Conférences	<i>D.A.A.C./UM</i>
10	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
11	NKOUMBOU Charles	Maître de Conférences	En poste
12	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
13	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Cellule MINTP</i>
14	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Chargé de Cours	Chef DAASR
15	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
16	BISSO Dieudonné	Chargé de Cours	<i>Directeur Projet Barage Memve'ele</i>
17	EKOMANE Emile	Chargé de Cours	<i>Délégué Régional./MINMIDT</i>
18	ESSONO Jean	Chargé de Cours	<i>Sous Directeur MINMIDT</i>
19	GANNO Sylvestre	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
20	GHOGOMU Richard TANWI	Chargé de Cours	<i>Chef de Dépt IMIP/Maroua</i>
21	LAMILEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
22	MBIDA YEM	Chargé de Cours	<i>CS/LABOGENIE</i>

23	MINYEM Dieudonné	Chargé de Cours	<i>Chef de Dépt IMIP/Maroua</i>
24	MOUAFU Lucas	Chargé de Cours	En poste
25	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargé de Cours	En poste
26	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargé de Cours	En poste
27	NGUEUTCHOUA Gabriel	Chargé de Cours	CEA MINRESI
28	NJOM Bernard de Lattre	Chargé de Cours	En poste
29	NYECK Bruno	Chargé de Cours	<i>S/ Directeur/MINMID T</i>
30	ONANA Vincent	Chargé de Cours	En poste
31	TCHAKOUNTE Jacqueline ép. NUMBEM	Chargé de cours	<i>CEA MINRESI</i>
32	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Chargé de Cours	En poste
33	ZO'O ZAME Philémon	Chargé de Cours	<i>S.G. MINTP</i>
34	ANABA ONANA Achille Basile	Assistant	<i>En Poste</i>
35	BINELI BETSI Thierry Olivier	Assistant	<i>En Poste</i>
36	FUH Calistus Gentry	Assistant	<i>Sec.d'Etat/ MINMIDT</i>
37	METANG Victor	Assistant	<i>En poste</i>
38	NOMO NEGUE Emmanuel	Assistant	En poste
39	TCHAPTCHET TCHATO De Pesquidoux I	Assistant	En poste
40	TEHNA Nathanaël	Assistant	<i>CS/ MINMIDT</i>
41	TEMGA Jean Pierre	Assistant	En poste

Répartition chiffrée des enseignants permanents par Département (30 Nombre, 2017)

Département	Nombre d'enseignants				Total
	Pr	MC	CC	ASS	
BC	6 (1)	11 (5)	18 (12)	3 (2)	38 (19)
BPA	10 (0)	9 (1)	14 (6)	10 (4)	43 (11)
BPV	1 (0)	7 (0)	12 (3)	7 (6)	27 (9)
C.I.	6 (1)	9 (1)	14 (3)	5 (2)	34 (7)
C.O.	9 (0)	10 (3)	12 (3)	2 (0)	33 (6)
IN	3 (1)	2 (0)	7 (0)	16 (4)	28 (5)
MA	3 (0)	7 (0)	18 (1)	7 (0)	35 (1)
MB	1 (0)	4 (1)	6 (2)	2 (0)	13 (3)
PH	8 (0)	10 (1)	18 (2)	3 (1)	39 (4)
ST	4 (0)	10 (1)	20 (4)	8 (0)	42 (5)
Total	51 (3)	79 (13)	144 (33)	67 (21)	335 (70)

Soit un total de : 335 (70) dont
- Professeurs 51 (3)
- Maîtres de Conférences 78 (13)
- Chargés de Cours 144 (33)
- Assistants 67 (22)
- () = Nombre de femmes.

Le Doyen de la Faculté des Sciences

Pr. AWONO ONANA Charles

Dédicace

Je dédie cette Thèse :

À l'Eternel Dieu,

Toi qui, balaie les obstacles rencontrés sur le chemin; qui donne la force de résister face aux épreuves quotidiennes.

A mes parents, TAZANOU Martin et Feu DONGUEU Gisèle.

A mes Géniteurs ZEUFACK Delphine et Feu père SONFACK Victor.

A tous les membres de ma famille sans exception.

Remerciements

Le présent travail a été réalisé dans les **Laboratoires** de: Phytoprotection et de valorisation des ressources végétales; Phytobiochimie et d'étude de plantes médicinales de l'Université de Yaoundé I; Phytopathologie de l'IRAD de Nkolbisson; Chimie Organique Structurale et Analytique de l'Université de Yaoundé I; Molecular biology (Bengal institute of Technology, Kolkata India); Biochemistry (Science College of Kolkata University, India); Biochemistry unit (Bose Institute Kolkata); Biology of Secondary Metabolism in Plant Microbe Interaction (College of Agronomy and Biotechnology of China Agricultural University, Beijing) et la collaboration de la Danish Seed Health Centre for Developing Countries (DSHC) of Danemark. Il a nécessité l'assistance de plusieurs personnes. J'exprime ici mes remerciements les plus sincères à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail, plus particulièrement:

Au **Pr. Nguéfack Julienne** qui grâce à sa rectitude scientifique, sa disponibilité inconditionnelle et ses conseils a dirigé de bout en bout le présent travail. Recevez ici professeur, l'expression de ma fierté inestimable.

Au **Pr. Nkengfack Augustin Ephrem**, Chef de Département de Chimie Organique de l'Université de Yaoundé I, qui a accepté superviser ce travail.

Au **Pr. Moundipa Fewou Paul**, Chef de Département de Biochimie.

Aux **Pr. Boudjeko Thaddée; Pr. Fekam Boyom Fabrice; Dr. Kuaté Jean**, pour avoir permis la réalisation d'une partie de ce travail dans leurs laboratoires

Au **Pr. Zhou Ligang et son équipe** de la College of Agronomy and Biotechnology of China Agricultural University qui est le premier à m'avoir accueilli à l'international.

Au **Dr. Tapan Kumar Pal**, de la Bengal institute of Technology, Kolkata, avec qui nous avons discuté sur la partie intitulée «induction de la résistance» de ce travail.

A **Katia Lena Wide, Pr. Hans Jørgen Lyngs Jørgensen, Dr. Ralf Vögele**, de la DSHC, pour leur contribution inestimable sur la partie «Biologie de l'infection» de ce travail.

A **tous les enseignants** du Département de Biochimie et ceux des autres Départements qui sont intervenus dans les enseignements tout au long de mon cursus académique.

Aux **membres de la "Crop Protection and Seed Health Unit"** pour leurs interventions multiformes. Recevez ici ma sincère gratitude.

A tous mes aînés du Laboratoire de Phytobiochimie et d'étude des plantes médicinales de l'Université de Yaoundé I, en particulier **Dr. Dongmo Blaise, Dr. Dakole Charles, Fotio**

Daniel, Guemjom Emilie, Dr. Nguikwie Sylvie, Dr. Tamgue Ousman, Dr. Ngouana Vincent; Il est certain que vos idées /conseils ont influencé/orienté ce travail.

Aux **dirigeants de l'université de Maroua**, notamment le Recteur, le Doyen de la Faculté des Sciences, les Vice -Doyens et le Chef de Département des Sciences Biologiques.

A **tous les collègues de l'université de Maroua** en particulier; **Pr. Bouba Armand, Pr. Ponka Roger, Dr. Beppe Jean; Dr. Tenyang Noel, Dr. Fameni, Mawouma Saliou, Tonleu Jean, Dountsop Armand.**

Au **Dr. Akono Nantia Edouard** de l'Université de Bamenda, pour ses conseils.

Au **Dr. Mkounga Pierre et les membres** du Laboratoire de Chimie Organique Structurale et Analytique l'Université de Yaoundé I pour leur collaboration dans la partie «chimie».

Au **Dr. Akindeh Mbuh Nji**, Chargé de cours au Département de Biochimie de l'Université de Yaoundé I, qui m'a permis de mieux comprendre l'analyse statistique.

La TWAS, à travers la bourse, TWAS Fellowship for Research and Advanced Training (FR number: 3240224110 of Decembre11th 2009) qui a favorisé mes premiers pas à l'international, me permettant aussi d'avoir accès à beaucoup de documentation.

La FICCI: à travers la bourse, CV Raman International Fellowship for African Researchers, 2016 (reference INT/NAI/CVRF/2014 of July 15th 2016) qui a permis la réalisation de la partie «induction de la résistance» de ce travail.

A mon épouse, **Anague Corinne** et à mon fils **Dongmo Oliver**, pour leur amour, leur bienveillance et les encouragements permanents.

A Tous mes camarades de promotion en thèse en particulier **Dr. Choumessi Aphrodite et Dr. Donkeng Valérie** pour les encouragements mutuels.

A mes cadets de laboratoire: **Dr. Galani Joseph, Petchayo Sandrine, Ndonkeu Ghislaine, Fogwe Tembi, Mekam Pascal, Dr. Tankeu Sidonie, Mezatio Valérie, Kenfack Ghyslaine, Dongmo Albert, Azah Rene et Djoufack Molière** qui ont très souvent sacrifié une partie de leur temps pour ce travail.

A tous mes amis, et membres de la Friendship Forever, en particulier **Djiomo Cyrille, Bativou Christian, Takala Kuya Georges Moukous Olive et Dr. Kamda Aristide**, pour leur collaboration dans la recherche de la documentation utile à la réalisation de ce travail.

Aux membres de ma famille nucléaire, en particulier, **Manekem Julienne, Boufack Thomas, Kendzo Francis, Ngouanet patience, et Sonfack michèle;** mes familles maternelles et paternelles; ma belle-famille **en particulier Ngoujou Suzanne et Feu Dongmo David** pour leurs conseils, leurs contributions matérielles multiformes.

A tous, inclus ceux que j'aurais oublié de citer, je vous dis merci!

Sommaire

Liste Protocolaire	i
Dédicace.....	x
Remerciements	xi
Sommaire	xiii
Résumé	xvii
Abstract	xix
Liste des abréviations.....	xxi
Liste des Tableaux.....	xxiv
Liste des Figures	xxvi
Introduction générale.....	1
Problématique et objectifs	4
I. Revue de la littérature.....	8
I.1. Généralités sur le riz.....	8
I.1.1. Introduction	8
I.1.2. Origine et domestication du riz	8
I.1.3. Classification du riz.....	9
I.1.4. Botanique du riz	10
I.1.4. Ecologie et distribution du riz	11
I.1.5. Ecosystèmes de la culture du riz et système de production	11
I.1.6. Etapes et cycle de la production du riz.....	13
I.1.7. Production, marché international et consommation du riz.....	13
I.1.8. Importance, et usages du riz	14
I.2. Le riz au Cameroun	15
I.2.1. Historique de la culture du riz au Cameroun.....	15
I.2.2. Production et consommation du riz au Cameroun	16
I.2.3. Types variétaux de riz cultivés Cameroun	17
I.3. Différentes contraintes de la riziculture	18

I.3.1. Contraintes de production du riz	18
I.3.2. Les Maladies du riz et leurs agents pathogènes	18
I.4. Méthodes de lutte contre les champignons phytopathogènes	28
I.4.1. Introduction	28
I.4.2. Contrôle par la quarantaine	29
I.4.3. Contrôle par sanitation et par les méthodes culturales	29
I.4.4. Contrôle par les agents physiques et mécaniques	30
I.4.5. Contrôle biologique par les microorganismes.....	31
I.4.6. Contrôle génétique et par les organismes transgéniques.....	32
I.4.7. Contrôle chimique par les pesticides.....	33
I.4.8. Contrôle naturel par les extraits de plantes (Biopesticides)	34
I.4.9. Contrôle par immunisation.....	34
I.5. Les plantes comme sources de substances naturelles biologiquement actives ..	43
I.5.1. Définitions et origine.....	43
I.5.2. Procédés d'obtention et de caractérisation des métabolites secondaires des plantes .	43
I.5.3. Types de métabolites secondaires originaires des plantes et leurs usages	44
I.5.4. <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf.....	46
I.5.5. <i>Oxalis barrelieri</i> L.	48
I.6. Travaux antérieurs.....	50
II. Matériel et Méthodes	51
II.1. Matériel.....	51
II.2. Méthodes.....	51
II.2.1. Récolte, identification et conditionnement des Plantes	51
II.2.2. Isolement des souches fongiques sur les semences de riz	51
II.2.3. Extraction et fractionnement des huiles essentielles.....	52
II.2.4. Evaluation de l'activité antifongique des extraits de <i>C. citratus</i> et d' <i>O. barrelieri</i> et du fongicide	55
II.2.5. Test <i>in vitro</i> et en serre de l'effet du traitement des semences en solution salée et par les extraits de plantes.....	56
II.2.6. Evaluation des marqueurs d'induction de la résistance, de la sévérité de la maladie des taches brunes et de la biologie de l'infection.	59

II.2.7. Description des essais en champ.....	64
II.2.8. Caractérisation chimique des extraits de plantes	75
III. Résultats et Discussion	87
III.1. Caractéristiques des extraits de <i>C. citratus</i> & d' <i>O. barrelieri</i>	87
III.1.1. Caractéristiques des HE et des extraits aux solvants.....	87
III.1.2. Analyse des caractéristiques des extraits de plantes.....	88
III.2. Activités antifongiques des extraits de plantes, du fongicide de synthèse et analyse des données.....	89
III.2.1. Activités antifongiques des extraits de plantes et du fongicide de synthèse	89
III.2.2. Analyse des données des activités antifongiques des extraits de plantes et du fongicide de synthèse.....	97
III.3. Effets du tri des semences de riz en solution NaCl et/ou couplés aux traitements par les extraits aux solvants sur; la germination, la vigueur, l'incidence de <i>B. oryzae</i> et <i>F. moniliforme</i>	101
III.3.1. Effets du tri des semences de riz en solution NaCl couplés aux traitements par les extraits aux solvants.	101
III.3.2. Analyse des résultats des effets du tri des semences de riz en solution NaCl couplés aux traitements par les extraits aux solvants.	110
III.4. Effets des extraits de plantes sur les marqueurs d'induction de la résistance, la croissance du riz, la sévérité de l'helminthosporiose et la biologie de l'infection.	112
III.4.1. Effets des extraits de plantes sur la germination et les marqueurs d'induction de la résistance	112
III.4.2. Effets des extraits de plantes sur; la croissance du riz, la sévérité de l'helminthosporiose et la biologie de l'infection par <i>B. oryzae</i>	122
III.4.3. Analyse des données des effets des extraits sur les marqueurs d'induction de la résistance, la croissance du riz, la sévérité de l'helminthosporiose et de la biologie de l'infection	128
III.5. Effets des traitements sur les paramètres de production en champ.....	134
III.5.1. Effets des traitements sur les paramètres de production en riziculture irriguée et en riziculture pluviale.....	134
III.5.2. Analyse des résultats obtenus des expérimentations en champ.....	154
III.6. Composition chimique des extraits plantes utilisés et discussion	160
III.6.1. Compositions chimiques des extraits de <i>C. citratus</i> et <i>O. barrelieri</i>	160

III.6.2. Analyse des résultats phytochimiques des extraits de plantes.....	175
Conclusion.....	182
Perspectives.....	185
Références bibliographiques	186
Annexes.....	a
Publication issue de la thèse	A

Résumé

Dans le présent travail, les fractions de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus*, les extraits aqueux et les extraits éthanoliques de *Calistemon citratus* et d'*Oxalis barrelieri* ont été testés *in vitro* comme biofongicides contre *Bipolaris oryzae* et *Fusarium moniliforme*, deux champignons phytopathogènes du riz. Les effets des traitements par les extraits de *C. citratus* et d'*O. barrelieri*, couplés au tri des semences de riz en solution de NaCl, ont été déterminés par les mesures; du taux de germination, de la vigueur, de l'émergence, du taux d'infestation des semences par *B. oryzae*/*F. moniliforme* et des paramètres de production du riz en champ. La caractérisation des phytochimique des extraits de plantes, l'étude de leur potentiel d'induction de la résistance chez les plants de riz et la biologie de l'infection par *B. oryzae* ont été effectués.

Des effets majeurs significatifs ($p < 0,05$) des extraits, de la concentration et de l'interaction de ces deux paramètres ont été observés vis-à-vis de l'inhibition de *B. oryzae* et *F. moniliforme*. Ainsi, l'activité antifongique a été fonction de l'extrait et dose dépendante. Les fractions d'HE obtenues des plantes sèches de *C. citratus* (CS₁ CS₂ et CS_M) ont été moins actives que celles des plantes fraîches (CF₁ CF₂ et CF_M). Les fractions d'HE collectées pendant la première heure suivant le début de l'écoulement des principes actifs (CF₁ et CS₁) ont été plus actives que celles qui ont été collectées après une heure (CF₂ et CS₂). Les extraits aqueux (EAc et EAo) ont été en général moins actifs comparés aux extraits éthanoliques (EEc et EEO); parmi ces extraits, l'extrait éthanolique de *C. citratus* a présenté le plus grand potentiel inhibiteur à 10000 ppm vis-à-vis *F. moniliforme* (58,51%) et *B. oryzae* (55.9%).

Les semences de riz sélectionnées (triées) en solution NaCl 20% ont eu une masse plus importante; un potentiel germinatif 12,5% supérieur à celui des semences sélectionnées à l'eau et 19,5% supérieur à celui des semences non triées. Une relation linéaire positive et significative ($Rho(78) = 0,427^{**}$, $p < 0,01$) a été observée entre la masse des semences de riz et leur germination. Les extraits à l'éthanol d'*O. barrelieri* et de *C. citratus* couplés au tri des semences en solution NaCl 20%, ont stimulé à un degré comparable, la germination des semences de riz de l'ordre de 15,15-22,06% sur blotter et de 11,1-16,2% en serre. Les concentrations 1% des extraits éthanoliques de *C. citratus* et d'*O. barrelieri* ont été les meilleures pour le traitement des semences de riz et ont réduit l'infestation par *B. oryzae* et *F. moniliforme* de 25,25% et 9,83% respectivement.

Les études de l'induction de la résistance montrent que; les concentrations en protéines chez les plants de riz témoins (T0) ont été supérieures à celles des plants de riz dont les semences ont été uniquement triées en solution NaCl 20% (T1), et à celles des plants traitées avec les extraits d'*O. barrelieri*/*C. citratus* (T2, T3 et T4). Les plants de riz témoins (T0) ont gardé des concentrations en groupement thiols, significativement faibles, comparées aux autres traitements (T1, T2, T3 et T4) après évaluation aux 14^{ième}, 21^{ième} et 28^{ième} jours. Dans l'ensemble, les activités des enzymes marqueurs d'induction de la résistance; β -1,3-glucanase, polyphénols oxydases, amylases et peroxydases des plants de riz traités avec les extraits de *C. citratus* ont été significativement supérieures à celles des plants de riz témoins; aux 14^{ième}, 21^{ième} et 28^{ième} jours; celles des plants de riz traités aux extraits d'*O. barrelieri* ont eu les mêmes tendances qu'avec *C. citratus*, à l'exception de l'activité des peroxydases. Le score de la gravité de la maladie (helminthosporiose) a montré que les plants de riz non traités présentaient des symptômes 4 à 5 fois plus élevés que les plants de riz traités par les extraits.

Les études de la biologie de l'infection par *B. oryzae*, faites au moyen de la microscopie n'ont révélé que des différences significatives de germination des spores de *B. oryzae*, entre les plants de riz traités aux extraits de *C. citratus* et les non traités, au stade précoce de l'infection.

Dans les essais en champ; en riziculture pluviale, on peut noter qu'à une exception près tous les traitements ont été statistiquement comparables pour ce qui est des variables; degré de tallage et panicule/levée. La production/levée a scindé les traitements en trois groupes significativement différents les uns des autres; T₄ (8,06^c) et T₃ (7,89^c) d'une part T₂ (6,91^b) et T₁ (6,90^b) d'autre part et T₀ (4,75^a). La production/tallage et la production/panicule ont été également scindées en trois groupes significativement différents; cependant avec une répartition un peu différente; T₃ et T₂ > T₄ et T₁ > T₀. En riziculture irriguée, l'émergence (64,4%) des semences traitées aux extraits d'*O. barrelieri* (T₂, T₃, T₄) a été significativement plus importante que celle (61,8%) de T₁ (uniquement trié en solution NaCl), significativement plus importante que celle des témoins T₀ (38,7%). T₄ (566,1^bg/m²) et T₃ (557,6^bg/m²) ont eu de meilleurs rendements; ceux-ci ont été significativement différents de T₀ (483,1^ag/m²) mais ne l'ont pas été par comparaison à T₁(519,3^{ab}g/m²) et T₂(522^{ab}g/m²). À la floraison tout comme à la maturité, la sévérité de *B. oryzae* a été moindre pour les lots ayant reçus les traitements aux extraits de plantes (T₃, T₄ et T₂).

Toutes les fractions d'HE de *C. citratus* contiennent le myrcène, le limonène, l' α – gurjunène, le néral et le géranial, mais à des proportions différentes. Les constituants prédominants de toutes les fractions d'HE ont été le Néral (19,95 - 41,56%) et le géranial (18,79 - 45,64%); avec une prédominance du néral dans les fractions CS₁, CS₂, CS_M, CF_M et une prédominance du géranial dans les fractions CF₁ et CF₂. Certains composés à l'instar du carvacrol acétate et du farnésol (2E, 6Z) se sont retrouvés uniquement dans les fractions des HE issues des plantes fraîches de *C. citratus* (CF₁, CF₂, et CF_M). Le cédrool, l'hexahydrofarnesyl acétone, le γ -déalactone, le β -bisabolol, l' α –muurolol, le cavacrol et le β -eudesmol ont été détectés à de faibles proportions seulement dans les fractions d'HE collectées entre la 61^{ème} minute à la fin de l'hydrodistillation (CF₂ et CS₂). Les extraits éthanoliques de *C. citratus* et d'*O. barrelieri* (EEc et EEo) ont été significativement ($p < 0,05$) plus concentrés en; composés phénoliques, flavonoïdes et sucres totaux comparés aux extraits aqueux (EAc et EAo), qui avaient plutôt une teneur en protéines significativement plus importante. La quercétine, la catéchine, le catéchol, l'acide L-ascorbique et l'acide iso ascorbique sont présents dans tous les extraits aux solvants (EAc, EAo, EEc et EEo) mais en concentrations plus élevées dans les extraits éthanoliques (EEc et EEo); EEc avec 16,04 μ g/mg a été le plus riche en composés phénoliques identifiés. Le fractionnement bio-guidé de l'extrait à l'éthanol de *C. citratus* a permis d'identifier le 3-O- β -D-glucopyranosyl- α -amyrine et le 3-O- β -D-glucopyranosyl-uvaole.

Au terme de ce travail il ressort que; le tri des semences de riz avec le NaCl 20% couplé aux traitements avec les extraits aqueux et éthanoliques de *C. citratus* et d'*O. barrelieri* (EEo, EEc, EAc et EAo) rend la semence de riz plus homogène, améliore l'état sanitaire et la germination, maintient la vigueur des plantules, est susceptible d'induire certains marqueurs de résistance contre les maladies; ce qui augmente les rendements de production du riz.

Mots clés: Extraits de plantes, Caractérisation chimique, Biofongicides, Eliciteurs, Riz, Paramètres de production

Abstract

In the present study, the essential oil (EO) fractions of *Cymbopogon citratus*, the aqueous and ethanolic extracts of *C. citratus* (AEc, EEc) and *Oxalis barrelieri* (AEo, EEo) were first tested *in vitro* as biofungicides against *Bipolaris oryzae* and *Fusarium moniliforme*, two rice seed borne fungi. Then, the effects of the sorting out rice seeds with NaCl solution coupled to treatment with *O. barrelieri* and *C. citratus* extracts were determined through the evaluation of the germination rate, vigor, emergence, seed rate infestation by *B. oryzae*/*F. moniliforme* and yield components under field conditions. The induction potential of resistance in rice by *O. barrelieri* and *C. citratus* extracts, the characterization of their chemical compositions and the biology of infection of *B. oryzae* were studied.

Significant major effects ($p < 0.05$) of the extracts, the concentration and the interaction between both factors were observed with respect to the growth inhibition of *B. oryzae* and *F. moniliforme*. The antifungal activity varied with the extract that was dose dependent. Essential Oil fractions obtained from dried plants of *C. citratus* (CS₁, CS₂ and CS_M) were less active than those of fresh plants (CF₁ CF₂ and CF_M). The EO fractions collected within the first 60 minutes starting from the first drop deposit of essential oil (CF₁ and CS₁) were more active than the fractions collected after one hour (CF₂ and CS₂). Among the solvent extracts, the aqueous extracts (EA_c and EA_o) were generally less active than the ethanolic extracts (EE_c and EE_o); the ethanolic extract of *C. citratus* at 10000 ppm showed the highest inhibitory effect, with 58.51% and 55.9% growth inhibition of *F. moniliforme* and *B. oryzae* respectively. The rice seeds sorted out with 20% NaCl solution had a greater mass (quantify); a germination rate of 12.5 folds higher as compared to seeds sorted in with water and 19.5 folds higher than that of unsorted seeds. A moderate positive and significant linear relationship ($Rho(78) = 0.427$, $p < 0.01$) was observed between weight and germination of rice seeds. The sorting out of rice seeds in 20% NaCl solution coupled with treatment in ethanolic extracts of *O. barrelieri* and *C. citratus* stimulated rice seed germination at a comparable degree; 15.15 - 22.06% from the top of paper method and 11.1-16.2% from sand method in green house trials. Rice seed treated with 1% ethanolic extract, exhibited the best germination and reduced the infestation of *B. oryzae* and *F. moniliforme* by 25.25% and 9.83% respectively.

Induced resistance studies showed that, protein concentrations in rice plants from untreated seeds (T0) were higher than those of rice plants from seeds were sorted out in 20% NaCl solution (T1), and those of rice plants from seeds treated and sprayed with *O. barrelieri* / *C. citratus* extracts (T2, T3 and T4). With one exception, rice plants from treatment T0, kept their thiol concentrations significantly lower compared to treatments T1, T2, T3 and T4 at the 1st, 2nd and 3rd evaluation. In general, the activities of enzyme as markers of induced resistance such as; β -1,3-glucanase, polyphenol oxidases, amylases and peroxidases of rice plants treated with *C. citratus* extracts were significantly greater than those of untreated rice plants at the the 1st, 2nd and 3rd evaluation. The activities of rice plants treated with *O. barrelieri* extracts had the same pattern as with *C. citratus*, except for the activity of peroxidases. The disease severity score (brown spot disease) showed 4-5 times more symptoms in untreated rice plants than extract-treated rice plants. Studies of the biology of *B. oryzae* infection through the microscope revealed significant differences in the spores germination of *B. oryzae* between rice plants treated with *C. citratus* extracts and untreated ones, only during early stages infections.

Under field conditions in rainfed upland system, plant extract treatments had no significant effect on tillering ability and number of panicles. The production/emergence split the treatments into three groups significantly different from one another; T₄ (8.06^c) and T₃ (7.89^c) on one hand, T₂ (6.91^b) and T₁ (6.90^b) on the other hand, and T₀ (4.75^a). Production/tillering and production/panicle were also split into three different groups, however with a slightly different distribution; T₃ and T₂ > T₄ and T₁ > T₀. In the irrigated system, the emergence (64.4%) of seeds treated with *O.barrelieri* extracts (T₂, T₃, T₄) was significantly greater than that (61.8%) of T₁ (only sorted in 20% NaCl solution), significantly higher than that of untreated (T₀) seeds (38.7%). T₄ (566.1^bg/m²) and T₃ (557.6^bg/m²) had better yields; these yields were significantly different from that of T₀ (483.1^ag/m²), but were not different from those of T₁ (519.3^{ab}g/m²) and T₂ (522^{ab}g/m²). At the flowering as well as at the maturity stage of rice development, the severity of *B. oryzae* was lower for plots that received plant extracts treatments (T₃, T₄ and T₂).

All the six EO fractions of *C. citratus* contain myrcene, limonene, α -gurjunene, neral and geranial, but at different proportions. The two major components in all the oils fractions were neral which was found to vary from 19.95 to 41.56%, and geranial which was found to vary from 18.79 to 45.64%. Neral was predominant in fractions CS₁, CS₂, CS_M, CF_M, whereas geranial was in fractions CF₁ and CF₂. Some compounds such as carvacrol acetate and farnesol (2E, 6Z) were found only in EO fractions from fresh plants of *C citratus* (CF₁, CF₂, and CF_M). Cedrol, hexahydrofarnesyl acetone, γ -decalactone, β -bisabolol, α -muurolol, cavacrol and β -eudesmol were detected at low concentration only in the EO fractions collected between the 61st minute and the end of the hydrodistillation process (CF₂ and CS₂). Ethanolic extracts of *C. citratus* and *O. Barrelieri* (EEc and EEO) were found to be significantly ($p < 0.05$) higher in phenolics, flavonoids and total sugars content, compared to aqueous extracts (EAc and EAo), which in turn were the richest in protein. Quercetin, catechin, catechol, L-ascorbic acid and iso ascorbic acid were present in all solvent extracts (EAc, EAo, EEc and EEO), but were more concentrated in ethanolic extracts (EEc and EEO). EEc with 16.04 μ g/mg was the richest extract in phenolic identified compounds. Bioguided fractionation and purification of the ethanolic extract of *C. citratus* led to the identification of 3-O- β -D-glucopyranosyl- α -amyrin and 3-O- β -D-glucopyranosyl-uvaol.

In conclusion, sorting out rice seeds with 20% NaCl solution, coupled to treatments with aqueous and ethanolic extracts of *C. citratus* and *O. barrelieri* (EEO, EEc, EAc and EAo); render rice seeds more homogeneous, improve their health status and germination, maintain the vigor of rice seedlings, induce some rice defence responses, resulting in reduction of disease development and that of grain yield losses.

Key words: Plant extracts, Chemical characterization, Biofungicides, Elicitors, Rice , yield parameters.

Liste des abréviations

<i>A. padwickii</i>:	<i>Alternaria padwickii</i>
ANOVA:	Analyse de variance
Av. JC:	Avant Jésus Christ
<i>B. oryzae (B.o)</i>:	<i>Bipolaris oryzae</i>
Banko Plus:	Culot de semence traitée à 20% NaCl plus trempage dans 0,2% de fongicide Banko Plus
<i>C. citratus</i>:	<i>Cymbopogon citratus</i>
CCM:	Chromatographie sur couche mince
CF₁:	Fraction 1 de l'HE des plantes fraîches de <i>C. citratus</i> , collectées pendant les 60 premières minutes depuis le début de l'écoulement des principes actifs lors de l'hydrodistillation
CF₂:	Fraction 2 de l'HE des plantes fraîches de <i>C. citratus</i> , collectées de la 61 ^{ème} minutes jusqu'à la fin de l'hydrodistillation
CF_M:	HE complète des plantes fraîches de <i>C. citratus</i>
CLHP (HPLC):	Chromatographie Liquide Haute Performance (High Pressure Liquid Chromatography)
CMI:	Concentration Minimale Inhibitrice
CPG/SM (GC-MS):	Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
CS₁:	Fraction 1 de l'HE des plantes sèches de <i>C. citratus</i> , collectées pendant les 60 premières minutes depuis le début de l'écoulement des principes actifs lors de l'hydrodistillation
CS₂:	Fraction 2 de l'HE des plantes sèches de <i>C. citratus</i> , collectées de la 61 ^{ème} minutes jusqu'à la fin de l'hydrodistillation
CS_M:	HE complète des plantes sèches de <i>C. citratus</i>
DSHC:	Danish Seed Health Centre for Developing Countries
EAc:	Extrait de <i>C. citratus</i> obtenu par macération dans l'eau
EAO:	Extrait d' <i>O. barrelieri</i> obtenu par macération dans l'eau Chaude
EEc:	Extrait de <i>C. citratus</i> obtenu par macération dans l'éthanol-eau 70%.
EEo:	Extrait d' <i>O. barrelieri</i> obtenu par macération dans l'éthanol-eau 70%.
FAO:	Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture
<i>F. moloniforme</i>	(Fm): <i>Fusarium moniliforme</i>

ha:	Hectare
HE (EO):	Huile Essentielle
HR:	Réaction d'Hypersensibilité.
IRAD:	Institut de Recherche Agricole pour le Développement
IRRI (IIRR):	Institut international de recherches sur le riz
<i>M. oryzae</i>:	<i>Magnaporthe oryzae</i>
MPLC:	«Medium Pressure Liquid Chromatographie».
MTT:	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NERICA:	Nouveau riz pour l'Afrique
NIST:	National Institute Standard and Technology
<i>O. glaberima</i>:	<i>Oryzae glaberrima</i>
<i>O. sativa</i>:	<i>Oryzae sativa</i>
<i>O. barreilieri</i>:	<i>Oxalis barrelieri</i>
PDA:	Potatoes Dextrose Agar
PGPR:	«Plant Growth Promoting Rhizobacteria»
PGM:	Plante Génétiquement Modifiée
ppm:	Partie par million
PRs protéines:	«Pathogenesis-Related proteins»
Rdt:	Rendement
RSA:	Résistance systémique Acquise
RSI:	Résistance systémique induite
Sec:	Semences non traitée
SEMRY:	Société d'Expansion et de Modernisation de la Riziculture de Yagoua
T⁺0%:	Culot de semence traitée à 20% NaCl plus trempage dans l'eau distillée
T⁺1%:	Culot de semence traitée à 20% NaCl plus trempage dans 1% d'extrait à l'éthanol de <i>C. citratus</i> / <i>O. barrelieri</i>
T⁺2%:	Culot de semence traitée à 20% NaCl plus trempage dans 2% d'extrait à l'éthanol de <i>C. citratus</i> / <i>O. barrelieri</i>
T⁺4%:	Culot de semence traitée à 20% NaCl plus trempage dans 4% d'extrait à l'éthanol de <i>C. citratus</i> / <i>O. barrelieri</i>
T⁺Sur:	Surnageant de semence traitée à 20% NaCl plus trempage dans l'eau distillée

- T0:** Semences n'ayant reçu aucun traitement dans l'induction de la résistance
- T1:** Semence traitée à 20% NaCl dans l'induction de la résistance
- T2:** Semence traitée à 20% NaCl plus 1% d'extrait dans l'induction de la résistance
- T3:** Semence traitée à 20% NaCl plus 2% d'extrait dans l'induction de la résistance
- T4:** Semence traitée à 20% NaCl plus 4% d'extrait dans l'induction de la résistance
- T0:** Témoin non traité; en champ
- T1:** Traitement avec le NaCl 20%; en champ
- T2:** Traitement avec 20% de NaCl + Trempage dans la solution 1% de l'extrait à l'éthanol d'*O. barrelieri* pendant 24H; en champ
- T3:** Traitement avec 20% de NaCl + Trempage dans la solution 1% de l'extrait à l'éthanol d'*O. barrelieri* pendant 24H + Pulvérisation de 2% de l'extrait à l'éthanol d'*O. barrelieri* à 300L/Ha au 14^{ième} jour + pulvérisation de l'extrait aqueux d'*O. barrelieri* (20g de poudre par litre d'eau) à 556L/Ha chaque deux semaines jusqu'au stade de grain dur; en champ
- T4:** Traitement avec 20% de NaCl + Trempage dans la solution 1% de l'extrait à l'éthanol d'*O. barrelieri* pendant 24H + Pulvérisation de 2% de l'extrait à l'éthanol de *C. citratus* à 300L/Ha au 14^{ième} jour + Pulvérisation de l'extrait aqueux de *C. citratus* (20g de poudre par litre d'eau) à 556L/Ha chaque deux semaines jusqu'au stade de grain dur; en champ
- TM 0%:** Semence trempée dans l'eau distillée;
- Ts0%C:** Culot de la semence trempée dans l'eau distillée;
- Ts10%C:** Culot de la semence trempée dans la solution de NaCl 10%
- Ts20%C:** Culot de la semence trempée dans la solution de NaCl 20%
- Ts30%C:** Culot de la semence trempée dans la solution de NaCl 30%
- Ts0%S:** Surnageant de la semence trempée dans l'eau distillée;
- Ts10%S:** Surnageant de la semence trempée dans la solution de NaCl 10%
- Ts20%S:** Surnageant de la semence trempée dans la solution de NaCl 20%
- Ts30%S:** Surnageant de la semence trempée dans la solution de NaCl 30%

Liste des Tableaux

Tableau I: Caractéristiques des fractions d'HE de <i>Cymbopogon citratus</i>	87
Tableau II: Caractéristiques des extraits aux solvants de <i>C. citratus</i> et d' <i>O. barrelieri</i>	88
Tableau III: Analyse de la variance pour le pourcentage d'inhibition comme fonction de l'huile essentielle et la concentration.....	90
Tableau IV: Pourcentages d'inhibition de la croissance radiale de <i>B. oryzae</i> et <i>F. moniliforme</i> en présence du fongicide de synthèse 'Banko Plus'	94
Tableau V: Analyse de la variance pour le pourcentage d'inhibition comme fonction de la concentration et de l'extrait.....	95
Tableau VI: Masse et pourcentage des germinations des lots de semences traitées au NaCl	102
Tableau VII: Analyse de la variance pour le pourcentage de germination des semences, comme fonction de l'extrait, du stress et du traitement.....	104
Tableau VIII: Analyse de la variance pour le pourcentage d'infestation de <i>B. oryzae</i> et de <i>F. moniliforme</i> , comme fonction de l'extrait et du traitement	106
Tableau IX: Inter corrélations entre le pourcentage de germination <i>in vitro</i> , les taux d'infections de <i>B. oryzae</i> , de <i>F. moniliforme</i> et le pourcentage de germination en serre (N=56)	110
Tableau X: Germination et émergence des semences de riz traitées par les extraits de <i>C. citratus</i> et d' <i>O. barrelieri</i>	112
Tableau XI: Activités des peroxydases dans les feuilles de riz, après différents traitements aux extraits de <i>C. citratus</i> et <i>O. barrelieri</i>	118
Tableau XII: Activités des polyphénols oxydases des plantules de riz, après différents traitements aux extraits de <i>C. citratus</i> et d' <i>O. barrelieri</i>	119
Tableau XIII: Score des symptômes causés par <i>B. oryzae</i> , 5 jours après inoculation des plantules de riz issues de différents traitements par les extraits de <i>C. citratus</i>	123
Tableau XIV: Evaluation quantitative du processus d'infection de <i>B. oryzae</i> , sur les feuilles de riz issues des semences traitées à l'eau (control) aux extraits de <i>C. citratus</i> à 2% et 4%	125
Tableau XV: Tests multivariés de significativité pour les effets principaux des variables intra-groupes.....	135
Tableau XVI: Effets du traitement et de la variété sur; la levée, le tallage/m ² , le nombre de panicules/m ² , la sévérité de l'helminthosporiose à la floraison, la sévérité de l'helminthosporiose à la maturité et la production/m ² en riziculture pluviale	136
Tableau XVII: Comparaisons des moyennes marginales pour le traitement et la variété comme une fonction de la levée, tallage/m ² , du nombre de panicules/m ² , de la sévérité de	

l'helminthosporiose à la floraison, de la sévérité de l'helminthosporiose à la maturité et de la production/m ² en riziculture pluviale	137
Tableau XVIII: Tests multivariés de significativité pour les effets principaux des variables inter-groupes	141
Tableau XIX: Effets du traitement et de la variété sur le degré de tallage, le nombre de panicules/levée, la production/levée, la production/tallage et la production/panicule en riziculture pluviale.....	143
Tableau XX: Moyennes, écart-types et inter-corrélations pour la production/m ² et les variables de prédiction (N = 45) en riziculture pluviale.....	146
Tableau XXI: Sommaire de l'analyse de la régression multiple avec entrée forcée pour la levée, tallage/m ² , panicules/m ² et sévérité de l'helminthosporiose à la floraison; prédisant la production/m ² (N = 45) en riziculture pluviale	146
Tableau XXII: Tests multivariés de significativité pour les effets principaux des variables inter-groupes en riziculture irriguée	147
Tableau XXIII: Effets du traitement et de la variété sur la levée, le tallage/m ² , le nombre de panicules/m ² , la sévérité de l'helminthosporiose à la floraison, la sévérité de l'helminthosporiose à la maturité et la production/m ² en riziculture irriguée.....	148
Tableau XXIV: Comparaisons des moyennes marginales pour le traitement et la variété comme une fonction de la levée, tallage/m ² , du nombre de panicules/m ² , de la sévérité de l'helminthosporiose à la floraison, de la sévérité de l'helminthosporiose à la maturité et de la production/m ² en riziculture irriguée.....	149
Tableau XXV: Moyennes, écart-types et inter-corrélations pour la production/m ² et les variables de prédiction (N = 45) en riziculture irriguée	153
Tableau XXVI: Sommaire de l'analyse de la régression multiple avec entrée forcée pour la levée, tallage/m ² , panicules/m ² et sévérité de l'helminthosporiose à la floraison; prédisant la production/m ² (N = 45) en riziculture irriguée.....	153
Tableau XXVII: Composition chimique des fractions d'huiles Essentielles de <i>Cymbopogon citratus</i>	163
Tableau XXVIII: Screening phytochimique des extraits aqueux et éthanolique de <i>C. citratus</i> et d' <i>O. barrelieri</i>	166
Tableau XXIX: Temps de rétention et proportions des principaux composés détectés dans EEc, EAc EEO et EAo à 280 nm	171
Tableau XXX: Teneur en composés phénoliques identifiés dans les extraits EEc, EAc, EEO et EEc.....	173

Liste des Figures

Figure 1: Symptômes de l'helminthosporiose. (a) taches brunes sur les glumes des semences de riz; (b) taches brunes sur les feuilles de riz (Agarwal et al., 1994); (c) conidies de <i>B. oryzae</i> au stéréo microscope, développées en apparence de velours (Misra et al., 1994).....	21
Figure 2: Caractéristiques morphologiques de <i>B. oryzae</i> . (a) colonies sur PDA; (b) conidiophores au microscope (Mew et Gonzales, 2002); (c) conidies au microscope (Argawal et al., 1994).....	22
Figure 3: Lésions foliaires causées par <i>A. padwickii</i> (Agarwal et al., 1994). (a) taches de suies causées par <i>A padwickii</i> ; (b) larges spots ovales ou circulaires, avec des centres brun-pâles et des bords noir-marron sur la feuilles de riz.....	23
Figure 4: Caractéristiques morphologiques d' <i>Alternaria padwickii</i> . (a) Croissance mycélienne sur la semence de riz (Misra et al., 1994); (b) colonies sur PDA (Misra et al., 1994); (c) conidies au microscope (Agarwal et al., 1994)	24
Figure 5: Symptômes du gigantisme. (Gauche) Elongations anormales des tiges et des feuilles de riz; (Droite) assèchement précoce des plants infectés par <i>F. moniliforme</i>	26
Figure 6: Caractéristiques morphologiques <i>Fusarium moniliforme</i> (Misra et al., 1994) (a) Mycélium couvrant les semences de riz; (b) microconidies poudreuses; (c) micro et macro conidies au microscope.....	27
Figure 7: Symptômes de la pyriculariose. (a) Grandes zones nécrotiques en toile d'araignée sur les feuilles de riz; (b) affaiblissement paniculaire due à <i>M. oryzae</i> ; (c) noircissement des nœuds des tiges de riz infectés par <i>M. oryzae</i>	28
Figure 8: Schéma simplifié des principales réactions de défense structurales et biochimiques élaborées par la plante en réponse à l'infection.....	40
Figure 9: Schéma synthétique général des voies biosynthétiques et des précurseurs des principales classes de métabolites secondaires (Gutzeit et Ludwig-Muller, 2014).....	46
Figure 10: Plants de <i>Cymbopogon citratus</i> . (A) Touffe avec des feuilles de plus de 50cm de long; (B) nombreuses tiges issues d'une bouture	47
Figure 11: Plant d' <i>Oxalis barrelieri</i>	49
Figure 12: Isolement sur PDA de <i>B. oryzae</i> et de <i>F. moloniforme</i> sur les semences de riz	52
Figure 13: Protocole de macération de la poudre de <i>C. citratus</i> / <i>O barrelieri</i>	54
Figure 14: Dispositif en blocs aléatoires complet avec parcelles divisées (Dispositif en split-plot), impliquant 5 extraits de plantes (T ₀ , T ₁ , T ₂ , T ₃ , T ₄) comme traitement des parcelles élémentaires et trois variétés de riz (N ₁₃ , RR, et N ₃) comme traitement des blocs; dans trois répétitions.....	67

Figure 15: Opérations de mise en place du riz pluvial. (A) Quadrillage des parcelles élémentaires et semis en poquet; (B) Dissuasion des oiseaux par les papiers cahier après semis; (C) champ sarclé.....	68
Figure 16: Opérations d'entretiens en riziculture pluviale. (A) Dissuasion des oiseaux avec des épouvantails, (B) Traitement par pulvérisation en champs.....	69
Figure 17: Opérations de récoltes en riziculture pluviale. (A) Récolte des panicules des échantillons avec des couteaux; (B) Conditionnement des échantillons dans des papiers plastiques; (C) Battage du reste de la récolte	69
Figure 18: Maladie des taches brunes causée par <i>B. oryzae</i> à l'échelle 8, en riziculture pluviale. (A) Sur la jeune feuille au stade de reproduction; (B) sur la feuille au stade de maturité.....	71
Figure 19: Mise en place de la pépinière en riziculture irriguée. (A) semences sur le lit et recouvertes avec du papier plastique et de la paille; (B) Pépinière vue d'ensemble longitudinalement; (C) Pépinière vue d'ensemble latéralement.....	72
Figure 20: Opérations d'entretiens et de récoltes en riziculture irriguée. (A) Vue générale de la parcelle en cours de traitement par pulvérisation; (B) circonscription et récolte du mètre carré pour estimation du rendement	74
Figure 21: Protocole d'extraction pour isolement des métabolites de <i>C. citratus</i>	82
Figure 22: Techniques chromatographiques d'isolement des composés de l'extrait à l'éthanol de <i>Cymbopogon citratus</i> : (A): Chromatographie «Cut column»; (B): Chromatographie sur Couche Mince; (C): Chromatographie Liquide à Moyenne Pression	84
Figure 23: CCM et bioautographie. (A) regroupements des fractions selon leurs ressemblances; (B) Chromatogramme de bioautographie de la sous sous fraction B, contre <i>Xanthomonas vesicatoria ATCC 11633</i>	85
Figure 24: Comparaison des pourcentages d'inhibitions; des huiles essentielles (A) et à différentes des concentrations (B) vis-à-vis <i>B. oryzae</i> et <i>F. moniliforme</i>	92
Figure 25: Variation du pourcentage d'inhibition de <i>B. oryzae</i> (gauche) et de <i>F. moniliforme</i> (droite) par les fractions d'huiles essentielles en fonction de la concentration	93
Figure 26: Inhibition dose dépendante des fractions d'huiles essentielles de <i>C. citratus</i> . CFm en présence de <i>B. oryzae</i> (A); contrôle (a), 200 ppm (b), 400ppm (c), 600 ppm (d), 800 ppm (e), 1000 ppm (f). CF ₂ en présence de <i>F. moniliforme</i> (B); contrôle (a), 200 ppm (b), 400ppm (c), 800 ppm (d), 1200 ppm (e), 1400 ppm(f) et 1600 ppm (g).....	93
Figure 27: Modifications structurales de la croissance de <i>B. oryzae</i> en présence de 'Banko Plus'. (A) 5000 ppm; (B) 6000 (ppm).....	94
Figure 28: Inhibition de la croissance de <i>F. moniliforme</i> (A) de <i>B. oryzae</i> (B) à différentes concentrations des extraits de <i>C. citratus</i> et d' <i>O. barrelieri</i>	96

Figure 29: Inhibition dose dépendante des extraits aux solvants. EAO en présence de <i>F. moniliforme</i> (A); EEO en présence de <i>F. moniliforme</i> (B); EAc en présence de <i>B. oryzae</i> (C) ; contrôle(a) ; 1000 ppm(b), 5000 ppm(c) et 10000 ppm (d)	97
Figure 30: Germination des semences de riz rouge issues des traitements à différentes concentrations de NaCl.....	103
Figure 31: Variation du pourcentage de germination en présence et en absence de stress selon l'extrait de plante.....	105
Figure 32: Variation du pourcentage de germination des traitements des semences du riz en présence et en absence de stress (gauche); en présence des extraits de plantes (droite) ...	106
Figure 33: Incidence de <i>B. oryzae</i> et de <i>F. moniliforme</i> , en milieu PDA; après traitement avec différentes concentration de l'extrait à l'éthanol de <i>C. citratus</i> (EEc).....	108
Figure 34: Variation du pourcentage d'infestation de <i>B. oryzae</i> (Gauche) et de <i>F. moniliforme</i> (Droite), à différents traitements des semences du riz selon l'extrait de plante	108
Figure 35: Pourcentage d'émergence en serre en fonction des traitements: (Gauche) selon l'extrait de plante utilisé (Droite) en comparant les traitements	109
Figure 36: Germination sur blotter à gauche (gauche vers droite: T0, T1, T2, T3 et T4) de l'extrait d' <i>O. barrelieri</i> ; émergence en serre (droite vers gauche: T0, T1, T2, T3 et T4) de l'extrait de <i>C. citratus</i>	113
Figure 37: Teneur en protreines des plantules de riz en fonction des traitements aux extraits de <i>C. citratus</i> et <i>O. barrelieri</i>	114
Figure 38: Teneur en composés phenoliques des plantules de riz en fonction des traitements aux extraits de <i>C. citratus</i> et <i>O. barrelieri</i>	115
Figure 39: Teneur des groupes thiols des plantules de riz en fonction des traitements aux extraits de <i>C. citratus</i> et <i>O. barrelieri</i>	116
Figure 40: Teneur de la β -1,3-glucanase des plants de riz en fonction des traitements aux extraits de <i>C. citratus</i> et <i>O. barrelieri</i>	117
Figure 41: Activités des amylases dans les feuilles de riz, en fonction des traitements aux extraits de <i>C. citratus</i> et <i>O. barrelieri</i>	120
Figure 42: Caractéristiques particulières au cours de l'induction de la résistance. (A) Symptômes de l'helminthosporiose sur les tiges de riz en serre; (B) faible taux de repousse pour le témoin T0; (C) fort taux de repousse pour le traitement T4.....	121
Figure 43: Résistance au stress hydrique. (A) plantules de riz traitées avec les extraits de <i>C. citratus</i> ; (B) plantules de riz traitées avec les extraits d' <i>O. barrelieri</i> . De la droite vers gauche: T0, T1, T2, T3 et T4.....	121
Figure 44: Teneur de la β -1,3-glucanase des plants de riz en fonction des traitements aux extraits de <i>C. citratus</i> et <i>O. barrelieri</i>	122

Figure 45: Stimulation de la croissance et de la germination des semences de riz traitées avec extraits de <i>C. citratus</i> . (A) Différences au niveau de l'émergence; les traitements sont dans l'ordre suivant (de la gauche vers la droite: 4% ; 2% et 0% (contrôle)). (B) stimulation de la croissance; les traitements sont dans l'ordre suivant (de la gauche vers la droite: 0% (control), 2% et 4%)	122
Figure 46: Symptômes de l'helminthosporiose sur les feuilles de riz inoculés par <i>B. oryzae</i> dont les semences ont été traitées à l'eau (contrôle A et C) aux extraits de <i>C. citratus</i> à 2%(D) et 4%(B).....	123
Figure 47: Croissance des hyphes de <i>B. oryzae</i> enregistrée au 3 ^{ième} jour, sur les feuilles de riz issues des semences traitées avec: (A) 4% d'extrait de <i>C. citratus</i> (microscopie optique); (B): 2% d'extrait de <i>C. citratus</i> (microscopie électronique à balayage).....	126
Figure 48: Pénétration de <i>B. oryzae</i> à travers la surface de la paroi cellulaire. (A) Accumulation de H ₂ O ₂ dans une seule cellule, indiquant la réaction d'hypersensibilité (coloration marron); (B) montre le même motif en microscopie à fluorescence. Les photos ont été prises (au 1 ^{ier} jour) des feuilles de riz issues des semences traitées avec 2% d'extrait de <i>C. citratus</i> et colorées au DAB	126
Figure 49: A) Pénétration de <i>B. oryzae</i> à travers le stomate sur la feuille de riz colorée au DAB pour la localisation de H ₂ O ₂ ; (B) Montre le même motif en microscopie à fluorescence. La HR de la cellule pénétrée est clairement observée en utilisant la lumière à fluorescence. Les photos ont été prises (au 1 ^{er} jour) des feuilles de riz issues des semences traitées l'eau et colorées au DAB	126
Figure 50: Microscopie électronique à balayage de la pénétration de <i>B. oryzae</i> à travers le stomate. (A) Le tube germinatif du champignon croît dans la feuille à travers le stomate; au même moment, un hyphe est probablement en croissance du stomate vers l'extérieur; (B) montre la liaison étroite de l'hyphe sur l'épiderme de la feuille de riz. Les photos ont été prises (au 3 ^{ième} jour) des feuilles de riz issues des semences traitées avec 4% d'extrait de <i>C. citratus</i>	127
Figure 51: Appressorium ou structure d'attache du champignon, observé en microscopie électronique à balayage. Les photos ont été prises des feuilles de riz issues des semences traitées. (A) avec l'eau (contrôle); (B) avec 4% d'extrait de <i>C. citratus</i> au 5 ^{ième} jour	127
Figure 52: Réaction d'hypersensibilité (HR) multi cellulaire du riz en réponse à l'infection de <i>B. oryzae</i> , (A-C) microscopie optique après coloration au DAB pour la localisation de H ₂ O ₂ ; (B-D) montre le même motif en microscopie à fluorescence; (A-B). Les feuilles de riz sont issues des semences traitées avec 2% d'extrait de <i>C. citratus</i> au 3 ^{ième} jour; (C-D) Les feuilles de riz sont issues des semences traitées avec 4% d'extrait de <i>C. citratus</i> au 3 ^{ième} jour après inoculation	127
Figure 53: Accumulation de H ₂ O ₂ indiquée par la coloration au DAB en relation avec la présence de <i>B. oryzae</i> , sur les feuilles de riz issues des semences traitées avec 2% d'extrait de <i>C. citratus</i> 12h après inoculation	128

Figure 54: Riz rouge présentant la colonisation de la feuille par <i>B. oryzae</i> sous forme de toile d'araignée (A), la colonisation de la panicule par <i>B. oryzae</i> (B) et la sensibilité à la verse (C)	138
Figure 55: Moyennes marginales de (A) levée, (B) tallage/m ² , (C) panicule/m ² en fonction des différents traitements et suivant les variétés de riz RR, N ₃ et N ₁₃	139
Figure 56: Moyennes marginales de (A) production/m ² , (B) S.H.F, (C) S.H.M en fonction des différents traitements et suivant les variétés de riz RR, N ₃ et N ₁₃	140
Figure 57: Comparaisons des moyennes marginales des variétés de riz (RR, N ₃ , N ₁₃) pour leurs degré de tallage, panicules/levée, production/levée, production/tallage et production/panicule en riziculture pluviale	144
Figure 58: Comparaisons des moyennes marginales des traitements (T ₀ , T ₁ , T ₂ , T ₃ et T ₄) pour leur degré de tallage, panicules/levée, production/levée, production/tallage et production/panicule en riziculture pluviale	145
Figure 59: Pépinières présentant (A) la vigueur de plantules traitées aux extraits de plantes comparée à celle des plantules non traitées, (B) les plantules chlorosés de la pépinière des producteurs (C) pépinières des producteurs ayant des plantules infectées par <i>B. oryzae</i> .	150
Figure 60: Moyennes marginales de; (A) levée, (B) tallage/m ² , (C) panicule/m ² en fonction des différents traitements et suivant les variétés de riz Tox, NL ₄₂ et NL ₅₂	151
Figure 61: Moyennes marginales de ; (A) production/m ² , (B) S.H.F. (C) S.H.M en fonction des différents traitements et suivant les variétés de riz Tox, NL ₄₂ et NL ₅₂	152
Figure 62: Chromatogrammes des fractions d'HE des plantes fraîches de <i>C. citratus</i> : du haut vers le bas; CF ₁ , (FF ₁) CF ₂ (FF ₂) et CF _M (FF _M).....	161
Figure 63: Chromatogrammes des fractions d'HE des plantes sèches de <i>C. citratus</i> : du haut vers le bas; CS ₁ (SF ₁), CS ₂ (SF ₂) et CS _M (SF _M)	162
Figure 64: Teneur des extraits aux solvants de <i>C. citratus</i> et d' <i>O. barrelieri</i> en métabolites secondaires (A) Phénols totaux; (B) Flavonoïdes totaux	167
Figure 65: Teneur des extraits aux solvants de <i>C. citratus</i> et d' <i>O. barrelieri</i> en métabolites primaires. (A) Sucres totaux; (B) Protéines totaux	168
Figure 66: Chromatogramme de l'analyse par CLHP de l'extrait éthanolique de <i>C. citratus</i> (EEc) à la longueur d'onde $\lambda = 280$ nm.....	169
Figure 67: Chromatogramme de l'analyse par CLHP de l'extrait aqueux de <i>C. citratus</i> (EAc) à la longueur d'onde $\lambda = 280$ nm	169
Figure 68: Chromatogramme de l'analyse par CLHP de l'extrait éthanolique d' <i>O. barrelieri</i> (EEo) à la longueur d'onde $\lambda = 280$ nm.....	170
Figure 69: Chromatogramme de l'analyse par CLHP de l'extrait aqueux d' <i>O. barrelieri</i> (EAo) à la longueur d'onde $\lambda = 280$ nm.....	170
Figure 70: Chromatogramme de l'analyse par CLHP de l'extrait du mélange de standards phénoliques à la longueur d'onde $\lambda = 280$ nm.....	172

Figure 71: Structure des composés identifiés dans les extraits EEc, EAc, EEo et EEc 174

Figure 72: Composés identifiés dans les extraits éthanoliques de *Cymbopogon citratus*. (A) 3-O- β -D-glucopyranosyl- α -amyrine; (B) 3-O- β -D-glucopyranosyl-28-hydroxy- α -amyrine ou. 3-O- β -D-glucopyranosyl-uvaole. 175

**INTRODUCTION GENERALE
ET PROBLEMATIQUE**

Introduction générale

Le riz est l'une des cultures vivrières la plus ancienne, il constitue l'aliment de base de plus de 60% de la population vivant dans le monde (**Chandrasekaran et al., 2010**). Sa culture est aujourd'hui présente dans plus d'une centaine (114) de pays y compris le Cameroun (**Small, 2009**). Le riz n'est pas seulement la céréale la plus importante pour la consommation humaine dans le monde, mais a aussi récemment émergé comme plante fourragère et comme ressource pour la fabrication du bio-carburant (**Takatsuji et al., 2010**). Aujourd'hui, le volume du marché international de riz ne représente qu'environ 6,9% de la production totale de riz, indiquant ainsi que le riz tend à être consommé là où il est produit (**FAOstat, 2017**). Toutes les zones Agro-écologiques du Cameroun sont favorables à la culture du riz. Jadis (1983-1990), les rendements de production de riz au Cameroun oscillaient entre 4,3-5,46 tonnes/ha. La crise économique de 1994 est venue asphyxier les sociétés de la filière, au point où aujourd'hui presque toute la production de riz au Cameroun est dans les mains des petits producteurs, qui contribuent à plus de 93% de la production totale (**Goufo, 2008**). En 2014, la production totale de riz paddy (189477 tonnes) au Cameroun ne représentait qu'environ 0,66% de la production et 1,59% des surfaces rizicoles en Afrique; son rendement était de 1,0714 tonnes/ha contre 2,59 tonnes/ha pour le continent Africain et 4,556 tonnes/ha au niveau mondial. La production de riz au Cameroun a contribué le plus souvent à moins de 15% de sa consommation; le Cameroun a donc fait recours aux importations pour combler sa consommation interne, dont la moyenne se situe autour de 29,5 kg/habitant/an. En effet, selon les bases de données statistiques de la **FAOstat (2017)**, les importations de riz au Cameroun sont passées de 446466 à 753263 tonnes de riz blanchi entre 2005 et 2013. En 2016, le Cameroun faisait partie des plus grands pays importateurs (23^{ème}) de riz blanchi; ses importations représentaient 1,3% des importations mondiales de riz, pour une valeur chiffrée à 242.3 millions de dollars US (**WFFL, 2017**). Selon le diagnostic du **Minader (2009)**, tous les pans de la production du riz au Cameroun doivent bénéficier d'une attention particulière afin d'améliorer sa production et ses rendements, parce que cette riziculture camerounaise est soumise à plusieurs types de contraintes, notamment: les contraintes écologiques (climat, pollution et désertification), à l'exemple des pluies excessives qui ont favorisé les inondations en 2012 dans l'Extrême Nord, entraînant des dommages sérieux à la production de riz (**FAO, 2012**); les contraintes sociales économiques (connaissance, disponibilité des intrants, institutions, disponibilité des

crédits, attitudes rétrogrades), à l'exemple, d'un producteur qui refuse l'expérimentation d'une nouvelle variété de riz; et les contraintes de production. Ces dernières comprennent les facteurs abiotiques (irradiations, eau, température et nutriments) et les facteurs biotiques (mauvaises herbes, ravageurs animaux et les agents pathogènes). Selon **Oerke (2006)** les facteurs biotiques assurent l'essentiel des pertes (77%) et de nombreuses maladies causées par les agents pathogènes (champignons, bactéries et virus) y sont des contributeurs majoritaires. Les affections cryptogamiques sont non seulement les plus nombreuses des maladies dues aux agents phytopathogènes, mais sont aussi celles qui causent plus de dégâts dans les zones de production de riz (**Willocquet et al., 2004; Oerke, 2006; Gnanamanickam, 2009**). Quelques-unes les plus répandues comprennent: la pyriculariose causée par *Magnaporthe oryzae*, la maladie des taches brunes (helminthosporiose) causée par *Bipolaris oryzae*, le gigantisme causé par *Fusarium moniliforme*, la maladie des taches de suies causée par *A. padwickii*, et la rhizochtone «sheath blight» causé *Rhizoctonia solani* (**Misra et al., 1994**). La plupart des champignons phytopathogènes du riz est véhiculée par les semences qui sont la source de leurs propagations (**Mew et Gonzales, 2002**). Des pertes considérables pouvant atteindre jusqu'à 90% ont été enregistrées dans des cas graves d'attaque (**Padmanabhan, 1973**).

Plusieurs méthodes de lutttes sont utilisées pour contrôler les champignons microscopiques pathogènes du riz: les méthodes de lutte qui excluent l'introduction d'un agent pathogène dans un environnement; représentées par les mesures de quarantaine (législation, inspections, certification, traitement) et les méthodes de lutte qui réduisent ou éradiquent l'inoculum déjà présent sur la plante (organes) hôte ou présent dans son environnement; incluant la lutte par les méthodes culturales, la lutte par les agents physiques et mécaniques, la lutte biologique par les microorganismes, la lutte génétique et par les organismes transgéniques et la lutte chimique par les pesticides synthétiques(fongicides). Cette dernière est en général très utilisée, et est assez efficace; en effet, selon la **FAO (2010)**, les pertes de production de riz estimées à environ 52%, seraient de l'ordre de 82% en l'absence des protections phytosanitaires incluant les fongicides de synthèses. Dans les pays de grande production de riz comme l'Inde, les fongicides synthétiques/matières actives (Thiram, Captan, Carboxin, Carbendazim, Pyroquilon et Tricyclozole) sont recommandés pour le traitement des semences de riz afin de tuer ou limiter le développement des champignons (**Chandrasekaran et al., 2010**). La lutte chimique par les pesticides synthétiques(fongicides) présente cependant, plusieurs limites: elle affecte l'environnement à travers la contamination de l'eau, du sol et de l'air qui

transfèrent les résidus chimiques dans la chaîne alimentaire; elle détruit la vie marine et les oiseaux et/ou altère génétiquement leurs futures générations; elle réduit la biodiversité, la fixation de l'azote, la flore bénéfique non ciblée, et la population d'insectes prédateurs des parasites ainsi que celle des abeilles (**Stoytcheva, 2011**); elle produit des effets adverses sur la santé de l'homme et le capital social (**Atreya et al., 2012; Ahmed et al., 2011**); elle induit l'apparition des souches résistantes aux pesticides (**Dianz et al., 2002**). Ces limites ont favorisé l'introduction des mesures très rigoureuses dans la réglementation, la commercialisation et l'usage des pesticides; mesures qui sont très peu respectées par les producteurs en particulier ceux des zones rurales dans les pays en voie de développement. En effet plusieurs pesticides bannis sont encore largement utilisés dans les pays en voie de développement et continuent à causer de sérieux problèmes environnementaux et de santé (**Ahmed et al., 2000**).

L'usage des extraits de plantes (si bien formulés) pour le contrôle des champignons phytopathogènes est une alternative réelle aux pesticides (fongicides) synthétiques, pour une production agricole plus saine (**Wilson et al., 1997; Fiori et al., 2000**). En fait les extraits peuvent être facilement obtenus des plantes disponibles et renouvelables, donc économiques (**Kumar et al., 2007**); Ils posent moins de problèmes à la santé humaine et animale; ils ont des actions multiples soit directe sur la maladie, soit systémique et/ou stimulatrice de la croissance; ils limiteraient les problèmes de résistance et atténueraient les effets indésirables rencontrés lorsqu'on utilise les antimicrobiens synthétiques (**Raveesha, 2011**). Ils sont facilement biodégradables, non ou peu phytotoxiques, éco favorables et largement acceptés par les consommateurs (**Dubey et al., 2008**). Plusieurs espèces de plantes supérieures n'ont pas encore été étudiées; leurs constituants biologiquement actifs comme sources potentielles de pesticides commerciaux restent à découvrir, principalement à cause du manque d'informations sur le screening de leur potentiel antimicrobien (**Satish et al., 2007**).

Problématique et objectifs

Les nombreuses maladies causées par les agents pathogènes, au premier rang desquels les affections cryptogamiques, causent des dégâts considérables dans toutes les zones de production de riz dans le monde (**Oerke, 2006**). Plusieurs de ces affections sont principalement véhiculées par les semences. A cet effet, *Bipolaris oryzae* et *Fusarium moniliforme*, respectivement responsables de la maladie des taches brunes (helminthosporiose) et du gigantisme chez le riz, sont détectés sur les semences de riz aux taux de 56,7% et 28,1% (**Mew et Gonzales, 2002**). Les pertes dues à ces agents pathogènes varient de 4-52% pour *B. oryzae* (**Barnwal et al., 2013**) et de 4-20% pour *F. moniliforme* (**Reddy et Sathyanarayana, 2001**). En plus de la réduction du rendement, *B. oryzae* retarde la croissance des plants de riz et entraîne la décoloration du grain à maturité, réduisant ainsi la valeur marchande du grain (**Srinivasachary et al., 2011**). Relativement aux deux agents pathogènes sus mentionnés, **Nguefack et al (2013)** ont évalué l'état phytosanitaire des semences originaires de plusieurs zones agro écologiques du Cameroun, et ont constaté que l'helminthosporiose (*B. oryzae*) et le gigantisme (*F. moniliforme*) étaient présents dans tous les écosystèmes de riziculture avec des incidences variant de 81,25%; et de 13,75% respectivement. Actuellement, les stratégies adéquates pour le contrôle de ces affections fongiques du riz, en particulier l'helminthosporiose sont très limitées (**Srinivasachary et al., 2011**).

Au Cameroun, la grande majorité des riziculteurs obtiennent leurs semences de la production antérieure. L'une des premières lignes d'éradication et/ou de réduction des inocula fongique, et donc ceux de *B. oryzae* et *F. moniliforme* du riz, est le traitement des semences (de riz) qui présente d'ailleurs de nombreux avantages; y compris qu'il protège la semence et le jeune plant contre les agents pathogènes dans les premiers stades de la germination et de développement. Il utilise moins de produits chimiques que le traitement des plantes en champ. Il pollue moins l'environnement, et utilise les biocides qui affectent principalement les organismes ciblés et non d'autres entités bénéfiques dans le sol (**Sharma et al., 2015**). D'autre part le traitement des semences en pré-semis est considéré comme une technologie viable pour améliorer l'émergence rapide et uniforme, une grande vigueur et de meilleurs rendements dans certaines cultures (**Hu et al., 2005**).

La plupart des riziculteurs camerounais procèdent au semis du riz sans traitement préalable de leurs semences. En dépit des dégâts pouvant être causés par *F. moniliforme* et plus particulièrement *B. oryzae*, la liste des pesticides homologués au Cameroun

(Minader, 2013) ne prévoit pas de fongicides pour le traitement des semences de riz; encore moins, pour la lutte contre ces deux ravageurs en champ. Par ailleurs les fongicides utilisés pour le traitement des semences de riz dans d'autres pays (Kumar *et al.*, 2016; Chandrasekaran *et al.*, 2010; Bhalli *et al.*, 2001), subissent les critiques sans cesse croissantes du fait de leurs effets adverses (Wilson et Tisdell, 2001). C'est ainsi qu'au cours de ces dernières années, il y a eu des pressions considérables dans l'agriculture, pour la réduction de l'usage de ceux-ci, et la recherche des alternatives meilleures (Tripathi et Dubey, 2004).

Le règne végétal est reconnu comme le producteur le plus efficace de différents composés biologiquement actifs; certains produits de plantes supérieures ont été formulés comme pesticides organiques et sont utilisés à grande échelle en tant que mesures éco favorables dans la gestion des ravageurs agricoles (Dubey *et al.*, 2011). En plus, les extraits de plantes (Tapan *et al.*, 2011) et leurs produits, entre autres; l'azadirachtine, la brassinolide, l'acide jasmonique et composés apparentés, les oligogalacturonides, l'oxalate, l'acide salicylique, la spermine, les composés organiques volatiles et l'éthylène (Lyon, 2007) ont été identifiés comme responsables et/ou potentialisateur de l'induction de la résistance chez la plante. Aussi, bien qu'il n'existe que peu d'exemples d'applications pratiques de la résistance induite en tant que méthode de lutte contre les maladies des plantes, les résultats obtenus à partir de quelques expériences menées en plein champ et en serre sont encourageants et indiquent que cette approche a le potentiel de devenir une stratégie de lutte efficace et durable contre toute une gamme d'agents pathogènes. (Benhamou et Picard, 2000).

En outre, quelques connaissances empiriques recommandent le traitement des semences par les solutions de chlorure de Sodium (NaCl), sans précisions réelles sur les concentrations en sel utilisées (Pham *et al.*, 2003); faisant qu'aujourd'hui, très peu d'informations ressortent de cette pratique.

L'intérêt de notre travail repose sur la protection générale de la culture de riz par les extraits de plantes facilement accessibles associés au tri des semences en solution salée; et l'exploitation des techniques culturales simples; dans le but ultime d'accroître la production, le rendement et la productivité du riz. Le travail est la suite d'un ensemble de travaux engagés depuis quelques années sur la lutte à travers les substances naturelles issues des plantes contre les maladies des cultures, afin d'améliorer la production végétale en générale et celle du riz (*Oryzae sativa*. L) en particulier (Nguéfack, 2005; Nguéfack *et*

al., 2005; Nguefack *et al.*, 2007; Nguefack *et al.*, 2008; Nguefack *et al.*, 2013). Dans ce travail, les huiles essentielles et leurs fractions, les extraits aqueux et les extraits éthanoliques de *C. citratus* et d'*O. barrelieri* ont été utilisés comme des biofongicides. Leurs effets ont été mesurés sur le potentiel d'inhibition de la croissance de *B. oryzae*/*F. moniliforme*, ainsi que les paramètres de production du riz. Les résultats ont été bouclés par la caractérisation de la composition chimique et l'étude du potentiel d'induction de la résistance chez les plants de riz traités par ces extraits de plantes. Le tri des semences de riz en solution salée a été couplé au traitement par ces extraits de plantes pour l'amélioration de la production du riz.

Hypothèse de recherche

Le tri des semences de riz en solution salée et leur traitement par les extraits de *C. citratus*/*O. barrelieri*, couplé à la pulvérisation en champ; améliore l'état phytosanitaire des semences, affecte la vigueur des plantules, induit les mécanismes de défense, réduit l'incidence de la transmission des maladies et entraîne l'augmentation des rendements de production du riz.

Objectif général.

Mesurer l'effet du tri des semences de riz en solution salée et leur traitement par les extraits de *C. citratus*/*O. barrelieri*, couplé à la pulvérisation des plants de riz en champ sur; l'inhibition de la croissance de *B. oryzae* et *F. moniliforme*, l'état sanitaire général du riz et les paramètres associés à la production.

Objectifs spécifiques

- ✓ Déterminer l'activité antifongique des huiles essentielles (fractions d'HE) et des extraits aux solvants (aqueux et éthanoliques) de *C. citratus*/*O. barrelieri* contre *B. oryzae* et *F. moniliforme*, deux champignons véhiculés par les semences de riz.
- ✓ Déterminer la concentration de NaCl permettant de trier les semences de riz qui développent les meilleures performances de germination, et étudier l'influence de ce pré-traitement couplé aux traitements par les extraits éthanoliques d'*O. barrelieri*/*C. citratus* sur; l'état phytosanitaire des semences, la germination, l'émergence et la vigueur du riz.
- ✓ Evaluer l'incidence du traitement 'par les extraits éthanoliques d'*O. barrelieri*/*C. citratus*' des semences de riz préalablement triées en solution NaCl, et associé à la

pulvérisation des plants de riz en serre sur les marqueurs d'induction de la résistance (enzymes et phytoalexines) et la biologie de l'infection par *B. oryzae*.

- ✓ Etudier dans les écosystèmes irrigué et pluvial, l'influence du traitement des semences de riz 'préalablement triées en solution NaCl' par les extraits éthanoliques d'*O. barrelieri*/*C. citratus*, et couplé à la pulvérisation des plants de riz en champ 'par les extraits aqueux' sur; l'émergence, le tallage, le nombre de panicule, l'indice de sévérité de l'helminthosporiose aux stades de floraison et de maturité, et sur le rendement de la production du riz.
- ✓ Caractériser la composition chimique des huiles essentielles (fractions), des extraits aqueux et éthanoliques de *C. citratus* et d'*O. barrelieri* puis, faire une tentative de corrélation de cette composition chimique avec les activités biologiques.

CHAPITRE I:
REVUE DE LITTERATURE

I. Revue de la littérature

I.1. Généralités sur le riz

I.1.1. Introduction

Le riz constitue l'aliment de base de plus de 60% de personne vivant dans le monde (Chandrasekaran et al., 2010). C'est l'une des plantes vivrière la plus ancienne; sa domestication remonterait à plus de dix milles ans et ses premières cultures seraient apparues au Sud/Sud-Est de l'Asie. La culture du riz est aujourd'hui présente dans tous les continents (à l'exception de l'Antarctique), et dans plus d'une centaine (114) de pays (Small, 2009), parmi lesquels le Cameroun. Les variétés cultivées appartiennent au genre *Oryzae* qui comprend vingt-quatre espèces dont deux seulement présentent un intérêt agricole pour l'Homme: *Oryzae sativa* L, originaire d'Asie et distribuée presque partout dans le monde; *Oryzae glaberrima*, originaire d'Afrique Occidentale et cultivée en Afrique de l'Ouest (Chandrasekaran et al., 2010).

I.1.2. Origine et domestication du riz

Le genre *Oryzae* est probablement originaire du super continent Gondwana, il y a de cela environ 130 millions d'années et, ses différentes espèces se sont distribuées dans différents continents (Afrique, Europe, Asie, Amérique et Australie) suite à la fragmentation du Gondwana; les espèces cultivées, *O. sativa* et *O. glaberrima* viennent d'un ancêtre commun avec un gène AA (Khush, 1997).

O. sativa date de 8000 avant Jesus Christ; bien que l'origine et la date de sa domestication demeurent un sujet de débat, elle a été retrouvée dans des sites archéologiques (Sweeney et McCouch, 2007). Ses ancêtres pérennes et annuels sont *Oryzae rufipogon* et *Oryzae nivara*; les informations récentes ressortent que l'Inde et l'Indochine représenteraient les centres ancestraux de *Oryzae rufipogon*; on sait par ailleurs que *Oryzae sativa* a été au moins doublement domestiquée à partir des populations différentes de *Oryzae rufipogon* qui ont donné naissance à deux espèces majeures: *Oryza sativa indica* domestiqué à l'Est de l'Inde/Myanmar /Thailand; et *Oryza sativa japonica* domestiqué au sud de la Chine (Londo et al., 2006). La culture de *O. sativa* s'est étendue par la suite dans tout le sud de la Chine (5000 Av. JC), au Nord du Vietnam (4000 Av. JC), au Sud-Est de l'Asie (3000 Av. JC), Philippines (2000 Av. JC) en Europe (495-406 Av. JC), en Amérique au 14^{ème} siècle, en Afrique au 16^{ème} siècle et en Australie au 18^{ème} siècle (Sharma, 2010).

O. glaberrima dont les ancêtres pérennes et annuels sont *Oryzae longistaminata*, *Oryzae Breviligulata*, a été probablement domestiqué dans le delta de la rivière Niger (**Khush, 1997**) 1500 ans avant JC. Il est appelé riz Africain parce qu'il est communément cultivé en Afrique de l'Ouest (**Small, 2009**); ce riz Africain avait été longtemps cultivé dans la côte Ouest de l'Afrique jusqu'au lac Tchad avant l'arrivée des Européens en Afrique (**Linares, 2002**). Après l'introduction en Afrique de la variété Asiatique *O. sativa* dans la moitié du 16^{ème} siècle par les colonisateurs portugais, les surfaces cultivées d'*O. glaberrima* n'ont cessé de diminuer au détriment des surfaces de la variété introduite, au point où les rizières occupées par celui-ci atteignent difficilement 5% des surfaces rizicoles dans ses zones traditionnelles (**Sharma, 2010**). Ainsi, *O glaberrima* a été progressivement remplacé par la variété Aasiatique *O sativa* jusqu'à ce que certains paysans de l'Afrique de l'Ouest ne continuent à cultiver le riz Africain que pour un usage dans des rites traditionnels (**Linares, 2002**).

Dans les récentes années, les scientifiques de «African Rice Center» ont réussi à croiser *O. glaberrima* (compétitif aux mauvaises herbes, tolèrent à la sécheresse et capable de croître dans les conditions limités en éléments nutritifs) avec *O. sativa* (fort potentiel de production), pour obtenir un nouveau type variétal appelé NERICA (New Rice for Africa) qui est prometteur pour les pays d'Afrique Sub Saharienne (**Sarla et Mallikarjuna, 2005**).

I.1.3. Classification du riz

Taxonomiquement, le riz est Classé comme suit:

- Règne: Plantae
- Sous règne: Tracheobionta
- Division: Magnoliophyta
- Classe: Liliopsida
- Sous classe: Commelinidae
- Ordre (Order): Poales
- Famille: Poaceae
- Genre (Genus): *Oryzae*; Espèce: *Oryzae sativa* et *Oryza glaberrima*

On classe aussi les variétés de riz en fonction des caractéristiques des graines (Glutineux et non glutineux); de la taille des graines (court: 5.5 mm; moyens: 6.6 mm et long: 7-8 mm); de la durée du cycle végétatif (très précoces < 110 jours; précoces 110-140 jours; tardives 150-170 jours et très tardives: > 180 jours) et des méthodes rizicoles soit irriguée, pluviale ou de bas fond (**Winch, 2006**).

I.1.4. Botanique du riz

Le riz (*Oryzae sativa* L.) est plante annuelle monocotylédone de la famille des Poacées. Son système racinaire est fibreux, avec des racines secondaires et adventives qui émergent sur les nœuds situés à la base des tiges (Chaumes). Le riz émet de nombreuses tiges (tallage) mesurant entre 0,6 et 2,4 mètres de haut (les variétés flottantes peuvent atteindre 5m voir plus). Chaque tige possède 10 à 20 nœuds entre lesquels on a les entre nœuds; sur chaque nœud on a une feuille qui est mince légèrement cuve avec une longueur de 30-50 cm et 7-25 mm de large. La panicule est un ensemble d'inflorescences de longueur variant entre 7.5–37.5 cm; elle est constituée de plusieurs branches portant chacune 75 à 150 épillets individuellement uniflore. La fleur hermaphrodite, renferme 6 étamines, 1 ovaire à 1 ovule, 2 styles très court à 2 stigmates; elle est protégée par 2 glumes très petites et 2 glumelles. Après fécondation il se forme le grain (paddy) dont les dimensions varient de 5-14 mm de long et 2-3,7 mm de large. Le grain dépourvu de glumelles est généralement blanc, parfois rouge, violet ou marron (Ross, 2005). Comparer à *O. sativa* L, *O. glabérima* à des fleurs glabres et groupés (Small, 2009), est caractérisé par sa coque rouge (riz rouge), sa petite taille (0,9-1,5m), ses glumes lisses et sa tendance à se briser après usinage mécanique (Carney, 1998). *O. sativa* L. possède plus de 1500 variétés différentes de riz, organisés en trois sous espèces de base: *Indica*, *Japonica* et *Javanica* (Small, 2009)

- *Indica* est indigène à l'Inde, est habituel des zones tropicales, a de longs grains et est le type le plus consommé. Il est cultivé en Indochine, en Thaïlande, en Inde, au Pakistan, au Brésil et au Sud des Etats Unis.
- *Japonica*, aussi connu sous le nom de *Sinica*, est indigène du Japon, caractéristique des climats tempérés et a de courts grains. Il est utilisé pour faire les sucreries parce qu'il cuit vite et fusionne plus facilement que les variétés à longs grains. Il est majoritairement cultivé dans les pays où il fait froid en l'occurrence au Japon, en Koré, au Nord de la Chine et en Californie.
- *Javanica* aussi connu sous le nom de *Bulu*, est indigène à une île de l'Indonésie (Java), est présente dans les zones tropicales et subtropicales; ses grains varient de moyens à longs. Il est particulièrement cultivé en Indonésie.

Avec la création croissante de plusieurs variétés, la distinction entre ces trois sous espèces d'*Oryzae sativa* L. devient de plus en plus difficile.

I.1.4. Ecologie et distribution du riz

Le riz (*O. sativa* L.) est cultivé dans des zones géographiques diverses: tropicales, subtropicales et tempérés chaudes; entre 55° N de l'équateur et 36°S de latitude (**Khush, 1997**), à trois mètres en dessous du niveau de la mer (Kerala-Inde), jusqu'à 3000 mètres d'altitude (Népal). La plupart des zones rizicoles se trouvent entre l'Equateur, 40° N et 70°–140° longitude Est; les rendements les plus élevés ont été rapportés entre 30° et 45°N de l'équateur et les pays proches de l'équateur ont montré des rendements de l'ordre de 0.8–1.4 tonnes par hectare (**Chandrasekaran et al., 2010**). La température moyenne durant toute la période de croissance du riz est de 20°C, avec 22-28°C comme optimum durant les principales périodes de croissance et un minimum de 25°C au cours de la floraison; le riz requiert de longues périodes d'ensoleillement, particulièrement durant les six dernières semaines de son cycle; la demande minimale en radiation solaire est de 300 cal/cm²/jour et l'eau irriguée devrait idéalement être à une température comprise entre 21-30°C (**Winch, 2006**). Le riz pluvial demande un minimum de 900 mm d'eau durant la période de croissance. En ce qui concerne le riz irrigué, la transplantation doit se faire dans un sol bien humide avec un peu d'eau stagnante; le niveau d'eau devrait être augmenté de 15-30 cm au cours de la croissance et réduit à la floraison jusqu'à séchage complet à la récolte; pour les deux méthodes de cultures, les périodes les plus critiques pour la supplémentation en eau sont comprises entre 10-12 jours avant le tallage et au cours de la floraison (**Winch, 2006**). Les vents modérés sont bénéfiques à la croissance du riz; les sols ayant une bonne capacité de rétention d'eau, une bonne quantité d'argile et de matières organiques sont idéals pour la culture du riz. Le riz croît bien sur des sols ayant des pH (potentiel d'hydrogène) variant entre 5,5-6,5; il peut croître sur des sols alcalins après traitement avec du gypse ou de la pyrite. (**Chandrasekaran et al., 2010**). *O. glaberrima* s'adapte mieux aux conditions stressantes des sols; il est tolérant à la toxicité du fer; est plus résistant à la sécheresse, aux maladies et aux insectes d'Afrique (**Sharma, 2010**).

I.1.5. Ecosystèmes de la culture du riz et système de production

Le riz est une plante d'origine aquatique, et donc assez exigeante en eau; son semis est effectué directement, à la volée et par repiquage de jeunes plants issus des pépinières. Tenant compte de l'exigence en eau, on classe la culture du riz sous quatre écosystèmes majeurs: la riziculture irriguée, la riziculture inondée, la riziculture de montagne et la riziculture en eau profonde (**Khush, 1997**). Les écosystèmes irrigués représentent sensiblement 50%, la riziculture inondée 34%, la riziculture de montagne ou de plateau fait

près de 9% et la riziculture en eau profonde (flottante) couvre 7% des surfaces rizicoles cultivées dans le monde entier (IRRI, 2009).

I.1.5.1. Riziculture irriguée

C'est la méthode de riziculture où les apports en eau sont parfaitement maîtrisés à travers les digues et diguettes, les canaux et les drains. Cette riziculture est l'image emblématique de la culture du riz. Ici le sol est préparé à l'état humide et le riz est repiqué; cependant, le semis direct est de plus en plus pratiqué à cause des coûts croissants de la main-d'œuvre. Cette méthode de culture de riz est prépondérante en Asie; est presque la seule pratiquée en Europe, en Amérique du Nord et en Australie. Elle contribue pour environ 75% de la production mondiale de riz, avec des rendements atteignant jusqu'à 10 tonnes par l'hectare.

I.1.5.2. Riziculture inondée (rainfed lowland)

Encore appelé riziculture pluviale de bas-fond, c'est la méthode rizicole endiguée où la maîtrise de l'eau n'est pas assurée; c'est la méthode la plus ancienne. La présence de l'eau dans la rizière est généralement associée aux crues d'origine pluviale. Elle peut être subdivisée en plusieurs catégories selon la hauteur de l'eau dans la parcelle (Singh et Singh, 2000): de 0-30 cm (Shallow lowlands), de 30-50 cm (Medium lowlands) et de 50-100 cm (Deepwater lands). Le semis qui se fait directement ou par repiquage est souvent difficile; l'usage des engrais est moindre et les rendements sont faibles. Elle est principalement pratiquée en Afrique et en Asie et son apport est de l'ordre de 17% de la production mondiale de riz.

I.1.5.3. Riziculture de montagne ou de plateau (upland)

C'est une riziculture non endiguée dont les besoins en eau dépendent totalement de la pluviométrie et où il n'y a pas immersion des surfaces cultivées. Le semis est direct et se fait à sec; plus de 50% de la surface totale consacrée au riz est occupée par la riziculture pluviale dans plusieurs pays de l'Afrique et de l'Amérique latine. Les rendements de cette riziculture sont généralement faibles; Elle ne nécessite pas les amendements importants et peut facilement se pratiquer dans le cadre des rotations des cultures. Elle contribue pour environ 4% de la production mondiale de riz.

I.1.5.4. Riziculture flottante

C'est une riziculture qui suit les crues des grands fleuves; la hauteur de l'eau est supérieure à 1 mètre et peut aller jusqu'à 5 mètres. Le semis se fait à la volée sur un labour grossier; on rencontre cette riziculture en Asie (Bangladesh, Mékong, Chao Phraya, Thaïlande centrale, Cambodge, Sumatra), en Afrique de l'Ouest (Niger) et en Amérique du

sud. La plupart des rizières en eau profonde est constituée par de petites exploitations familiales. Les rendements de cette riziculture sont bas; elle représente moins de 3% de la production mondiale.

I.1.6. Etapes et cycle de la production du riz

Les étapes de la culture du riz peuvent être scindées en quatre grandes phases: la préparation du sol, le semis, l'entretien durant le développement et la récolte. La préparation du sol consiste à défricher (désherbage manuel, chimique ou mécanique), à labourer, à emmotter et/ou à mettre en place les lits de la pépinière. Le semis en riziculture pluviale est direct à la volée en ligne ou en poquet; en riziculture irriguée très souvent, on fait une pépinière et les jeunes plants de 21-30 jours sont transplantés sur les parcelles endiguées, mais on y réalise aussi de plus en plus le semis direct. La croissance du riz se déroule suivant son cycle végétatif qui peut être subdivisé en neuf stages successivement désignés par: la germination, la plantule, le tallage, l'élongation du chaume, l'initiation paniculaire (montaison), la floraison, le grain laiteux, le grain pâteux et le grain dur (**Misra et al., 1994**). Au cours de ce cycle, la plante est soumise à diverses contraintes et doit être entretenue: il s'agit de faire le sarclage, la fertilisation, l'alimentation de la parcelle en eau (riz irriguée) la lutte contre les ravageurs (animaux et agents pathogènes). L'inter-culture n'est pas convenable pour la riziculture irriguée, inondée et flottante; elle est souvent réalisée en riziculture pluviale. En bref le riz est généralement cultivé sur les sols non favorables aux autres cultures et donc il se retrouve communément en monoculture (**Winch, 2006**). La récolte du riz peut se faire manuellement à l'aide de faucilles manuelles, ou mécaniquement via les moissonneuses batteuses. Les opérations post récolte incluent le battage, le nettoyage, le séchage, le stockage, la transformation, l'usinage (**Chandrasekaran et al., 2010**), la commercialisation ou la consommation.

I.1.7. Production, marché international et consommation du riz

La production totale de riz paddy dans le monde en 2014 était de 741477711 tonnes; l'Asie à lui seul contribuait à près de 90% de cette production. La Chine centrale, l'Inde, l'Indonésie, le Vietnam et la Thaïlande étaient les cinq premiers producteurs contribuant à eux seuls pour environ 70,5% de la production totale. L'Afrique représente près de 6,5% des surfaces rizicoles récoltées et 4,1% de la production mondial; les rendements de la production de riz en 2014 étaient de 2,59; 4,64; 5,75; 7,33 et 10,23 tonnes/ha respectivement pour l'Afrique, l'Asie, l'Amérique, l'Europe et l'Océanie (**FAOStat, 2017**). Bien que le volume du marché international de riz ait augmenté de

presque quatre fois (de 7,5 millions de tonnes en 1960 à une moyenne 28,5 millions de tonnes en 2000), il ne représentait que 6,9% (contre 4,4% en 1960) de la production totale de riz. En contraste le marché international du maïs et du blé était de 11,8% et 18,8% de leurs productions totales respectives en 2000. Ainsi; la plupart du riz tend à être consommé là où il est produit et par conséquent n'entre pas dans le marché international. Le marché international du riz est aussi caractérisé par un nombre relativement petit de pays exportateurs qui interagissent avec un nombre important de pays producteurs (**Dorosh et Wailes 2010**). La Thaïlande (qui est par ailleurs l'un des premiers fournisseurs de riz au Cameroun) a été constamment le plus grand exportateur de riz dans le monde avec un volume qui est passé de 1,4 millions de tonnes en 1960, à 10,6 millions de tonnes en 2011; ce leader de l'exportation a perdu la main en 2012 en faisant seulement les exportations de 6,9 millions de tonnes derrière l'Inde et le Vietnam qui ont exporté respectivement 9,5 millions et 7,8 millions de tonnes de riz. Les prix du riz n'ont pas substantiellement augmentés jusqu'en octobre 2007 où ils sont passés de 329 US dollars la tonne à 465 US dollars la tonne en février 2008 (**Dorosh et Wailes, 2010**); les prix du riz thaïlandais sont restés très haut et ont fluctué durant toute l'année 2012 entre 545-590 US dollars la tonnes (**FAO, 2012**). En considérant les régions, l'Afrique est le plus grand importateur de riz. Les pays les plus régulièrement retrouvés en tête des importations du riz incluent l'Indonésie, le Nigeria, les Philippines, l'Iran, et le Bangladesh (**FAO, 2012**). La demande de riz est sans cesse croissante à cause de l'augmentation la population mondiale; **Khush (1997)** a estimé que la production de riz devrait augmenter de 60% en 2025 pour couvrir la demande de nouveaux consommateurs de riz; il faut chercher donc à combler cette demande.

I.1.8. Importance, et usages du riz

Etant à la base de l'alimentation, plus de 85% de la production de riz grain est estimé être destiné à la consommation humaine, et seulement une faible partie destinée à l'usage industriel (production de l'alcool, de l'amidon, du glucose, de l'acide acétique, du vinaigre, de l'acétone, de l'huile et des produits pharmaceutiques) ou la nutrition animale. En Afrique, le besoin quantitatif de riz par personne et par an était estimé à 56,8 kg pour l'année 2013, ce qui est en augmentation comparé à celui de l'année 2012, qui était de 56,7 kg (**FAO, 2012**). Selon l'**USDA Nutrient Database (2017)**, l'analyse de 100g de riz blanc long grain non enrichi montre qu'il contient 365 kcal d'énergie, 79,95 g de glucides, 0,12 g de sucres libres, 1,3 g de fibres alimentaires, 0,66 g de lipides, 7,13 g de protéines, 0,07 mg de thiamine, 0,05 mg de riboflavine, 1,6 mg de niacine, 1,01 mg d'acide pantothénique,

0,16 mg de piridoxine (vitamine B6), 28 mg de calcium, 0,8 mg de fer, 25 mg de magnésium, 115 mg de phosphore, 115 mg de potassium, 1,09 mg de zinc et 1,09 mg de manganèse. La plante *O. sativa* L et le riz grain sont aussi utilisés à des buts thérapeutiques: en chine par exemple, la décoction de la paille (qui sert par ailleurs à la nutrition des animaux) est consommée oralement contre l'hépatite; l'infusion des racines est utilisé en Malaisie pour faciliter l'accouchement; la décoction des graines est prise en Inde contre la jaunisse; les grains sont consommés oralement contre la diarrhée au Mexique et les grains frais sont consommés au japon pour l'apport général en nutriments (Ross, 2005). Le riz représente un enjeu économique important, en ce sens qu'il constitue une source d'entrée considérable de devises pour certains pays à exemple de l'Inde, du Vietnam et de la Thaïlande qui ont été jusqu'ici les plus grand exportateurs (FAOstat, 2017). Cet enjeu économique peut déboucher par ricochet sur un enjeu politique; on se souvient de la crise alimentaire mondiale 2008 qui a failli ébranler tout le monde entier: c'était aussi la crise des prix élevés des denrées en général et du riz en particulier. C'est vue cette importance incontournable dans la vie, que l'Organisation des Nations Unies (O.N.U) a désigné l'année 2004 comme l'année internationale du riz.

I.2. Le riz au Cameroun

I.2.1. Historique de la culture du riz au Cameroun

La culture du riz au Cameroun daterait de la même période que la culture de l'espèce *Oryza glaberrima* qui a été domestiquée dans le delta du Niger, il y a de cela environ 1500 ans avant Jesus Christ et s'est 'étendue jusqu'au environ du Lac Tchad. Les navigateurs portugais introduiront *O. sativa* en Afrique (Cameroun) vers la moitié du 16^{ème} siècle. Les premiers rapports sur la culture du riz au Cameroun date des années 1930 à l'Extrême-Nord dans le secteur de modernisation rizicole de Yagoua; l'attention des techniciens de l'agriculture a été attirée dès avant 1939 par les caractéristiques favorables à la riziculture, que présentait cette zone, en particulier à cause de l'inondation. La culture du riz était dès 1945 pratiquée sporadiquement par un certain nombre de cultivateurs, mais à toute petite échelle et probablement à la suite de l'introduction par les services agricoles de semences diverses (Gros Buffet de Guyane, M32, M23, etc.). En 1950, la station de riziculture de Pouss a été créée avec pour missions principales la mise au point des conditions d'emploi du matériel mécanique, l'aide à la riziculture africaine grâce à son matériel, l'amélioration de la riziculture africaine traditionnelle par des études agronomiques tendant à la mise au point des techniques culturales et la multiplication de semences. Cette station, de situation géographique jugée excentrique, fut transférée à

Toukou en 1953, puis près de Yagoua, puis à Vourlalom, sur la berge du Logone où les possibilités d'aménagement étaient meilleures; malheureusement les infestations de *Pachytiplosis oryzae* ne favoriseront pas l'installation durable de la culture de riz. Fin 1954, le Secteur Expérimental de Modernisation de la Riziculture de Yagoua (SEMRY) fut créé et resta en sommeil jusqu'en 1959. Dès 1960 les financements reçus par la SEMRY ont permis de stabiliser les surfaces rizicoles cultivées aux alentours de 2800 hectares (**Chabrolin, 1961**). Entre 1970 et 1990, pour pallier aux problèmes d'insécurité alimentaire dans les zones marginales à forte pression démographique, l'Etat du Cameroun avait volontairement encouragé la riziculture irriguée, plus productive au détriment de la riziculture pluviale. A cet effet, trois sociétés de développement avaient été créées à savoir: la Société d'Expansion et de Modernisation de la Riziculture de Yagoua (SEMRY) à l'Extrême Nord, le «Upper Noun Valley Development Authority (UNVDA) » au Nord-Ouest et la Société de Développement de la Riziculture dans la Plaine de Mbo (SODERIM) à l'Ouest. Elles ont bénéficié d'importants financements nationaux et extérieurs; malgré ces appuis, la production camerounaise de riz n'a pu satisfaire la demande intérieure (**Minader, 2009**). La crise économique de 1994 viendra mettre à genou ces sociétés au point où aujourd'hui presque toute la production de riz au Cameroun est dans les mains des petits producteurs, qui contribuent à plus de 93% de la production totale (**Goufo, 2008**).

I.2.2. Production et consommation du riz au Cameroun

Le riz est couramment cultivé au Cameroun en irrigué, en pluvial stricte et en inondé dans plusieurs zones agro écologiques: zone soudano sahélienne (Yagoua, Maga, Kousseri, Lagdo, Karéwa), zone de montagne (Ndop, Tonga), zone de savane (plaine de Mbo), zone forestière (Nanga Eboko, NdiKiniméki, Obala); bref la riziculture est pratiquée dans presque toutes les régions du Cameroun, le plus souvent en monoculture. La production totale Camerounaise est environ au 2/3 assurée par la SEMRY qui encadre les petits producteurs pour assurer l'essentiel de cette production (**Minader, 2009**). De 2005 à 2014, la production de riz paddy au Cameroun a augmenté de plus de quatre fois, passant de 45000 tonnes à 189477 tonnes. En 2014, cette production représentait environ 0,66% de la production et 1,59% des surfaces rizicoles en Afrique; son rendement était de 1,0714 tonnes/ha contre 2,59 tonnes/ha pour le continent Africain, et très loin du rendement moyen mondial estimé à 4,556 tonnes/ha; il faut noter qu'entre 1983-1990 les rendements de la production de riz au Cameroun oscillaient entre 4,3-5,46 tonnes/ha. Le taux de semence de riz au Cameroun est d'environ 50 Kg/Ha (**FAOStat, 2017**) et la plupart de ces

semences proviennent des récoltes de la campagne agricole précédente. Depuis plus de deux décennies, la production de riz (qui est en grande partie absorbée par les pays voisins: Nigeria, Tchad, RCA) au Cameroun a contribué le plus souvent à moins de 15% de sa consommation et, les différences de cette consommation ont été comblées par des importations qui ne font que croître au fil des années (**Goufo, 2008**). En effet, selon les bases de données statistiques de la **FAOStat 2017**, les importations de riz au Cameroun sont passées de 446466 à 753263 tonnes de riz blanchi entre 2005 et 2013. En 2016, le Cameroun faisait partie des plus grands pays importateurs (23^{ième}) de riz blanchi et ses importations représentaient 1,3% des importations mondiales de riz, pour une valeur chiffrée à 242.3 millions de dollars US (**WFFL, 2017**). Tous les pans de la production du riz au Cameroun doivent recevoir une attention particulière afin d'améliorer sa production et ses rendements (**Minader, 2009**).

I.2.3. Types variétaux de riz cultivés Cameroun

IL existe des centaines de variétés de riz cultivées au Cameroun; ces variétés ont beaucoup évolué depuis l'expansion de la riziculture au Cameroun; quelques-unes récemment recensées par **Nguefack et al. (2013)**, dans différentes zones agro écologiques (localités) comprennent: quatre de Badounga (*Sankou, Taitchum, Toubeum, et Tox*), deux de Foumbot (*Tainan 5 et Tox 3145-34-3-2*), trois de Garoua (*IRAT, IRAT 112, et Tox 3100*), quatre de Kumba (*Chinese, Wab 122-IDSa-1-Wab 2, Wab 161-B-9-3, et Wab 127-IDSa-2-Wab 1*), 25 venant de Ndop (*DR 92, Faro 39-144, IR 7167-33-2-3, IRAT 104, IR 46, ITA 212, ITA 222, ITA 306, Nerica 1, Nerica 5, Tokambono 669, Tox 3145-34-3-2, Tox 3145-38-2-3, Tox 4004-36-2-2-2-31, Tox 4248-7-12, Wab 181-18, Wab 56-50, Wab 56-39, Wat-311-Was-B23-7-1-1-3, Wita 2, Wita 5, Wita 7, Wita 8, Wita 9, et Wita 10*), une venant Ntui (variété locale), quatre de Tonga (*Cica 8, Cholera, Kankou, riz blanc, and Riz rouge*) et trois de Yagoua (*IRAT 112, ITA 300, et Tox 3100*) on peut ajouter *IR 46* bien cultivé dans la région de l'Extrême Nord et les variétés NERICA (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 13, L8, L12, L19, L41, L42, L52, L60) qui sont en cours d'essai dans plusieurs régions. La plupart des variétés ci-dessus font partie des variétés d'*O. sativa*. Le NERICA est une variété hybride obtenue par croisement d'*O. glabérima* possédant les caractéristiques de suppression de mauvaises herbes, maturation précoce, tolérance à la sécheresse, résistance à la gale de riz du moucheron Africain, résistance aux maladies et qualités organoleptiques élevées; avec *O. sativa* qui est caractérisé par un faible taux de brisures, l'abondance des branches secondaires sur les panicules (rendements élevés) et la bonne réaction à la fertilisation minérale (**AfricaRice, 2008**).

I.3. Différentes contraintes de la riziculture

La culture du riz au Cameroun comme d'ailleurs partout dans le monde est soumise à trois types de contraintes: les contraintes écologiques (climat, pollution et désertification) à l'exemple des pluies excessives qui ont favorisé les inondations en 2012 dans l'Extrême Nord, causant des dommages sérieux à la production de riz cette année-là (**FAO, 2012**); les contraintes socio économiques (connaissance, disponibilité des intrants, institutions, disponibilité des crédits, attitudes traditionnelles), à l'exemple, d'un producteur qui refuse l'expérimentation d'une nouvelle variété de riz ou d'une nouvelle méthode culturale; et les contraintes de production à l'exemple des ravageurs du riz dans les bassins de productions.

I.3.1. Contraintes de production du riz

Comme la plupart des spéculations, le riz est exposé à plusieurs contraintes de production; ces contraintes comprennent les facteurs biotiques (mauvaises herbes, ravageurs animaux et les agents pathogènes) et les facteurs abiotiques (irradiations, eau, température et nutriments). Les dommages sont fréquents en champ et lors du stockage; selon **Oerke (2006)** les facteurs biotiques contribuent l'essentiel des pertes (77%); il estime que les pertes de production de riz liées aux mauvaises herbes, dans 19 régions du monde entre 34-47%. Les ravageurs animaux les plus dangereux, rencontrés en champs incluent les insectes (grillon, termites...), les mollusques, les colonies de larves, les sauterelles, les locustes (criquets migrateurs des régions désertiques d'Afrique, d'Asie ou d'Amérique), divers nématodes, les rongeurs (les rats et les hérissons), les crabes, les oiseaux (**Winch, 2006**), les acariens et les escargots. En stockage, les ravageurs tel que les coléoptères, *trogoderma granarium* et les lépidoptères (**Winch, 2006**) sont susceptibles d'altérer la qualité de la semence et donc sa germination. Les pertes associées aux ravageurs animaux sont de l'ordre de 13-26% (**Oerke, 2006**). De nombreuses maladies causées par les agents pathogènes (champignons, bactéries et virus) sont également responsables de pertes considérables pouvant atteindre jusqu'à 90% dans les cas graves (**Singh et Singh, 2000**).

I.3.2. Les Maladies du riz et leurs agents pathogènes

Les maladies rizicoles dues aux agents pathogènes incluent les affections fongiques qui sont majoritaires, les affections bactériennes et les affections virales. La moyenne des pertes de production de riz due à ces agents pathogènes est estimée à environ 15,2% (**Oerke, 2006**). **Gnanamanickam (2009)** cite la pyriculariose, la rhizochtone noir, le sheath rot, le flétrissement bactérien et le tungro comme les maladies majeures de la

production de riz. En Asie tropicale, **Savary (2000)** établit la rhizochtone noir, l'helminthosporiose et la pyriculariose comme les principales causes des pertes de la production du riz. L'importance économique des maladies du riz est plus souvent fonction de la région rizicole où l'on se trouve.

I.3.2.1 Les affections d'origines bactériennes

Deux des affections bactériennes sont d'une importance géographique et/ou économique considérable: Le flétrissement bactérien des feuilles (Bacterial Leaf Blight) qui est l'une des plus vieilles et plus importante maladie du riz signalée en Asie, au Nord de l'Australie, en Afrique et aux Etats Unis d'Amérique; et est causé par *Xanthomonas oryzae* s pv. *Oryzae* qui infecte les feuilles engendrant des lésions grisâtres qui s'étendent et entraînent le fanage (**Gnanamanickam, 2009**). La maladie des stries bactériennes (Bacterial Leaf Streak) qui est assez rependue en Asie tropicale, est véhiculé par *Xanthomonas oryzae* pv.*oryzicola* qui induit les formations des stries inter veineuses translucides de tailles variables sur les feuilles, avec parfois des exsudats jaunâtres sur les lésions (**Cottyn et al., 1994**).

I.3.2.2 Les affections virales

Parmi les affections virales, le tungro est sans doute l'affection la plus redoutable. Il est causé par le tungro bacilliforme et un tungro sphérique; ces deux virus sont transmis par un insecte du riz (*Nephotettix virescens*). Les plants de riz infectés par le tungro au stade de plantule entraînent des pertes de rendement variant entre 10-40%; les symptômes typiques sont; la restriction de croissance des plants, la décoloration des feuilles en jaune ou jaune-orangé et la réduction du tallage (**Singh et Singh, 2000**).

I.3.2.3 Les affections fongiques (cryptogamiques)

Les affections cryptogamiques sont non seulement les plus nombreuses des maladies dues aux agents phytopathogènes, mais sont aussi celles qui causent plus de dégâts dans les zones de production de riz (**Willocquet et al., 2004; Oerke, 2006; Gnanamanickam, 2009**). Quelques-unes les plus rependues comprennent: la pyriculariose, la maladie des taches brunes, le gigantisme, la maladie des taches de suies, la pourriture de la tige feuillée «Sheath rot» la rhizochtone «sheath blight» la brûlure des feuilles «leaf scald» (**Misra et al., 1994**), La plupart des champignons phytopathogènes du riz est véhiculé par la semence qui est l'organe à la base de la propagation du riz (**Mew et Gonzales, 2002**). **Nguefack et al. (2013)** ont évalué l'état phytosanitaires des semences originaire de plusieurs zones agro écologiques du Cameroun et ont ressorti que: l'helminthosporiose (*B. oryzae*) était présente dans tous les écosystèmes de riziculture avec

une incidence de 81,25%; la maladie des 'taches de suies' (*A. padwickii*) était présente dans un seul bassin (Badounga) mais avec une incidence atteignant 80% et que le gigantisme (*F. moniliforme*) avait un taux d'infection de 13,75%. Par ailleurs les symptômes de la pyriculariose causés par *Magnaporthe oryzae* ont été observés en champ bien que n'ayant pas été identifiés sur les semences.

I.3.2.3.1 L'helminthosporiose

I.3.2.3.1.1 Epidémiologie, symptômes et importance de la maladie

L'helminthosporiose est vulgairement appelé 'maladie des taches brunes'; elle a été signalée dans tous les pays producteurs de riz et plus particulièrement en riziculture pluviale de nappe, en riziculture de montagne ou en situation de pauvreté du sol (**Mew et Gonzales, 2002**). C'est une maladie chronique qui affecte des millions d'hectares de plantation de riz chaque année et en dépit de sa large répartition et de son impact, beaucoup reste à comprendre sur cette maladie; les pertes de production varient de 4 à 52 % (**Barnwal et al., 2013**). Une épidémie de l'helminthosporiose en 1942 au Bengal a entraîné les pertes de 40-90%, largement responsable de la famine qui sévit dans ce pays en 1943 (**Singh et Singh, 2000**). La maladie peut survenir à tous les stades de développement du riz; cependant la semence constitue la source primaire de l'infection et la fréquence de détection de l'agent pathogène sur les semences originaires de plusieurs régions du monde est d'environ 56,7% (**Mew et Gonzales, 2002**). L'infection secondaire est véhiculée par les spores (conidies) transportées par le vent; ce qui présage des possibilités d'infections au cours des stades végétatifs de développement du riz (**Picco et Rodolf, 2002**). Les hôtes collatérales comme *Leersia hexandra*, *Echinochloa colona*, *Pennisetum typhoides*, et *Setoria italica* pourraient être aussi les sources secondaires d'infection de l'inoculum (**Misra et al., 1994**). Sur les feuilles, les symptômes de la maladie se présentent en général sous forme de petits spots ovales ou circulaires et marron foncé (**Figure 1b**); les lésions larges ont très souvent les bords de même couleur mais ont un centre pâle ou grisâtre; la plupart des spots a un halo jaune clair au tour de leur bord (**IRRI, 2000**). Sur les glumes, les spots noirs ou marron peuvent couvrir la surface totale de la semence en cas d'attaque sévère (**Figure 1a**); dans les conditions favorables les conidies se développent sur le spot donnant une apparence de velours comme sur la **Figure 1c** (**Mew et Gonzales, 2002**).



Figure 1: Symptômes de l’helminthosporiose. (a) taches brunes sur les glumes des semences de riz; (b) taches brunes sur les feuilles de riz (Agarwal *et al.*, 1994); (c) conidies de *B. oryzae* au stéréo microscope, développées en apparence de velours (Misra *et al.*, 1994).

I.3.2.3.1.2 Biologie (caractéristiques) de l’agent pathogène

L’agent pathogène responsable de la maladie des taches brunes est *Bipolaris oryzae* (Breda deHaan) Shoemaker. On l’appelle encore *Drechslera oryzae* ou *Helminthosporium oryzae*. Les caractéristiques taxonomiques de *B. oryzae* tel que décrites par Agrios, 1997

sont les suivantes: Embranchement des Thallophytes; Groupe des Eumycota; Classe des Deutéromycètes; Sous classe des Hyphomycètes; Ordre des Hyphales; Famille des Monoliacées; Genre *Bipolaris*; Espèce *oryzae*.



Figure 2: Caractéristiques morphologiques de *B. oryzae*. (a) colonies sur PDA; (b) conidiophores au microscope (Mew et Gonzales, 2002); (c) conidies au microscope (Argawal et al., 1994)

En ce qui concerne les caractéristiques morphologiques de *B. oryzae*, lorsqu'on incube les semences infectées sur du papier buvard, il apparaît un mycélium noir marron

ou noir visible à l'œil nu. Sur milieu Potatoes Dextrose Agar, le mycélium est dense, aérien, cotonneux et de couleur variant du gris à gris verdâtre (**Figure 2a**). Au microscope, le mycélium est septé et noir à noir verdâtre; les conidiophores sont septés, solitaires ou en petits groupes, pâles à marron et portent des conidies à leurs extrémités et sur les côtés comme illustré à la **Figure 2b** (**Mew et Gonzales, 2002**). Les conidies sont incurvées avec un renflement dans la partie médiane. Ces conidies sont souvent cylindriques, presque droites (**Figure 2c**) avec 6 à 14 septa parallèles entre eux (**Argawal et al., 1994**).

I.3.2.3.2. La maladie des taches de suies

I.3.2.3.2.1. Epidémiologie et symptômes de la maladie

La maladie des 'taches de suies', ou «Stackburn disease» est distribuée dans la plupart des pays producteurs de riz en Afrique. En Asie, en Australie, en Océanie, en Amérique du Nord et Sud. Comme l'helminthosporiose, elle est premièrement véhiculée par les semences et est l'une des affections responsables de la décoloration significative des grains de riz (**Arshad et al., 2009**); sa fréquence de détection sur les semences issues de différentes régions du monde est d'environ 67,1% (**Mew et Gonzales 2002**). Les glumelles infectées ont des taches brunes pâles ou blanchâtres; L'infection de la plantule, des racines, et du coléoptile est marquée par de petites taches nécrotiques variant du noir-marron au noir, qui coalescent souvent (**Figure 3a**); les lésions au niveau des feuilles sont constituées par de larges spots ovales ou circulaires, avec des centres brun-pâles et des bords noir-marrons (**Figure 3b**) bien distincts (**Mew et Gonzales 2002**); Les dégâts causés sur les feuilles sont moindres, comparés aux cas où les semences sont attaquées.



Figure 3: Lésions foliaires causées par *A. padwickii* (**Agarwal et al., 1994**). (a) taches de suies causées par *A padwickii*; (b) larges spots ovales ou circulaires, avec des centres brun-pâles et des bords noir-marrons sur la feuilles de riz

I.3.2.3.2.2. Biologie (caractéristiques) de l'agent pathogène

L'agent pathogène de la maladie des taches de suies est *Alternaria padwickii*; c'est la seule espèce rencontrée sur les semences de riz, parmi la cinquantaine que compte le genre *Alternaria*. Les synonymes de *A. padwickii* sont: *Trichoconis padwickii* et *Trichoconiella padwickii*. Selon **Agrios (1997)**, ses caractéristiques taxonomiques sont les suivantes: Embranchement des Thallophytes; Groupe des Euacomycètes; Classe des Deutéromycètes; Sous classe des Hyphomycètes; Ordre des Pléosporale; Famille des Pléosporacées; Genre *Alternaria*; Espèce *padwickii*.

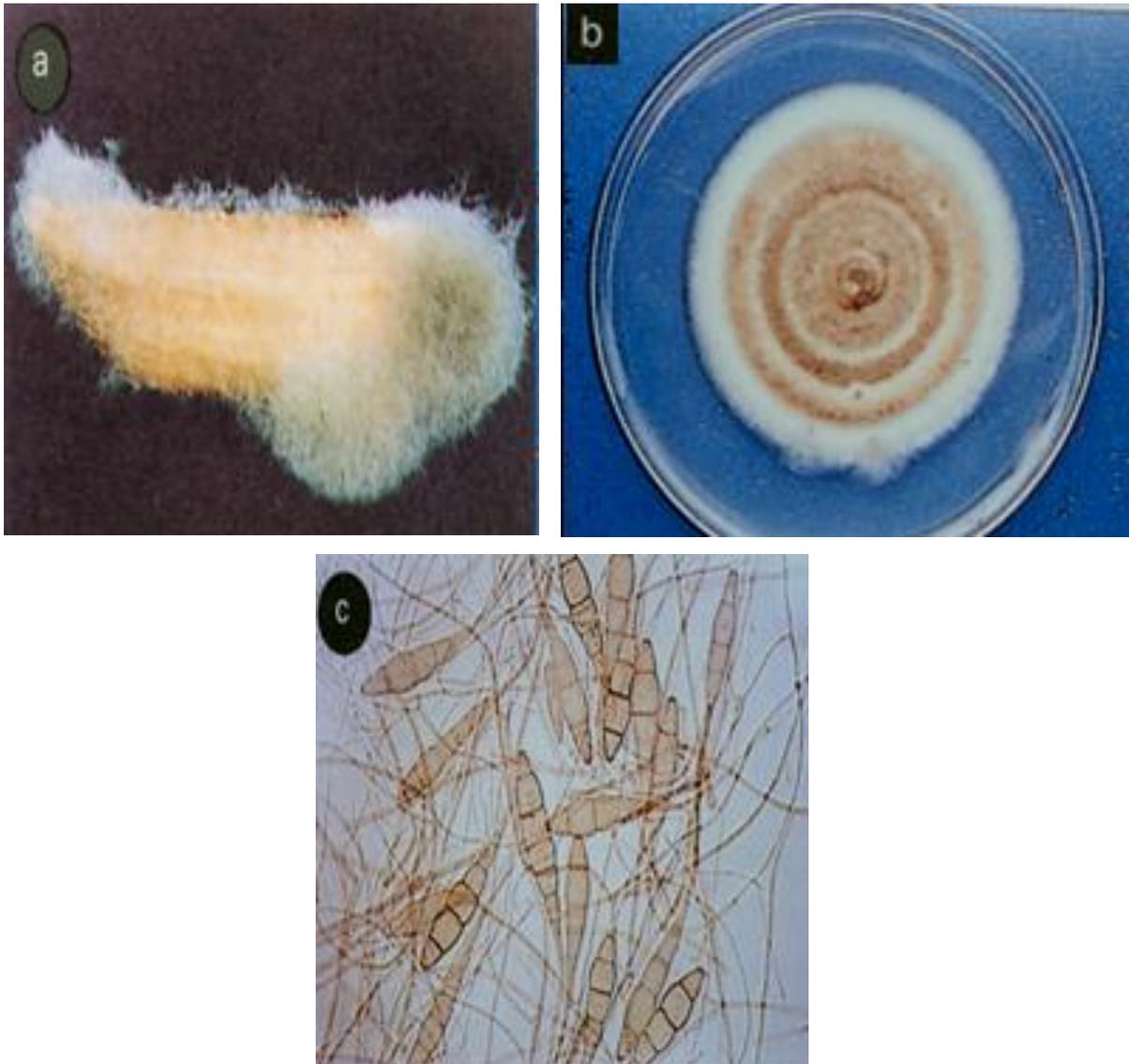


Figure 4: Caractéristiques morphologiques d'*Alternaria padwickii*. (a) Croissance mycélienne sur la semence de riz (**Misra et al., 1994**); (b) colonies sur PDA (**Misra et al., 1994**); (c) conidies au microscope (**Agarwal et al., 1994**)

Morphologiquement sous un stéréo microscope, une croissance mycélienne avec conidies peut être observée sur les semences de 6 à 8 jours, incubées sur Blotter (**Figure**

4a); ici, la croissance mycélienne est volumineuse et présente une couleur grisâtre-marron. Sur milieu PDA, le mycélium le plus souvent dense, cotonneux et aérien; les colonies ont une couleur lumineuse pâle-orange à noir grisâtre-marron; la reverse est verdâtre noir avec des bords orange pâle (**Figure 4b**). Au microscope, les conidiophores sont enflés apicalement; les conidies mesurent $103-173 \times 9-20$ nm, sont rectilignes ou incurvées, généralement fuselées et comportent chacun 3 à 5 septa transverse (**Figure 4c**); elles sont étroites au niveau du septa, hyalines et se transforment de la couleur pâle-brunâtre au grisâtre-marron à maturité; elles présentent une longue queue terminale sur laquelle peut se trouver un ou plusieurs septa (**Misra et al., 1994**).

I.3.2.3.3. Le gigantisme

I.3.2.3.3.1. Epidémiologie Importance de la maladie et Symptômes

Le gigantisme est une maladie largement distribuée dans les aires de la pratique de la culture du riz; il se développe en riziculture irriguée et pluviale; il est connu dans plusieurs pays producteurs sous différents noms: aux Philippines elle est appelée male du riz «play lalake», «white stalk» en Chine et «man rice» en Guyana (**Misra et al., 1994**). Les semences infectées ont été prouvées être la source la plus importante de l'inoculum comparé à d'autres sources comme le sol et les mauvaises herbes. L'inoculum est retrouvé en pourcentage élevé sur les glumes vides et, le taux de détection est d'environ 28,1% (**Mew et Gonzales, 2002**). La maladie peut être observée en pépinière et en champ; les plantules infectées présentent généralement une élongation anormale de la tige feuillée et/ou des feuilles (**Figure 5 gauche**) contrairement aux plantules normales; on peut aussi noter quelques cas de restriction de croissance. Les plantes matures infectées s'assèchent très souvent et meurent (**Figure 5 droite**) ; celles-ci portent les panicules vides lorsqu'elles atteignent le stage de reproduction (**Mew et Gonzales, 2002**).



Figure 5: Symptômes du gigantisme. (Gauche) Elongations anormales des tiges et des feuilles de riz; (Droite) assèchement précoce des plants infectés par *F. moniliforme*

I.3.2.3.3.2. Biologie de l'agent pathogène

L'agent responsable du gigantisme est *Fusarium moniliforme* Sheld; ses synonymes comprennent: *Fusarium heterosporum* Nees; *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg; *Lisea fujikuroi* Sawada; *Gibberella fujikuroi* (Sawada) S. Ito; *Gibberella moniliformis* Wineland et *Gibberella moniliforme*. Sous un stéréo microscope, les semences infectées sur blotter montrent une croissance mycélienne modérée à dense, blanc clair et couvrant généralement toute la semence (**Figure 6a**); le mycélium devient souvent violet. Les vieilles cultures apparaissent poudreuses à cause de la formation des microconidies (**Figure 6b**). La colonie sur PDA après incubation à 20°C est pâle rougeâtre et couverte par un mycélium doux; à 25 °C, cette couleur devient violet rougeâtre. Les hyphes sont septées et branchées. Les microconidies forment des chaînes; les conidies sont formées de une à deux cellules, sont fusiformes à ovales, hyalines et mesurent 5-12 × 1.5-2.5 nm. Les macroconidies ayant 3 à 7 septa sont allongées ou un peu courbées au niveau de la cellule basale ou distinctement pédicellées forment un «sporodochia» avec une couleur variant du pâle jaunâtre-berge, pâle rougeâtre-orange à rouge carotte et mesure 5-82 × 2.0-4.2 nm comme représenté sur la **Figure 6c** (Misra et al., 1994).

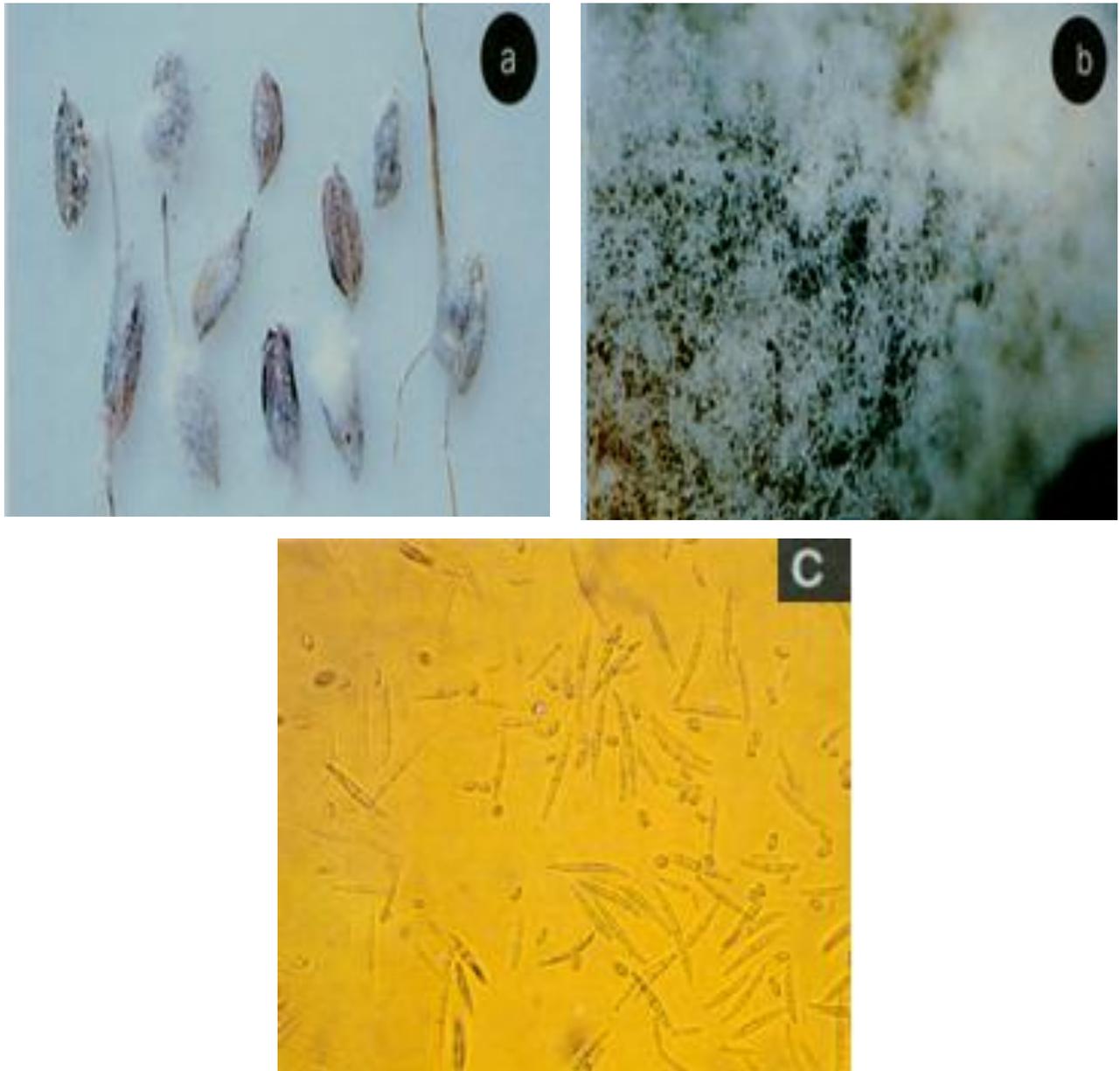


Figure 6: Caractéristiques morphologiques *Fusarium moniliforme* (Misra et al., 1994) (a) Mycélium couvrant les semences de riz; (b) microconidies poudreuses; (c) micro et macro conidies au microscope

I.3.2.4. La pyriculariose

La pyriculariose (fungal Blast) est considérée comme la principale maladie du riz, du fait de sa large distribution dans tous les continents et environ dans 85 pays; son incidence est élevée en cas de conditions environnementales favorables et les pertes peuvent être supérieures à 50% quand la maladie survient dans les proportions épidémiques (Gnanamanickam, 2009). La pyriculariose est une maladie d'importance économique et biologique énorme (Howard et Valent, 1996). *Magnaporthe oryzae*

(Hebert) Barr est l'agent responsable de la pyriculariose; on l'appelle encore *Pyricularia oryzae* Cav, *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc; *Pyricularia grisea*, *Pyricularia oryzae* Cavara, *Dactylaria oryzae* (Cav.) Sawad, *Trichothecium griseum* Cooke, *Ceratospaeria grisea* Hebert, *Phragmoportha grisea* (Hebert) Monod); c'est un champignon ascomycète filamenteux, hétérothallique et hémibiotrophique (Park et al., 2009). Il est le champignon pathogène le plus important chez le riz et, a un degré de spécificité élevé vis à vis de son hôte (Couch et al., 2005); Il infecte toutes les parties du plant de riz y inclue les racines (Sesma et Osbourn, 2004). La fréquence de détection de ce pathogène sur les semences est d'environ 9,9%; les symptômes apparaissent sur les feuilles d'abord comme de petites lésions blanchâtres ou de mouchetures grisâtres qui s'élargissent éventuellement sous forme de larges zones nécrotiques en toile d'araignée de couleur dépendant de la susceptibilité de la variété et riz et des conditions environnementales, avec des contours de couleur variant du brun au rougeâtre (Figure 7a); les tissus infectés du cou paniculaire s'affaiblissent, deviennent noirs et se brisent facilement pour tomber (Figure 7b); les nœuds infectés se décomposent et deviennent noirs (Figure 7c) (Mew et Gonzales, 2002).



Figure 7: Symptômes de la pyriculariose. (a) Larges zones nécrotiques en toile d'araignée sur les feuilles de riz; (b) affaiblissement paniculaire due à *M. oryzae*; (c) noircissement des nœuds des tiges de riz infectés par *M. oryzae*

I.4. Méthodes de lutte contre les champignons phytopathogènes

I.4.1. Introduction

On distingue les méthodes de lutte qui excluent l'introduction d'un agent pathogène dans un environnement, représentés par les mesures de quarantaine (législation, inspections, certification traitement) et les méthodes de lutte qui réduisent ou éradiquent ou l'inoculum déjà présent sur la plante (organes) hôte ou présent dans son environnement;

incluant la lutte par sanitation et les méthodes culturales, la lutte par les agents physiques et mécaniques, la lutte biologique, la lutte génétique et par les organismes transgéniques, la lutte chimique et la lutte naturelle par les extraits de plantes (biopesticides).

I.4.2. Contrôle par la quarantaine

Dans son sens stricte, la quarantaine fait référence au maintien en isolement des plantes ou des organes de propagation de ceux-ci, jusqu'à ce qu'ils soient censés être dépourvus de pathogènes ou de maladies. Elle a comme principe l'exclusion et parfois l'éradication d'un agent pathogène, afin de prévenir son expansion d'une zone à une autre. La quarantaine se justifie par les mesures de législation, d'inspection, de certification et de traitement. La législation de la quarantaine est l'ensemble des règles et mesures à respecter lorsque un matériel susceptible d'abriter des agents pathogènes, est transféré d'une région à une autre; elle varie d'un pays à un autre mais, est maintenant largement harmonisée à travers la plupart des régions géographiques. La législation restreint ou prohibe l'importation des pathogènes eux même, des organes de propagation pouvant les abriter, des sols infestés et des denrées alimentaires susceptibles d'abriter les pathogènes. L'inspection devrait être faite dans le pays exportateur avant la délivrance du certificat phytosanitaire, et dans le pays importateur comme double contrôle pour détecter les pathogènes et les maladies devenues évidents au cours du transit. La valeur de l'inspection dépend des connaissances et de l'expérience des équipes d'inspection. Les traitements utilisés en quarantaine sont généralement similaires à ceux utilisés dans les procédures générales de pratique agricole pour le contrôle des agents pathogènes et des maladies; ils incluent le poudrage, la pulvérisation, le trempage avec le pesticide, le traitement thermique ou à basse température et la fumigation. Les termes quarantaine intermédiaire et quarantaine post entrée sont respectivement utilisés en référence à la détention des plantes en isolement pour l'inspection durant le transit et après arrivée à leur destination finale. Circonscrire un agent pathogène ou une maladie par les mesures de quarantaine est très complexe et le pathogène (maladie) fini le plus souvent par se retrouver de l'autre côté (Waller, 2002).

I.4.3. Contrôle par sanitation et par les méthodes culturales

La sanitation consiste à réduire ou à éradiquer l'inoculum présent sur les plants, en pépinière et serre pour éviter l'expansion de la maladie sur les plantes saines. Elle inclut; l'élimination directe des plantes ou parties de plantes infectées ou suspectées abriter l'agent pathogène, le sarclage (arrachage des mauvaises herbes) et la désinfection des surfaces dans les pépinières et l'enlèvement des débris végétaux (Kerruish et al., 2010).

Les méthodes culturales incluent la rotation culturale qui est généralement associée à la diminution de l'incidence des maladies véhiculés par le sol (**Janvier et al., 2007**), ceci en brisant le cycle des pathogènes, réduisant par ricochet leur accumulation; l'inter-culture qui réduit l'incidence, la sévérité et la vitesse de progression de la maladie quoique son efficacité soit fonction du système de culture mis en place (**Fininsa et Yuen, 2002**); le labour qui peut entraîner l'agent pathogène en profondeur dans le sol et réduire ainsi sa densité et donc son potentiel pathogène à travers les changements de texture, d'aération de température, d'humidité et de densité (**Bailey et Lazarovits, 2003**); l'application adéquate du fumier et du compost riche en azote pourrait réduire les maladies véhiculées par le sol en libérant tous les éléments électrochimiques générés durant l'entreposage (latence) ou en décomposant l'agent microbien (**Bailey et Lazarovits, 2003**). La création des conditions environnementales défavorables à l'évolution de l'agent pathogène à l'exemple du «Mulching», le choix du site et la période de semis, la densité du semis, le contrôle de l'eau sont là, d'autres méthodes culturales permettant de lutter contre les agents pathogènes (**Kerruish et al., 2010**). L'usage de ces méthodes pour le contrôle de *B. oryzae* et *F. moniliforme*, repose principalement sur la période de semis, la densité du semis, et le sarclage des mauvaises herbes susceptibles de favoriser l'infection. Le contrôle par sanitation et par les méthodes culturales est assez contraignant et son efficacité est limitée en cas d'attaque sévère.

I.4.4. Contrôle par les agents physiques et mécaniques

Cette méthode utilise les agents physiques tels que: la température (basse et élevée), les radiations solaires, les radiations électromagnétiques/particulaires, les rayons UV et les filtres pour lutter contre les agents phytopathogènes (**Agrios, 2005**). A ces agents physiques et mécaniques sont associés plusieurs méthodes de lutte, parmi lesquelles le stockage des semences à basse température, la pasteurisation du sol, la stérilisation des sols par la chaleur, le simple lavage des semences, le traitement des organes de propagation des plantes (semences, boutures) par l'eau chaude, la lésion des tissus des plantes infectées par les radiations efficaces et la solarisation (**Kerruish et al., 2010**). Cette dernière encore appelée chauffage du sol par les radiations solaires est une technique climat-dépendant, de désinfection du sol devant être adapté à une région ou une saison spécifique; la liste des pathogènes contrôlés par solarisation comprend les champignons phytopathogènes clés comme *Verticillium*, *Rhizoctonia* et *Fusarium sp.* La destruction possible de la micro flore saprophyte normale du sol, l'accumulation d'un degré toxique de sels (manganèse) et d'ammoniac (par destruction des bactéries nitrifiantes, pouvant rendre le sol

temporairement phytotoxique) sont là, quelques limites que présente cette méthode de contrôle (Agrios, 2005); elle est aussi généralement assez coûteuse en temps de travail et considérée comme de moindre intérêt économique (Agrios, 2005).

I.4.5. Contrôle biologique par les microorganismes

Le contrôle par les microorganismes consiste à utiliser un organisme vivant pour réduire ou supprimer un agent pathogène spécifique (Eilenberg et al., 2001). De milliers de micro-organismes sont connus comme agents de contrôle biologique, mais seulement très peu sont enregistrés et commercialisés; parmi ceux-ci, on peut citer *Trichoderma barzianum*, vendu sous le nom de F-Stop, pour le contrôle de plusieurs champignons transmis par le sol; et *Trichoderma harzianum/T. polysporum*, vendu sous le nom de BINAB T pour le contrôle de la décomposition du bois (Agrios, 2005). Les agents de bio contrôle des champignons phytopathogènes sont le plus souvent des champignons ou des bactéries qui ont une action antagoniste, endophyte, hyperparasite ou mycorhize (Kerruish et al., 2010). Certains champignons hyperparasites d'agents pathogènes font l'objet de recherches intensives: il s'agit de *Ampelomyces quisqualis*, *Tilletiopsis*, *Verticillium lecanii* et *Stephanoascus* les plus répandus (Panneton et al., 2000). Plusieurs champignons phytopathogènes du riz incluant *Pyricularia grisea*, *Bipolaris oryzae*, *Sclerotium oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Sarocladium oryzae* peuvent être biologiquement contrôlés en utilisant diverses souches bactériennes notamment *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma sp*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas sp* et *Pseudomonas aeruginosa* respectivement. (Vasudevan et al., 2002). En effet, *Trichoderma spp* a montré son efficacité pour le contrôle de la croissance mycélienne de *Bipolaris oryzae* (Khalili et al., 2012) et *F. moniliforme* (Bacon et al., 2001); en plus *Trichoderma spp* stimule la croissance du riz. Certains auteurs considèrent la lutte utilisant les organismes génétiquement modifiés (OGM) comme faisant partie intégrante de la lutte biologique (Panneton et al., 2000); ceci ne sera pas le cas dans ce paragraphe. Pour ses défenseurs, le contrôle biologique se présente comme une alternative à l'usage des pesticides en agriculture; cependant cette méthode présente plusieurs limites notamment les effets délétères sur les micro-organismes non ciblés ou utiles, le développement des résistances vis à vis de l'agent de bio contrôle, les limitations écologiques (nature du sol, pluviométrie, température) et la possibilité réelle de modification de l'environnement (Vasudevan et al., 2002).

I.4.6. Contrôle génétique et par les organismes transgéniques

Le contrôle génétique est une méthode simple, qui consiste à sélectionner des variétés de plantes tolérantes aux agents ravageurs et les vulgariser. Différentes variétés de riz ont différentes sensibilités vis à vis des champignons pathogènes; par exemple la variété IR 46 est résistante vis à vis *M. oryzae*, mais est sensible à *B. oryzae* (Singh et Singh, 2000). Ce moyen de contrôle est non polluant, peu contraignant et moins coûteux; cependant, les races de ravageurs s'adaptent sans cesse aux gènes auxquels les sélectionneurs les opposent, entraînant ainsi l'apparition de nouvelles souches très agressives (Savery et al., 2000). En plus, à défaut de caractères de résistance adéquats, la tolérance peut être utilisée avec cette réserve que les plantes tolérantes peuvent servir de réservoir de germes et de sources de contamination pour les variétés sensibles; ce qui contrarie l'épuration phytosanitaire; par ailleurs, plusieurs facteurs limitent la généralisation de l'emploi des variétés résistantes, en particulier l'absence de gènes de résistance efficaces et l'impossibilité d'associer la résistance aux caractéristiques de productions (rendement, propriétés technologiques) les plus appréciées (Semal, 1989).

L'usage des PGM dans la lutte contre les agents pathogènes consiste à utiliser les techniques du génie génétique pour introduire un ou plusieurs gènes dans un organisme (plante), le permettant ainsi de résister aux attaques d'un agent nuisible (champignon) particulier. Au cours de la dernière décennie, les variétés de riz (génétiquement modifiées) développées ont montré des résistances à quelques maladies fongiques; la stratégie commune pour développer le riz résistant aux champignons repose essentiellement sur la sur-expression des PRs protéines (pathogenesis-related proteins) incluant la chitinase (PR-3), la β -1,3-glucanases (PR-2), la «thaumatin-like proteins» (PR-5) et d'autres protéines antifongiques dérivées d'autres plantes ou bien des microorganismes; la chitinase est la PRs protéines la plus utilisée pour développer les plantes de riz résistant aux champignons; elle catalyse l'hydrolyse de la chitine qui est l'un des principaux constituants des parois cellulaires de plusieurs champignons (Chen et al., 2010). Par ailleurs, Nishizawa et al. (2003) ont rapporté que le riz transgénique exprimant la 1,3;1,4- β glucanase résistait vis à vis de *Magnaporthe grisea*; Datta et al. (1999) ont quant à eux montré que la «thaumatin-like protein» du riz transgénique augmentait la résistance contre *Rhizoctonia solani*. L'approche de lutte contre *B. oryzae* et *F. moniliforme* via les PGMs, n'a pas encore été véritablement développée. L'usage des PGMs fait l'objet de nombreux questionnements qui sont à l'origine de nombreux débats; on souligne entre autres les potentiels risques associés à l'usage des PGMs assez complexes (pas encore explorés), les questions

d'éthiques et les risques d'abus des grandes firmes qui détiennent le monopole sur les PGMs (Acquaah, 2004). Il faut aussi noter que de manière générale, les résistances conférées par les gènes ne sont pas très souvent fortes (Bajaj et Mohanty, 2005), et que les transformations génétiques (du riz) peuvent s'accompagner de la perte de certaines propriétés de la plante en l'occurrence la mauvaise croissance, l'altération du système racinaire, la perte de la fertilité et la réduction de la germination (Nishizawa et al., 2003).

I.4.7. Contrôle chimique par les pesticides

L'usage des pesticides est la méthode de contrôle la plus utilisée dans les grandes exploitations agricole; elle est communément appelée lutte conventionnelle et consiste à utiliser les pesticides synthétiques (fongicides) pour lutter contre les organismes ravageurs. La fumigation, le traitement des semences par enrobage et trempage, la pulvérisation et le poudrage en champ sont couramment utilisés ici. Les fongicides font parties intégrantes de la production agricole dans la plupart des pays du monde; sans ces dernières, les pertes de production de certaines spéculations comme le riz, le blé, le maïs, la pomme de terre, le soja et le coton seraient considérablement élevées (Oerke, 2006). En effet, selon les données de la FAO (2010), les pertes de production de riz estimées à environ 52%, seraient de l'ordre de 82% en l'absence des protections phytosanitaires incluant les fongicides. Dans les pays de grande production de riz (Asiatique) notamment l'Inde, les fongicides synthétiques tel que Thiram, Captan, Carboxin, Carbendazim, Pyroquilon et Tricyclozole sont recommandés pour le traitement des semences de riz dans le but de tuer ou de limiter le développement des champignons (Chandrasekaran et al., 2010); à cet effet, Ahmed et al. (2002) ont montré que le Dithane M-45 (fongicide) dont la matière active est le Mancozèbe, inhibe avec succès in vitro, la croissance de *B. oryzae*, qui joue un rôle dans l'inhibition de la germination du riz. La méthode chimique de lutte s'avère donc assez efficace; cependant elle présente plusieurs limites en l'occurrence l'augmentation du coût de production agricole. Elle affecte l'environnement à travers la contamination de l'eau, du sol et de l'air qui transfèrent les résidus chimiques dans la chaîne alimentaire; elle réduit la biodiversité et la fixation de l'azote; détruit la vie marine et les oiseaux et/ou altère génétiquement leurs futures générations; elle réduit la flore bénéfique et non ciblée; réduit la population d'insectes prédateurs des parasites ainsi que celle des abeilles (Stoytcheva, 2011). Elle produit des effets adverses sur la santé de l'homme et le capital social (Atreya et al., 2012; Ahmed et al., 2011); elle induit l'apparition des souches résistantes aux pesticides (Dianz et al., 2002). Ces limites ont favorisé l'introduction des mesures très rigoureuses dans la réglementation, la commercialisation et l'usage des

pesticides; ces mesures sont très peu respectées par les producteurs en particulier ceux des zones rurales dans les pays en voie de développement; en effet plusieurs pesticides bannis sont encore largement utilisés dans les pays en voie de développement et continuent à causer de sérieux problèmes environnementaux et de santé animale (**Ahmed et al., 2000**).

I.4.8. Contrôle naturel par les extraits de plantes (Biopesticides)

Le contrôle naturel est l'amélioration phytosanitaire des végétaux et/ou des semences de ceux-ci par des essences naturelles ayant un pouvoir pesticide. Durant les dernières décennies, les extraits de certaines plantes ont mondialement reçu une attention particulière du fait de leurs propriétés antimicrobiennes; certains ont ainsi ont été formulés comme pesticides botaniques pour une large application et en alternative aux pesticides de synthèses. (**Dubey et al., 2008; Dubey et al., 2011**). Les extraits de plantes sont généralement utilisés comme remèdes en médecine traditionnelle et, sont préparés par macération dans l'eau à température ambiante ou par décoction. En laboratoire, les extractions sont généralement faites avec les solvants organiques comme l'éthanol dans les soucis premiers d'amélioration des rendements. L'application des extraits de plantes (si bien formulés) dans le contrôle des champignons phytopathogènes est une alternative réelle aux pesticides synthétiques, pour une production agricole plus saine (**Wilson et al., 1997; Fiori et al., 2000**). Ces extraits peuvent être facilement obtenus des plantes disponibles et renouvelables, donc économique (**Kumar et al., 2007**). Ils posent moins de problèmes à la santé humaine et animale; ils ont des actions multiples soit directe sur la maladie, soit systémique et/ou stimulatrice de la croissance; ils limiteraient les problèmes de résistance et atténueraient les effets indésirables rencontrés lorsqu'on utilise les antimicrobiens synthétiques (**Raveesha, 2011**). Ils sont facilement biodégradables, non ou peu phytotoxiques, éco favorables et largement acceptés par les consommateurs (**Dubey et al., 2008**). Plusieurs espèces de plantes supérieures n'ont pas encore été étudiées; leurs constituants biologiquement actifs comme sources potentielles de pesticides commerciaux restent à découvrir; ceci est principalement due au manque d'information sur le screening du potentiel antimicrobien (antifongique) de ces plantes (**Satish et al., 2007**).

I.4.9. Contrôle par immunisation

L'inoculation d'une plante avec certains pathogènes ou bien un certain nombre de substances, conduit souvent à une 'immunisation' presque permanente de la plante; c'est à dire la résistance induite de la plante contre le pathogène auquel la plante est normalement sensible (**Agrios, 2005**).

I.4.9.1. Définition de résistance induite

La résistance induite est un état physiologique au cours duquel la capacité des mécanismes de défense naturelle d'une plante est considérablement augmentée contre une large gamme de ravageurs (agents pathogènes); suite à une stimulation adéquate après interaction avec un micro-organisme, par traitement avec diverses substances chimiques naturelles et chimiques, ou bien suite à un stress physique (**Métraux et al., 2002; Hammerschmidt et al., 2001**). Elle a pour base l'induction de l'expression de l'information génétique latente qui est présente dans la plante (**Edreva, 2004**).

I.4.9.2. Agents inducteurs de la résistance

Les agents inducteurs de la résistance sont des facteurs (micro-organismes, molécules, et divers stress) ayant la capacité d'être reconnus par la plante et d'engendrer des réactions de défenses structurales et biochimiques associées à l'expression de la résistance; ils sont très souvent connus sous le nom de éliciteurs, stimulateurs de défense naturelles (SDN) ou encore stimulateurs des défenses des plantes (SDP); on les catégorise généralement en éliciteurs biotiques (endogènes ou exogènes) et éliciteurs abiotiques (**Benhamou et Rey, 2012a**). Les potentialisateurs sont communément englobés dans les éliciteurs; cependant, à la différence de ces derniers se sont des molécules qui ne déclenchent que les premières étapes de la résistance induite après leur application et, à la suite d'une infection ils sensibilisent la plante à répondre plus rapidement et plus efficacement « Priming » à l'attaque de l'agent pathogène (**Conrath et al., 2006; Zimmerli et al., 2001**). Ainsi les agents inducteurs de la résistance peuvent jouer le double rôle d'activateur direct (éliciteur) et de stimulateur (potentialisateur) des mécanismes de défense de la plante (**Conrath et al., 2001**).

Plusieurs facteurs ont été identifiés comme responsables et/ou potentialisateurs de l'induction de la résistance chez la plante et peuvent être répartis comme suit:

- Les microorganismes pathogènes causant les réactions nécrotiques hypersensibilité, les PGPR (plant-growth promoting rhizobacteria), les souches pathogéniques avirulentes ou atténuées, les fragments de membranes cellulaires (**Jung et al., 2009; Walters et al., 2005; Conrath, et al., 2002; Pieterse et al., 1998**) et les molécules inductrices issues de ces organismes; notamment les antibiotiques, la chitine, les glucans (hepta- β -glucopyranoside) l'ergosterol, les composés volatiles (2,3 butanediol) les lipopolysaccharides, les lipoolygosaccharides, les peptides/protéines, l'acide salicylique et les sphingolipides (**Benhamou et Rey, 2012a; Lyon, 2007**).

- Les extraits de plantes (**Tapan et al., 2011**) et leurs produits, notamment l'azadirachtine la brassinolide, l'acide jasmonique et composés apparentés, les oligogalacturonides, l'oxalate, l'acide salicylique, la spermine, les composés organiques volatiles et l'éthylène (**Lyon, 2007**).
- Les glucides et leurs dérivés incluant le chitosane (**Benhamou et al., 1994; Benhamou et al., 1998**), la saccharine (**Srivastava et al., 2011**) et les glucanes comme la laminarine (**Klarzynski et al., 2000**).
- Les éliciteurs abiotiques synthétiques incluant les inducteurs synthétiques à l'exemple du Benzothiadiazole, de l'acide 2,6-dichloroisonicotinique et du l'acide β -aminobutyrique (**Cohen, 2002**) les fongicides synthétiques (**Herms et al., 2002**); les détergents, les antibiotiques, les métaux lourds (Hg, Cu, Fe, Ni), les phénols et les quinones (**Ozeretskovskaya, 2007**).
- Les stress environnementaux/physiques comme le stress hydrique, le stress de pH, les chocs thermiques, les blessures de divers ordres, les vents fort, les stress de température (**Walters et al., 2005**); les rayonnements ultraviolets et l'ozone (**Ozeretskovskaya, 2007**).
- Les éléments chimiques tel que l'Aluminium (Al), le cobalt (Co), le sodium (Na), le sélénium (Se), et le silicium (Si) à faible concentration (**Pilon-Smits et al., 2009**).

En générale trois critères ont été émis pour un composé susceptible d'induire la résistance (**Zeller, 2006**):

- ✓ Le composé doit induire la résistance à une gamme de maladies comparable à celle de la résistance biologiquement induite;
- ✓ Le composé et/ou son métabolite ne doivent pas présenter une activité antimicrobienne directe;
- ✓ Le composé doit indure des processus biochimiques similaires à ceux observés dans les tissus des plantes biologiquement induites.

Cependant plusieurs composés chimiques ou extraits, en l'occurrence le silicium, le phosphate, le 2-thiouracile, l'acide polyacrylique les acides nucléiques et le fosetylal active la résistance, mais ne remplissent pas les critères sus cités (**Kessmann et al., 1994**).

I.4.9.3. Types et mécanismes de la résistance induite

Tenant compte de la nature de l'éliciteur (potentialisateur) et des voies de régulations des mécanismes de résistance contre les agents pathogènes, deux types de résistance induites sont bien connues: la résistance systémique acquise (SAR) et la résistance systémique induite (ISR); l'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'éthylène

étant les «hormones» qui jouent les principaux rôles dans la régulation du réseau des signaux impliqués dans la résistance contre les agents pathogènes et les insectes (**Pieterse et Van Loon, 2004**). A côté des deux types ci-dessus cité d'induction de la résistance, on a la résistance locale acquise (**Benhamou et Rey, 2012b**). L'efficacité de la réduction de la maladie par les agents inducteurs (qui tendent à avoir un large spectre) de la résistance varie de 20 à 80% (**Walters et al., 2013**).

I.4.9.4. Résistance systémique acquise (RSA)

La résistance systémique acquise s'exprime à distance du site de pénétration de l'agent pathogène dans les tissus non infectés de la plante. Ce type de résistance nécessite la diffusion d'un message pour alerter les cellules saines du danger (**Benhamou et Rey, 2012a**). Elle est induite par les agents pathogènes, les substances chimiques naturelles ou synthétiques et les stress abiotiques (basse températures, chaleur, pollution, blessures). Elle est caractérisée par une accumulation de l'acide salicylique et des PR protéines (pathogenesis-related proteins) susceptibles de contribuer à la résistance (**Durrant et Dong, 2004**). La RSA est une composante importante de défense de la plante contre les agents pathogènes; les plantes qui n'ont plus la capacité d'accumuler l'acide salicylique (molécule de transduction du signal dans la RSA) perdent considérablement leurs habiletés à venir à bout d'une infection (**Ryals et al., 1995**). Les PRs protéines (protéines de stress) qui comprennent 17 familles sont fortement associées à la RSA; on cite entre autres: la phénylalanine ammoniac lyase (PAL), la chitinase, la β -1,3-glucanase, la peroxydase (PO), la polyphénol oxydase (PPO), la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la lipoxygénase (LOX), l'ascorlate peroxydase (APX) et les inhibiteurs de protéinases (**Dzhavakhiya et al., 2007; Agrios, 2005; Van Loon, 1997**); ces enzymes possèdent certaines propriétés communes: elles sont solubles uniquement en milieu acide (pH = 3); elles sont présentes dans le liquide extra cellulaire vacuolaire et apoplastique; elles sont thermostables et hautement résistantes à la dégradation par les enzymes protéolytiques (**Dzhavakhiya et al., 2007**). Un trait important commun à la plupart des PRs protéines est leur capacité antifongique, bien que quelques-unes aient aussi exhibées une activité antibactérienne, insecticides, nématocide et antivirale. Les mécanismes d'action des PRs protéines peuvent être généralisés par leur activité hydrolytique, leur pouvoir inhibiteur des protéases et leur habileté à perméabiliser la membrane de l'agent pathogène (**Van Loon et Van Strien, 1999**). Les recherches récentes sur RSA suggèrent que l'immunité implique la régulation par changement structural de la chromatine et la méthylation de l'ADN (**Estrella et al., 2012**).

I.4.9.5. Résistance systémique induite (RSI)

La résistance systémique induite est induite principalement par les agents biologiques non pathogènes et plus spécifiquement par les rhizobactéries bénéfiques de la famille des *Pseudomonas spp*; ces rhizobactéries bénéfiques sont encore appelés PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Plus précisément, ce sont les substances synthétisées par les PGPR (antibiotiques, acide salicylique, sidérophores) et/ou les composants de leur surface (flagelline, lipopolysaccharides) qui jouent le rôle d'éliciteur. La RSI ne provoque généralement pas l'accumulation de l'acide salicylique et des PRs protéines; elle est plutôt régulée par l'acide jasmonique et l'éthylène (**Teniente et al., 2010**). Le traitement des semences par les PGPR causent des modifications structurales de la paroi cellulaire (lignifications, calloses, dépôts polymorphiques), les changements biochimiques / physiologiques conduisant à la synthèse des protéines (la lipoxygénase, les protéines de stress, les glycoprotéines riches en hydroxyproline) et des composés (phytoalexines, composés phénoliques, oxilipin) impliqués dans le mécanisme de défense de la plante (**Ramamoorthy et al., 2001**). Les PGPR ont été utilisés avec succès en champ, contre certains pathogènes, insectes et nématodes (**Ramamoorthy et al., 2001**).

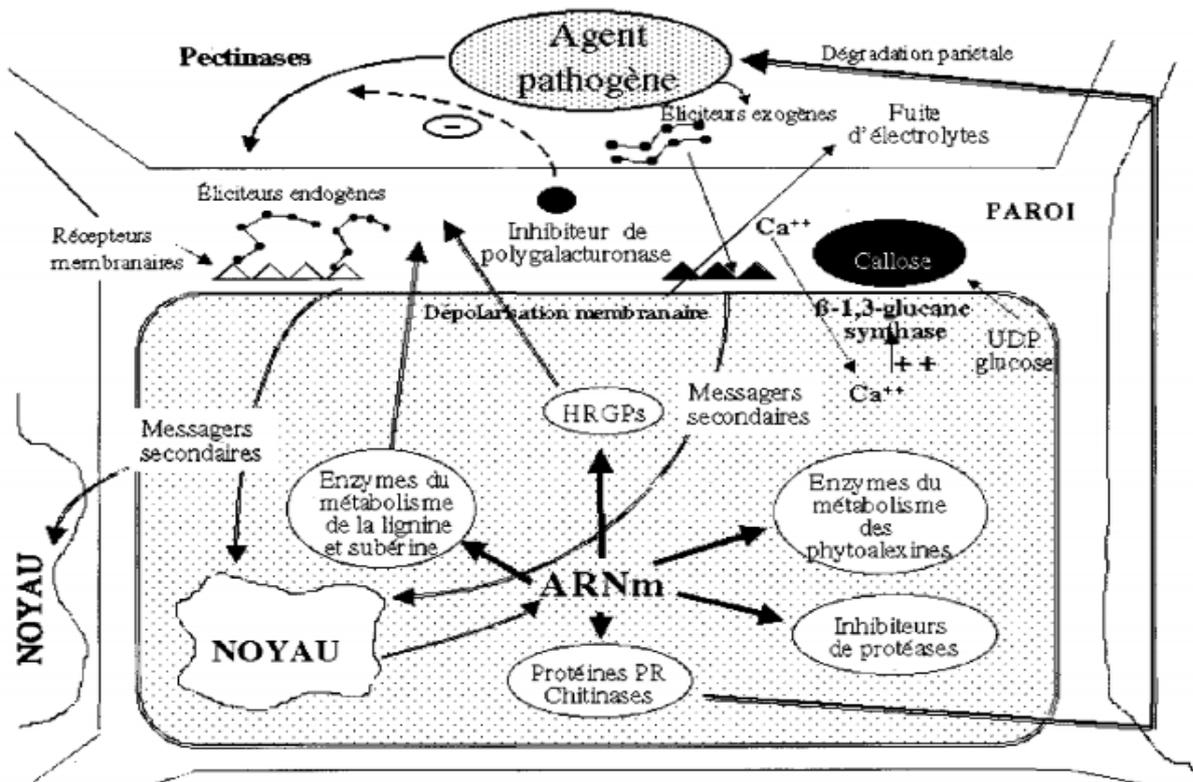
I.4.9.6. Résistance locale acquise et les autres mécanismes d'expression de la résistance induites

La résistance locale acquise ou résistance locale induite, est une résistance qui s'exprime au site de pénétration de l'agent pathogène, et qui ne s'étend pas dans les tissus non infectés (**Benhamou et Rey, 2012b**). Ici, l'un des mécanismes de résistance induite est l'accumulation des phytoalexines (phaséolline, camalexine, rishitine...) qui sont des composés antifongiques/antibiotiques de faible poids moléculaire, synthétisés chez les plantes après un stress biotique ou abiotique; ces composés s'accumulent dans les tissus de la plante situés au site d'infection (de stress), où ils exercent une toxicité pour réduire ou stopper la progression des agents pathogènes (**Garcion et al., 2015**). Un autre mécanisme de résistance est le renforcement de la paroi cellulaire accompagné des modifications comprenant; l'épaississement de la paroi des cellules corticales, la mise en place de barrières nouvellement formées (papilles) riche en callose (polymère β -1,3-glucan avec les branches β -1,6), la lignification, l'infiltration de composés phénoliques aux sites de pénétration potentielle de l'agent pathogène et la formation d'autres composés comme le peroxyde d'hydrogène et les protéines (**Garcion et al., 2015; Benhamou et Picard, 2000**).

Le dernier mécanisme de résistance dont on peut évoquer est la réaction hypersensibilité (HR), qui est une défense induite localisée au site de l'infection du

pathogène; résultat de la mobilisation rapide d'une cascade de défenses cellulaires suivie de la libération des substances toxiques qui tuent l'agent pathogène, les cellules infectées et les cellules environnantes (**Agrios, 2005**); ainsi, la HR est présente comme une sorte de mort programmée de la cellule hôte associée à la restriction du développement de l'agent pathogène au site de l'infection (**Garcion et al., 2015**). La HR est caractérisée par la poussée oxydative (oxidative burst) qui est mise en évidence par l'augmentation du taux d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et plus particulièrement H₂O₂ dont son rôle dans la mort cellulaire a été mis en évidence (**Dat et al., 2003**). Par ailleurs, on peut noter que les cellules victimes de la mort cellulaire programmée produisent des signaux qui activent des réponses de défense dans les cellules adjacentes (**Durrant et Dong, 2004**).

Les principaux mécanismes de résistance induite sus cités peuvent être globalisés par la **figure 8** dans le cas particulier du riz, **Song et Goodman (2001)** ont montré que les réactions de défenses les plus probables, impliquées dans l'interaction entre le riz et le champignon (éliciteur) comprennent l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (O₂⁻, H₂O₂), la réaction d'hypersensibilité (HR), la fortification de la paroi cellulaire (la formation de papilles qui contiennent de callose et la synthèse des composés phénoliques), la production des phytoalexines et la production des PR protéines notamment la PR-2 (β-1,3-glucanase), la PR-3 (chitinase) et la PR-9 peroxydase).



Les réactions de défense structurales, ayant pour but le renforcement des parois incluent: l'accumulation rapide de callose, un polymère de β -1,3-glucanes; le dépôt de lignine issue de la voie du métabolisme secondaire; l'incrustation de subérine et l'accumulation de glycoprotéines riches en hydroxyproline, (HRGPs = hydroxy praline rich glycoproteins). Les réactions biochimiques comprennent: la production de métabolites secondaires et des phytoalexines; la synthèse de novo des PRs protéines (pathogenesis – related) parmi lesquelles on retrouve certaines enzymes telles; les chitinases, et la production d'inhibiteurs de protéases. Les chitinases ainsi que les β -1,3-glucanases synthétisées par la plante permettent, en retour, la libération de fragments de chitine et de β -1,3-glucanes à activité élicitrice (Benhamou et Picard, 2000).

Figure 8: Schéma simplifié des principales réactions de défense structurales et biochimiques élaborées par la plante en réponse à l'infection

I.4.9.7. Résistance induite par les extraits de plantes

L'induction de la résistance par les extraits de plantes est un domaine de recherche encore en pleine exploration; cependant, quelques travaux en laboratoire et en serre ont été déjà faits: **Guleria et Kumar (2006)** ont montré que le traitement du sésame (*Sesamum indicum*) avec l'extrait aqueux de *Azadirachta indica* Juss, s'accompagnait des changements métaboliques dans la plante, incluant une augmentation significative des taux de phénylalanine aminolyase (PAL), de peroxydase (PO) et de composés phénoliques. Les feuilles de tomates traitées à l'huile essentielle de *C. citratus* (1000 μ L/L) suivie de l'inoculation par *Alternaria solani* entraîne une augmentation locale et systémique de la peroxydase, des composés phénoliques; et une augmentation locale de la β -1,3-glucanase; conférant ainsi à cette HE une potentielle capacité d'inducteur de la résistance (**Adriana et**

al., 2013). **Sateesh et al., 2011** ont montré que l'application foliaire des extraits aqueux de *Zizyphus jujuba* et *Ipomoea carnea* suivie de l'inoculation de *Rhizoctonia solani*, induit la résistance systémique chez le riz via l'accumulation significative des PRs protéines (chitinase, β -1,3-glucanase et peroxydase) et de composés de défenses (phénylalanine amino lyase et composés phénoliques). En outre, les semences de riz traitées aux extraits aqueux et éthanoliques de *Cymbopogon citratus* suivi l'exposition des feuilles de jeunes plants à *Rhizoctonia solani*, conduisent à une augmentation de deux à quatre fois plus importante de; l'activité de la phénylalanine amino lyase (PAL), la catalase, la peroxydase, la polyphénol oxydase (PPO) et la Tyrosinase (**Tapan et al., 2011**). Bien qu'il n'existe que peu d'exemples d'application pratique de la résistance induite en tant que méthode de lutte contre les maladies des plantes, les résultats obtenus à partir de quelques expériences menées en plein champ et en serre sont encourageants et indiquent que cette approche a le potentiel de devenir une stratégie de lutte efficace et durable contre toute une gamme d'agents pathogènes (**Benhamou et Picard, 2000**).

I.4.9.8. Contrôle de *B. oryzae* (helminthosporiose) et *F. moniliforme* (gigantisme)

Les bonnes pratiques agronomiques; notamment la rotation culturale, la sanitation, une application adéquate des fertilisants, le contrôle de l'eau et l'amendement du sol peuvent aider dans le contrôle de *B. oryzae* (**Gnanamanickam, 2009**) et *F. moniliforme* (**Alakonya et al., 2013**). L'application par exemple, de l'azote 60kg/ha contribue à la réduction de la sévérité de *B. oryzae* en riziculture pluviale (**Singh et Singh, 2000**); l'amendement du sol par des déjections de chèvre, a un effet significatif sur la pathogénicité de *F. moniliforme*. Au Cameroun la mauvaise organisation des producteurs, le manque de formations et de moyens financiers limitent l'usage des pratiques agricoles susmentionnées pour lutter contre *B. oryzae* et *F. moniliforme*.

Dans la lutte physique, le traitement des semences par l'eau chaude est généralement utilisé pour inhiber les pathogènes véhiculés par les semences, notamment *B. oryzae*; on applique l'eau chaude à température comprise entre 52-57°C pour une durée de 15 min (**Misra et al., 1994**). Le simple nettoyage et lavage des semences décroît l'incidence de *B. oryzae* et de *F. moniliforme* (**Asad-ud-doullah et al., 2002**). Les méthodes de lutte physiques contre *B. oryzae* et *F. moniliforme* sont très peu exploitées au Cameroun et leurs résultats semblent mitigés.

En lutte biologique, le trempage des semences de riz dans une solution de *Pseudomonas fluorescence* et/ou *Azospirillum* (600 g/ha) pendant toute une nuit avant la mise en pépinière permet de lutter contre les champignons du riz en général et *B. oryzae* en

particulier (**Chandrasekaran et al., 2010**). Par ailleurs, des expériences ont montré que les plants de riz pulvérisés avec des suspensions des spores de *Trichoderma harzianum* réduisaient significativement la sévérité de la maladie des taches brunes causée par *B. oryzae* (**Khalili et al., 2011; Gamal et al., 2007**). Les souches de *Bacillus. oryzicola* YC7007 se sont révélées être de bons agents de bio contrôle du gigantisme, par inhibition direct de *F. moniliforme*; et ont montré également la capacité d'induire la résistance systémique contre ce pathogène, à travers l'activation de la voie de l'acide jasmonique (**Hossain et al., 2016**). L'approche de lutte biologique contre *B. oryzae* et *F. moniliforme* est inexistante au Cameroun.

En ce qui concerne la lutte génétique, différentes souches de *B. oryzae* apparaissent avoir différents degrés d'agressivité (**Kamal et Mia, 2009**) et différentes variétés de riz ont différentes sensibilité vis à vis de *B. oryzae* (**Singh et Singh, 2000**) et vis-à-vis *F. moniliforme* (**Sunder et al., 2014**); la variété NERICA 5 (en expérimentation au Cameroun) par exemple est moins sensible à *B. oryzae* et *F. moniliforme*; comparé au riz rouge de Tonga. Aucun gène majeur résistant vis à vis de *B. oryzae* n'a encore été identifié; cependant, les variétés avec une résistance partielle et trois QTL (quantitative trait loci) pour la résistance contre *B. oryzae* ont été identifiés (**Sato et al., 2008**). Hors mis la connaissance de quelques variétés peu sensibles à *B. oryzae* et *F. moniliforme*, les approches de lutte génétique et de lutte via les PGMs sont encore peu productive et coûtent très chères.

Les fongicides tel que Bavistin, Hinosan, Tilt 250 EC et le Dithane peuvent être utilisés pour l'inhibition de la croissance mycélienne de *B. oryzae* (**Ahmed et al., 2002**). Les Etats Unis utilisent les fongicides tels que; captan, thiram, maneb, chloroneb, difolatan (*cis* -N-((1,1,2,2- tetrachloroethyl) thio) 4- cyclohexene-1,2, dicarboximide), Vitavax (2,3-dihydro-6-méthyl-5- phenyl carbamoyl-1,4-oxathiin), terracoat (5-ethoxy-3-trichlorométhyl-1,2,4-thiadiazole) et pentachloronitrobenzène pour le traitement des semences (**Misra et al., 1994**). En Inde, le traitement à sec des semences, consiste à mélanger 2g de l'un des fongicides suivant: Thiram, Captan, Carboxin ou Carbendazim avec 1kg de semences de riz, et laisser pendant 24 heures avant le semis; le traitement humide consiste à tremper les semences dans une solution de Carbendazim / Pyroquilon / Tricyclozole à 2g/litre par kg de semence pendant 2 heures avant la mise en pépinière (**Chandrasekaran et al., 2010**). Les infections secondaires véhiculées par le vent pourraient être contrôlées par les pulvérisations de Hinosan et Dithane M-45. Le carbendazim 50 WP, le tebuconazole 250 EC ont été prouvés efficaces pour le contrôle de

F. moniliforme, *in vitro* et en champ (**Kumar et al., 2016**); le Derosal, dont le principe actif est également le Carbendazim, a été utilisé avec succès dans le traitement des semences riz, afin de contrôler *F. moniliforme* (**Bhalli et al., 2001**). En dépit de dégâts, pouvant être causés par *F. moniliforme* et plus particulièrement *B. oryzae* (**Nguefack, et al., 2013**), la liste des pesticides homologués au Cameroun (**Minader, 2013**) ne prévoit pas de fongicides pour le traitement des semences de riz, encore moins, pour la lutte contre ces deux ravageurs en champ.

La méthode de lutte utilisant les extraits de plantes (biopesticides), avec ses multiples avantages (**Dubey et al., 2011**), est une potentielle porte de sortie pour pallier aux autres méthodes de lutte et constitue ainsi le socle de cette recherche.

I.5. Les plantes comme sources de substances naturelles biologiquement actives

I.5.1. Définitions et origine

Les produits naturels bioactifs sont des composés chimiques produits par les organismes vivants, exerçant un effet biologique sur d'autres organismes. Dans certains cas, ces produits naturels bioactifs sont éphémèrement produits par l'organisme pour sa propre protection dans son environnement; dans d'autres cas, le composé fait partie intégrante de l'existence quotidienne de l'organisme, mais possède une activité importante non reliée à son système biologique (**Steven et Russel, 2008**). Les produits naturels bioactifs sont communément appelés métabolites secondaires; ils sont généralement des intermédiaires métaboliques, de petites tailles et n'intervenant pas directement dans les fonctions primaires; notamment la croissance, la reproduction et la structure de l'organisme (**Raymond et George, 2015**). Les métabolites secondaires phytochimiques sont originaires de diverses familles incluant les poaceae les myrtacées, les lamiacées, les astéracées, les rutacées. Certains groupes de métabolites secondaires sont spécifiques à de groupes taxonomiques précis, à l'exemple des glucosinolates qui sont spécifiques aux crucifères; alors que d'autres groupes (polyphénols) sont présent dans une large gamme de plantes (**Schreiner et Huyskens-Keil, 2006**).

I.5.2. Procédés d'obtention et de caractérisation des métabolites secondaires des plantes

Les métabolites secondaires bioactifs retrouvés dans une espèce végétale constituent un mélange complexe de plusieurs molécules; leurs séparation et

caractérisations constituent encore un grand challenge (**Sasidharan et al., 2011**). L'extraction est la première étape dans la recherche des substances naturelles biologiquement actives; l'application d'une méthode d'extraction adéquate garantit non seulement les groupes de composés ciblés pour l'extraction, mais permet aussi d'éviter les interférences avec les composés non ciblés et de simplifier le travail de séparation. Ainsi, le but de l'extraction est de maximiser les rendements des groupes de composés d'intérêts en minimisant l'extraction des composés indésirables. De nos jours, l'extraction des métabolites des plantes est communément faite avec du matériel végétal sec, afin de limiter l'inhibition des processus métaboliques qui peuvent affecter les métabolites actifs. Les méthodes conventionnelles communes d'extractions utilisant comme solvant l'eau et/ou un solvant organique comprennent; la macération, l'infusion, la décoction l'extraction au Soxhlet, l'hydrodistillation; d'autres méthodes incluent l'extraction au four micro-onde, l'enfleurage, l'expression à froid, l'extraction par le dioxyde de carbone liquide et la pyrogénéation (**Raymond et George, 2015**). Différents organes (racines, rhizomes, bois, écorces, tiges, feuilles, fleurs et les graines) peuvent produire différents groupes de composés. La suite de la séparation comprend la partition de l'extrait brut dans différents solvants suivi très souvent d'une combinaison de plusieurs méthodes chromatographiques pour individualiser les différents composés (**Sasidharan et al., 2011**). Parmi ces méthodes chromatographiques, on peut citer la chromatographie traditionnelle sur colonne, la chromatographie sur couche mince, la MPLC (Medium Pressure Liquid Chromatography), la CLHP (chromatographie liquide de haute performance), la chromatographie en phase gazeuse (CPG). Les techniques les plus importantes pour l'élucidation de la structure des composés naturels d'origine végétale sont; la Résonance Magnétique Nucléaire (MNR) et la spectroscopie de masse (MS); en addition, l'infra rouge (IR) et la spectrophotométrie ultraviolet-visible (UV-Vis) y sont aussi d'une certaine importance (**Terrence, 1998**).

I.5.3. Types de métabolites secondaires originaires des plantes et leurs usages

Les métabolites secondaires d'origine végétale, constituent un groupe très hétérogène; le schéma général de leurs biosynthèses est présenté sur la **Figure 9** parmi les principaux groupes, viennent en premier lieu les dérivés lipidiques dont les représentants les plus actifs biologiquement sont les terpènes et les terpénoïdes, très communs dans les huiles essentielles obtenues par hydrodistillation (**AFNOR, 2000**). Le second groupe le plus représenté est celui des phénols qui dérivent du phénylpropane, et comprend les simples phénols, les phénols éthers, les phenylpropanoïdes, les flavonoïdes, les tannins et

les quinones; on les trouve régulièrement dans les extraits à l'éthanol et au méthanol et à l'acétone (**Wang et al., 2010**). Le troisième groupe est celui des alcaloïdes qui contiennent de l'azote dans leur noyau; leurs précurseurs incluent non seulement les acides aminés aromatiques (Phe, Tyr et Trp), mais aussi Asp, Glu, Lys, Gly et Val. Ils sont présents dans les extraits à l'éthanol et à l'éther (**Wang et al., 2010**).

A l'état pur, à l'état semi purifié ou encore sous forme d'extrait brute les métabolites secondaires peuvent jouer plusieurs rôles notamment en médecine où ils sont utilisés comme médicament, principe actif du médicament ou bien comme modèle de base pour la synthèse de nouveaux principes actifs (**Isman, 1999**); un exemple patent est la pratique de l'aromathérapie qui utilise les huiles essentielles dans le traitement de plusieurs maladies. Les métabolites secondaires sont utilisés dans les industries alimentaires où ils jouent le rôle d'arôme et/ou d'agent de conservation; leurs utilisations aussi en parfumerie et cosmétique n'en est pas de moindre importance. En agriculture les métabolites secondaires ont montré leurs propriétés fongicides, bactéricides, insecticides, nématocides, herbicides (**Nguefack et al., 2007; Amadiolha, 2000; Isman, 1999**) et sont de plus en plus formulés pour usage; par exemple l'extrait «pyréthrine» de pyrèthres (plante florale) est un insecticide végétal très répandu et utilisé dans le monde; en outre, une étude rétrospective sur les nouveaux ingrédients actifs des pesticides conventionnels et des biopesticides enregistrés par l'EPA entre 1997-2010 a révélé que 35,7% était des produits naturels (originaire des plantes), 30,7% des produits synthétiques, 27,4% des produits biologiques et 6,1% des produits synthétiques dérivés du naturel (**Cantrell et al., .2012**)

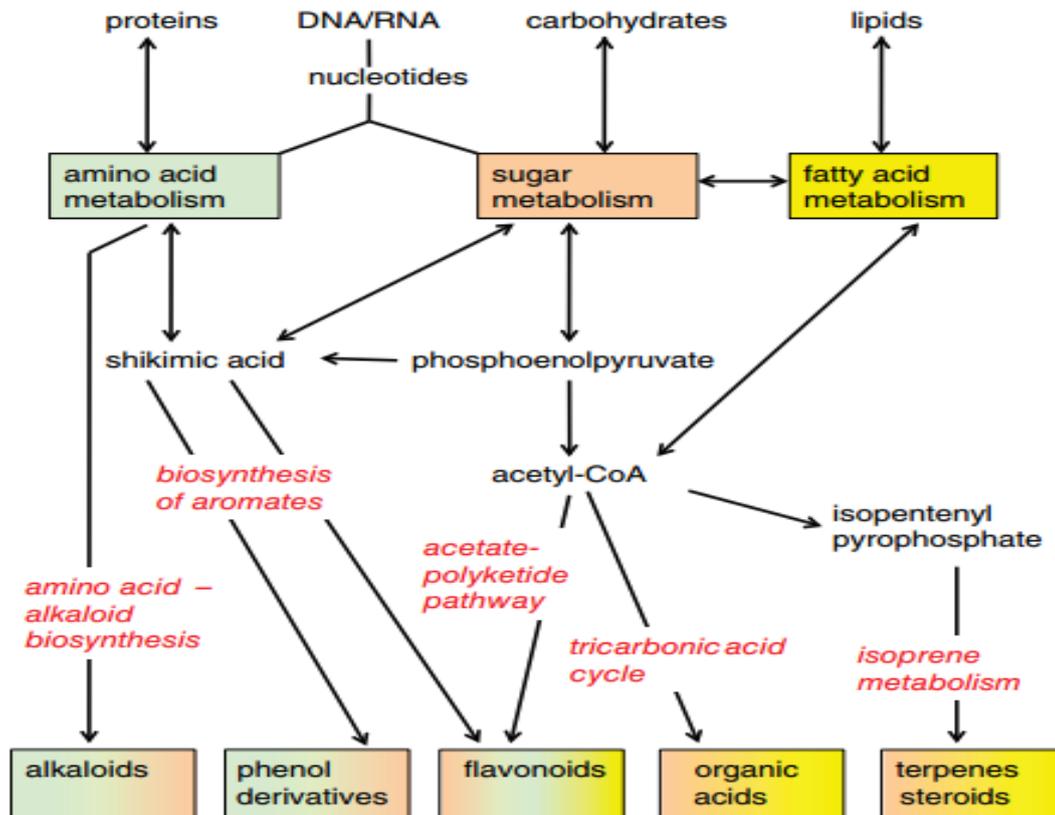


Figure 9: Schéma synthétique général des voies biosynthétiques et des précurseurs des principales classes de métabolites secondaires (Gutzeit et Ludwig-Muller, 2014)

I.5.4. *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf

I.5.4.1. Distribution et taxonomie

Cymbopogon citratus est une plante communément appelée citronnelle chez les francophones, et «Lemongrass» chez les anglo-saxons. Elle est originaire de l'Asie du Sud-Est (Inde) et est distribuée dans presque toutes les régions tropicales et sub-tropicales notamment en/au Argentine, Brésil, Cameroun, Cuba, Guatemala, Haïti, Indonésie, Jamaïque, Japon, Kenya, Mexique, Philippines, Seychelles, Somalie, Surinam, Tanzanie, Thaïland, Uganda et Zaïre (Nethsinghe et Paskaranathan, 1976). Sa taxonomie se présente comme suit: règne des plantae, division des magnoliophyta, classe des liliopsida, ordre des poales, famille des poaceae (graminées), genre *Cymbopogon*. Son nom scientifique est *cymbopogon citratus* (DC) Stapf; quelques-uns de ses synonymes incluent *Andropogon ceriferus* Hack, *Andropogon citratus* DC, *Andropogon nardus* subsp. *Ceriferus* (Hack) et *Andropogon citriodorum* Hort x Desf (CNWG, 2018). On la trouve dans toutes les régions du Cameroun où elle est cultivée dans les jardins, et les abords des maisons.

I.5.4.2. Botanique et écologie de la plante

Cymbopogon citratus est une herbe aromatique vivace de la famille des graminées (Poaceae); elle est généralement constituée en touffe avec plusieurs tiges (**Figure 10A**); elle possède des racines fibreuses densément touffues; elle a une courte tige souterraine (rhizome) avec des segments en anneaux (**Weiss, 1997**); Les feuilles ont des bords coupants, sont rétrécies aux extrémités et atteignent parfois 70 cm de long (**Figure 10B**); elle croit bien entre les températures de 10°C à 33°C et nécessite beaucoup de lumière; les précipitations favorables de croissance dans les conditions sèches sont comprises entre 700 et 3000 mm.



Figure 10: Plants of *Cymbopogon citratus*. (A) Touffe avec des feuilles de plus de 50cm de long; (B) nombreuses tiges issues d'une bouture

I.5.4.3. Usage des extraits de *Cymbopogon citratus*

La citronnelle est une herbe tropicale d'importance économique (**Lewinsohn et al., 1998**); environ 80% des personnes dans le monde ont confiance en l'efficacité des soins primaires de santé que peut procurer *C. citratus* (**Dubey et al., 2004**). Les infusions et les décoctions de feuilles de *C. citratus* sont largement utilisées en médecine traditionnelle; elles sont recommandées pour le traitement des désordres digestif, des inflammations, du diabète, des désordres nerveux et de la fièvre aussi bien que d'autres problèmes de santé (**Carlini et al., 1986**). Les huiles essentielles des feuilles sont utilisées dans les industries alimentaires, de parfumerie, de fabrication du savon, de cosmétique, pharmaceutiques (sédatif) et de fabrication d'insecticides (**Negrelle et Gomes, 2007**). A cause de son goût fort et de sa senteur, la citronnelle est largement utilisée comme un ingrédient essentiel dans la cuisine asiatique. Au Cameroun elle est principalement utilisée contre le traitement de la fièvre. Des recherches sont aussi de plus en plus entreprises sur l'usage des extraits de *C. citratus* pour contrôler les agents pathogènes des maladies des cultures et du riz en particulier (**Adriana et al., 2013; Nguetack et al., 2013**).

I.5.4.5. Composition chimiques des extraits de *Cymbopogon citratus*

Les extraits les plus revus concernant *C. citratus* sont les HE obtenus par hydrodistillation les extraits à l'eau (macération et décoction) l'extrait à l'éthanol et l'extrait au méthanol. L'huile essentielle de *C. citratus* représente jusqu'à 1,5% du poids de la matière sèche (**Donelian et al., 2009**) et est communément obtenu par Hydrodistillation; les analyses par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), de plusieurs HE commercialisées au Brésil, ont permis l'identification de 22 composés dont deux majeur; le néral et le géranial, avec des pourcentage variant de 40.7% à 75.4% de la composition totale (**Luiz et al., 2008**). Par ailleurs les résultats utilisant la même technique ont montré que cette l'HE de *C. citratus* est riche (90,39%) en monoterpènes oxygénés (**Nguefack, 2005**). **Galani et al. (2013)** ont fait une étude qualitative de la teneur en principaux métabolites secondaires des extraits aux solvants de *C. citratus* et, il y ressort que l'extrait à l'eau (macération) contient les glycosides et les coumarines; l'extrait à l'eau chaude (décoction) contient les phénols, les flavonoïdes glycosides et les tannins condensés; l'extrait hydro-éthanolique 70% contient les phénols, les flavonoïdes les saponines, les anthraquinones, les glycosides et les tannins condensés. Les C-glycosylflavones l'orientine, l'isoorientine et l'acide chlorogénique constituent les principales molécules qui ont été caractérisées dans l'extrait méthanolique de *C. citratus* (**Cheel, 2005**).

I.5.5. *Oxalis barrelieri* L.

Originaire de l'Ouest des Indes, du Centre et du Sud de l'Amérique, *Oxalis Barrelieri* Linnaeus est une herbe appartenant au genre *Oxalis* qui compte plus de 700 espèces; elle est principalement répartie en Amérique du sud (Brésil, Bolivie Colombie) en Afrique (Tanzanie; Uganda, Côte d'ivoire) en Asie tropicale (Sri Lanka; Indonésie) et au Pacifique en Polynésie française. Elle appartient à la division des magnoliophyta, la classe des magnoliophsida, l'ordre des oxalidales et la famille des oxalidaeaes (**GRIN, 2015**). *Oxalis Barrelieri* est communément appelée oseille marron, oseille savane ou encore trèfle; elle pousse spontanément dans presque toutes les régions du Cameroun.

I.5.5.1. Botanique et écologie de la plante

Oxalis barrelieri (**Figure 11**) est une plante herbacée annuelle que l'on rencontre très régulièrement sur les sols secs et sableux; sa propagation se fait à travers les semences dispersées dans le sol qui ont acquis des formes de résistances dans les conditions de vie défavorables. L'oseille marron a une tige dressée et mesure en moyenne 60 cm de haut; ses feuilles sont alternes; son limbe trifoliolé à folioles ovées; ses fleurs ont des sépales

linéaires, blanches ou rose pâles avec un centre jaune. (CIRAD, 2007). Elle est répandue dans les altitudes de 900-1220 m.



Figure 11: Plant d'*Oxalis barrelieri*

I.5.5.2. Usage des extraits d'*Oxalis barrelieri*

La macération et/ou la décoction de *Oxalis barrelieri* sont utilisées en médecine traditionnelle comme anti-inflammatoire, antiseptique et diurétique. Elles sont aussi réputées pour le traitement des diarrhées, des maladies de la peau, le mal d'estomac l'hypertension artérielle. Les feuilles et les fleurs d'*Oxalis barrelieri* peuvent aussi être directement consommées où appliquées sur la peau après ramollissement (Fokam Tagne, 2015).

I.5.5.3. Composition chimiques des extraits d'*Oxalis barrelieri*

Très peu d'études chimiques ont été faite sur *Oxalis barrelieri*. Cette plante ne contient pas de l'HE; Mékam, 2011 a fait le screening phytochimique des extraits *Oxalis barrelieri* et a relevé la présence des Alcaloïdes, des flavonoïdes, des tannins galliques, des coumarines, des anthraquinones, des saponines, des phénols, des stérols et des triterpènes dans l'extrait aqueux (macération); la présence des phénols, des flavonoïdes des stérols, des saponines, des triterpènes, des tannins galliques et des coumarines dans l'extrait éthanolique 70%.

I.6. Travaux antérieurs

Nguefack et al., 2008 ont montré que les huiles essentielles de *C. citratus*, pouvaient être utilisées pour traiter les semences afin contrôler les champignons et les bactéries véhiculés par les semences du riz. **Nguefack et al., 2013** ont évalué l'état phytosanitaires des semences originaires de plusieurs zones agro écologiques du Cameroun et ont ressorti que l'helminthosporiose (*B. oryzae*) était présente dans tous les écosystèmes de riziculture avec une incidence de 81,25%; et le gigantisme (*F. moniliforme*) avec un taux d'infection de 13,75%. Dans nos précédents travaux, nous avons fait l'observation que lors de l'hydrodistillation des huiles essentielles de *Cymbopogon citratus*, une partie des principes actifs de l'HE s'écoulait précocement; cependant aucune étude n'a été entreprise jusqu'ici pour apprécier si cet écoulement précoce avait un impact sur la composition chimique et l'activité biologique. Par ailleurs quelques études ont été amorcées avec les extraits de *C. citratus* pour la protection contre les maladies du riz et l'amélioration de ses rendements; mais beaucoup reste à faire notamment; l'étude phytochimique corrélée à l'activité biologique, leurs potentiels d'induction de la résistance contre les maladies et les mécanismes de protection de ces extraits. Hormis quelques informations sur les activités biologiques des extraits aqueux et éthanoliques d'*O. barrelieri* vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* *Phytophthora infestans* (**Dakole et al., 2016**), très peu d'information sont connus sur cette plante; encore moins sa phytochimie, ainsi que les effets de ses extraits sur les champignons pathogènes du riz et sur les semences de riz. Quelques connaissances empiriques recommandent le traitement des semences avec les solutions chlorure de sodium (NaCl); par exemple, **Pham et al. (2003)** dans leurs travaux, ont utilisé arbitrairement la solution de NaCl 15% pour la tri des semence de riz; ainsi, très peu d'informations ressortent de cette pratique. Nous nous proposons donc dans notre travail d'étudier les effets phytoprotecteurs et éliciteurs des extraits de *Cymbopogon citratus/Oxalis barrelieri*, couplés au tri des semences en solution NaCl, pour le contrôle de *Bipolaris oryzae/Fusarium moniliforme* et l'amélioration des rendements de production du riz (*Oryza sativa* L.)

CHAPITRE II:
MATERIEL ET METHODES

II. Matériel et Méthodes

II.1. Matériel

Le matériel végétal est constitué des plantes entières de *Cymbopogon citratus* (**Figure 10**) et *Oxalis barrelieri* (**Figure 11**). Les souches fongiques utilisées sont celles de *Bipolaris oryzae* et de *Fusarium moniliforme*, deux champignons véhiculés par les semences de riz. Le fongicide de synthèse ‘Banko Plus’ (Monographie en **Annexe II**), largement commercialisé au Cameroun, a été utilisé comme témoin positif. Une liste non exhaustive du matériel et une liste des appareils, sont listées en **annexe V** et **annexe VI**.

II.2. Méthodes

II.2.1. Récolte, identification et conditionnement des Plantes

Les plantes entières de *Cymbopogon citratus* et *Oxalis barrelieri* ont été récoltées (20 Août 2015) aux quartiers Nkolbisson et Simbock dans le chef lieu de la région du centre (Yaoundé - Cameroun). *C. citratus* a été identifié en comparaison avec l'échantillon de *Cymbopogon citratus* (De Candolle) Stapf du Collecteur Daniel Dang N° 202 du spécimen de la collection d'Herbier N° 18622 SRF/Cam (YA). *O. barrelieri* a été identifié en comparaison avec l'échantillon d'*Oxalis barrelieri* Linn du Collecteur A.J.M Leeuwemberg N° 6048 du spécimen de la collection d'Herbier N° 19798 SRF/Cam (YA). Une partie de l'échantillon frais a été directement soumise à l'hydrodistillation. Après séchage à température ambiante à l'ombre pendant 45 jours de l'autre partie, une quantité a été hydrodistillée et le reste émiétté en poudre dans les meules d'un moulin à grain.

II.2.2. Isolement des souches fongiques sur les semences de riz

Les semences du riz irrigué (*Tox 3145-38-2-3*) et du riz pluvial (riz rouge) respectivement originaires de Ndop (région du Nord-Ouest) et de Tonga (région de l'Ouest) ont été ensemencées dans des boites de pétri 90×15 mm contenant deux couches de papier Buvard humidifié (**Figure 12**); les boites de Pétri ont été par la suite incubées à 28°C dans les conditions alternées 12 h lumière, 12h obscurité pendant 10-12 jours. Les souches de *Bipolaris oryzae* et *Fusarium moniliforme* ont été identifiées, isolées par les techniques standards de mycologie (**Mathur et Kongsdal, 2003**) et purifiées sur milieu PDA supplémenté avec 5mg/L de chloramphénicol. Un repiquage a permis d'avoir une quantité suffisante de pathogènes pour faire les expérimentations.

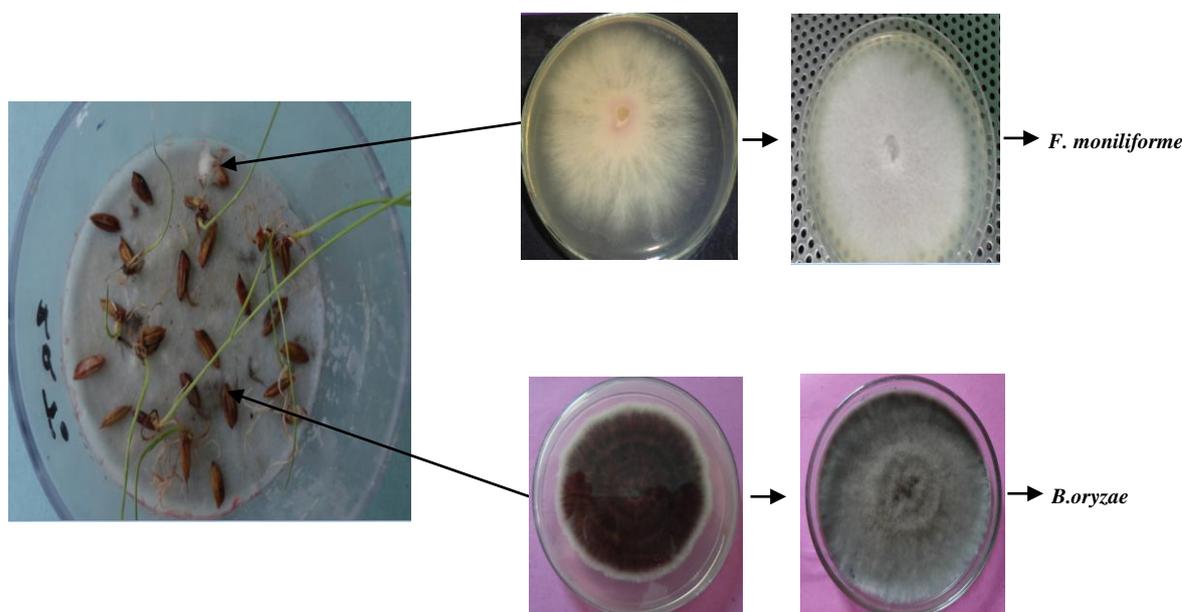


Figure 12: Isolement sur PDA de *B. oryzae* et de *F. moniliforme* sur les semences de riz

II.2.3. Extraction et fractionnement des huiles essentielles

II.2.3.1. Principe de l'hydrodistillation

La méthode utilisée pour l'extraction des huiles essentielles (HE) est l'hydrodistillation à l'aide d'un montage de type Clévenger (**Clevenger, 1928**). C'est une technique d'extraction par entraînement à la vapeur, basée sur le fait que la plupart des composés odorants et volatils contenus dans les végétaux sont susceptibles d'être entraînés par les aérosols des vapeurs d'eau du fait de leur point d'ébullition relativement bas et de leur caractère hydrophobe. Ils ne sont ni retenus dans les biopolymères de la plante ni solubilisés dans l'eau (**Bernard et al., 1988**).

II.2.3.2. Extraction de l'huile essentielle

Les plants entiers de *Cymbopogon citratus* et d'*Oxalis barrelieri* sont pesés et introduits dans le réacteur, puis de l'eau distillée représentant 3 à 5 fois la masse du matériel végétal y est ajoutée. Porter à ébullition le réacteur à l'aide d'une calotte chauffante pendant environ 4 heures. Au cours du chauffage, les principes volatils sont entraînés par la vapeur d'eau qui, après condensation au niveau d'un réfrigérant où l'eau froide circule de façon continue, permet d'obtenir dans la colonne à décanter un distillat composé de deux phases: une phase aqueuse constamment recyclée et une phase organique odoriférante (huile essentielle) qui surmonte la première. L'huile essentielle (HE) a été recueillie à la fin de l'hydrodistillation, séchée par filtration à travers une colonne contenant de la laine de verre et du sulfate de sodium anhydre. L'extrait d'HE a été pesé, et le rendement (Rdt) d'extraction a été calculé, utilisant la formule ci après:

$$\text{Rdt (\%)} = \frac{\text{Masse de l'HE}}{\text{Masse du matériel végétal}} \times 100$$

L'HE obtenue est mise dans un flacon fumé bien étiqueté, fermé convenablement et conservé entre 4 et 6 °C.

II.2.3.3. Fractionnement de l'huile essentielle

Une heure après que les premiers principes volatils aient commencé à être entraînés, la première fraction de l'HE a été recueillie (**Fraction 1**); après l'heure jusqu'à la fin de l'hydrodistillation, la deuxième fraction a été recueillie (**Fraction 2**). Par ailleurs, l'hydrodistillation a été faite sans aucun fractionnement (**Fraction M**). Ainsi la première fraction de l'HE de plantes fraîches de *Cymbopogon citratus* /*Oxalis barrelieri* a été notée **CF₁/OF₁**, la deuxième fraction **CF₂/OF₂** et l'HE complète **CF_M/OF_M**. Quant aux plantes sèches, la première fraction a été marquée **CS₁/OS₁**, la deuxième **CS₂/OS₂** et l'HE complète **CS_M/OS_M**.

II.2.3.4. Extraction aqueuse à l'eau froide par macération

La **figure 13** présente le protocole de macération de la poudre de *C. citratus*/*O. barrelieri*: le matériel végétal a été dégraissé en pesant 100 g de poudre de *C. citratus*/*O. barrelieri*, que l'on a trempé dans 600 mL d'hexane pour une durée totale de deux heures (2h), sous agitation. Par la suite, le mélange obtenu a été filtré à l'aide d'une toile; le résidu a été récupéré, séché sous une hotte jusqu'à évaporation complète de l'hexane et introduit dans 600 mL d'eau distillée pendant 12 heures (12h) en remuant de temps en temps. Le nouveau mélange a été filtré avec une toile; le filtrat a été récupéré et centrifugé à la force de centrifugation relative 6042 g (Rmp = 6000 tr/min; rayon du rotor = 15cm) pendant 20 minutes ; le surnageant a été récupéré et lyophilisé. Le lyophilisat (en poudre) obtenu a été pesé et le rendement de l'extraction a été calculé par rapport à la masse du matériel végétal de départ en utilisant la formule ci-dessous:

$$\text{Rdt (\%)} = \frac{\text{Masse du lyophilisat}}{\text{Masse du matériel végétal}} \times 100$$

Le lyophilisat a été conservé dans un flacon étiqueté, bien fermé, à l'abri de l'humidité et de la chaleur pour utilisation au moment opportun.

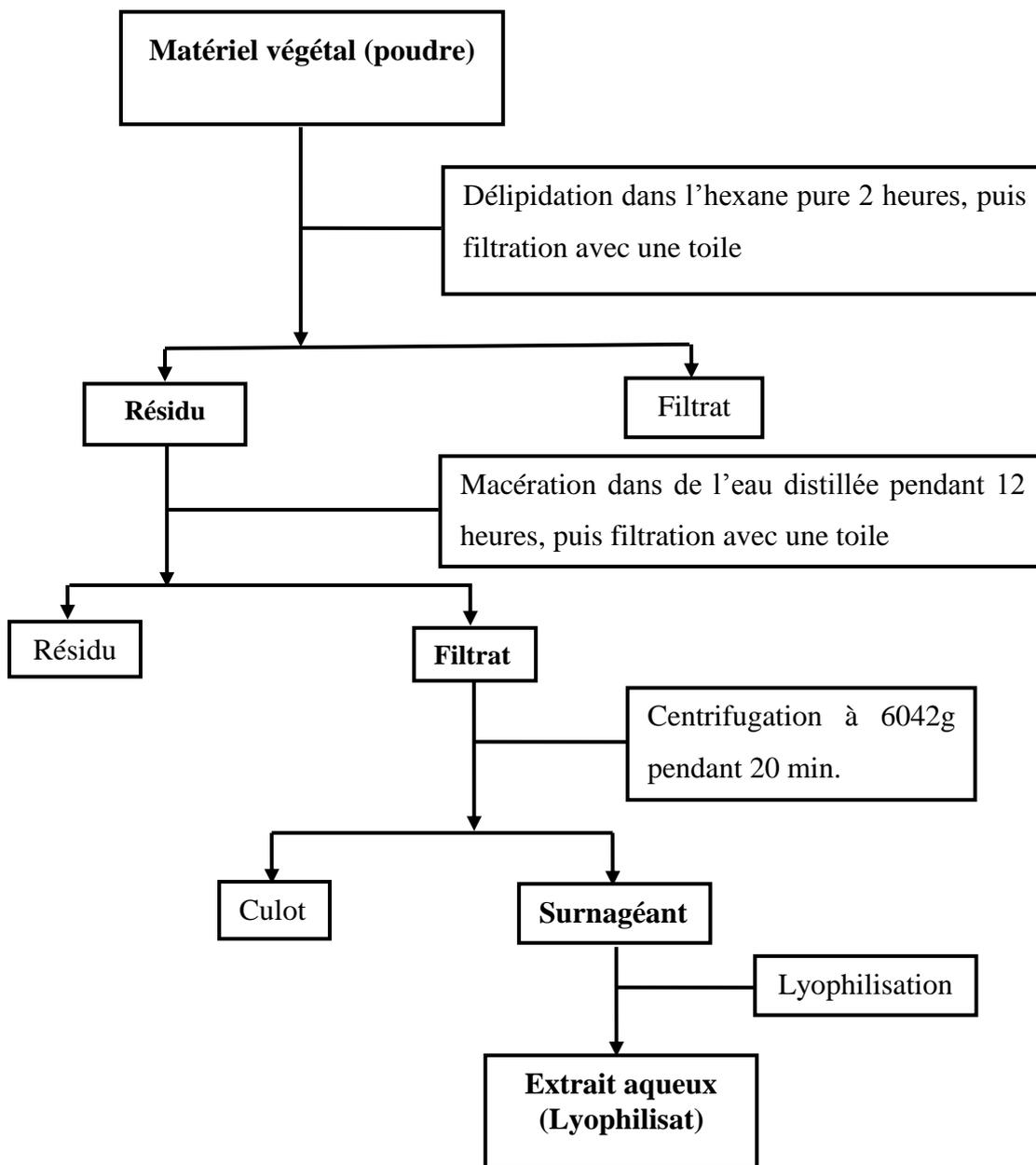


Figure 13: Protocole de macération de la poudre de *C. citratus* / *O. barrelieri*

II.2.3.5. Extraction au solvant organique (à l'éthanol)

Le matériel végétal a été dégraissé en pesant 100g de poudre auquel on ajoute 600 mL d'hexane, pour une durée de deux heures, sous agitation. Le mélange obtenu a été filtré à l'aide d'une toile; le résidu a été récupéré, séché sous une hotte jusqu'à évaporation complète de l'hexane. Le résidu sec a été introduit dans 600 mL d'éthanol 70% pour une durée totale de 12 heures également sous agitation ; la préparation obtenue a été filtrée dans un premier temps avec une toile, puis avec du papier filtre de type wattman no 5 (Porosity = Fine, Flow Rate = Slow, Particle Retention = 2.5 µm) et le filtrat a été récupéré. À l'aide d'un évaporateur rotatif, l'éthanol a été évaporé du filtrat et l'extrait obtenu a été lyophilisé. Le rendement de l'extraction a été calculé comme dans le cas de la macération.

II.2.4. Evaluation de l'activité antifongique des extraits de *C. citratus* et d'*O. barrelieri* et du fongicide

II.2.4.1. Principe

Les activités antifongiques ont été faites selon la méthode décrite par **Grover et Moore (1962)**. Cette méthode consiste à faire croître un champignon dans un milieu de culture auquel l'extrait de plante ou le pesticide (fongicide) à tester a été préalablement dispersé à une concentration précise; l'activité de l'extrait étant marquée par une inhibition de la croissance mycélienne, la comparaison de cette croissance avec celle du milieu non supplémenté en extrait/pesticide (Control négatif) permet l'évaluation de l'inhibition de la croissance radiale et de déterminer la concentration minimale de l'extrait qui inhibe la croissance visible du champignon (CMI).

II.2.4.2. Préparation des milieux supplémentés en huiles essentielles

Le milieu de culture PDA, préparé suivant le protocole décrit en (**Annexe I**), a été distribué dans des erlenmeyers et autoclavé pendant 15 minutes à 121 °C. Ces milieux ont été par la suite maintenus liquides entre 40 et 50 °C sous une hotte à flux laminaire, puis supplémentés par des émulsions d'huiles essentielles à des quantités bien définies (200, 400, ...2000 ppm). L'ensemble a été homogénéisé à l'aide d'un agitateur magnétique et coulé dans des boîtes de pétri de 90 mm de diamètre.

En ce qui concerne les extraits aux solvants (extrait aqueux et éthanoliques), 5 mg de chloramphénicol a été ajouté par litre de milieu de culture PDA préparé. Les extraits en poudre ont été dissous dans de l'eau distillée, puis supplémentés à des concentrations de 1mg/mL, 5mg/mL et 10mg/mL dans les erlenmeyers contenant les milieux de culture, avant que l'ensemble ne soit autoclavé et coulé dans les boîtes de pétri.

Le fongicide de synthèse a été supplémenté de la même façon que les HE, à la seule différence qu'il a d'abord été dissout dans de l'eau stérile avant d'être ajouté à différentes concentrations variant de 12,5 ppm à 6000 ppm dans le milieu de culture maintenu entre 40 et 50 °C sous la hotte. Deux répétitions de trois expériences chacune ont été réalisées.

II.2.4.3. Ensemencement et incubation

Après solidification du milieu de culture, un disque mycélien de 5 mm de diamètre a été prélevé à l'aide d'un emporte pièce et une aiguille dans les zones périphériques d'une culture âgée de 6 (*B. oryzae*) à 10 (*F. moniliforme*) jours et déposé au centre de la boîte de pétri. Les boîtes ainsiensemencées ont été scellées avec du papier parafilm et incubées en position renversée sur le couvercle, à 28 °C, dans les conditions alternées de 12 heures de

lumière et 12 heures d'obscurité pendant 7 jours pour *Bipolaris oryzae* et 12 jours pour *Fusarium moniliforme*. Six répétitions ont été faites pour chaque traitement.

II.2.4.4. Evaluation de l'inhibition de la croissance radiale du champignon

L'inhibition de la croissance radiale du champignon a été évaluée en mesurant les diamètres perpendiculaires de croissance mycélienne au fond des boîtes de pétri à la fin de l'incubation. Par comparaison des diamètres de croissance dans les boîtes supplémentées et ceux des boîtes non supplémentées (contrôles), les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne ont été calculés selon la formule de **Pandey et al. (1982)** ci-dessous, et la CMI a été déterminé

$$\%I = \frac{D_c - D_T}{D_c} \times 100$$

Avec:

%I : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne ;

D_c: Diamètre moyen de croissance mycélienne dans la boîte de pétri non supplémenté;

D_T: Diamètre moyen de croissance mycélienne dans la boîte de pétri supplémenté.

II.2.4.5. Evaluation de la propriété fongistatique ou fongicide des extraits des extraits et du fongicide

La méthode utilisée est celle développée par **Thompson (1989)**, **Kishore et al. (1993)**; d'après cette méthode, les disques mycéliens dont l'inhibition de la croissance du champignon a été totale sur milieu de culture supplémenté en extraits/fongicide sont prélevés au terme de l'incubation et repiqués aseptiquement sur milieu non supplémenté. Après 10 jours d'incubation dans les conditions alternées de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité, la reprise de la croissance fongique traduit le caractère fongistatique et l'absence de croissance révèle le caractère fongicide de l'extrait.

II.2.5. Test *in vitro* et en serre de l'effet du traitement des semences en solution salée et par les extraits de plantes.

II.2.5.1. Traitement des semences de riz par les solutions de NaCl

Les semences de riz rouge de Tonga (pluvial) et de Tox 3145-38-2-3 de Ndop (irrigué), deux variétés de riz très cultivées dans deux grands bassins rizicoles au Cameroun, ont été utilisées dans la détermination de la meilleure concentration en sel (NaCl) pour la sélection des semences. Des solutions de NaCl (300 mL) ont été préparées à différentes concentrations: 0% (eau distillée), 10%, 20% et 30%; 60 g de semences (occupant environ 125 mL) a été introduit dans le bécher contenant uniquement de l'eau distillée (NaCl 10%), puis remué à l'aide d'une baguette en verre pendant environ 1 min et

laissé au repos jusqu'à stabilisation du mouvement de l'eau; la semence surnageant (S) a été récupérée par décantation, lavée abondamment à l'eau distillée et séchée (Ts0%S); une partie de la semence immergée ou culot (C) a été récupérée, rincée abondamment à l'eau distillée et séchée (Ts0%C). Le reste du culot a été introduit dans la solution de NaCl 10% et remué pendant 1 min; après stabilisation de la solution, le surnageant a été récupéré et rincé abondamment à l'eau distillée avant d'être séché (Ts10%S); une petite partie du nouveau culot a été retenue et rincée également abondamment à l'eau distillée et séchée (Ts10%C). Le reste de culot a été introduit dans la solution de NaCl 20% et, le cycle a été répété (Ts20%S et Ts20%C) jusqu'à la concentration de 30% en NaCl (Ts30%S et Ts30%C). 100 graines (x 4) de chaque lot de semences séchées (Ts0%S, Ts0%C, Ts10%S, Ts10%C, Ts20%S, Ts20%C, Ts30%S et Ts30%C) en plus des semences non traitées au sel (Sec), et celles trempés pendant une minute dans l'eau distillée (TM0%), ont été pesées à l'aide d'une balance à précision et les masses ont été rapportées en grammes. Les tests de germination de différents lots de semences ont été évalués.

II.2.5.2. Test standard de germination.

Quatre répétitions de 50 graines, issues des lots ci-dessus, répartis dans deux sous répétitions de 25 graines chacune, ont été soumis au test de germination: deux couches de papier Buvard humidifié ont été placées dans des boîtes de pétri de 90 mm de diamètre; les semences ont été ensemencées et incubées à la température ambiante de laboratoire (28~30°C), à peu près dans les conditions alternées 12h de lumière naturelle, 12h d'obscurité (ISTA, 1996), pendant 7 jours, au bout desquels le nombre de grain germé a été compté et exprimée pourcentage (%G).

$$\%G = \frac{\text{Nombre de grains germés}}{\text{Nombre total de grains}} \times 100$$

II.2.5.3. Evaluation de l'effet des extraits sur la germination des semences de riz

Les semences du riz rouge de Tonga ont été utilisées ici; le culot des semences issues de la sélection par traitement dans la solution de NaCl 20%, a été divisé en 5 lots identiques; 4 lots ont été trempés pendant 24h dans des solutions d'extraits à l'éthanol de *C. citratus/O. barrelieri*, à des concentrations respectives de 0%, 1%, 2% et 4% et 1 lot dans 0,2% du fongicide Banko Plus; concomitamment, les semences surnageant issues du traitement NaCl 20% ont été immergées dans l'eau distillée, et les semences sèches (Sec) tel que utilisées par les producteurs servaient de référence. Après ces traitements, les lots (T+0%, T+1%, T+2%, T+4%, Banko plus, Sec et T+Sur) ont été récupérés séchés pendant 1h, et leur germination a été évaluée.

II.2.5.4. Evaluation par vieillissement accéléré (détérioration contrôlée), de l'effet du traitement sur la vigueur du riz.

La technique du vieillissement accéléré consiste à placer les semences pendant de courtes périodes (48 heures ou plus selon les espèces), dans des conditions de température élevée (40°C-45°C) et dans une atmosphère à forte humidité relative (>90%). Après cette période de stress, les semences sont placées dans les conditions normales de croissance et la germination est évaluée pour déterminer le potentiel physiologique initial de la semence. Le test du vieillissement accéléré tel que décrit par **Delouche et Baskin (1973)**, a été utilisé pour évaluer la vigueur des semences: une partie des différents lots de semences séchés après différents traitements décrits plus haut (T⁺0%, T⁺1%, T⁺2%, T⁺4%, Banko plus, Sec et T⁺Sur), a été déposée sur des supports grillagés tapissés de toiles; les supports grillagés ont été par la suite placés dans des bacs transparents en plastique contenant environ 500 mL d'eau distillée, et de manière à éviter le contact entre la semence et l'eau. Les bacs ont été hermétiquement fermés et placés dans l'étuve à température maintenue à 44°C, pendant 72h (**Suraj et Thawatchai, 2010**). Après ce stress, les lots de semences ont été retirés et soumis au test standard de germination.

II.2.5.5. Evaluation de l'effet du traitement sur l'état phytosanitaire des semences

Les lots de semences (riz rouge) issus des traitements aux extraits à l'éthanol de *C. citratus* et *O. barrelieri* ont été aussi analysés pour leurs états phytosanitaires; à cet effet, ils ont été ensemencés dans les boîtes de pétri contenant le milieu PDA supplémenté avec 2g/L de chloramphénicol; quatre répétitions de 25 graines chacune ont été faites, et après 4 jours d'incubation, les taux d'infestation par *B. oryzae* et par *F. moniliforme* ont été rapportés en dénombrant les graines colonisées par chacun de ces pathogènes, et en exprimant le résultat en pourcentage.

II.2.5.6. Evaluation de l'effet du traitement sur l'émergence en serre

Pour évaluer la germination en serre, les pots d'environ 1L ont été remplis au 4/5 d'un mélange terre noire et de sable dans le rapport 4:1; les lots de semences issus des traitements avec les extraits éthanoliques *C. citratus* (EEc) et *O. barrelieri* (EEo) ont été ensemencés dans les pots à environ 2 cm de surface à raison de 15 graines choisis au hasard par pot. Les pots ont été arrangés dans un dispositif complètement aléatoire de quatre répétitions pour chaque traitement. Chaque pot a reçu environ 20 mL d'eau chaque jour; au bout de 10 jours les plantules viables ont été comptées et exprimées en termes de pourcentage (%).

II.2.6. Evaluation des marqueurs d'induction de la résistance, de la sévérité de la maladie des taches brunes et de la biologie de l'infection.

II.2.6.1. Evaluation des marqueurs d'induction de la résistance

II.2.6.1.1. Préparation des plants de riz et évaluation de la germination/émergence

La variété de riz rouge de Tonga, sensible à la maladie des taches brunes, a été utilisée pour l'évaluation des marqueurs d'induction de la résistance. Les semences de riz sélectionnées en solution NaCl 20%, ont été traitées pendant 24h, à température ambiante (28°C) avec les extraits éthanolique de *C. citratus* et d'*O barrelieri* (EEc ou EEo) à des concentrations de 0% (T1), 1 % (T2), 2% (T3) et 4% (T4); les semences non traitées ont été utilisées comme Témoin (T0). Après les traitements ci-dessus indiqués, une partie de semences a été transférée dans les boîtes de pétri contenant chacune du papier Buvard humidifié, pour le test standard de germination. Une autre partie a été semée dans des pots (45 grains/pot) contenant un mélange de terre noir et de sable (4:1), préalablement stérilisé. Les essais ainsi préparés ont été mis en croissance dans une serre emménagée à cet effet; dans les conditions de température et de luminosité naturelle. Chaque pot a reçu journalièrement 30 mL d'eau et aucune fertilisation minérale n'a été apportée aux plants en croissance. Le pourcentage de germination sur blotter et le pourcentage d'émergence en serre ont été évalués au 10^{ième} jour, par comptage du nombre de grains germé/émergé par rapport au nombre total de grain ensemencé. Deux semaines (14^{ième} jour) après le semis, une partie des plantules de riz a été récoltée pour l'évaluation des marqueurs d'induction de la résistance. Le reste de plants a été pulvérisé par l'extrait aqueux (20g de poudre sèche par litre d'eau) de *C. citratus* ou d'*O barrelieri* (~ 15 mL par pot), aux 15^{ième} et 22^{ième} jours et les mêmes marqueurs d'induction de la résistance ont été estimés aux 21^{ième} et 28^{ième} jours après semis.

II.2.6.1.2. Dosages biochimiques des marqueurs d'induction de la résistance

Pour les dosages biochimiques des marqueurs d'induction de la résistance, les plantules en croissance ont été récoltées à différents stades de l'évaluation (14^{ième}, 21^{ième} et 28^{ième} jours), et traitées dans le tampon approprié: pour chaque essai, 500 mg de plantules maintenu dans de la glace, a été homogénéisé à l'aide d'un mortier, du pilon et du quartz sand, dans 10 mL de tampon phosphate (50 mM, pH 7,2) contenant 0,001% de tritonex (v/v). Le mélange d'extrait de plante ainsi préparé a été centrifugé à 5000g pendant 15 min entre 2- 5°C. Le surnageant a été utilisé comme source de marqueur d'induction. En ce qui concerne l'activité de la β -1,3-glucanase et de l'amylase, les plantules ont été broyées plutôt dans le tampon acétate 50 mM, pH 5.

II.2.6.1.2.1 Quantification de la teneur en protéines des plants de riz

Les protéines des extraits enzymatiques ont été quantifiées par la méthode colorimétrique décrite par **Bradford (1976)**: 50 µL d'extrait de plantules de riz a été dilué dans 450 µL de solution de NaCl 0,15M; puis le milieu réactionnel était constitué de; 50 µL de la dilution précédente plus 150 µL de NaCl 0,15M et 1 mL de réactif de Bradford (100mg de Bleu brillant de Coomassie G-250 dissous dans 50 mL d'éthanol 95% plus 100 mL d'acide phosphorique 85% (P/v), plus 850 mL d'eau distillée). L'absorbance a été mesurée à 595 nm après 15 minutes d'incubation, contre un blanc constitué de 200 µL de NaCl 0,15M et 1mL du réactif de Bradford. L'albumine bovine sérique (BSA, Sigma) préparée à des masses comprises entre 0-100 µg a été utilisée pour la construction de la courbe d'étalonnage (**Annexe IV**); la teneur en protéines a été exprimée en milligramme par gramme de feuilles fraîches (mg/g feuilles).

II.2.6.1.2.2. Dosage des phénols des plants de riz

La teneur en composés phénoliques des plantules de riz a été estimée selon la méthode de Folin-Ciocalteu, sur la base de la procédure décrite par **Zieslin et Ben-zaken (1993)**. 50 µL d'extrait de plantules de riz a été ajouté à 750 µL du réactif de Folin-Ciocalteu Folin 2N (1:10 v/v avec l'eau distillée), homogénéisé et incubé pendant 5min; 1000 µL de carbonate de sodium (Na₂CO₃) 7% (m/v) a été ensuite ajouté et homogénéisé. Le mélange obtenu a été incubé à température ambiante pendant 90 min et l'absorbance a été mesurée à 725 nm. Une courbe d'étalonnage a été parallèlement réalisée dans les mêmes conditions en utilisant comme référence l'acide gallique, dans la marge de concentrations variant de 0-100 µg/mL. La formule de la régression linéaire de cette courbe est $Y = 0.00399X + 0,079$ (X: masse d'acide gallique (µg); Y: Densité optique à 725 nm) avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,997$ (**Annexe IV**). Les teneurs en phénols ont été exprimées en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme de feuilles fraîches de riz (mg EAG.g⁻¹).

II.2.6.1.2.3. Quantification des groupes thiols dans les plants de riz

Les groupes thiols ont été déterminés sur la base de l'absorption moléculaire, avec comme réactif, l'acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque (DTNB, Sigma) aussi connu sous le nom de réactif de Ellman's (**Ellman, 1959**). Le protocole de dosage a été réalisé suivant la fiche technique de Thermo Scientific: A 2,5 mL de tampon phosphate pH 8 contenant 1mM d'EDTA, il a été ajouté successivement 50 µL du réactif d'Ellman (4mg/mL), 200 µL d'extrait de plants de plant de riz; et l'ensemble a été soigneusement homogénéisé et incubé à température ambiante (25°C) pendant 15 min. Le blanc a été constitué avec 200

μL de tampon du milieu réactionnel en lieu et place de l'extrait de plantules de riz. Après incubation, la densité optique a été lue à 412 nm, et la concentration des groupes thiols dans les extraits a été calculée à partir du coefficient d'extinction molaire ($14,150\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) de l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïc (TNB, produit de la réaction du DTNB avec les groupes thiols) suivant la formule:

$$C = \frac{A_E - A_B}{\epsilon l} * \frac{2,75}{0,2}$$

Avec **C**= Concentration des groupe thiols (mol/L); **A_E**= Absorbance de l'extraits enzymatique à 412 nm; **A_B** = Absorbance du tube blanc; **ϵ** = coefficient d'extinction molaire ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$); **l**= longueur de la cuve chromatographique (cm); 2,75 = volume total de la solution pour un essai (mL); 0,2 = volume de l'extrait de plantules de riz dans un essai (mL)

II.2.6.1.2.4. Evaluation de l'activité de la β -1 ,3-glucanase

L'activité de la β -1 ,3-glucanase a été évaluée en combinant la méthode décrite par **Fink et al. (1988)** et celle décrite par **Vieira et al. (2006)** avec quelques modifications: 50 μL d'extrait enzymatique a été ajouté à 325 μL de tampon acétate (50 mM, pH= 5) et 125 μL 2mg mL^{-1} de Laminarine (Sigma) dans le tampon acétate. Après deux heures d'incubation à 37°C, 500 μL de réactif DNS (1% (p/v) d'acide 3,5-dinitrosalicylique (Merck) plus 30% (p/v) de sodium potassium tétra hydrate de tartrate (Merck) et 0,4N de NaOH) a été ajouté et le mélange porté à ébullition pendant 10 min. Après refroidissement à température ambiante, 2mL d'eau distillée a été ajouté à chaque tube et homogénéisé. La densité optique a été lue à 540 nm contre le tube blanc dans lequel le tampon de réaction remplace l'extrait de plantules de riz. Les concentrations de glucose ont été préparées respectivement à 0, 10, 20, 40, 80, 120, 160, 200, 300 et 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour la constitution de la courbe d'étalonnage (**Annexe IV**); l'activité spécifique de la β -1 ,3-glucanase a été exprimée en μg glucose min^{-1}x mg protéine $^{-1}$.

II.2.6.1.2.5. Evaluation de l'activité des polyphénols oxydases

L'activité des polyphénols oxydases a été déterminée par spectrophotométrie, basée sur l'augmentation de l'absorbance initiale à 420 nm, tel que décrit par **Duckworth et Coleman (1970)**, avec quelques modifications du contenu du milieu réactionnel. Le mélange réactionnel assemblé dans une cuve chromatographique de 1cm de long était constitué par 1960 μL de tampon phosphate (50 mM, pH= 6,8 à 25°C) contenant 20 mM de catéchol (Merck) et enrichie en bulle d'air, plus 40 μL d'extrait de plantule de riz;

l'ensemble a été homogénéisé rapidement et le changement dans l'absorbance a été immédiatement noté toute les 30 secondes pendant 3 minutes à l'aide d'un spectrophotomètre UV (Visiscan167, Systronic India). L'activité des polyphénols oxydases a été exprimée comme variation de l'absorbance entre 30S-2min30 par minute par milligramme de protéines ($\Delta DO_{30S-2min30} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protéine}$)

II.2.6.1.2.6. Evaluation de l'activité des peroxydases

L'activité des peroxydases a été déterminée par spectrophotométrie, basée sur l'augmentation de l'absorbance initiale à 420 nm, tel que décrit par **Chance et Maehly (1955)**, avec quelques modifications. Dans une cuve chromatographique de 1cm de long, a été successivement ajouté 260 μL de tampon phosphate (100 mM, pH= 6 à 25°C), 220 μL de pyrogallol (Merck) 5% w/v, 1400 μL d'eau distillée, 200 μL de H_2O_2 (Merck) 0,5% v/v. et 20 μL d'extrait de plantules de riz. Le mélange a été ensuite soigneusement homogénéisé et le changement dans l'absorbance a été immédiatement noté toute les 30 secondes pendant 3 minutes à l'aide d'un spectrophotomètre UV (Visiscan167. Systronic India). L'activité de la peroxydase a été exprimée comme variation de l'absorbance entre 30S -2min 30 par minute par milligramme de protéines ($\Delta DO_{30S-2min30} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protéine}$)

II.2.6.1.2.7. Evaluation de l'Activité des amylases

L'activité des amylases a été évaluée sur la base de la méthode décrite par **Dure (1960)**: à 100 μL d'amidon 2% dans le tampon acétate, 200 μL de tampon acétate 0,1M, pH= 5,5 et 200 μL d'extrait de plantules de riz ont été successivement ajoutés, homogénéisés et incubés à 30°C pendant 10 min. Par la suite 400 μL de réactif de l'acide DNS (1g d'acide 3,5 Dinitro salicylique dans 20 mL de NaOH 2N et 30g de Sodium potassium tartrate et compléter le volume de la préparation à 100 mL avec de l'eau distillée) a été apporté à la préparation et porté à 100°C pendant 5min. Le mélange a été ensuite refroidit, 2mL d'eau distillée a été ajouté et l'absorbance a été lue à 540 nm. Le maltose a été utilisé comme standard (**Annexe IV**); les valeurs obtenues ont été exprimés en microgramme de maltose libéré par milligramme de protéines par minutes (μg maltose x μg protéine⁻¹ min⁻¹).

II.2.6.2. Effets des extraits sur la sévérité de la maladie des taches brunes, la biologie de l'infection et la croissance du riz.

Les effets des extraits de *C. citratus* sur; la sévérité de la maladie des taches brunes, la biologie de l'infection et la croissance du riz ont été étudiés, *in vitro* et *in situ*. Les concentrations 0%, 2% et 4% de l'extrait éthanolique de *C. citratus* (EEc), ont été utilisées pour traiter par trempage pendant 24 heures, à 29 °C et à l'obscurité, les semences de la

variété de riz OM 4498 du Vietnam, sensible à la maladie des taches brunes. Après les traitements ci-dessus indiqués, les semences ont été transférées dans les boîtes de pétri contenant chacune cinq couches de papier filtre humidifiées, et incubées de nouveau pendant 24H, à 29°C à l'obscurité pour stimuler la germination. Les semences pré germées ont ensuite été semées dans un substrat constitué d'un mélange de tourbe (Pindstrup Substrate no. 2), de vermiculite et de sable respectivement dans les proportions 2:1:1, et mise en croissance pendant 7 à 13 jours dans la serre et dans les conditions alternées de 12 heures de lumière (intensité lumineuse d'env. 275 μ E) à 28 °C et 12 heures d'obscurité à 25°C avec une humidité relative de 75-80%. Les plants ont été fertilisés une fois par semaine avec du NPK 5-1-4 à (10mL/10L d'eau.). A 14-20 jours après semis, les plants de riz ont été inoculés avec *B. oryzae*; en pulvérisant jusqu'à ruissellement, la suspension de conidies (mêlé au Tween 20) de l'isolat BO5 originaire du Vietnam (**Khoa et al., 2011**), qui a été obtenu des cultures vieilles de 35 à 40 jours et a été ajusté à la concentration de 10000 conidies/ml. Ces plants ont été ensuite incubés à l'obscurité pendant 24 heures dans des sacs en plastique pour maintenir l'humidité relative élevée.

II.2.6.2.1. Evaluation des symptômes de l'helminthosporiose.

Les plants de riz ont été inoculés par la suspension de spores de *B. oryzae* (10000 conidies/mL); 5 jours après l'inoculation, les symptômes ont été enregistrés par détermination du pourcentage de la surface foliaire infectée pour trois prétraitements.

II.2.6.2.2. Evaluation de l'effet des extraits sur et la croissance

La croissance des plants de riz a été déterminée par des prises de photos à 20-30 jours après le semis, afin de déceler les effets putatifs des extraits de *C. citratus*. En outre, des données quantitatives sur les différences de croissance ont été recueillies; notamment les hauteurs de 5 plants par pot, pour 4 pots par traitement ont été enregistrées, en mesurant la hauteur de la tige principale.

II.2.6.2.3. Etude de la biologie de l'infection

La biologie de l'infection par *B. oryzae* a été étudiée par microscopie optique et par microscopie à fluorescence. Des échantillons de feuilles ont été prélevés aux jours 1, 3 et 5 après l'inoculation avec *B. oryzae* (concentration 10000 conidies / mL) et, nettoyés avec un mélange d'éthanol à 100% et d'acide acétique glacial (3:1 v/v). Par la suite, les feuilles ont été transférées (pour saturation des tissus) dans le lactoglycerol (mélange d'acide lactique, de glycérol et d'eau, 1:2:1 (v/v /v)) pour stockage pendant un temps assez long. Afin de localiser les structures fongiques, 4 - 5 cm de segments de feuilles ont été colorés avec du bleu d'Evans. 2,5% (p / v).

Les feuilles ont été examinées en utilisant un microscope Olympus BX 60. Le nombre de spores non germé a été enregistré sur chaque segment de feuille et par la suite, le développement de 15 spores germées par feuille et choisit au hasard a été étudié (un total de 30 spores par traitement) en utilisant la microscopie optique et la microscopie à épi fluorescence (excitation maximum 330-385 nm, dichroic mirror DM 400 nm, barrier filter 420 nm). Pour chaque spore germée, l'emplacement de l'appressorium formant le renflement d'hyphes a été enregistré (ie si l'appressorium est formé au-dessus des ouvertures du stomate, au-dessus de l'antichlinal ou au-dessus du périclinal de la paroi cellulaire). Enfin, il a été noté si les spores ont causé la pénétration et la réaction d'hypersensibilité dans le tissu; ce dernier facteur a été observé comme des cellules épidermales fluorescentes.

Des morceaux de (4 x 7) mm² de feuilles ont été coupés aux jours 1, 3 et 5 après inoculation des feuilles (concentration 10000 conidies/ml) et, fixés dans 2,5% glutaraldéhyde préparé avec 0,1 M de tampon phosphate (pH 6,8). Après 24h, les morceaux de feuilles ont été lavés dans un tampon et déshydratés dans de l'acétone. Par la suite, ils ont été séchés dans à l'étuve (EMS 850 Critical Point Dryer), couverts de 20 nm d'un alliage or-palladium et examinés au microscope électronique à balayage (FEI QUANTA 200 ESEM) dans le but d'enquêter sur les caractéristiques particulières du développement du champignon.

II.2.7. Description des essais en champ

Les essais en champ ont été menés deux années successives dans deux sites: le site de Tonga pour l'expérimentation des variétés pluviales et le site de Ndop pour l'expérimentation des variétés irriguées.

II.2.7.1. Expérimentation en riziculture pluviale

II.2.7.1.1. Site l'étude

Tonga (situé à 819 mètres d'altitude, longitude de 10°71"Est et une latitude de 4°97" Nord) a été choisie pour l'expérimentation de riziculture pluviale en champ; l'essai a été réalisé entre Juin -Décembre 2011 (un essai) et Juin-Décembre 2012 (deux essais).

II.2.7.1.2. Matériel végétal (semences)

Trois variétés de riz ont été utilisées sur ce site: le riz rouge de Tonga obtenu auprès d'un producteur ; le NERICA 3 (WAB 56-104/CG 14//WAB56-104) et le NERICA 13 (WAB 56-50/CG 14//WAB56-50) cultivés à Nkolbisson et fournis par l'IRAD Nkolbisson-Yaoundé.

II.2.7.1.3. Préparation de la parcelle expérimentale

La parcelle utilisée pour la mise en place de l'essai en champ à Tonga, n'avait pas de précédent cultural, les deux années précédant la mise en place du premier essai (2011); le deuxième essai (2012) a eu un précédent cultural qui était le maïs. Une fois que la parcelle expérimentale a été choisie, les arbres pouvant créer l'ombrage ont été abattus; la parcelle a été ensuite défrichée à ras du sol; une semaine après, le Roundup 450 Turbo (Glyphosate s/f d'isopropyl amine 450g/; Formulation SL; classe toxicologique III; dose 3L/Ha) a été épandu sur les jeunes herbes émergentes à l'aide d'un atomiseur (pulvérisateur à dos). Environ 10 jours après le traitement chimique, on procède au labour, à l'émottage et à l'aplatissement du sol, par le biais des houes. Les blocs, les sous blocs et les parcelles élémentaires des sous blocs ont été quadrillés à l'aide des ficelles, du décimètre et des jalons préparés à cet effet. Le matériel local (bambous) a été dimensionné pour faciliter le semis.

II.2.7.1.4. Traitement des semences et semis

Environ 1/5 (180g) de 900g de semences d'une des trois variétés sélectionnées pour l'expérience, a été retenu pour servir de témoin négatif (T₀); le reste (720g) a été plongé dans une solution de NaCl 20 % et agité manuellement à l'aide d'une baguette en verre pendant 60 seconde; le surnageant est écarté et le culot constitué de semences immergées a été récupéré et lavé abondamment à l'eau distillée et 180g de cette semence est prélevé pour constituer le témoin traité au NaCl (T₁). Le reste de la semence (540g) a été trempé pendant 24h à température ambiante (~25°C) dans une solution 1% d'extrait à éthanol de *O barrelieri L*, pour constituer les traitements T₂, T₃, T₄. Concomitamment les témoins cités plus haut ont été trempés dans de l'eau distillée dans les mêmes conditions pour la même durée. Après 24h les semences de chaque catégorie sont récupérées essorées, conditionnées dans des papiers plastiques bien étiquetés et acheminées en champ pour le semis. Le semis a été effectué manuellement de manière directe en poquet (**Figure 15A**); l'espacement entre deux poquets sur une ligne et entre deux lignes est de 25 cm. La densité de semis est de 5 graines par poquet de profondeur 3-4 cm. après mise en terre le poquet est couvert et tassé au pied. Une parcelle élémentaire de 3m x 4m aura ainsi 221 poquets (13x17) pour 1105 graines (environ 38g).

II.2.7.1.5. Dispositif expérimental

L'expérimentation a été mise en place suivant un dispositif en blocs aléatoires complet et parcelles divisées (Dispositif en split-plot), avec comme facteur principal le traitement par l'extrait de plante et comme facteur subsidiaire, la variété de riz. La parcelle expérimentale a été divisée en trois blocs; chaque bloc (B) a été divisé en autant de sous blocs (SB) que de modalités (3) du facteur subsidiaire et, ces modalités (N₁₃, RR et N₃) ont été affectées aléatoirement à chacun des sous blocs; chaque sous bloc a été ensuite divisé en autant de parcelles élémentaires (split plots) que de modalités (5) du facteur principal et, ces modalités (T₀, T₁, T₂, T₃, T₄) ont été affectées de manière aléatoire à chaque parcelle élémentaire. Ainsi chaque bloc comprenait 15 parcelles élémentaires de surface 12 m² (4m x 3m) chacune, qui étaient séparées entre elles par des espacements de 50 cm; deux blocs étaient séparés par des couloirs de 1m de large. L'essai comportait au total 3 répétitions (blocs) soit 45 parcelles élémentaires pour sur une surface totale d'environ 759 m² (23m x 33m). Des bandes de bordures ont été prévues de part et d'autre de la parcelle de l'essai pour éviter les phénomènes de bordure. Le dispositif expérimental mis en place à Tonga pour les cinq traitements ci-dessous associés à trois variétés de riz (N₁₃, RR, et N₃), est présenté par la **figure 14**.

1. Témoin non traité (T₀)
2. Traitement avec le NaCl 20%(T₁)
3. Traitement avec 20% de NaCl + Trempage dans la solution 1% de l'extrait à l'éthanol d'*O. barrelieri* pendant 24H (T₂)
4. Traitement avec 20% de NaCl + Trempage dans la solution 1% de l'extrait à l'éthanol de *O.barrelieri* pendant 24H + Pulvérisation de 2% de l'extrait à l'éthanol de *O. barrelieri* à 300L/Ha au 14^{ième} jour + Pulvérisation de l'extrait aqueux *O. bareilleri* (20g de poudre par litre d'eau) à 556L/Ha chaque deux semaines jusqu'au stade de grain dur (T₃)
5. Traitement avec 20% de NaCl + Trempage dans la solution 1% de l'extrait à l'éthanol de *O.barrelieri* pendant 24H + Pulvérisation de 2% de l'extrait à l'éthanol de *C. citratus* à 300L/Ha au 14^{ième} jour + Pulvérisation de l'extrait aqueux de *C. citratus* (20g de poudre par litre d'eau) à 556L/Ha chaque deux semaines jusqu'au stade de grain dur (T₄)

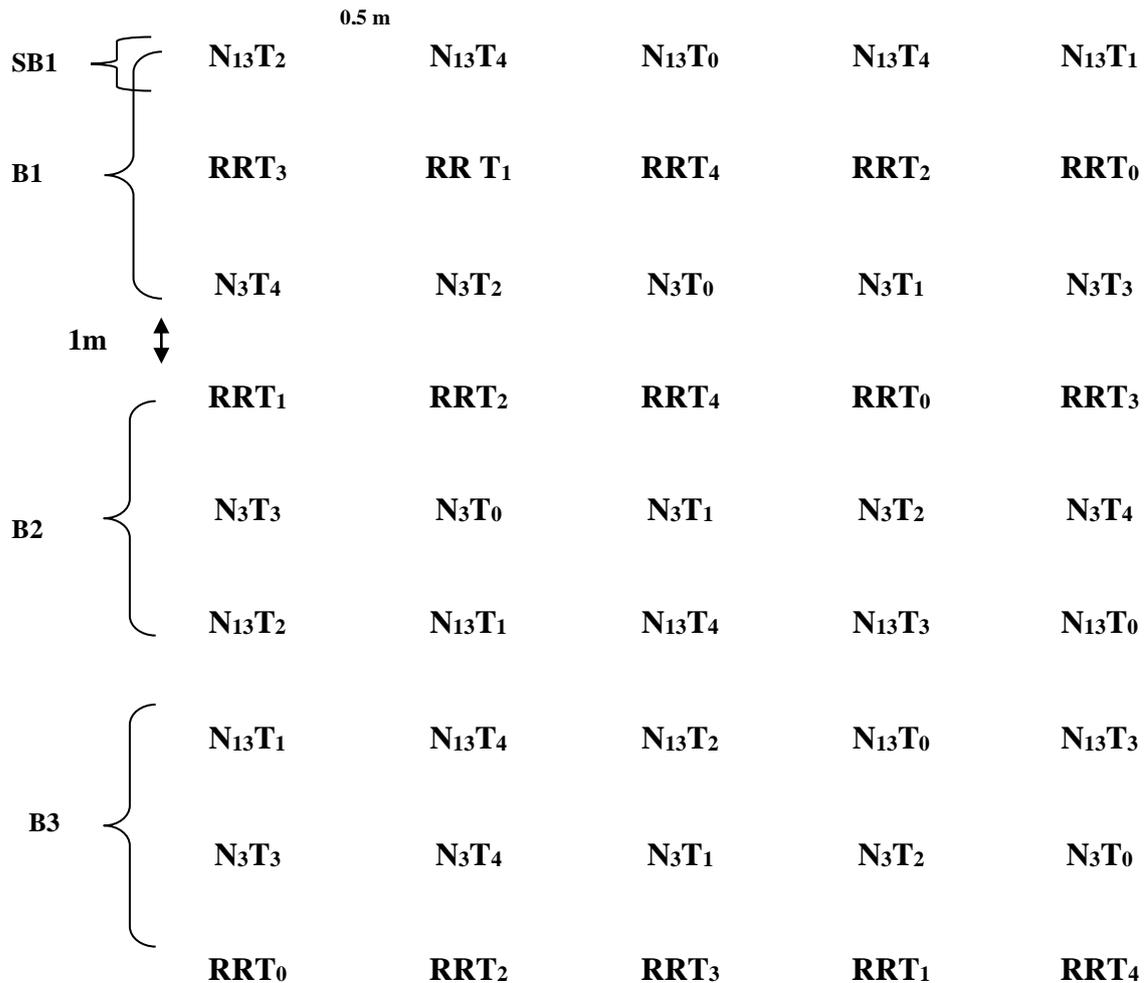


Figure 14: Dispositif en blocs aléatoires complet avec parcelles divisées (Dispositif en split-plot), impliquant 5 extraits de plantes (T₀, T₁, T₂, T₃, T₄) comme traitement des parcelles élémentaires et trois variétés de riz (N₁₃, RR, et N₃) comme traitement des blocs; dans trois répétitions

II.2.7.1.6. Suivi agronomiques et entretien des parcelles

Pour dissuader et éloigner les oiseaux, des feuilles de papier cahier ont été disposées sur les allées des blocs, des sous blocs et des parcelles élémentaires directement après le semis (**Figure 15B**); par ailleurs, des épouvantails ont été dressés dans le champ au stade de la floraison (**Figure 16A**). Le nettoyage des alentours de la parcelle expérimentale et une présence régulière (au moins une fois par semaine) en champ étaient suffisante pour éloigner les hérissons qui sont des ravageurs redoutables au stade de la montaison. Deux sarclages ont été nécessaires pour chaque expérimentation (**Figure 15C**): le premier est intervenu à environ 30 jours après le semis, et le second à environ quatre semaines du premier; ce dernier était associé au binage. Après le premier sarclage (30 jours après le semis), 120g d'engrais NPK 20.10.10 a été épandu manuellement à la volée sur

chaque parcelle élémentaire, soit une dose de 100 kg/Ha (10g/m²) ou 5,4 kg pour 540 m² représentant la surface des 45 parcelles élémentaires de notre essai. L'urée à la dose de 100 kg/Ha (10g/m²) a été appliquée après le deuxième sarclage, environ 51 jours après le semis.

Les parcelles élémentaires T₃ (3RRT₃, 3N₃T₃ et 3N₁₃T₃) occupant 108 m² de surface (12m² x 3 x 3), ont été pulvérisées deux semaines après le semis, avec une solution 2% de l'extrait à l'éthanol d'*O. barrelieri* à 300L/Ha. Deux semaines après ce premier traitement en champ, 120g de poudre de plant de *O. barrelieri* a été trempé dans environ 5 litres l'eau pendant une heure puis filtré; le filtrat a été complété à 6 litres et pulvérisé sur les parcelles élémentaires T₃ (556L/Ha); ce dernier traitement a été continuellement effectué tous les deux semaines (**Figure 16B**) jusqu'au stade de développement du grain dur. Les parcelles élémentaires T₄ (RRT₄, N₃T₄ et N₁₃T₄) ont été traitées de la même manière que celles T₃; cependant, à la place des extraits d'*O. barrelieri*, les poudres de *C. citratus* ont été utilisés. Les parcelles T₀ (RRT₀, N₃T₀ et N₁₃T₀), T₁ (RRT₁, N₃T₁ et N₁₃T₁) et T₂ (RRT₂, N₃T₂ et N₁₃T₂) ont été chacune traités par un volume d'eau équivalent à celui utilisé dans la préparation de l'extrait à l'eau utilisés pour le traitement de T₃ et T₄.



Figure 15: Opérations de mise en place du riz pluvial. (A) Quadrillage des parcelles élémentaires et semis en poquet; (B) Dissuasion des oiseaux par les papiers cahier après semis; (C) champ sarclé



Figure 16: Opérations d’entretiens en riziculture pluviale. (A) Dissuasion des oiseaux avec des épouvantails, (B) Traitement par pulvérisation en champs

II.2.7.1.7. Récolte

La récolte a été faite à la main, lorsque les panicules étaient à environ 90% de couleur paille; au 111^{ème} jour pour le Nerica 13, au 121^{ème} jour pour le Nerica 3 et au 153^{ème} jour pour le riz rouge. Seules les panicules devant servir à l’évaluation des rendements ont été enlevées sur un mètre carré de chaque parcelle élémentaire (**Figure 17A**). Les panicules récoltées ont été par la suite conditionnées dans des papiers plastiques (**Figure 17B**), séchées, et le grain a été extrait à la main. Le reste de la récolte a été obtenu par battage manuel de la paille possédant le grain (coupée deux jours avant), sur les troncs d’arbres disposés sur de grandes bâches (**Figure 17C**).



Figure 17: Opérations de récoltes en riziculture pluviale. (A) Récolte des panicules des échantillons avec des couteaux; (B) Conditionnement des échantillons dans des papiers plastiques; (C) Battage du reste de la récolte

II.2.7.1.8. Collecte des données

Plusieurs données ont été collectées:

- L'émergence a été évaluée en comptant le nombre total de plants levé/m², 20 jours après le semis.
- Le nombre total de talles a été relevé environ au 80^{ième} jour pour les variétés NERICA et 120^{ième} jour pour le riz rouge après le semis, par comptage de tous les plants retrouvés dans le mètre carré circonscrit pour la collecte des données.
- Le nombre de panicules /m² a été compté environ au 110^{ième} jour pour la variété NERICA 13, au 120^{ième} jour pour la variété NERICA 3 et au 145^{ième} jour pour la variété riz rouge.
- L'incidence de l'helminthosporiose causé par *Bipolaris oryzae* a été évaluée en champ sur les trois variétés pluviales, aux stades de la reproduction (floraison) et de maturité du riz (grain dur), en se référant l'échelle de la «Standard Evaluation System for Rice» de l'IRRI (2002), avec quelques modifications: les index de la maladie variant de 1 à 9 ont été convertis en pourcentages médian d'attaque correspondant de la surface foliaire présentant les symptômes; avec: 0 = pas d'attaque(0%), 1= moins de 1% d'attaque(0,5%), 2 = 1-3% d'attaque (2%), 3= 4-5% d'attaque(4,5%), 4= 6-10% d'attaque(8%), 5= 11-15% d'attaque (13%), 6= 16-25% d'attaque (20,5%), 7 = 26-50% d'attaque (38%), 8 = 51-75% d'attaque (63%) **Figure 18A, B**, 9 = 76-100% d'attaque (88%). L'index de l'helminthosporiose sur les trois feuilles les plus centrales, a été estimé pour 25 plants de riz choisis au hasard dans le mètre carré de chaque parcelle. Les index des 25 plants ont été rapportés en pourcentage médian correspondant et, le pourcentage moyens de l'incidence de *Bipolaris* sur les 25 plants à été rapporté.
- Le rendement de production a été évalué en pesant en gramme la masse de riz produite par mètre carré.

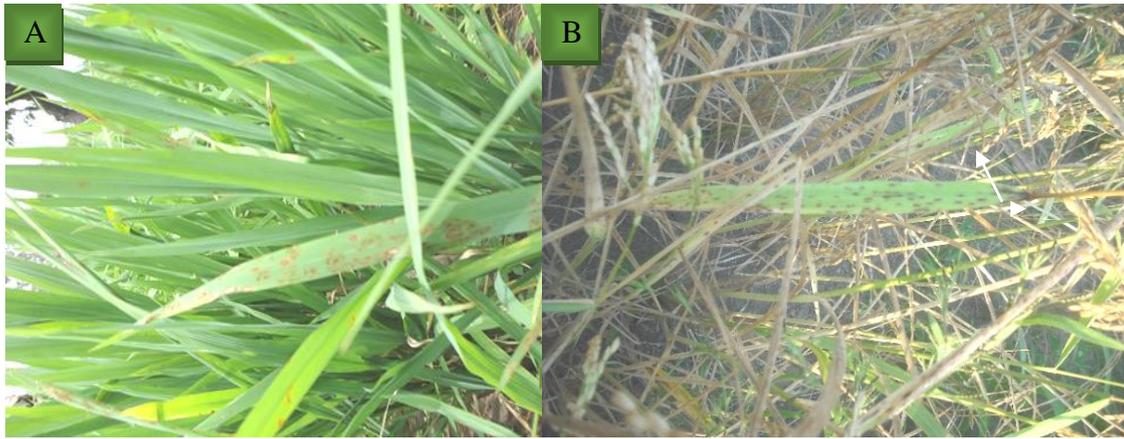


Figure 18: Maladie des taches brunes causée par *B. oryzae* à l'échelle 8, en riziculture pluviale. (A) Sur la jeune feuille au stade de reproduction; (B) sur la feuille au stade de maturité

II.2.7.2. Expérimentation en riziculture irriguée

II.2.7.2.1. Site l'étude

Ndop (situé à 1172 mètres d'altitude, avec une longitude de 10°45"Est et une latitude de 5°99" Nord) a été choisi pour l'expérimentation de la riziculture irriguée ; l'essai a été réalisé entre Juin -Décembre 2011 et Juin-Décembre 2012.

II.2.7.2.2. Matériel végétal (semences)

Trois variétés de riz ont été utilisées sur ce site: le *Tox 3145-38-2-3* obtenu auprès d'un producteur; le NERICA-L-42 (TOG5681/4*IR64) et le NERICA-L-52 (TOG5681/4*IR64) cultivés à Nkolbisson et fournie par l'IRAD Nkolbisson-Yaoundé.

II.2.7.2.3. Traitement des semences et mise en place de la pépinière

Les traitements effectués en riziculture irriguée sont exactement les mêmes que ceux de la riziculture pluviale: semence n'ayant reçu aucun traitement (T_0); semence ayant reçu le traitement au NaCl à 20% (T_1); semence ayant reçu le traitement au NaCl à 20% plus le trempage dans l'extrait éthanolique d'*O. barrelieri* à 1% pendant 24h (T_2, T_3, T_4).

La pépinière a été mise en place à un endroit immergé par une faible lame d'eau (**Figure 19A, B, C**): les houes ont été utilisées pour façonner des sillons d'environ 30 cm de hauteur, et former des billons d'environ un mètre de large sur 10m de long, quelques jours avant la mise en boue; par la suite, des surfaces d'environ 1 m² ont été délimitées et, à l'aide d'un morceau de latte, de petits sillons (dépressions représentant les lits de la semence) d'environ 3,5 cm ont été formés tout le long des parcelles délimitées. 6000 graines (x3) de chaque traitement (180g) ont été aléatoirement dispersées sur les lits de la semence du mètre carré; les semences ainsi dispersées ont été successivement recouvertes par du papier plastique et de la paille (**Figure 19A**). Une semaine après, la paille et le

papier plastique ont été retirés, et au 15^{ième} jour, les parcelles T₃ (ToxT₃, NL₄₂T₃, NL₅₂T₃) et T₄ (ToxT₄, NL₄₂T₄, NL₅₂T₄) ont été pulvérisées respectivement avec une solution 2% de l'extrait à l'éthanol d'*O. barrelieri* à 200L/ha et une solution 2% de l'extrait à l'éthanol de *C. citratus* à 200L/ha.

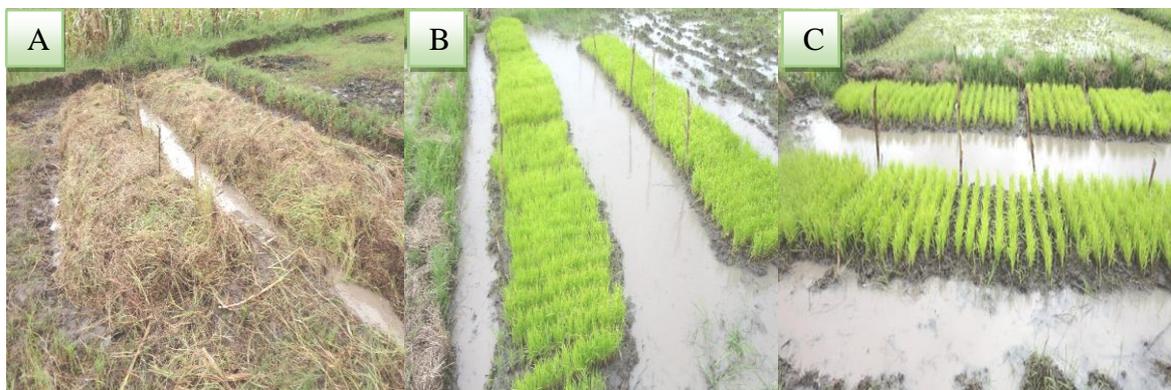


Figure 19: Mise en place de la pépinière en riziculture irriguée. (A) semences sur le lit et recouvertes avec du papier plastique et de la paille; (B) Pépinière vue d'ensemble longitudinalement; (C) Pépinière vue d'ensemble latéralement

II.2.7.2.4. Préparation de la parcelle expérimentale

Les parcelles (carrés ou casiers préalablement endiguées) utilisées pour la mise en place de l'expérimentation en 2011 et 2012 à Ndop, avaient toutes un précédent cultural, le riz. Une fois la parcelle expérimentale choisie, l'herbicide de contact Herbextra (2,4-D Sel d'Amide 720 g/l; Formulation SL; classe toxicologique II; dose 1L/ha) a été utilisé pour assécher l'herbe dans les carrés; l'herbe asséchée a été ensuite brûlée. Les carrés ont été par la suite irrigués jusqu'à obtention d'une lame d'eau d'environ 5 cm; le labour mécanique à l'aide d'un tracteur a été effectué deux fois dans un intervalle de six jours; l'émiettement des mottes (émottage) et le nivelage du sol se sont faits manuellement avec des houes. Les blocs, les sous blocs et les parcelles élémentaires des sous blocs ont été quadrillés à l'aide des ficelles, du décimètre et des jalons préparés à cet effet. Le matériel local (bambou de chine) a été dimensionné pour faciliter le repiquage.

II.2.7.2.5. Dispositif expérimental

Comme dans le cas de l'expérimentation en riziculture pluviale, le dispositif en blocs aléatoires complet et parcelles divisées (Dispositif en split-plot 5 x 3 x 3) a été utilisé. Egalement, les mêmes traitements et le même nombre de répétitions à la seule différence des variétés de riz utilisées, ont été utilisés. Les parcelles élémentaires (45) des sous blocs sont de l'ordre de 15m² (3m x5m) pour une surface expérimentale totale d'environ 924 m² (28m x 33m).

II.2.7.2.6. Repiquage

Le repiquage a été effectué à partir des cultures vieilles de 25 jours issues de la pépinière; la lame d'eau avait une hauteur d'environ 3 cm. Il a été effectué manuellement, en poquet de profondeur 3-4 cm; l'espacement entre deux poquets sur une ligne et entre deux lignes était de 25 cm. La densité de semis est de trois plants par poquet; ainsi une parcelle élémentaire de 3m x 5m aura 273 poquets (13x21) pour 819 plants.

II.2.7.2.7. Suivi agronomiques et entretien des parcelles

Un seul sarclage manuel principal a été effectué 25 jours après le repiquage, par arrachage des mauvaises herbes entre les lignes. Les autres sarclages consistaient à l'arrachage des adventistes parsemés çà et là dans la rizière. Pour éviter que le grain en pépinière ne soit consommé par les oiseaux granivores, les billons de la pépinière ont été couverts par du papier plastique et de la paille. Un gardien a été payé (1500 FCFA/jours) pour la surveillance de la parcelle contre les oiseaux, à partir du début du stade de grain laiteux de la phase reproductive, jusqu'au stade de grain dur de la phase de maturation. La surveillance du niveau d'eau dans les cassiers de notre expérimentation a été assurée par les entrées et les sorties créées aux niveaux des cassiers; la lame d'eau était généralement maintenu à environ 7-10 cm au cours de la phase végétative, de 5-7 cm au cours des périodes de fertilisation (5jours), et autour de 10 cm durant de la phase reproductive du cycle de développement, jusqu'à deux semaines de la récolte où les cassiers ont été complètement drainés. Au cours du repiquage, 225g d'engrais NPK 20.10.10 a été épandu manuellement à la volée sur chaque parcelle élémentaire, soit une dose de 150 kg/Ha ou 10,125 kg pour les 675 m² représentant les 45 parcelles élémentaires de notre essai. L'urée à la dose de 100 kg/Ha (150g/parcelle élémentaire) a été appliquée deux fois sous une lame d'eau maintenue entre 3-4 cm, 25 jours après le repiquage (juste après le sarclage) et 21 jours après le sarclage. Deux semaines après le repiquage, 125g de poudre de plant d'*O. barrelieri* a été trempé dans l'eau pendant une heure puis filtré; le filtrat a été complété à 7,5 litres et pulvérisé (**Figure 20A**) sur 135m² représentant la surface des parcelles élémentaires T₃ (3ToxT₃, 3NL₄₂T₃ et 3NL₅₂T₃), soit ~556L/Ha; ce traitement a été répété toutes les deux semaines jusqu'au stade de développement, du grain dur. Les parcelles élémentaires T₄ (3ToxT₄, 3NL₄₂T₄ et 3NL₅₂T₄) ont été traitées de la même manière que celles de T₃, mais avec l'extrait de *C. citratus*. Les parcelles T₀, T₁, et T₂ ont été traitées avec de l'eau.

II.2.7.2.8. Récolte

Toutes les trois variétés de riz utilisées en culture irrigués ont été récoltées aux environ du 133^{ième} jour après le repiquage: Les eaux ont été complètement drainées des casiers, deux semaines avant la récolte; le mètre carré de chaque parcelle devant servir pour l'évaluation du rendement, a été circonscrit (**Figure 20B**) récolté séché et conditionné dans le papier pour pesé. Le reste du paddy a été récolté manuellement au moyen des faucilles; la paille possédant le grain, a été coupée à environ 15 cm du sol et le grain a été détaché de la paille par battage de la panicule sur un fût vide disposé au milieu d'une grande bâche; il a été par la suite vanné, nettoyé, séché et conditionné.

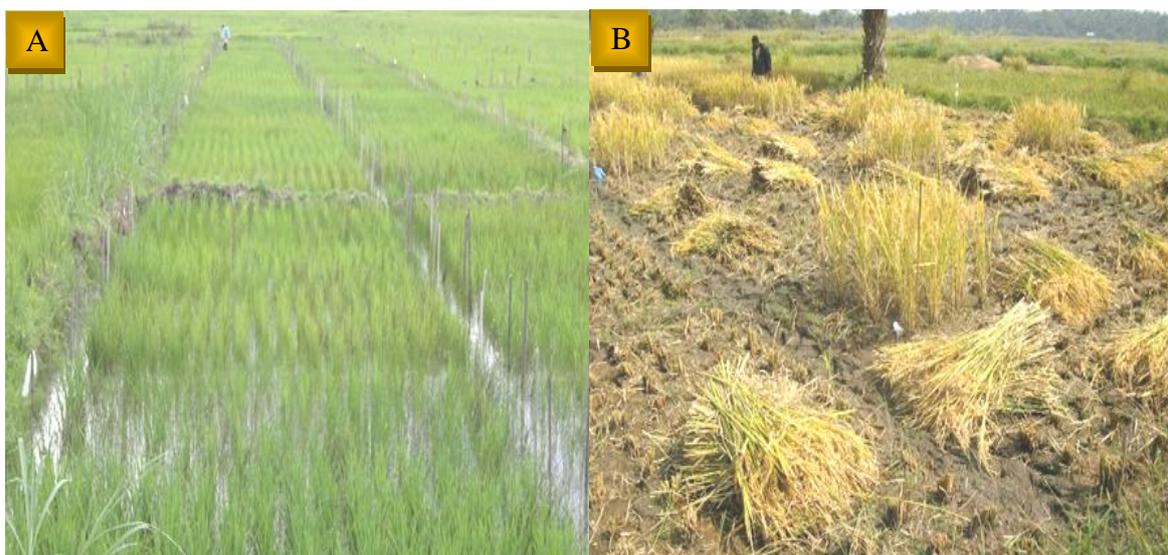


Figure 20: Opérations d'entretiens et de récoltes en riziculture irriguée. (A) Vue générale de la parcelle en cours de traitement par pulvérisation; (B) circonscription et récolte du mètre carré pour estimation du rendement

II.2.8.2.9. Collecte des données

Les données collectées en riziculture irriguée étaient de même type que celles collectées en riziculture pluviale cependant, le nombre total de talles a été relevé au 120^{ième} jour de la mise en pépinière; le nombre de panicules/m² a été compté au 145^{ième} jour du cycle.

II.2.8. Caractérisation chimique des extraits de plantes

II.2.8.1. Détermination de la composition chimique des fractions d'huiles essentielles

II.2.8.1.1. Préparation des échantillons d'huiles essentielles pour injection

Afin de stériliser et d'éliminer les impuretés, chaque échantillon d'huile essentielle a été tout d'abord filtré à travers une membrane de filtration en nylon (Econofiltr Nylon 13m) donc la taille des pores était de 0,2 µm. Ensuite, 100µL de l'huile ainsi filtrée a été introduite dans du 900 µL de chloroforme pour GS-MS; l'ensemble a été vortexer pendant 1 min; Puis, 100µL de ce mélange a été une fois de plus dilué dans 900 µL de chloroforme et de nouveau vortexer pendant 1 min. Le mélange obtenu était ainsi prêt pour l'analyse.

II.2.8.1.2. Analyse de la composition chimique des fractions d'huile essentielle de *Cymbopogon citratus*

L'analyse des différentes compositions des huiles (fractions) essentielles a été réalisée à la Bose Institute of Kolkata, India; par chromatographie en phase gazeuse (*Trace GC Ultra* S/No 320080111, Thermo-Scientific) couplée à la spectrométrie de masse (Polaris Q à trappe ionique, S/No MS211912, Thermo Scientific). La séparation des constituants des huiles essentielles s'est effectuée dans une colonne capillaire polaire en silice fondue (30 m de long, 0,25 mm de diamètre interne, 0,25 µm d'épaisseur du film), de type TR-Wax MS (Polyéthylène Glycol). L'hélium (99,99%) a été utilisé comme gaz vecteur, avec un débit fixé à 1 ml / min. La température du four du chromatographe a été programmée de 50°C (2 min) à 260°C à raison de 4 °C/min puis maintenue à la température finale pendant 5min. 1µL d'échantillon d'HE a été injecté à la température de 250°C (température de l'injecteur), en mode 'Split' (split ratio 1:20) de débit 20 mL/min. La température de la ligne de transfert était de 260°C; la fragmentation s'est effectuée par impact électronique avec une énergie d'ionisation constante à 70 eV. La température d'interface était de 230°C et la gamme de scan (full scan) variait de 40 à 600 (m/z). Un système informatique gérant une bibliothèque de spectres de masse de la National Institute Standard and Technology (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library Version 2.0, build jul 1 2002) était relié au dispositif CPG/SM (GC-MS). L'identification des différents composés chimiques a été faite sur la base des données des spectres de masse NIST et des indices de rétention (indices de Kovats) des composés calculés suivant la formule ci-dessous et comparés avec les indices spectraux des échantillons de référence qui sont publiés dans la littérature (**Babushok et al., 2011; Davies, 1989**).

La quantité relative de chaque composé individuel a été calculée sur la base de l'aire de pic issu de la CPG (GC), sans utilisation le facteur de correction et exprimée en pourcentage.

$$I_x = 100n + 100(t_x - t_n)/(t_{n+1} - t_n)$$

Avec I_x correspondant à l'indice de rétention du composé inconnu; t_x le temps de rétention composé inconnu qui est élué entre un alcane à n atomes de carbone dont le temps de rétention est t_n et un autre à $n+1$ atomes de carbone et au temps de rétention t_{n+1} .

II.2.8.2. Screening phytochimique des extraits aux solvants d'*Oxalis. barrelieri* et *Cymbopogon citratus* (EAo, EEO, EAc et EEc)

Pour mieux comprendre les propriétés antimicrobiennes des extraits des plantes, il est intéressant de connaître les principaux groupes de composés antimicrobiens qu'ils renferment (Cowan, 1999). Ainsi, plusieurs groupes de métabolites secondaires à activités antifongiques ont été qualitativement recherchés dans les extraits à l'eau et à l'éthanol de *C.citratus* (EAc et EEc) et *O. barrelieri* (EAo et EEO). Les tests utilisés étant colorimétrique, l'intensité de la coloration a été comparativement évaluée pour estimer une idée de la quantité du métabolite testé; l'eau distillée a été utilisée comme témoin. Les extraits ont été préparés à 10%, filtré, et les filtrats ont été utilisés pour la réalisation de ces tests.

- ✓ **Recherche des alcaloïdes:** Ajouter 0,5 mL d'extrait à 1 mL de H₂SO₄ (95%); Homogénéiser le mélange et porter à ébullition pendant 2 min, puis ajouter 5 gouttes de réactif de Meyer. Le développement d'une turbidité confirme la présence des alcaloïdes (Odebeyi et Sofowora, 1978).
- ✓ **Recherche des phénols:** Dans 0,5 mL d'extrait, on introduit 1,5 mL de méthanol puis on chauffe le mélange au bain-marie pendant 15 min. A ce mélange, ajouter 3 gouttes de solution de cyanure ferrique fraîchement préparée. La formation d'un précipité vert marque la présence des phénols (Harbone, 1976).
- ✓ **Recherche des triterpènes et stérols:** A un mélange de 0,5 mL d'extrait et 0,5 mL de chloroforme, on ajoute successivement quelques gouttes d'anhydride acétique et d'acide sulfurique concentré. La présence des triterpènes se manifeste par l'apparition de la couleur rouge violacée, alors que la couleur bleu verdâtre indique celle des stérols (Schoppe, 1964).

- ✓ **Recherche des flavonoïdes:** Après avoir mélangé 0,5 mL d'extrait à 0,5 mL de méthanol 95%, on ajoute quelques copeaux de magnésium et du HCl concentré (goutte à goutte). La présence des flavonoïdes se manifeste par une effervescence avec un changement de couleur qui peut être rouge brique ou violet (**Harbone, 1976**).
- ✓ **Recherche des saponines:** Quatre (4) mL d'eau distillée est ajouté à 0,5 mL d'extrait et l'ensemble est porté au bain-marie pendant 5 min. Après refroidissement, la solution homogénéisée est agitée avec un mixeur pendant 10 secondes. La présence d'une mousse persistante (1 min) pouvant dépasser 1 cm d'épaisseur, indique la présence des saponines (**Wall et al., 1954**).
- ✓ **Recherche des anthocyanines:** A 0,5 mL d'extrait on ajoute 1,5 mL de HCl 1%, et le mélange est porté à ébullition. La variation de coloration du rouge orangé au bleu orangé caractérise la présence des anthocyanines (**Odebeyi et Sofowora, 1978**).
- ✓ **Recherche des anthraquinones:** Dans un mélange de 0,5 mL de chloroforme et 0,5 mL d'éther de pétrole, est dilué 0,5 ml d'extrait. Après homogénéisation, on y ajoute 1 ml de NaOH 10%. Le développement d'une coloration rouge est caractéristique des anthraquinones (**Trease et Evans, 1989**).
- ✓ **Recherche des glucosides:** On introduit 0,5 mL d'extrait dans 1 mL de HCl; on neutralise le mélange avec 1 mL de NaOH à 5%; La solution de Fehling est ensuite ajoutée goutte à goutte. La présence des glucosides se manifeste par l'apparition d'un précipité rouge brique (**Odebeyi et Sofowora, 1978**).
- ✓ **Recherche des coumarines:** Sur une plaque de chromatographie sur couche mince, une goutte de solution alcoolique de l'extrait est déposée et exposée aux vapeurs d'ammoniaque. Les coumarines sont détectées par des taches dont la coloration exaltée en présence des vapeurs d'ammoniaque, varie du bleu au pourpre. Par ailleurs, les coumarines peuvent être identifiées en exposant les taches à la lumière ultra violette : elles y donnent une fluorescence bleue.
- ✓ **Recherche des tannins:** A 0,5 mL d'extrait, est ajouté quelques gouttes de chlorure ferrique. La présence des tannins se manifeste par un changement de coloration de la solution: la coloration bleu foncée indique la présence des tannins hydrolysables, alors que la coloration vert noirâtre traduit la présence des tannins condensés (**Trease et Evans, 1989**).

II.2.8.3. Dosages des métabolites primaires et secondaires des extraits aux solvants de *Oxalis barrelieri* et *Cymbopogon citratus* (EAo, EEO, EAc et EEc)

II.2.8.3.1. Quantification des métabolites secondaires

20 mg de poudre lyophilisée des différents extraits (EAc, EAo, EEc et EEO) a été dissout dans 2mL d'eau (EEc et EAo) ou d'un mélange hydro éthanolique (EEc et EEO). La préparation ainsi obtenue (1%) a été centrifugé à 6000 g pendant 15 min et le surnageant a été utilisé pour le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux.

II.2.8.3.1.1. Dosage des polyphénols totaux

Le contenu en polyphénols totaux a été estimé par colorimétrie, selon la méthode de Folin-Ciocalteu, sur la base de la procédure décrite par **Zieslin et Ben-zaken (1993)**. 50 µl du surnageant ci-dessus a été dilué avec 200 µl d'eau distillée et ajouté à 750 µl du réactif de Folin-Ciocalteu Folin 2N (1:10 v/v avec l'eau distillée). Par la suite, le mélange a été homogénéisé et incubé pendant 5min; 1000 µl de carbonate de sodium (Na₂CO₃) 7% (m/v) a été ajouté et homogénéisé. Le mélange obtenu a été incubé à température ambiante pendant 90 min et l'absorbance a été mesurée à 725 nm. Une courbe d'étalonnage a été parallèlement réalisée dans les mêmes conditions en utilisant comme référence l'acide gallique, dans la marge de masse de 0 -50 µg. La formule de la régression linéaire de cette courbe est $Y = 0.00399X + 0,079$ (X: masse d'acide gallique (µg); Y: Densité optique à 725 nm) avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,997$ (**Annexe IV**). Les teneurs en polyphénols ont été exprimées en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme de lyophilisat (µgEAG.mg⁻¹).

II.2.8.3.1.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par la méthode au trichlorure d'aluminium, tel que décrite par **Zhishen et al. (1999)**. Brièvement, 100 µl d'extrait (surnageant) ont été dilués avec 1900 µl d'eau distillée, suivi de l'addition de 150 µl de nitrite de sodium (NaNO₂) 5% et, l'ensemble a été correctement homogénéisé. Après 5 min d'incubation, 150 µl de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) 10% a été rajouté au mélange et incubé à nouveau pendant 6 min. 500 µl d'hydroxyde de sodium (NaOH) 4% a été ajouté homogénéisé et l'absorbance de la préparation a été mesurée à 510 nm. Une courbe d'étalonnage a été parallèlement réalisée dans les mêmes conditions en utilisant comme référence la quercétine, à des masses variant de 0 à 400 µg. La formule de la régression linéaire de cette courbe est $Y = 0.0037X$ (X: masse d'acide gallique (µg); Y: Densité optique à 510 nm) avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,983$ (**Annexe IV**). Les teneurs en flavonoïdes ont été exprimées en microgramme équivalent de quercétine par milligramme de lyophilisat (µgEQ.mg⁻¹).

II.2.8.3.2. Quantification des métabolites primaires

II.2.8.3.2.1. Quantification de la teneur en protéines des extraits de plantes

Les teneurs en protéines des extraits ont été quantifiées par la méthode colorimétrique décrite par **Bradford (1976)**. Le lyophilisat de chaque extrait de plante a été solubilisé à 1% avec de l'eau distillée, centrifugé à 6000 g pendant 15 min et le surnageant a été utilisé pour le dosage. 50 μL de ce surnageant a été mélangé à 150 μL de NaCl 0,15M puis, 1 mL de réactif de Bradford (100 mg de bleu brillant de coomassie G-250 dissous dans 50 mL d'éthanol 95% plus 100 mL d'acide phosphorique 85% (P/v) et 850 mL d'eau distillée) a été ajouté au mélange; l'absorbance a été mesurée à 595 nm après 15 minutes d'incubation, contre un blanc constitué de 200 μL de NaCl 0,15M et 1mL du réactif de Bradford. L'albumine bovine sérique (Sigma) préparé à des masses comprises entre 0-100 μg , a été utilisée comme standard pour la réalisation de la courbe d'étalonnage en **Annexe IV** ($Y = 0.0087X$ masse de BSA (μg); Y: densité optique à 595 nm; R^2 : 0,9278). Les résultats ont été exprimés en microgramme équivalent de BSA par milligramme de lyophilisat ($\mu\text{gEBSA.mg}^{-1}$).

II.2.8.3.2.2. Estimation des sucres totaux des extraits de plantes

100 mg de lyophilisat de chaque extrait de plante a été hydrolysé à chaud (100°C), pendant 3h30 min, dans un tube à essai contenant 2,5mL de HCl 2N. L'acidité contenu dans l'hydrolysate a été ensuite neutralisée par ajout progressif de petite quantité de Na_2CO_3 dans le tube, jusqu'à cessation complète de l'effervescence. Le volume du tube a été complété par après à 50 ml avec de l'eau distillée puis centrifugé à 6000 g pendant 20 min. Le milieu réactionnel constitué 50 μL de surnageant, 950 μL d'eau distillée et 3mL du réactif à l'antrone (300 mg d'antrone plus 4,62 mL d'eau distillée et 145,38 mL de H_2SO_4 98%) fraîchement préparé, a été homogénéisé, chauffé pendant 8 min à 100°C dans un bain marie puis, refroidit rapidement, et l'absorbance a été lue à 630 nm (**Hedge et Hofreiter, 1962**). Une courbe d'étalonnage (**Annexe IV**) a été parallèlement réalisée dans les mêmes conditions en utilisant comme référence le D-glucose préparé à des masses comprises entre 0-100 μg ($Y = 0.0139X$ masse de D-glucose (μg); Y: Densité optique à 630 nm; R^2 : 0,9963). Les résultats ont été exprimés en microgramme équivalent de D-glucose par milligramme de lyophilisat ($\mu\text{gEGlc.mg}^{-1}$).

II.2.8.4. Détection des composés constitutifs des extraits aux par CLHP (HPLC)

II.2.8.4.1. Collection des composés phénoliques de références (standard)

Dix (10) composés donc 9 composés phénoliques de références et l'acide L-Ascorbique ont pour la plupart été achetés dans une entreprise à Kolkata (Tulika Scientific Engineering Work). Il s'agit de: la quercétine et la catéchine (Flavonoïdes); l'acide gallique et l'acide salicylique (acides phénoliques); la vanilline (Aldéhyde phénoliques); l'acide tannique (Tannins); catéchol, le pyrogallol et résorcinol (Alcool phénoliques). A l'exception du pyrogallol qui provenait de SRL Laboratories pvt Ltd, tous les autres composés étaient issus de la compagnie Merck.

II.2.8.4.2. Préparation des standards et les extraits de plantes pour CLHP (HPLC)

A l'aide d'une balance à précision, 5mg de chaque composé phénolique standard a été dissous dans 1 mL de méthanol pour CLHP (HPLC grade Methanol), puis vortexer pendant 5min; pour une concentration de finale 5mg/mL. 100µl de chaque solution de standard ainsi préparé a été mélangé dans un tube pour constituer le mélange de standard (1mL); soit une concentration de chaque standard de 500 µg/mL pour ce mélange. 100 mg de chaque échantillon (extrait de plante lyophilisé) à analyser (EEc, EEO, EAc et EAO) a été introduit dans 10 mL de méthanol pour HPLC (10 mg/mL), le mélange a été vortexer pendant 5min, et porté à la sonnication pendant 15 min. Les solutions de standards et extraits de plantes ci-dessus préparées ont été stérilisées par filtration à travers une membrane, Millipore Express PES Membrane (Millex GP Filter unit 0,22 µm). Les préparations ainsi obtenues étaient prêtes pour l'analyse par CLHP.

II.2.8.4.3. Chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

La CLHP en phase inverse (Reverse phase HPLC) a été utilisée pour l'analyse qualitative et quantitative des monomères phénoliques dans les extraits éthanoliques et aqueux de *C. citratus* et *O. barrelieri*. Cette analyse a été réalisée par le système Shimadzu HPLC (Shimadzu Corporation Tokyo, Japan) comprenant:

- un dégazeur, DGU – 20A₅
- un module de communication (communication module, CBM 20A)
- une pompe quaternaire, LC-20 AT de distribution du solvant
- un Injecteur automatique (Auto sampler SIL- 20A)
- un détecteur à barrette de diodes (Diode Array Detector, SPD – M20A) qui balaye les longueurs d'onde dans la lumière UV-Visible variant entre 190 et 800 nm
- La colonne Phenomenex Luna 5u C18 100A° (4.6 * 250 mm, I.d., 5 µm)
- Un four de la colonne (Column oven CTO-10AS)
- Le logiciel LC-solution, pour le contrôle et le traitement des données

Prenant pour socle les travaux de **Gupta et al., 2012**, l'élution a été faite à température ambiante (~ 28°C) en mode gradient grâce à un mélange de solvants binaire, composé de l'acide acétique dans l'eau 1:25 (solvant A) et du méthanol 100 % (solvant B). Le gradient de l'élution de la phase mobile a commencé par 100% du solvant A, et maintenu à cette concentration pour les quatre (4) premières minutes. La proportion du solvant B a été par la suite maintenue à 50% pour les six minutes qui suivaient. Au bout de ce temps, la proportion de B a été augmentée à 80% pour 10 min d'élution et ramené à 50% pour deux minutes, puis à 0% pour la dernière minute de l'élution. La colonne a été rééquilibrée (lavée) pendant 12 min entre chaque analyse. Le débit de la phase mobile a été maintenu constant à 1,00 ml min⁻¹ pour toutes les analyses; le volume d'injection de chaque échantillon était de 10 µl. Le temps total d'analyse d'un échantillon (standard) était de 23 min. Les aires de pics des extraits ont été mesurées à la longueur d'onde de 280 nm. Les composés phénoliques présents dans les extraits de plantes, ont été identifiés par comparaison des temps de retentions de leurs pics avec ceux des standards phénoliques injectés dans les mêmes conditions. Le calcul des concentrations a été faite par la formule: Quantité d'analyte (µg/mL) = Aire du pic de l'analyte dans l'extrait/Facteur de réponse; avec Facteur de réponse = Aire du pic de l'analyte dans le standard/concentration de l'analyte (µg/mL) dans le standard injecté.

II.2.8.5. Isolement des composés de l'extrait éthanolique de *Cymbopogon citratus* par fractionnement bio guidé

II.2.8.5.1. Extractions des poudres de *Cymbopogon citratus*

2,8 kg de poudre de plantes entières de *C. citratus* a été macéré dans 70% d'éthanol pendant 12 heures; le mélange obtenu a été filtré à l'aide d'une fine toile/papier filtre et le filtrat a été concentré sous vide (40°C) à l'aide d'un rota évaporateur. Le résidu a été de nouveau trempé dans l'éthanol 70%, et l'opération a été répétée quatre fois. Les différentes extraits successivement collectées, ont été mélangés, dissous dans de l'eau chaude; puis homogénéisées avec l'éther de pétrole (1:1) dans une ampoule à décanter. La phase aqueuse a été par la suite homogénéisée dans l'acétate d'éthyle (1:1) et la phase organique (fraction à l'acétate d'éthyle) récupérée a été évaporée sous vide et constituait la cible de l'isolement bio guidé des métabolites. Le protocole général de l'extraction est présenté par la **Figure 21**.

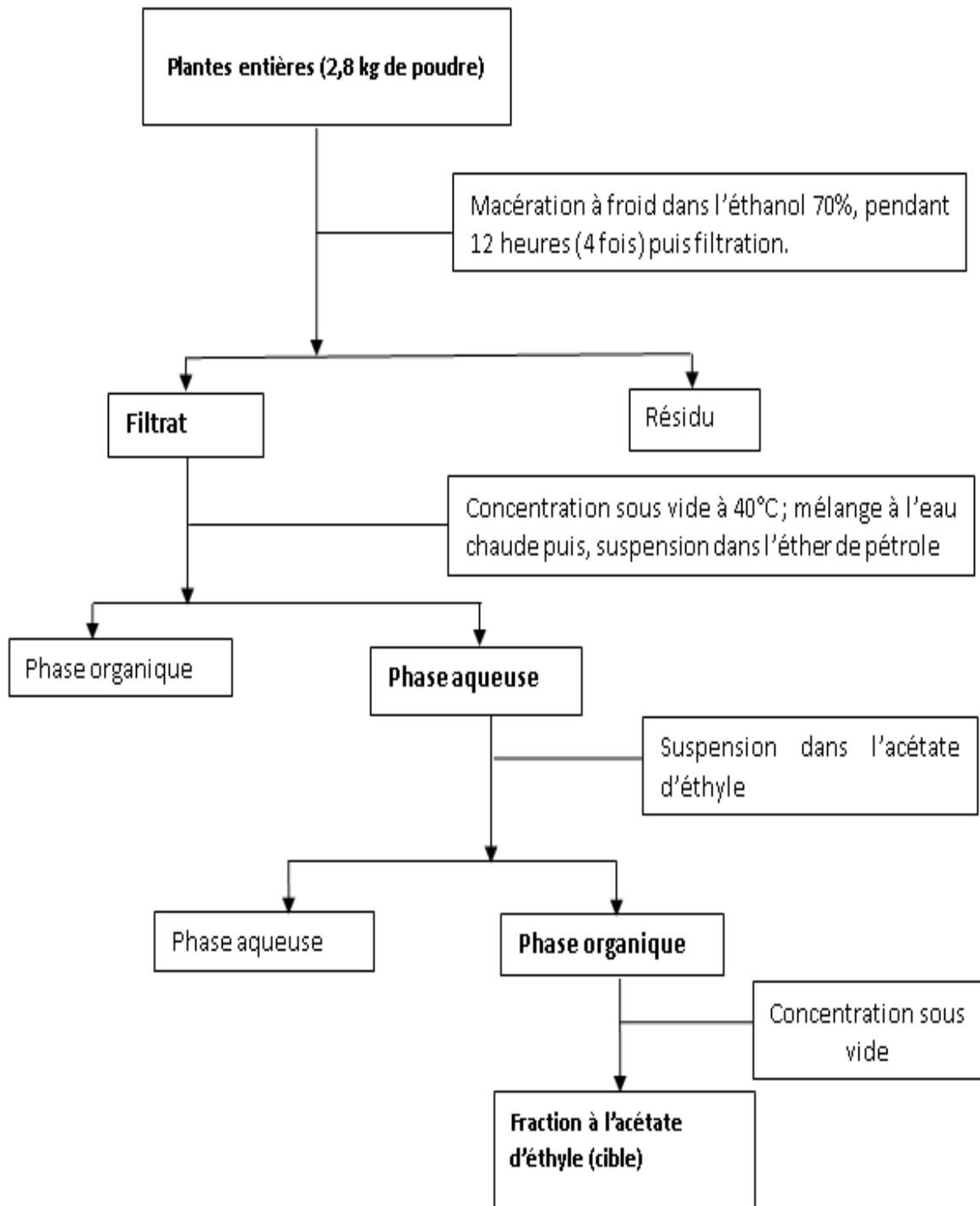


Figure 21: Protocole d'extraction pour isolement des métabolites de *C. citratus*

II.2.8.5.2. Séparations chromatographiques

- ✓ **Chromatographie 'Cut column'**: La fraction à l'acétate d'éthyle (46,5g) ci-dessus extraite a été mélangé à une petite quantité de silice (Mesh size 60-80) et, l'ensemble a été délicatement introduit dans une colonne de 5625 cm³ préalablement rempli au 2/3 par de la silice (mesh size 200-300), de façon à avoir la surface de dessus horizontale (rapport silice/échantillon:1/35). Le système solvant chloroforme/méthanol 9:1 a été utilisé comme phase mobile pour l'élution de la colonne pendant environ 10h (**Figure 22A**). La première fraction (12) et la deuxième fraction (11) d'environ 750 ml chacune, ont été collectées. Le gel sec a été ensuite partitionné en 10 portions d'inégales proportions (en fonction de la répartition de l'extrait dans le gel de silice). Chaque portion du gel partitionné, a été par la suite éluée dans une petite colonne avec du chloroforme 100% puis du méthanol 100%. Les éluats obtenus ont été concentrés sous vide (40°C) à l'aide d'un rota évaporateur et leurs masses ont été reportées.
- ✓ **Chromatographie sur couche mince (CCM)**: Les fractions obtenues (douze au total) ont été contrôlées sur plaque analytique de CCM (**Figure 22B**) dans les systèmes CHCl₃/MeOH (9:1) et ont été regroupées selon leur profil (**Figure 23A**).
- ✓ **Chromatographie Liquide à Moyenne Pression «MPLC»**: la sous fraction B (5,12g) a été incorporée dans une petite quantité de silice de (mesh size 60-80) et a été utilisé pour compléter la colonne à double bouchon qui a été hermétiquement fermée. La sous fraction B ainsi préparée a été chromatographiée en pompant le solvant (CHCl₃/MeOH) de polarité croissante (via un conduit placé au centre du bouchon de la colonne), à une vitesse d'écoulement moyenne 7mL/min grâce à une pompe de type EYELA, ceramic pump VSP 3050 de marque japonaise Pression: 0,3kg/Cm² (**Figure 23B**). Plusieurs sous fractions ont été collectées et rassemblées sur la base de la CCM. Deux groupes de sous fractions recueillies sous forme de cristaux ont été indexées SF46-61 (CHCl₃/MeOH: 95,75/4,25) et SF124-148 (CHCl₃/MeOH: 90/10).
- ✓ **Chromatographie traditionnelle sur colonne**: Elle a été utilisée pour la purification des cristaux obtenus lors de la MPLC; ainsi, à partir SF46-61, le composé BC-101 (Hexane/Acétate d'éthyle 85%) et le composé BC-421 (Acétate d'éthyle: 100%) on été obtenus. A partir de SF124-148 le composé BC-7 (Hexane/Acétate d'éthyle 25% a été obtenu. Tous ces composés se présentaient sous forme de cristaux blanchâtres et étaient solubles dans la pyridine.

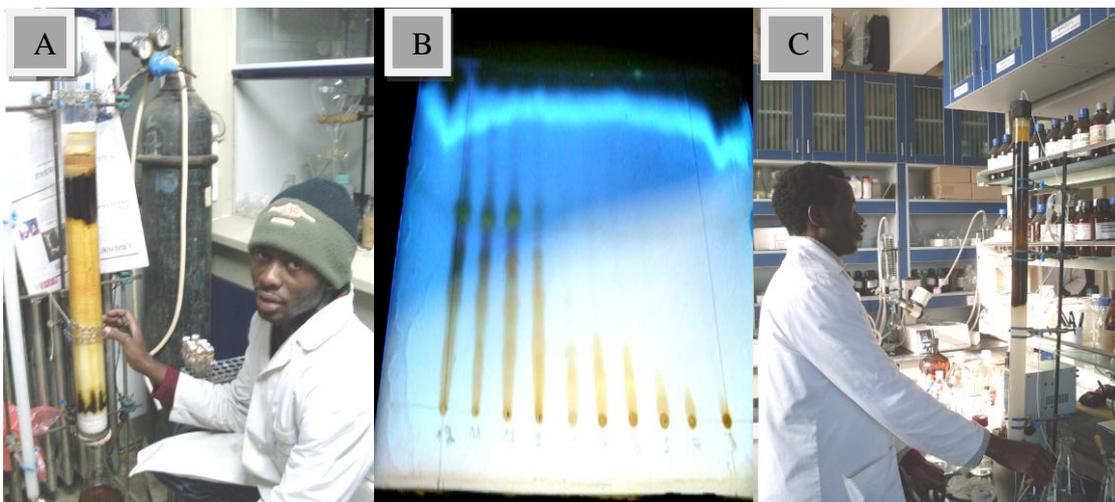


Figure 22: Techniques chromatographiques d'isolement des composés de l'extrait à l'éthanol de *Cymbopogon citratus*: (A): Chromatographie «Cut column»; (B): Chromatographie sur Couche Mince; (C): Chromatographie Liquide à Moyenne Pression

II.2.8.5.3. Bio autographie

Introduire dans une boîte de pétri du papier hygiénique humidifié et y déposer des supports (cure-dents) de manière à éviter ultérieurement tout contact direct entre la plaque de CCM développée et le papier hygiénique humide (préparation de la boîte de pétri). Dans le milieu de culture LB (**Annexe I**) contenant 0,5% d'agar et refroidit à environ 40°C, ajouter 5 ml d'une suspension bactérienne (*Xanthomonas vesicatoria* ATCC 11633/*Escherichia coli* ATCC 29425) vieille d'environ 24h; homogénéiser l'ensemble et inonder de manière douce, aussi rapidement que possible (avec une micropipette dont la tête de l'embout a été élargie) la préparation sur la plaque de CCM développée (à partir des sous sous fractions de l'isolement); déposer ensuite la plaque inondée dans la boîte de pétri précédemment préparée et la sceller. Incuber à 25°C, pendant environ 12h. Récupérer les plaques incubées et y pulvériser du MTT; les plaques deviennent bleu rosâtre; en général, on observe clairement les zones d'inhibitions au niveau des spots bioactifs de l'extrait de plante (**Figure 23B**).

II.2.8.5.4. Caractérisation des composés isolés

Les spectres de RMN¹H, RMN¹³C ont été enregistrés sur un spectromètre JEOL (500 MHz pour le proton et 125 MHz pour le carbone); les échantillons étant dissous dans la pyridine d₅ avec le TMS comme échantillon de référence; les déplacements chimiques ont été exprimés en partie par million et les constantes de couplages en Hz.

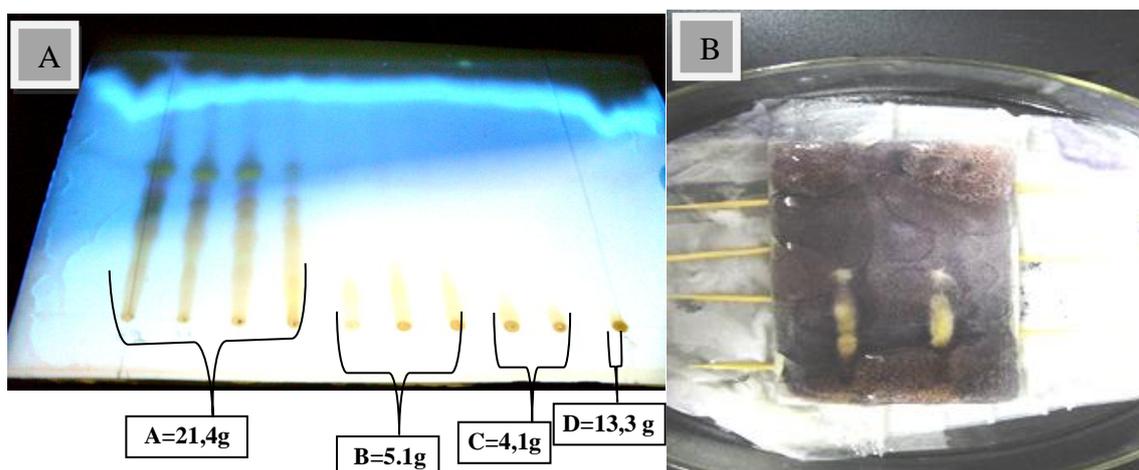


Figure 23: CCM et bioautographie. (A) regroupements des fractions selon leurs ressemblances; (B) Chromatogramme de bioautographie de la sous sous fraction B, contre *Xanthomonas vesicatoria* ATCC 11633

II.2.9. Analyse statistiques des données

Les données sur; les activités antifongiques des extraits des plantes, les dosages des métabolites primaires et secondaires, l'émergence, la germination, les masses, les pourcentages d'infection des champignons, les activités enzymatiques et les essais en champ (variables continues) ont été analysées par le logiciel IBM SPSS 23.0. Afin de pouvoir effectuer les tests paramétriques, les données ont été transformées, chaque fois que nécessaire pour le respect de l'hypothèse de la distribution normale. Le test d'égalité des variances des erreurs de Levene n'a été violé que dans quelques rares cas. Pour déterminer s'il existait une différence entre les scores moyens des modalités des variables indépendantes, l'analyse des variances (ANOVA) à un, deux et trois facteurs a été appliquée; les valeurs de $P < 0.05$ étaient considérées comme significativement différentes. La nature de différences entre les moyennes des scores de différents traitements ont été déterminées par le test de comparaison multiple de Student-Newman-Keuls (S-N-K) lorsque l'hypothèse d'égalité des variances était supposé, ou par la méthode de Games–Howell (Morgan et al., 2011), quand l'hypothèse d'égalité des variances était violée. Les données utilisées dans l'analyse statistique des résultats des fractions d'HE, ont été celles délimitées à la concentration à laquelle la (les) première(s) HE(s) a (ont) inhibée(s) 100% de la croissance mycélienne du champignon (800ppm vis-à-vis *B. oryzae* et 1600 ppm vis-à-vis *F. moniliforme*). Le coefficient de corrélation de Pearson et de Spearman rho, calculé dans l'intervalle de confiance de 99% a été utilisé pour établir les liens entre les variables. L'éta-carré (η^2) a été manuellement calculé utilisant les données des tableaux respectifs des tests des effets inter-sujets. L'analyse multivariée de la variance (MANOVA) à deux

facteurs, a été utilisée pour rechercher l'existence de différences entre les données des traitements issues des essais en champ

Les données issues des études de la biologie de l'infection ont été analysées par PC-SAS (version 9.2; SAS Institute, Cary, NC, USA). Ces données représentent des variables discrètes; comme elles ont été enregistrées si oui ou non un évènement a eu lieu (exemple; si oui ou non la spore a germée; si oui ou non le tube germinatif a formé l'appressorium; si oui ou non la pénétration engendre la réponse d'hypersensibilité). Par conséquent, ces données ont été analysées par régression logistique, en supposant une distribution binomiale et corrigée si présentant une sur-dispersion (**Collett, 1991**). Pour la comparaison des variables (en pourcentage), les odds ratios (**Collett, 1991**) ont été calculées en utilisant le control (traitement à l'eau distillée) comme référence (odds ratio = 1,00). Par exemple, le odds ratio pour le pourcentage de conidies germées chez les plantes traitées avec 2% d'extrait de *C. citratus* a été trouvé à 0,03 (**Tableau XVIII**). Ceci signifie que le odds ($P [1-P]^{-1}$, avec P la probabilité de germination d'une conidie) des plantes contrôles était 33 fois plus élevé que le odds (cote) des plantes traitées avec 2% d'extrait.

CHAPITRE III:
RESULTATS ET DISCUSSION

III. Résultats et Discussion

III.1. Caractéristiques des extraits de *C. citratus* & *d'O. barrelieri*

III.1.1. Caractéristiques des HE et des extraits aux solvants

III.1.1.1. Caractéristiques des fractions HE obtenues par hydrodistillation

Les plantes entières *d'Oxalis barrelieri* fraîches, tout comme les plantes sèches n'ont pas produits de l'huile essentielle. Les caractéristiques des huiles complètes et des fractions d'huiles essentielles obtenues des plants de *C. citratus* sont mentionnées dans le **Tableau I** ci- dessous.

Tableau I: Caractéristiques des fractions d'HE de *Cymbopogon citratus*

Plants de <i>C. citratus</i>	Date de distillation	Fractions d'HE	Couleur	Densité (g/mL)	Rdt (%)
Plantes fraîches	21 Août 2015	CF ₁	Claire	0,908	0,134
		CF ₂	Jaune	0,930	0,095
	22 Août 2015	CF _M	Jaunâtre	0,914	0,172
Plantes sèches	04 Octobre 2015	CS ₁	Jaune	0,899	0,315
		CS ₂	Marron foncé	0,926	0,162
	05 Octobre 2015	CS _M	Marron	0,902	0,438

Il ressort de ce tableau que, les couleurs des huiles essentielles des plantes sèches sont plus foncés (variant du jaune au marron) que celles des plantes fraîches (variant du clair au jaune); les rendements des plantes sèches sont 2 à 3 fois supérieurs à ceux des plantes fraîches; les fractions d'HE ont des densités voisines à 0,90; avec une petite plus-value pour les fractions CF₂ et CS₂. La grande partie des principes volatils est entraînée durant la première heure suivant le début de l'écoulement des HE (Rdt CF₁ = 0,134 > Rdt CF₂ = 0,095).

III.1.1.2. Caractéristiques des extraits aqueux et éthanoliques de *C. citratus* et *d'O. barrelieri*

Les caractéristiques des extraits à l'eau et à l'éthanol (70%), obtenus après lyophilisation sont mentionnées dans le **Tableau II**

Tableau II: Caractéristiques des extraits aux solvants de *C. citratus* et d'*O. barrelieri*

Plantes	Type d'extrait	Date d'extraction	Rdt (%)
<i>C. citratus</i>	Macérât (EAC)	08 Oct 2015	5,50
	Extrait à l'éthanol (EEC)	09 Oct 2015	4,78
<i>O. barrelieri</i>	Macérât(EAO)	08 Oct 2015	5,82
	Extrait à l'éthanol (EEO)	09 Oct 2015	3,54

A température ambiante, l'extrait à l'éthanol et le macérât de *C. citratus* se trouvent sous forme de fins cristaux bruns, alors que ceux de *O. barrelieri* sont verts. Les rendements des extraits à l'eau sont supérieurs à ceux des extraits à l'éthanol ($\text{Rdt } \text{EAO} = 5,82 > \text{Rdt } \text{EEO} = 3,54$), et plus de 10 fois grands que ceux des HE ($\text{Rdt } \text{EAC} = 5,50$, $12,5 \text{ fois} > \text{Rdt } \text{CS}_M = 0,438$).

III.1.2. Analyse des caractéristiques des extraits de plantes

III.1.2.1. Analyse des caractéristiques des fractions d'huiles essentielles

Fokam et al. (2015); ont relevé que *O. barrelieri* contient les huiles essentielles volatiles; mais, nos tentatives en vue d'obtenir les huiles essentielles par hydrodistillation, ont été vaines. Il faut tout de même remarquer la présence de précipités noirs flottant dans la colonne d'hydrodistillation, au cours de ces tentatives; et aussi que l'affirmation de ces auteurs n'avait pas été accompagné de l'hydrodistillation, mais par l'extraction aqueux d'*O. barrelieri*. Les rendements en huiles essentielles des plantes sèches (CS_M) sont en moyenne 2,5 fois supérieurs à ceux des plantes fraîches (CF_M); résultats conforme avec l'observation générale selon laquelle, la réduction de la quantité d'eau dans la plante entraîne l'augmentation de la masse sèche des ingrédients actifs. Les rendements des HES obtenus; 0,172 (CF_M) et 0,438 (CS_M) sont bien faibles comparés à ceux trouvés par d'autres auteurs qui ont utilisés les mêmes organes (**Matasyoh et al., 2011**). Toutefois, bien de raisons peuvent être avancées pour valablement justifier cette différence; notamment la localisation géographique, le stade de croissance, les influences environnementales (sol, climat) et le patrimoine génétique de la plante.

Lors du processus d'hydrodistillation, respectivement 58,51% et 66,03% de l'huile essentielle des plantes fraîches et des plantes sèches de *C. citratus* ont été collectées dans les fractions obtenues pendant la première heure suivant le début de l'écoulement des principes actifs (CF_1 et CS_1). Ces résultats diffèrent clairement de ceux de **Cannon et al. (2013)**; qui ont montré qu'au-delà de 20 min d'hydrodistillation des feuilles fraîches de *C.*

citratus, aucune augmentation significative du rendement de production n'est observé; et que par conséquent le temps utile pour l'hydrodistillation était à la limite compris entre 20 et 40 min. Cette divergence peut cependant trouver explication dans la nature du matériel végétal utilisé lors de hydrodistillation; en fait ils ont utilisé les feuilles et nous avons utilisé les plantes entières qui possèdent entre autre des pseudo tiges à la base desquelles se trouvent les rhizomes qui constituent des structures assez compacte (coriaces) pouvant ainsi retarder (résister à) la sortie des huiles. Les différences remarquables de coloration des différentes fractions d'huiles essentielles peuvent indiquer une différence qualitative de composition chimique ou à défaut une disparité quantitative d'un ou plusieurs métabolites dans l'une ou l'autre des fractions. Les rendements des huiles complètes CF_M et CS_M ne correspondent pas avec exactitude, aux sommes des rendements de leurs fractions respectives CF₁+CF₂ et CS₁+CS₂. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'hydrodistillation étant un système non clos, de probables pertes par évaporation ont pu survenir au cours du processus d'extraction (Cannon et al., 2013).

III.1.2.2. Analyse des caractéristiques des extraits aqueux et éthanoliques de *C. citratus* et d'*O. barrelieri*.

Mekam (2011) en travaillant avec les plantes entières d'*O. barrelieri*, dans les mêmes conditions expérimentales que les nôtres, a obtenu des rendements de 6,20% et 3,60% respectivement pour EAo et EEO; ces rendements étant assez proches de ceux obtenus dans ce travail. Dans les travaux de Dongmo (2017) toujours en utilisant les mêmes techniques, le rendement de 7,60% pour EAc et de 3,92% pour EEc ont été obtenus; ceux-ci étant clairement différents des nôtres; peut être parcequ'il a utilisé les feuilles alors que nous avons utilisé les plantes entières de *C. citratus*. Il faut cependant noter que, indépendamment de l'organe de la plante utilisée, les rendements des extraits aqueux sont supérieurs à ceux des extraits à l'éthanol et supérieurs à ceux des huiles essentielles

III.2. Activités antifongiques des extraits de plantes, du fongicide de synthèse et analyse des données

III.2.1. Activités antifongiques des extraits de plantes et du fongicide de synthèse

III.2.1.1. Activité antifongique des fractions d'huiles essentielles de *C. citratus*

L'ANOVA à deux facteurs a été utilisé pour évaluer, si l'huile essentielle, la concentration et l'interaction HE*Concentration avaient un effet sur l'inhibition de la croissance de *B. oryzae* et *F. moniliforme*; les résultats sont présentés dans le **Tableau III**.

Tableau III: Analyse de la variance pour le pourcentage d'inhibition comme fonction de l'huile essentielle et la concentration

Source	Σ carré type III		Ddl		Carré Moyen		F		p		η^2	
	<i>F.m</i>	<i>B.o</i>	<i>F.m</i>	<i>B.o</i>	<i>F.m</i>	<i>B.o</i>	<i>F.m</i>	<i>B.o</i>	<i>F.m</i>	<i>B.o</i>	<i>F.m</i>	<i>B.o</i>
HE	4759,7	9636,9	5	5	951,9	1927,3	164,18	200,09	<,001	<,001	,077	,207
Conc	53620,5	33196	5	3	10724,1	11065	1849,6	1148,7	<,001	<,001	,872	,713
HE * Conc	2689,07	3251,7	25	15	107,5	216,7	18,55	22,50	<,001	<,001	,044	,069
Erreur	417,45	462,3	72	48	5,7	9,6						

F.m: *F. moniliforme*; *B.o*: *B. oryzae*; *ddl*: degré de liberté; η^2 : Eta carré **HE**: Huile Essentielle; **Conc**: Concentration

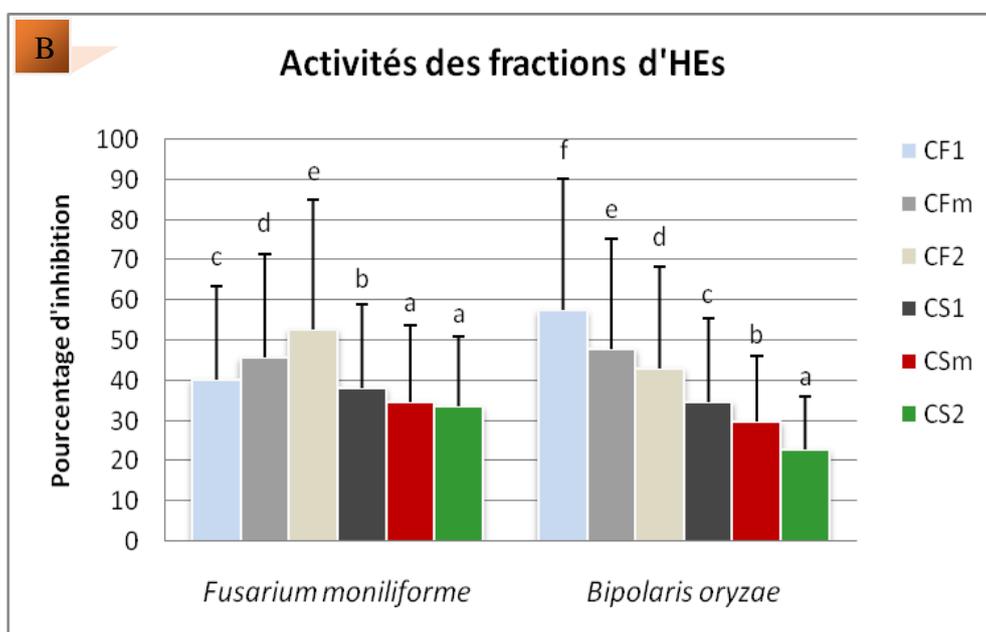
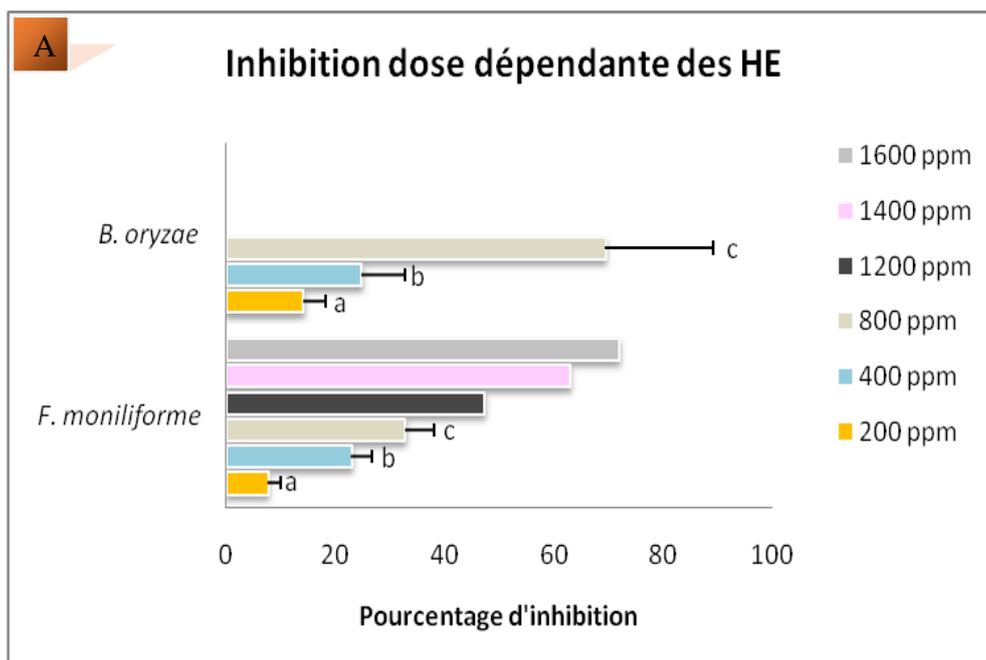
Une différence statistique significative a été obtenue entre les six fractions d'huiles essentielles (CF₁, CF_M, CF₂, CS₁, CS_M et CS₂) pour l'inhibition de *B. oryzae*, F (5, 48) = 200,09, $p < 0,001$, $\eta^2 = 0,207$ et l'inhibition de *F. moniliforme* F (5, 72) = 164,18, $p < 0,001$, $\eta^2 = 0,077$. Vis-à-vis *B. oryzae*, les activités de toutes les fractions d'huiles ont été significativement différentes les unes des autres (**Figure 24 droite**); les HE obtenus des plantes sèches (CS₁ CS₂ et CS_M) ont été moins actives que celles venant des plantes fraîches (CF₁ CF₂ et CF_M). Les fractions récoltées dans la première heure suivant le début de l'écoulement des principes actifs (CF₁ et CS₁) ont été plus actives que les fractions récoltées après une heure (CF₂ et CS₂). A l'exception de CS₂ et CS_M, qui étaient statistiquement identiques, les activités des HE ont été significativement différentes les unes des autres vis-à-vis *F. moniliforme*, (**Figure 24 droite**); Comme avec *B. oryzae*, les HE issues des plantes fraîches (CF₁ CF₂ et CF_M) ont été plus actives que celles des plantes sèches (CS₁ CS₂ et CS_M). Au regard des deux champignons, les activités des huiles complètes, CF_M et CS_M ont été intermédiaires à celles de leurs fractions correspondantes, CF₁-CF₂ d'une part et CS₁-CS₂ d'autre part (**Figure 24 droite**); la plus faible activité inhibitrice a été obtenu avec la fraction SF₂, 22,8% vis-à-vis *B. oryzae* et 335% vis-à-vis *F. moniliforme*. On doit remarquer que parmi les fractions d'HE issues des plantes fraîches, CF₁ (57,58%) dont l'activité était plus importante vis-à-vis de *B. oryzae*, s'est retrouvé avec la plus petite activité (40,36%) contre *F. moniliforme*, comparer à CF_M et CF₂; inversement la fraction CF₂ (43%) moins active contre *B. oryzae*, s'est retrouvé plus active (52,7%) contre *F. moniliforme* comparer à CF_M et CF₁.

Les tracés de l'évolution de l'inhibition de *B. oryzae* et *F. moniliforme* en fonction des concentrations testées pour chacune des HES, sont présentés sur la **figure 25** à partir

de laquelle on peut voir que, indépendamment du pathogène, les activités de toutes les HEs, à une exception près, sont bien distinctes et sont toutes doses dépendantes. Les concentrations minimales inhibitrices sont de 800 ppm, 1000 ppm, 1200 ppm, 1200 ppm, 1400 ppm et 1600 ppm respectivement pour CF₁, CF_M, CF₂, CS₁, CS_M et CS₂ à l'égard de *B. oryzae*; et de 1600 ppm, 1800 ppm, 2000 ppm, 2000 ppm, 2200 ppm et 2400 ppm respectivement pour CF₂, CF_M, CF₁, CS₁, CS_M et CS₂ relativement à *F. moniliforme*. Ainsi, on peut noter une plus grande sensibilité *B. oryzae* à toutes les fractions d'huiles essentielles, par rapport à *F. moniliforme*.

L'effet principal de la concentration été significatif, $F(3, 48) = 1148,77, p < 0,001, \eta^2 = 0,713$ à l'égard de l'inhibition de *B. oryzae* et $F(5, 72) = 1849,61, p < 0,001, \eta^2 = 0,872$ pour l'inhibition de *F. moniliforme*. De manière générale, l'inhibition de la croissance mycélienne de *B. oryzae* et de *F. moniliforme*, par les fractions d'huiles essentielles, a été dose dépendante et d'autant plus grande que la concentration augmente (**Figure 24 gauche, Figure 26**); toutes les concentrations testées sur chaque agent pathogène sont significativement différentes les unes des autres; par exemple, %I 200 ppm ($M = 14,13$) > %I 400 ppm ($M = 24,74$) > %I 800 ppm ($M = 69,37$) vis-à-vis de *B. oryzae*. L'essentiel de la variance entre les groupes a été expliqué par la concentration; 87, 2% vis-à-vis de *F. moniliforme* et 71,3% vis-à-vis de *B. oryzae*. Toute les HE/Fractions ont présenté une activité fongitocide à leurs CMI à l'égard des deux agents pathogènes.

Nos résultats ont aussi révélé un effet principal significatif de l'interaction HE * concentration; $F(15, 48) = 22,50, p < 0,001, \eta^2 = 0,069$ pour l'inhibition de *B. oryzae* et $F(25, 72) = 18,55, p < 0,001, \eta^2 = 0,044$ pour l'inhibition de *F. moniliforme*. Ceci montre que l'inhibition à l'égard de *B. oryzae* et de *F. moniliforme*, dépend de l'effet combiné de l'huile essentielle et la concentration. Il faut noter que, même comme l'effet de cette interaction pour l'inhibition de *F. moniliforme* est statistiquement significatif, la taille de l'effet (Cohen's $f = 0.21$) associée à cette variable indépendante est un «effet» de petite taille selon **Cohen (1988)**.



Les valeurs pour un même agent pathogène et portant des lettres différentes sont significativement différentes au seuil 95% ($p < 0,05$) selon S-N-K

Figure 24: Comparaison des pourcentages d'inhibitions; des huiles essentielles (A) et à différentes des concentrations (B) vis-à-vis *B. oryzae* et *F. moniliforme*

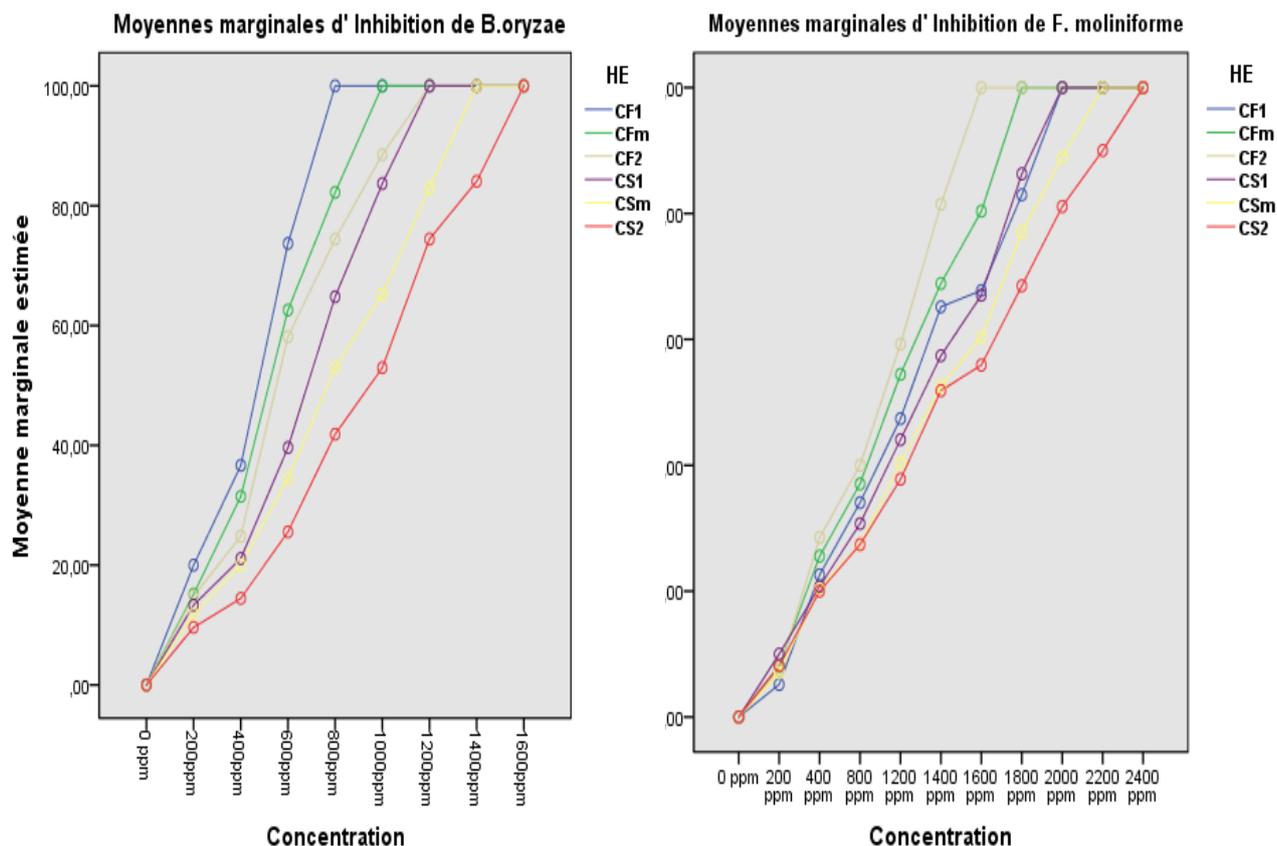


Figure 25: Variation du pourcentage d'inhibition de *B. oryzae* (gauche) et de *F. moniliforme* (droite) par les fractions d'huiles essentielles en fonction de la concentration

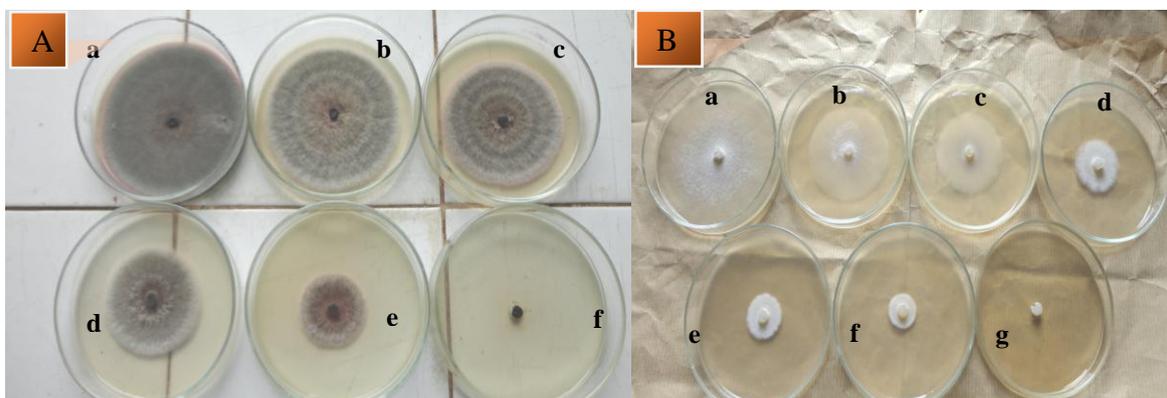


Figure 26: Inhibition dose dépendante des fractions d'huiles essentielles de *C. citratus*. CFm en présence de *B. oryzae*(A); contrôle (a), 200 ppm (b), 400ppm (c), 600 ppm (d), 800 ppm (e), 1000 ppm (f). CF₂ en présence de *F. moniliforme* (B); contrôle (a), 200 ppm (b), 400ppm (c), 800 ppm (d), 1200 ppm (e), 1400 ppm(f) et 1600 ppm (g)

III.2.1.2. Activité antifongique du fongicide Banko plus

Les activités antifongiques du fongicide de synthèse Banko Plus ont été évaluées eu égard de *B. oryzae* et *F. moniliforme*, et les résultats sont présentés dans le **Tableau IV**

Tableau IV: Pourcentages d'inhibition de la croissance radiale de *B. oryzae* et *F. moniliforme* en présence du fongicide de synthèse 'Banko Plus'

% d'inhibition de la croissance radiale								
Pathogènes	Concentrations du fongicide de synthèse 'Banko Plus' (ppm)							
	12,5ppm	25ppm	1000ppm	2000ppm	3000ppm	4000ppm	5000ppm	6000ppm
<i>F. moniliforme</i>	59,9 ± 5	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
<i>B. oryzae</i>	ND	ND	70,3± 1,6	76,2±0,6	76,2±2,5	78,8± 1,1	80,7± 1,2	80,5± 1,7

ND: non déterminé; les données sont les moyennes de trois expériences et chaque expérience est une moyenne de deux répétitions.

A partir de ce tableau, on peut noter que 'Banko Plus' a une activité forte vis-à-vis de *F. moniliforme*, avec une CMI de 25 ppm ; à cette même concentration, Banko Plus a été fongicide. A 1000 ppm l'inhibition de *B. oryzae* était de plus de 70%; jusqu'à 5000 ppm cette inhibition n'avait évolué que de 10% (80,7%), et tendait à être statique à 6000 ppm. Aussi, à 5000 ppm, des modifications structurales considérables de la structure du mycélium de *B. oryzae* ont été notées (**Figure 27A**); ces modifications ont entraîné à 6000 ppm, la formation des structures très coriaces (**Figure 27B**). L'activité de Banko plus a été nettement supérieure à celles des fractions d'HE à l'égard de *F. moniliforme*, et inférieure vis-à-vis de *B. oryzae*.

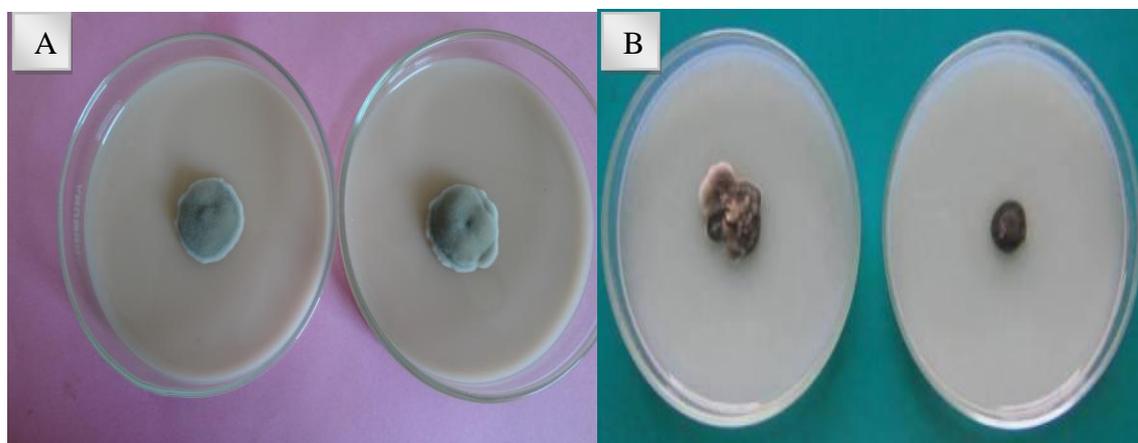


Figure 27: Modifications structurales de la croissance de *B. oryzae* en présence de 'Banko Plus' à 5000 ppm (A) et 6000 ppm (B)

III.2.1.3. Activité antifongique des extraits aux solvants

L'ANOVA à deux facteurs a été utilisé pour déterminer, si l'extrait et la concentration avaient chacun un effet sur l'inhibition de la croissance des champignons; et si l'effet de l'extrait sur l'inhibition des pathogènes dépend de la concentration; les résultats sont présentés dans le **Tableau V**.

Tableau V: Analyse de la variance pour le pourcentage d'inhibition comme fonction de la concentration et de l'extrait

Source	SC de type III		ddl		CM		F		Sig		η^2	
	<i>F.m</i>	<i>B.o</i>	<i>F.m</i>	<i>B.o</i>	<i>F. m</i>	<i>B.o</i>	<i>F.m</i>	<i>B.o</i>	<i>F.m</i>	<i>B.o</i>	<i>F.m</i>	<i>B.o</i>
Extrait	1575,86	1971,48	3	3	525,28	657,16	64,89	143,03	<,001	<,001	0,149	0,165
Conc	8465,80	9783,30	2	2	4232,90	4891,65	522,92	1064,67	<,001	<,001	0,80	0,82
Ext * Conc	322,30	59,23	6	6	53,717	9,87	6,636	2,148	<,001	,0085	0,018	0,005
*Erreur	194,273	110,268	24	24	8,09	4,594						

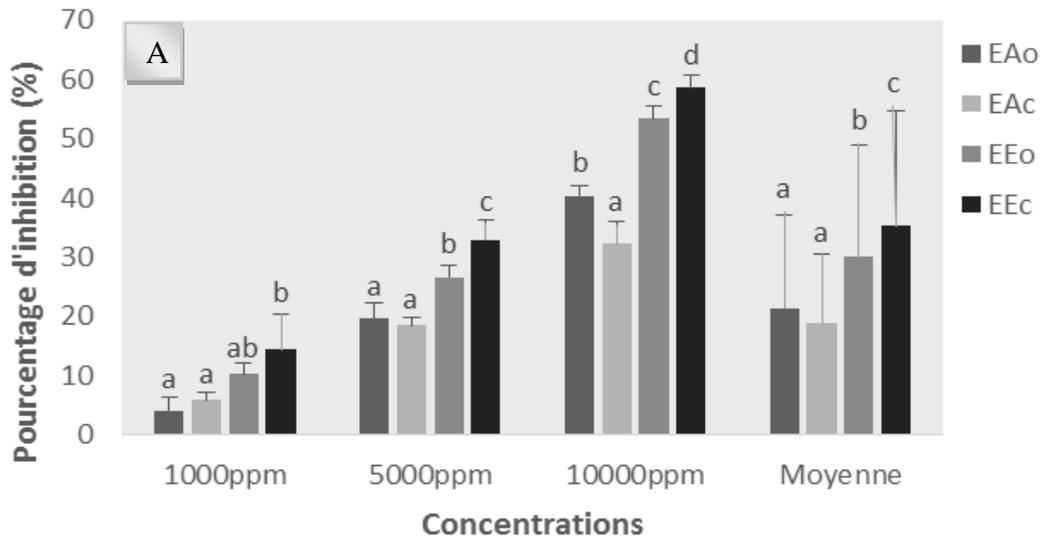
F.m: *F. moniliforme*; **B.o:** *B. oryzae*; **SC:** somme des carrés; **CM:** Carré Moyen ; **Conc** Concentration; **Ext:** Extrait; η^2 : Eta carré

On peut noter, un effet principal significatif majeur pour l'extrait; $F(3, 24) = 64,89$, $p < 0,001$ et $F(3,24) = 143,03$, $p < 0,001$; respectivement pour l'inhibition de *F. moniliforme* et *B. oryzae*; il existe donc des différences d'activité entre EAc, EEc, EAo, et EEO. Les EE ont été en général plus actifs que les EAs; à 10000 ppm, l'EEc a présenté le plus grand potentiel inhibiteur; 58,51% vis-à-vis *F. moniliforme* (**Figure 28A**) et 55,9% vis-à-vis de *B. oryzae* (**Figure 28B**).

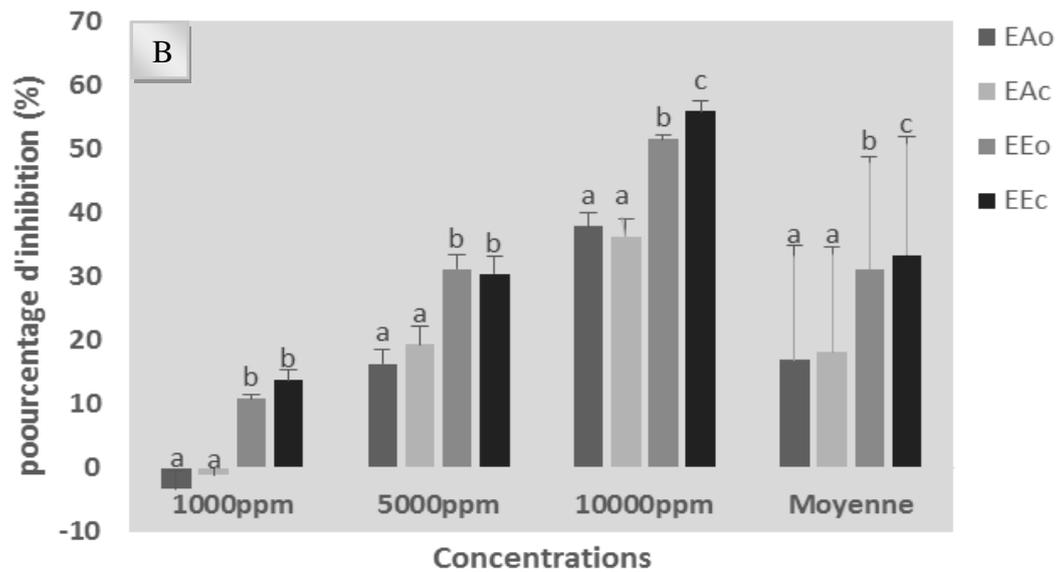
L'effet principal de la concentration a été significatif $F(2, 24) = 522,92$, $p < 0,001$ pour l'inhibition de *F. moniliforme* et $F(2,24) = 1064,67$, $p < 0,001$ pour l'inhibition de *B. oryzae*; l'inhibition de la croissance des deux agents pathogènes est en général dose dépendante; EAo1000 ppm (4.07%) < EAo5000 ppm (19.62%) < EAo10000ppm (40.36%) vis-à-vis de *F. moniliforme* (**Figure 29 A, B, C**). On note cependant, qu'à la concentration 1000 ppm EAo (-3,33%) et EAc (-1,1%) ont plutôt stimulé la croissance de *B. oryzae*.

L'interaction extrait * concentration est significatif $F(6, 24) = 6,636$, $p < 0,001$ et $F(6,24) = 2,148$, $p = 0,085$ pour l'inhibition respective de *F. moniliforme* et *B. oryzae*; ceci montre que l'effet de l'extrait sur l'inhibition est fonction de la concentration, et est d'autant plus importante que la concentration de l'extrait augmente. Cependant il faut noter que, même comme l'effet de l'interaction extrait * concentration pour l'inhibition de *B. oryzae* est statistiquement significatif, la taille de l'effet (Cohen's $f = 0,07$) associée à cette variable dépendante ne satisfait pas le minimum (Cohen's $f \geq 0,10$) des balises de **Cohen (1988)**, pour être qualifié de «effet» de petite taille.

Activités des extraits plantes vis à vis *F. moliniforme*



Activités des extraits de plantes vis à vis *B. oryzae*



A une concentration donnée, les extraits portant les lettres différentes, sont significativement différents ($p < 0,05$) selon S-N-K. Les données sont les moyennes de trois expériences et chaque expérience est une moyenne de deux répétitions. EAo: Extrait aqueux d'*O. barrelieri*; EEO: Extrait à l'éthanol d'*O. barrelieri*; EAc: Extrait aqueux de *C. citratus*; EEC: Extrait à l'éthanol de *C. citratus*.

Figure 28: Inhibition de la croissance de *F. moniliforme* (A) de *B. oryzae* (B) à différentes concentrations des extraits de *C. citratus* et d'*O. barrelieri*

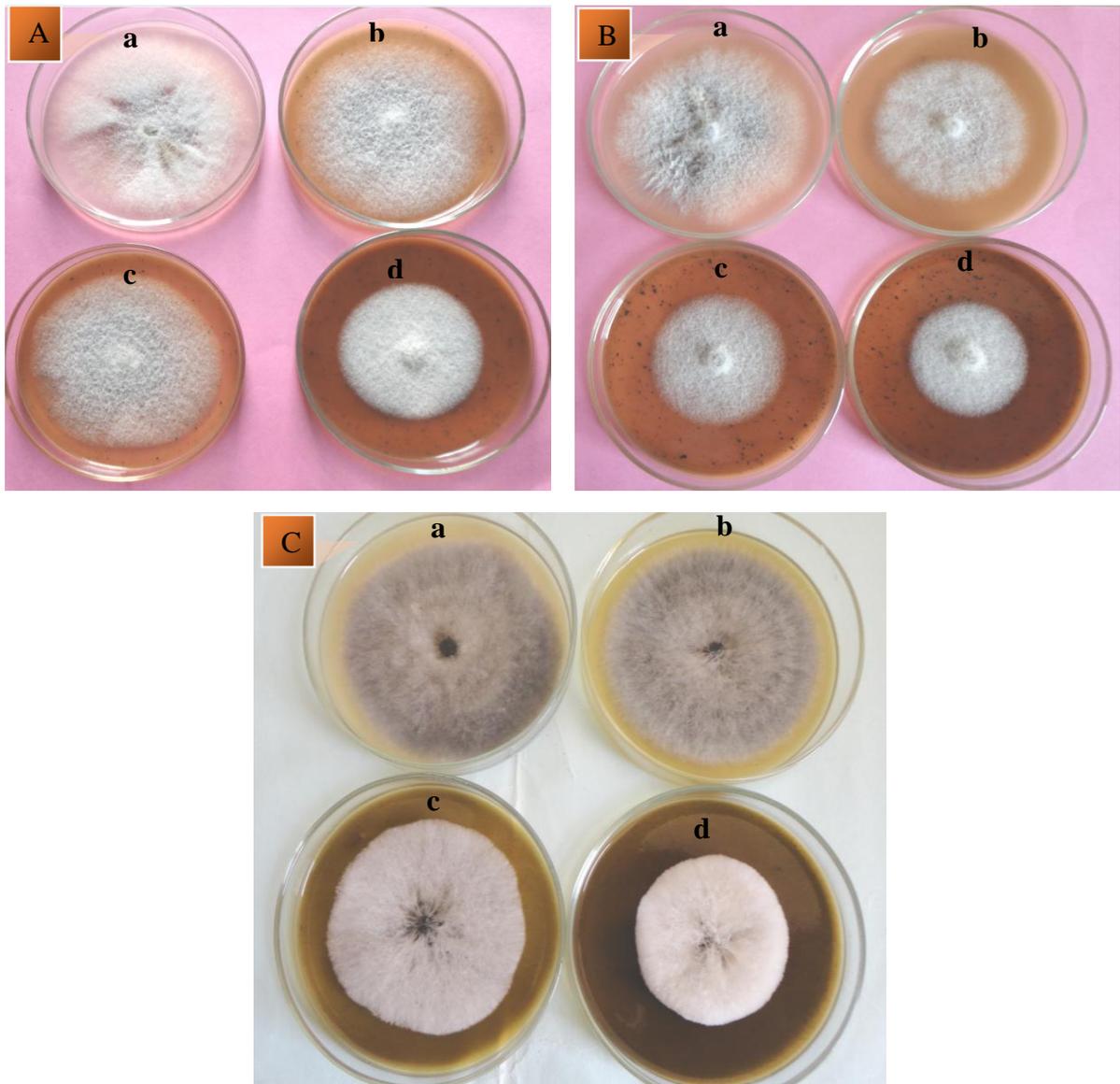


Figure 29: Inhibition dose dépendante des extraits aux solvants. EAO en présence de *F. moniliforme* (A); EEO en présence de *F. moniliforme* (B); EAC en présence de *B. oryzae*(C) ; contrôle(a) ; 1000 ppm(b), 5000 ppm(c) et 10000 ppm (d)

III.2.2. Analyse des données des activités antifongiques des extraits de plantes et du fongicide de synthèse

III.2.2.1 Analyse des activités antifongiques des fractions d'huiles essentielles de *C. citratus*

Les activités antifongiques des fractions d'HEs et des huiles complètes des plantes fraîches (CF₁, CF₂ et CF_M) et des plantes sèches (CS₁, CS₂ et CS_M) vis-à-vis *B. oryzae* et *F. moniliforme* sont certainement due aux métabolites secondaires actifs qu'elles contiennent; en fait, certains auteurs ont montré que les compositions chimiques des HEs des plantes fraîches (Barbosa et al., 2008; Matasyoh et al., 2011) et des plantes sèches (Barbosa et

al., 2008; **Jardinetti et al.**, 2016) de *C. citratus* incluait entre autres le citral (néral et géraniol), le géraniol, citronellol, citronellal; or ces composés sont bien connus pour leurs activités biologiques, en l'occurrence les propriétés antifongiques (**Saikia et al.**, 2001; **Ganjewala**, 2009); plus spécifiquement on peut prendre l'exemple de **Yaouba et al.** (2010) qui ont montré que le citral, géraniol, et citronellol inhibe chacun, totalement la croissance de *F. moniliforme* à la dose de 0,5mg/mL.

Malgré l'usage des techniques et des conditions d'expérimentation assez proches, les valeurs des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de CS_M (1400 ppm) et CF_M (1000 ppm) vis-à-vis *B. oryzae*, sont respectivement bien éloignées de celles trouvées (452µg/mL) par **Nguefack et al.** (2013) en dépit du fait que les plantes aient été récoltées dans la même localisation géographique, et de celles obtenues (0,1%v/v < 1000 ppm) par **Muthukumar et al.** (2016). Aussi, les CMI de CS_M (2200 ppm) et de CF_M (1600 ppm) contre *F. moniliforme* sont respectivement 1,4 fois plus petite que celle trouvée (3mg/mL/3000ppm), par **Mansour et al.** (2015) et environ 1,7 fois plus grande que celle obtenue (0,1%v/v) par **Muthukumar et al.** (2016). Ces divergences pourraient se justifier par les différences de souches fongiques utilisées dans ces études et donc aucune caractérisation moléculaire n'a été faite mention. En effet, il existe une grande variabilité de souche, avec différents degrés d'agressivités, au sein de *B. oryzae* (**Kamal et Mia**, 2009) et au sein de *F. moniliforme* (**Amatulli et al.**, 2010); or la grande variabilité au sein d'un pathogène conduit à briser la susceptibilité contre certains fongicides/huiles essentielles entraînant le développement quantitatif ou qualitatif de la résistance envers ledit fongicide/huile essentielle (**Kandan, et al.**, 2015). Outre les facteurs sus évoqués pour l'explication des différences d'activités des huiles essentielles complètes de nos travaux et ceux d'autres auteurs, les paramètres intrinsèques à la plante de *C. citratus*, en l'occurrence; la localisation géographique (**Priya et al.**, 2015) l'âge/stage de maturité de la plante (**Tajidin et al.**, 2012), les différences génétiques et la saison de récolte (**Dutta et al.**, 2016) sont susceptibles d'influencer la composition chimique de *C. citratus*, et par conséquent faire varier l'activité antifongique et expliquer ainsi «en partie» les divergences. Les activités des fractions (CS₁, CS₂, CF₁, CF₂) d'huiles essentielles de *C. citratus* en fonction du temps n'avaient pas été évaluées auparavant pour leurs activités antifongiques, afin de faire des comparaisons similaires.

Les différences d'activités aussi marquantes entre les HE des plantes fraîches (CF_M) et celles des plantes sèches (SF_M) à l'égard de chacun des deux champignons phytopathogènes utilisés dans ce travail (*B. oryzae* et *F. moniliforme*), ne s'expliqueraient

manifestement que par les différences dans leurs compositions chimiques; toutefois, si l'on ne tient pas compte de l'agent pathogène, cette explication ne tiendrait que partiellement selon **Jardinetti et al. (2016)**; ces derniers auteurs ont montré dans leurs travaux que malgré les différences de composition chimique entre les HE des feuilles fraîches et les feuilles sèches de *C. citratus*, leurs activités antifongiques vis-à-vis de l'inhibition de la croissance radiale et la sporulation de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc, n'étaient pas significativement différentes. Il faut remarquer en outre, la rareté de la littérature relative à la comparaison de l'activité biologique (antifongique) corrélée à l'analyse chimique des HE des plantes fraîches et sèches en général et de *C. citratus* en particulier.

La forte activité antifongique de la fraction CS₁ comparativement à CS_M et CS₂, de CF₁ comparativement à CF_M et CF₂ à l'égard de *B. oryzae* (**Figure 24B**), laisse penser à une sortie séquentielle des métabolites secondaires des huiles essentielles au cours de l'hydrodistillation; ainsi, les métabolites actifs inhibiteurs de *B. oryzae* seraient plus concentrés dans les fractions d'HE de *C. citratus* recueillis dans la première heure suivant le début de l'écoulement des principes actifs (CS₁, et CF₁). Dans une étude similaire mais en utilisant les feuilles fraîches et sèches de *Callistemon citrinus*, **Dongmo (2017)** a montré que c'était plutôt les fractions CS₂ comparativement à CS₁ et CS_M, et CF₂ comparativement à CF₁ et CF_M, qui étaient les plus actives à l'égard de *B. oryzae*. Il est donc clair qu'à différentes espèces botaniques, différents principes actifs dont l'hydrodistillation en fonction du temps peut entraîner la concentration d'un type particulier de métabolite dans l'une ou l'autre des fractions.

En dépit du fait que leur mécanisme d'action demeure jusqu'ici très peu étudié (**Saad et al., 2013**), si l'on s'en tient au fait que les huiles essentielles exerceraient leurs activités biologiques en affectant diverses structures et propriétés physicochimiques des membranes cellulaires (**Turina et al., 2006**), tout laissera penser que les structures membranaires et/ou les mécanismes d'action y impliqués sont différentes pour *B. oryzae* et *F. moniliforme*; cela peut expliquer pourquoi CF₂ qui était la plus active vis-à-vis *F. moniliforme* s'est retrouvé la moins active chez *B. oryzae* (**Figure 24B**), comparativement aux autres fractions des HE des plantes fraîches (CF₁ et CF_M). La réciproque n'a pas été vraie pour CS₂ comparativement à CS₁ et CS_M peut-être parce que: premièrement la composition chimique de celle-ci serait différente de celle de CF₂; deuxièmement parce qu'il est bien connu que l'interaction entre des proportions bien définies de métabolites dans un mélange peut augmenter ou bien diminuer l'activité biologique selon que la

proportion de l'un ou l'autre des constituants est plus importante. Il apparaît alors évident que les constituants de l'HE interagiraient entre eux (synergie) pour définir l'activité antifongique; ce qui est d'autant plus vrai que les activités des huiles complètes CF_M et CS_M ont été respectivement intermédiaires à CF₁-CF₂ et CS₁-CS₂ vis-à-vis de l'inhibition des deux agents pathogènes (**Figure 24B et figure 25**).

Très peu de travaux de recherche ont été développés sous l'angle avec lequel nous avons orienté notre protocole d'hydrodistillation; une pareille approche peut rapidement servir d'orientation aux chercheurs/formulateurs (industriels) à mieux baliser le terrain dans la recherche des nouveaux principes actifs à l'égard d'un agent pathogène précis, d'identifier d'éventuelles interactions qui pourraient exister entre deux ou plusieurs composés pour l'inhibition d'un agent pathogène, ou bien encore cibler l'une ou l'autre des fractions suivant l'objectif visé; ce qui permettra de gagner en temps.

III.2.2.2. Analyse des activités antifongiques du fongicide de synthèse

Certains auteurs, notamment **Harish et al. (2017)** ont montré que le carbendazime (Bavistin 50 WP) qui est par ailleurs l'une des matières actives constitutive de Banko plus, inhibe la croissance radiale de *B. oryzae in vitro*. Les changements structuraux observés et l'absence de variation dans l'inhibition de la croissance de *B. oryzae* entre 5000 ppm et 6000 ppm peuvent être des éléments notables pour caractériser d'éventuelles résistances de *B. oryzae* vis-à-vis du carbendazime et/ou du chlorothalonil. Les fongicides à base de Carbendazime comme Banko Plus ont eu à montrer leurs fortes activités inhibitrices *in vitro* à l'égard de *F. moniliforme*. A cet effet, **Kumar et al. (2016)** ont trouvé que le Carbendazime 50 WP, avait une concentration inhibitrice 90% (IC₉₀) de 1,14 ppm; cette activité est bien forte comparée à la CMI de 25 ppm que nous avons trouvé dans ce travail; la large différence s'expliquerait par le fait que Banko plus qui est constitué de deux principes actifs (chlorothalonil + Carbendazime) est moins concentré en Carbendazime, que Carbendazime 50 WP, qui serait le principe actif majeur à l'égard de l'inhibition de *F. moniliforme*. L'activité de Banko Plus a été plus forte que toutes les activités des fractions d'HE à l'égard de *F. moniliforme*; inversement, toutes les fractions d'HE ont été plus actives que Banko relativement à l'inhibition de *B. oryzae*. Ainsi, l'activité biologique n'est pas seulement fonction des métabolites actifs impliqués, mais également de la nature de l'agent pathogène.

III.2.2.3. Analyse des activités antifongiques des extraits aux solvants

Comparées aux travaux de **Nguefack et al. (2013)** dans lesquelles les mêmes méthodes avaient été utilisées pour l'évaluation du potentiel antifongique, les activités de

EEc et EAc contre *B. oryzae* ont été proches, mais un peu moins importantes; cette légère différence pourrait s'expliquer par le fait que, notre extraction s'est étalée sur 12h contre 24h chez eux; le temps d'extraction influençant ainsi la teneur et/ou la composition chimique des métabolites secondaires responsables de l'effet antifongique. Très peu de travaux ont été effectués sur le potentiel phytoprotecteur d'*O. barrelieri*; ses activités *vis-à-vis* *B. oryzae* et *F. moniliforme* sont ici rapportées pour la première fois; néanmoins, **Dakole et al. (2016)** ont montré qu'EAO et EEO inhibent totalement la croissance de *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* à 50000 µg/ml et 25000 µg/ml et celle de *Phytophthora infestans* à 25000 µg/ml et 12500 µg/ml respectivement; et que les phénols, les flavonoïdes et les saponines présents dans ces extraits expliqueraient leurs potentiels inhibiteurs. La forte activité antifongique des extraits éthanoliques, serait due au fait que celles-ci sont très souvent majoritairement riche en phénols (**Brigita et al., 2005; Mulinacci et al., 2004**) comparé aux extraits aqueux qui contiennent entre autres, une quantité parfois considérable de métabolites primaires, comme les polypeptides et les glucides (**Cowan, 1999**) qui, peuvent constituer des sources de nutriments pour le développement du champignon. L'activité stimulatrice observée peut nonobstant être exploitée dans la culture des champignons endophytes pour une meilleure production des métabolites secondaires.

III.3. Effets du tri des semences de riz en solution NaCl et/ou couplés aux traitements par les extraits aux solvants sur la germination, la vigueur, l'incidence de *B. oryzae* et *F. moniliforme*

III.3.1. Effets du tri des semences de riz en solution NaCl couplés aux traitements par les extraits aux solvants.

III.3.1.1. Effets du traitement des semences de riz par les solutions de NaCl

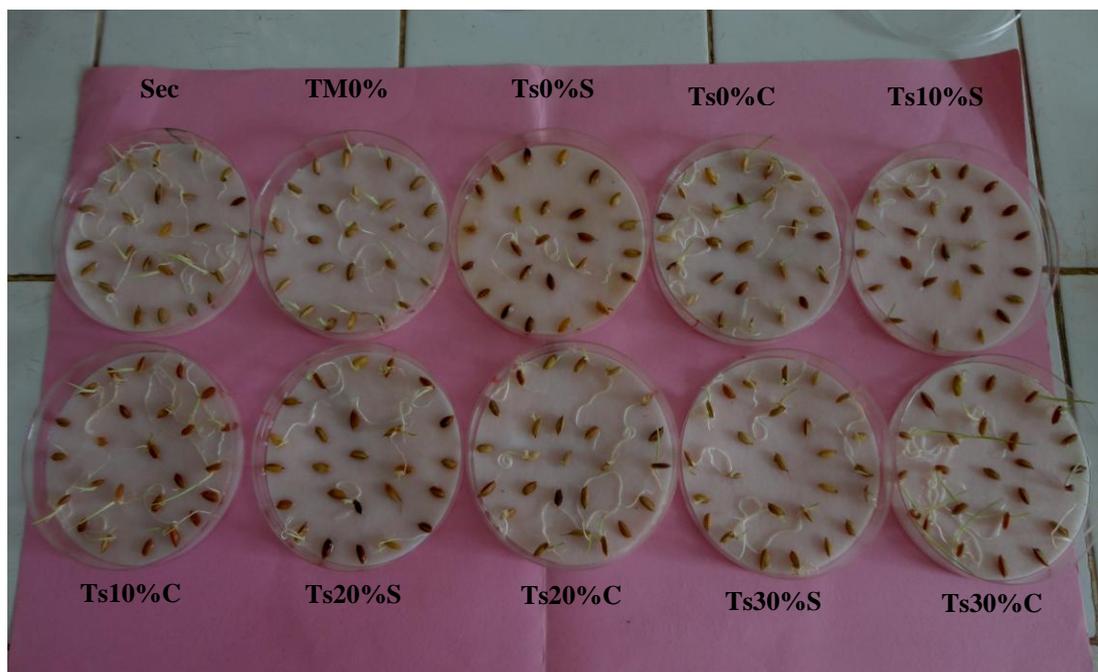
Nous avons utilisé l'ANOVA à un facteur pour comparer d'une part les moyennes des masses et d'autre part, les moyennes des pourcentages de germination des différents lots de semences traités par les solutions NaCl. Une différence significative a été trouvée entre les lots de semence: $F(9,30) = 143,332, p < 0,05$ et $F(9, 30) = 74,114, p < 0,05$ pour le pourcentage de germination; $F(9, 30) = 33,64, p < 0,05$ et $F(9, 30) = 30,785, p < 0,05$ pour les masses, respectivement pour le riz rouge de Tonga et le riz Tox 3145-38-2-3 de Ndop. Les niveaux des différences ont été décelés par les tests de comparaison multiples de S-N-K ou de Games-Howell et les résultats sont consignés dans le **Tableau VI**. Il y en ressort que, quel que soit la variété de riz, les masses et les pourcentages de germination des fractions de semences surnageant (T⁺10%S: 2,33g et 31%) sont significativement

faibles comparé à leurs correspondants culot (T⁺10%C: 3,05g et 67%); à l'exemple de la **Figure 30** qui illustre la germination. Tous les lots de semences immergés (culots) ont significativement plus germé que les lots non traités par les solutions salées (Sec et TM0%). Le riz rouge présente une amélioration significative de la germination, de l'ordre de 7% quand les semences sont triées à l'eau (T0%C-Sec), et de l'ordre de 19,5% lorsqu'elles sont triées en solution NaCl 20% (T20%C-Sec). La variation de l'augmentation du taux de germination du Tox 3145-38-2-3 traité au NaCl 20% est moindre (7% et 6%) comparé à celle du riz rouge.

Tableau VI: Masse et pourcentage des germinations des lots de semences traitées au NaCl

	Riz rouge de Tonga		Tox 3145-38-2-3 de Ndop	
	Germination (%)	Masse (g)	Germination (%)	Masse (g)
Sec	52 ^d ±3,2	2,84 ^d ±0,03	91 ^d ±1,15	2,84 ^d ±0,02
TM 0%	53,5 ^d ±3	3 ^{de} ±0,05	92 ^d ±1,63	2,87 ^d ±0,02
Ts0%C	59 ^e ±4,1	3,03 ^{de} ±0,08	96 ^{de} ±1,63	2,92 ^{de} ±0,04
Ts0%S	10 ^a ±2,3	1,70 ^a ±0,09	18 ^a ±2,82	1,32 ^a ±0,01
Ts10%C	67 ^f ±4,7	3,05 ^{de} ±0,05	98,5 ^{de} ±3	2,92 ^{de} ±0,02
Ts10%S	31 ^b ±2,5	2,33 ^b ±0,04	52 ^b ±4,32	2,18 ^b ±0,02
Ts20%C	71,5 ^f ±3	3,07 ^{de} ±0,1	98 ^{de} ±2,3	2,96 ^{de} ±0,01
Ts20%S	36 ^c ±3,6	2,71 ^c ±0,04	71,5 ^c ±2,51	2,3 ^b ±0,04
Ts30%C	72 ^f ±3,2	3,16 ^e ±0,03	99,5 ^e ±1	2,97 ^e ±0,06
Ts30%S	52,5 ^d ±1,9	2,93 ^d ±0,05	81,5 ^c ±3,41	2,54 ^c ±0,04

Les moyennes suivies d'une même lettre sur une même colonne ne sont pas significativement différentes ($p < 0,05$) selon S-N-K. Les données sont les moyennes de quatre répétitions. Ts: Semence traitée en solution NaCl; 0%, 10%, 20%, 30%: Concentrations de NaCl; C: Culot; S: Surnageant; TM0% : Semence trempée dans l'eau distillée; Sec: Semence non traitée



Ts: Semence traitée en solution NaCl; 0%, 10%, 20%, 30%: Concentrations de NaCl; C: Culot; S: Surnageant; TM0% : Semence trempée dans l'eau distillée; Sec: Semence non traitée

Figure 30: Germination des semences de riz rouge issues des traitements à différentes concentrations de NaCl

Indépendamment de la variété de riz et du type de traitement au sel appliqué, le coefficient de corrélation de Spearman rho, entre la masse et la germination a été calculé; une corrélation positive et modérée (**Hopkins, 1997**) a été trouvée ($Rho(78) = 0,427^{**}$, $p < 0,01$) indiquant ainsi une relation linéaire significative entre les deux variables: les lots de semences de masses élevées tendent à avoir un plus grand pourcentage de germination. La corrélation entre la masse et la germination était encore plus forte et significative lorsque les traitements ont été examinés scindés en culot ($Rho(78) = 0,606^{**}$, $p < 0,01$) et surnageant ($Rho(78) = 0,543^{**}$, $p < 0,01$) ou en encore par variété; riz rouge de Tonga ($Rho(78) = 0,895^{**}$, $p < 0,01$) et Tox 3145-38-2-3 de Ndop ($Rho(78) = 0,903^{**}$, $p < 0,01$).

III.3.1.2. Effets du tri des semences couplés aux traitements d'extraits de plantes sur la vigueur et la germination *in vitro*.

L'ANOVA à trois facteurs a été utilisée pour évaluer, si le type d'extrait, le stress, le type de traitement avaient un effet sur la germination des semences de riz et si les différentes interactions entre ces variables indépendantes affectaient la germination; les résultats sont présentés dans le **Tableau VII**.

Tableau VII: Analyse de la variance pour le pourcentage de germination des semences, comme fonction de l'extrait, du stress et du traitement

Tests des effets inter-sujets						
Pourcentage de germination						
Source/variables dépendantes	SC type III	ddl	CM	F	Sig	η^2
Modèle	394860,000 ^a	28	14102,143	946,150	<,001	
Extrait	28,000	1	28,000	1,879	,174	0,0007
Stress	2126,286	1	2126,286	142,658	<,001	0,0551
Traitement	33531,500	6	5588,583	374,953	<,001	0,8691
Extrait * Stress	82,286	1	82,286	5,521	,021	0,0021
Extrait * Traitement	159,500	6	26,583	1,784	,112	0,0041
Stress * Traitement	1380,214	6	230,036	15,434	<,001	0,0357
Extrait * Stress * Traitement	20,214	6	3,369	0,226	,967	0,0005
Erreur	1252,000	84	14,905			
Total corrigé	38580,00	112				

a R-deux = ,997 (R-deux ajusté = ,996)

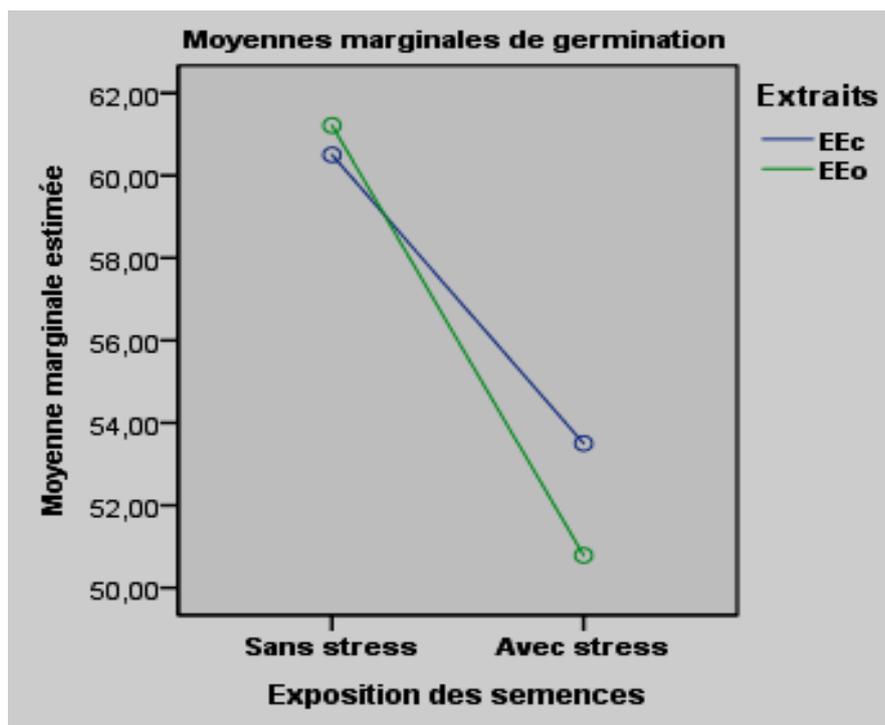
SC: somme des carrés; CM: Carré Moyen; η^2 : Eta carré

L'effet principal de l'extrait de plante utilisé n'est pas significatif $F(1, 84) = 1,87$, $p > 0,05$; le pourcentage moyen marginal de germination des semences traitées avec EEc ($57\% \pm 18,91$) n'est pas significativement différent du pourcentage moyen marginal de germination des semences traitées avec EEo ($56\% \pm 18,51$).

L'effet principal de l'exposition (stress ou sans stress) est significatif $F(1, 84) = 142,65$, $p < 0,001$; le pourcentage marginal moyen de germination des semences soumis au stress par vieillissement accéléré ($52,143\% \pm 19,07$) est nettement inférieur et significativement différent de celui des semences non stressées ($60,857\% \pm 17,21$).

Un effet principal significatif du traitement a été trouvé, $F(6, 84) = 374,95$, $p < 0,001$; en fait, à partir des moyennes marginales estimées des pourcentages de germination à différents traitements, l'ordre décroissant est le suivant: T⁺1% ($75,5\% \pm 5,6$) > T⁺2% ($70,625\% \pm 4,1$) > T⁺4% ($68,125\% \pm 4,64$) > T⁺0% ($60\% \pm 5,84$) > Banko plus ($56\% \pm 5,4$) > Sec ($43,75\% \pm 13,69$) > T⁺Sur ($21\% \pm 3,68$). Le test de comparaison multiple de S-N-K montre que les traitements sont significativement différents les uns des autres, hormis T⁺2% et T⁺4% qui sont identiques. L'essentiel de la variance (86,9%) entre les groupes a été expliqué par le traitement.

L'effet principal de l'interaction extrait * stress (exposition) est significatif $F(1, 84) = 5,52, p = 0,021$; ceci montre que l'effet du stress des semences de riz sur la germination est dépendante de l'extrait de plante utilisé; le pourcentage de germination décline lorsqu'on quitte de l'état d'absence du stress à l'état de présence de stress et le déclin est significativement plus prononcé en présence de EEO (61,214-50,786%) que EEc (60,5-53,5%) (**Figure 31**). La taille de l'effet associé à cette interaction (Cohen's $f = 0,045$) n'a pas satisfait le minimum pour être qualifié de «effet» de petite taille suivant les balises de **Cohen (1988)**.



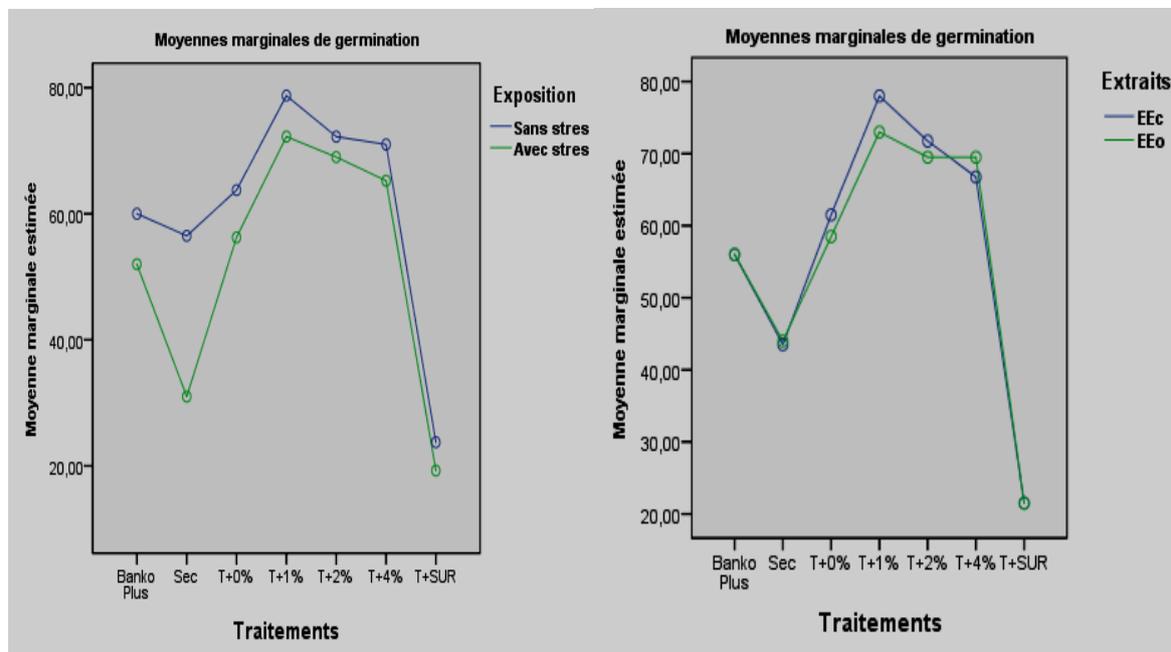
EEO: Extrait à l'éthanol d'*O. barrelieri*; EEc: Extrait à l'éthanol de *C. citratus*.

Figure 31: Variation du pourcentage de germination en présence et en absence de stress selon l'extrait de plante

L'effet principal de l'interaction extrait * traitement n'est pas significatif $F(6, 84) = 1,78, p = 0,112$; l'effet du traitement n'est pas significativement influencé selon qu'on soit en présence de EEc ou de EEO; par exemple, au traitement 2%; le pourcentage de germination est de $71,75\% \pm 3,77$ en présence de EEc et de $69,5\% \pm 4,5$ en présence EEO. Ainsi les tracés du pourcentage de germination en fonction des traitements selon EEc et EEO, sont à quelques différences près, confondus (**Figure 32 droite**). Il faut noter que le traitement 1% a présenté le plus grand pourcentage de germination, de l'ordre de $78\% \pm 4,4$ pour EEc et $73\% \pm 5,95$ pour EEO.

L'effet principal de l'interaction traitement * stress est significatif $F(6, 84) = 15,43, p < 0,001$; l'effet du traitement sur la germination est considérablement affecté

selon que les lots de semences aient été stressés ou pas. En fait on note une baisse de la germination chez tous les lots de semences quand ils sont soumis au test de vigueur par vieillissement accéléré: T⁺0% (63,75-56,25%), T⁺1% (78,75-72,5%), T⁺2% (72,25-69%), T⁺4% (71-65,25%), Banko plus (60-52%), Sec (56,5-31%) et T⁺Sur (23,75-19,25%); la baisse est drastique de l'ordre de 25,5% pour le lot Sec (**Figure 32 gauche**).



T⁺:Culot de semence traitée à 20% NaCl; 0%, 1%, 2%, 4%: Concentrations d'extraits de plantes T⁺Sur: Surnageant de semence traitée à 20% NaCl; Banko Plus: semence traitée avec 0,2% de fongicide; Sec: semence non traitée; EEo: Extrait à l'éthanol d'*O. barrelieri*; EEc: Extrait à l'éthanol de *C. citratus*.

Figure 32: Variation du pourcentage de germination des traitements des semences du riz en présence et en absence de stress (gauche); en présence des extraits de plantes (droite)

L'effet principal de l'interaction extrait * stress *traitement n'est pas significatif $F(6, 84) = 0,226, p = 0,967$; l'effet du traitement sur la germination n'est pas significativement affecté selon qu'on soit en présence de l'extrait à éthanol de *C. citratus* ou de l'extrait à éthanol de *O. barrelieri* et selon qu'on soit en présence ou en absence de stress.

III.3.1.3. Effets du tri des semences couplés aux traitements d'extraits de plantes, sur l'infestation de *B. oryzae* et de *F. moniliforme*

L'ANOVA à deux facteurs a été utilisée pour apprécier les effets de l'extrait, du traitement et de l'interaction de ces deux facteurs sur les pourcentages d'infestation de *B. oryzae* et de *F. moniliforme*; les résultats sont consignés dans le **Tableau VIII**.

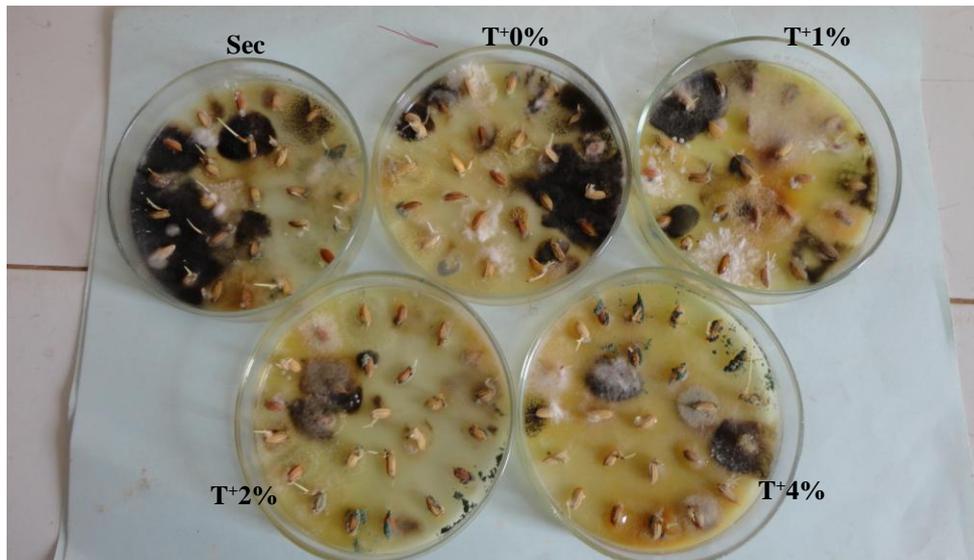
Tableau VIII: Analyse de la variance pour le pourcentage d'infestation de *B. oryzae* et de *F. moniliforme*, comme fonction de l'extrait et du traitement

Variable/source	SC de type 3		Ddl		CM		F		Sig		η^2	
	F.m	B.o	F.m	B.o	F.m	B.o	F.m	B.o	F.m	B.o	F.m	B.o
Extrait	48,28	8,64	1	1	48,286	8,643	1,532	0,22	,223	,642	,0137	,0012
Traitement	2140	5331,8	6	6	356,667	8881,6	11,314	22,60	<,001	<,001	,607	,750
Ext * Trait	9,71	111,8	6	6	1,619	18,64	0,051	0,474	,999	,0824	,0027	,015
Erreur	1324	1651	42	42	31,524	39,31						

F.m: *F. moniliforme*; **B.o:** *B. oryzae*; **SC:** somme des carrés; **CM:** Carré Moyen ; **Trait:** Traitement; **Ext:** Extrait; η^2 : Eta carré

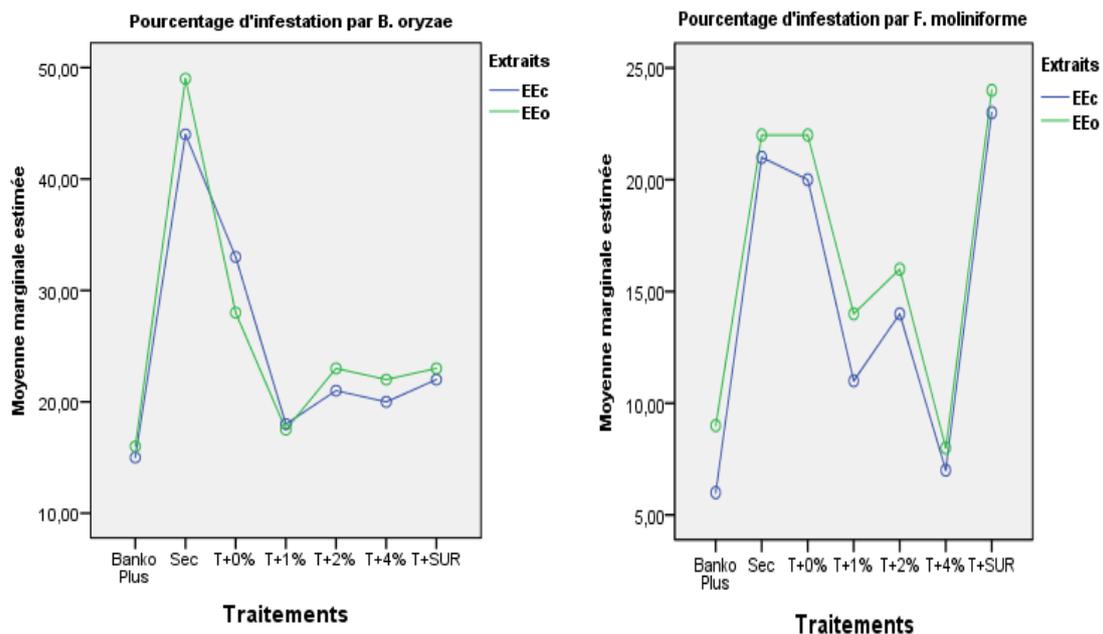
L'effet du traitement a été significatif, $F(6, 42) = 22,60, p <,001, \eta^2 = 0,750$ vis-à-vis l'infestation de *B. oryzae* et $F(6, 42) = 11,314, p <,001, \eta^2 = 0,607$ vis-à-vis l'infection de *F. moniliforme*. L'infestation par *B. oryzae* a été en général moins forte pour les semences traitées aux extraits de plantes comparée aux semences non traitées (**Figure 33**). Le test S-N-K utilisé pour déceler le niveau de différence ressort que, l'infection a été moindre en présence de Banko plus (15,5^c % \pm 3,38) statistiquement identique à T⁺1% (17,75^c % \pm 4,94), T⁺4% (21^c % \pm 4,14), T⁺2% (22^c % \pm 7,40), T⁺Sur (22,5^c % \pm 5,20); différent de T⁺0%(30,5^b % \pm 5,20) qui est différent de Sec (46,5^a % \pm 9,54). L'infection de *F. moniliforme* est plus élevée chez le lot T⁺Sur (23,5^a % \pm 7,23) statistiquement identique à Sec (21,5^{ab} % \pm 7,38), T⁺0%(21^{ab} % \pm 5,95) différent de T⁺2% (15^{bc} % \pm 4,14) identique à T⁺1% (12,5^c % \pm 4,50), T⁺4% (7,5^c % \pm 2,33) et Banko plus (7,5^c % \pm 2,56). A tous les traitements, l'infestation par *B.oryzae* a été nettement plus importante que celle de *F. moniliforme*.

Que ce soit pour l'infestation par *B. oryzae* (24,71% et 25,5%) ou bien celle par *F. moniliforme* (14,57% et 16,42%), les effets de l'extrait et de l'interaction extrait * traitement ne sont pas significatifs ($p > 0,05$); l'infestation par chacun des champignons n'est pas significativement différente en présence de EEc comparé à EEO (les pourcentages d'infestations des semences traitées par EEc sont comparables à ceux des semences traitées par EEO); ainsi, les tracés de leurs évolutions en fonction de différents traitements suivent approximativement la même allure (**Figure 34**).



T⁺:Culot de semence traitée à 20% NaCl; 0%, 1%, 2%, 4%: Concentrations d'extraits de plantes ; Sec: semence non traitée.

Figure 33: Incidence de *B. oryzae* et de *F. moniliforme*, en milieu PDA; après traitement avec différentes concentration de l'extrait à l'éthanol de *C. citratus* (EEc)



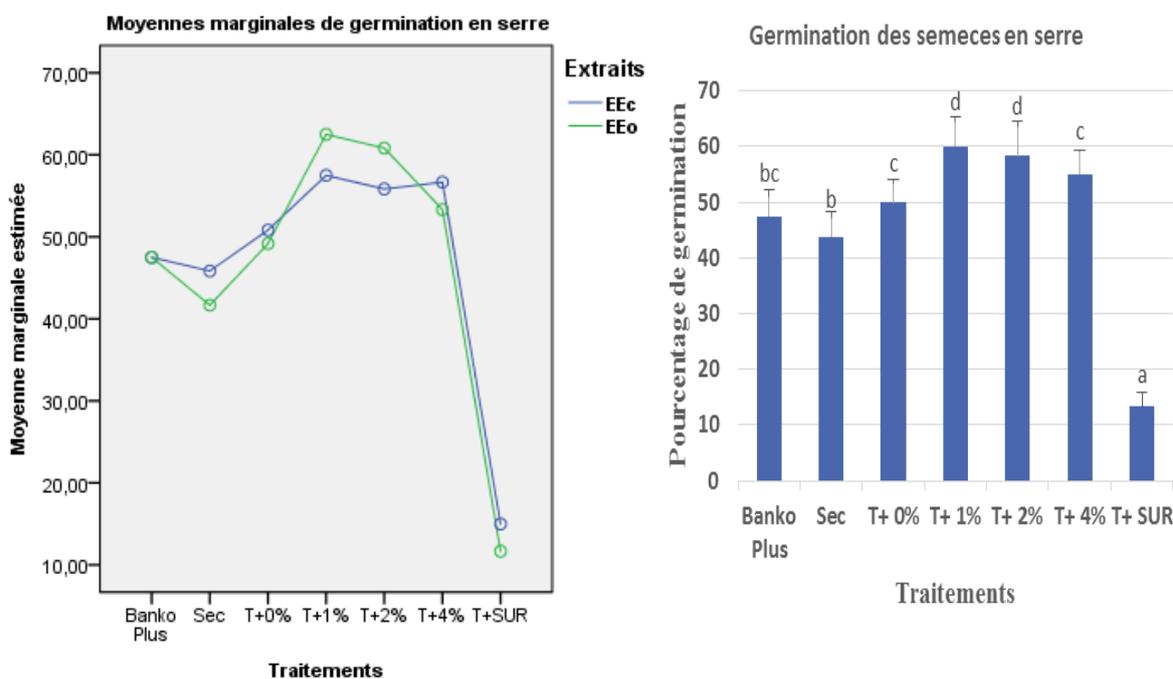
T⁺:Culot de semence traitée à 20% NaCl; 0%, 1%, 2%, 4%: Concentrations d'extraits de plantes T⁺Sur: Surnageant de semence traitée à 20% NaCl; Banko Plus: semence traitée avec 0,2% de fongicide; Sec: semence non traitée

Figure 34: Variation du pourcentage d'infestation de *B. oryzae* (Gauche) et de *F. moniliforme*(Droite), à différents traitements des semences du riz selon l'extrait de plante

III.3.1.4. Effets du tri des semences couplés aux traitements d'extraits de plantes, sur la germination du riz en serre (émergence)

L'ANOVA factoriel inter-sujets 7 (traitement) x 2 (extrait) a été conduite comparant la germination en serre (émergence) des groupes qui avaient l'un des sept traitements et les groupes qui étaient traités avec EEc ou EEO; il y ressort que les effets principaux de l'extrait ($F(1,42) = 2,335$ $p = 0,134$, $\eta^2 = 0,015$) et de l'interaction extrait * traitement ($F(6, 42) = 2,262$, $p = 0,56$, $\eta^2 = 0,090$) ne sont pas significatifs ($p > 0,05$), EEc (47,02%) et EEO (46,66%) ayant des effets proches sur l'émergence des semences de riz (**Figure 35 gauche**).

L'effet du traitement a été significatif, $F(6, 42) = 15,48$, $p < 0,05$; $\eta^2 = 0,612$; les natures des différences entre les traitements et leurs écarts types sont représentés par le **Figure 35 droite**, la plus forte émergence a été observé avec le traitement T+1% et le plus faible avec T+sur.



T⁺:Culot de semence traitée à 20% NaCl; 0%, 1%, 2%, 4%: Concentrations d'extraits de plantes T⁺Sur: Surnageant de semence traitée à 20% NaCl; Banko Plus: semence traitée avec 0,2% de fongicide; Sec: semence non traitée. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes au seuil 95% ($p < 0,05$) selon S-N-K.

Figure 35: Pourcentage d'émergence en serre en fonction des traitements: (Gauche) selon l'extrait de plante utilisé (Droite) en comparant les traitements

Les corrélations de Pearson ont été utilisées pour examiner les inters corrélations entre les variables, pourcentage de germination *in vitro*, infection par *B. oryzae*, infestation par *F. moniliforme* et pourcentage de germination en serre (**Tableau IX**).

Tableau IX: Inter corrélations entre le pourcentage de germination *in vitro*, les taux d'infections de *B. oryzae*, de *F. moniliforme* et le pourcentage de germination en serre (N=56)

Variabes	1	2	3	4	Moyenne	Ecart type
1. Germination <i>in vitro</i>	--	-0,127	-0,441**	+0,931**	60,85	17,29
2. Infestation par <i>B. oryzae</i>	--	--	+0,448**	-0,106	25,10	11,36
3. Infestation par <i>F. moniliforme</i>	--	--	--	-0,426**	15,50	8,00
4. Germination en serre	--	--	--	--	46,841	15,47

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

1=Germination *in vitro*; 2= Infestation par *B. oryzae*; 3=Infestation par *F. moniliforme*; 4=Germination en serre

La matrice de corrélation montre que, quatre des six paires de variables sont significativement corrélées. La plus forte corrélation positive, considérée comme presque parfaite par **Hopkins (1997)** a été trouvée entre la germination *in vitro* et la germination en serre $r(54) = 0,931^{**}$, $p < 0,01$. On devrait aussi remarquer l'existence d'une relation positive entre l'infection de *B. oryzae*, et l'infestation par *F. moniliforme* $r(54) = 0,448^{**}$, $p < 0,01$. La germination *in vitro* et l'émergence étaient chacun négativement corrélées avec l'infestation des deux pathogènes mais, la corrélation avec l'infestation par *B. oryzae* n'était pas significative ($p > 0,01$). La plus forte corrélation négative a été trouvée entre la germination *in vitro* et l'infection de *F. moniliforme*; $r(54) = -0,441^{**}$, $p < 0,01$.

III.3.2. Analyse des résultats des effets du tri des semences de riz en solution NaCl couplés aux traitements par les extraits aux solvants.

III.3.2.1. Analyse des résultats de l'effet du tri des semences de riz en solution salée

Certains auteurs ont trouvé des résultats parallèles quant à l'usage des solutions aqueuses salées pour le tri des semences de riz; notamment **Pham et al. (2003)** ont montré que le nettoyage des semences de riz à l'eau, diminue de 5,83-8,73% les grains non pleins en saison sèche et de 8,32-8.65% les graines décolorées en saison pluvieuse. En outre, ils ont montré que les semences de riz décolorés et tachetés pouvaient être nettoyées par traitement dans le chlorure de sodium 15%, et entraîner une amélioration de l'état phytosanitaire et de la germination (4,08-14,08%) de la semence; les semences tachetées et décolorées ainsi triées étant très souvent associée à une incidence élevée en agents pathogènes entre autre *B. oryzae* et *F. moniliforme* (**Akila et Ebenezar, 2009; Ibrahim et**

Abo El-Dahab, 2014) qui sont susceptibles de détériorer la graine. Le simple nettoyage des semences de riz à l'eau, tel que traditionnellement utilisé pour soustraire les grains de riz défailants, semble limité; l'association du NaCl est nécessaire; ce moyen de traitement étant simple, facile à mettre en œuvre et par-dessus tout assez Eco favorable.

La corrélation positive et significative trouvée entre la masse et le pourcentage de germination des semences de variétés du riz rouge et du Tox, corrobore avec les résultats de **Roy et al. (1996)**, qui ont montré que le taux de germination et la vigueur augmentent avec l'augmentation de la grosseur (masse) de la semence de riz; suggérant ainsi une sélection des grains lourds pour un bon établissement en champ. Pour renchérir, **Teng et al. (1992)** déclarent que le meilleur critère de sélection pour la vigueur du riz est sa masse.

Contrairement aux recherches de **Pham et al. (2003)** qui ont travaillé sur cet aspect en choisissant arbitrairement la concentration de saumure 15% pour le traitement des semences, la méthode utilisée dans ce travail, pour le traitement des semences de riz en solution NaCl décrit une approche scientifique simple et correcte ayant pour finalité de sélectionner la meilleure concentration de NaCl permettant le tri des impuretés et la sélection de bonne masse de semence permettant de maximiser le taux de germination quel que soit l'état et l'origine de la semence.

III.3.2.2. Analyse de l'impact du tri des semences, couplé aux traitements par les extraits de plantes sur la germination, la vigueur et l'incidence de *B. oryzae* et *F. moniliforme*

La faible germination des semences surnageant (21%) et non traitées (43,75%) comparé aux semences traitées par les extraits de plantes, pourrait être partiellement associée à une incidence élevée de *F. moniliforme* et *B. oryzae* sur ceux-ci. En effet une étude faite par **Imolehin (1983)**, sur les champignons véhiculés par les semences de riz et leur incidence sur la germination a révélé qu'il existe une forte corrélation significative et négative ($r = - 0,74$) entre l'infestation de ces deux champignons et la germination. Ceci semble d'autant plus vraie, dans la mesure où nous avons également trouvé une corrélation négative entre la germination et l'infestation par chacun des deux agents pathogènes; Cependant, cette corrélation a été moyenne ($r = -0,441$) à l'égard de *F. moniliforme* et non significative ($r = -0,441$) vis-à-vis *B. oryzae* ($- 0,127$).

La baisse drastique de l'ordre de 25,5% pour le lot Sec , modéré (7,5%) pour le lot de semences immergées dans l'eau (T0%) et un peu plus faible (5,33%) pour les lots traités aux extraits de plantes après soumission des semences au test de vigueur par vieillissement accéléré, est conforme aux conclusions de **Veselova et Veselovsky (2003)**; à savoir que,

le vieillissement accéléré se manifeste par une réduction du pourcentage de germination et, les semences qui parviennent à germer tendent à donner de plantules faibles. Ce résultat laisse aussi apparaître une évidence selon laquelle, le simple trempage de la semence de riz dans de l'eau a contribué à la consolidation de sa vigueur dans les conditions de stress, comme d'ailleurs constaté par **Ken-Ichi et Jun-Ichi (2013)**. Les extraits de plantes utilisés dans ce travail seraient donc un peu plus impliqués dans la stimulation de la germination que l'augmentation de la vigueur; ceci pouvant se faire via la stimulation de l'activité des α -amylases, la libération des sucres libres solubles et l'augmentation de la fréquence respiratoire des graines (**Wang et al., 2016**) suite à l'action de leurs métabolites secondaires.

III.4. Effets des extraits de plantes sur les marqueurs d'induction de la résistance, la croissance du riz, la sévérité de l'helminthosporiose et la biologie de l'infection

III.4.1. Effets des extraits de plantes sur la germination et les marqueurs d'induction de la résistance

III.4.1.1. Effets du traitement par les extraits sur la Germination/émergence de riz

La germination sur blotter et l'émergence en serre des semences de riz traitées par différentes concentrations d'extraits d'*O. barrelieri* et *C. citratus* sont présentées dans le **Tableau X**.

Tableau X: Germination et émergence des semences de riz traitées par les extraits de *C. citratus* et d'*O. barrelieri*

Pourcentage de germination/Emergence (%)				
	<i>Cymbopogon. Citratus</i>		<i>Oxalis barrelieri</i>	
Tr	Germination (Blotter)	Emergence (Serre)	Germination (Blotter)	Emergence (Serre)
T0	41,09 ^a ± 1,8-	43,00 ^a ± 2,64	45,77 ^a ± 0,86	45,66 ^a ± 2,08
T1	66,90 ^c ± 1,14	68,16 ^c ± 1,25	71,44 ^d ± 1,26	73,00 ^d ± 1,00
T2	72,07 ^d ± 1,00	69,50 ^c ± 1,32	69,72 ^d ± 1,42	70,83 ^{cd} ± 1,25
T3	67,54 ^c ± 0,50	73,21 ^d ± 1,33	65,44 ^c ± 1,41	68,16 ^c ± 1,25
T4	63,25 ^b ± 0,75	64,00 ^b ± 1,00	61,00 ^b ± 2,00	63,33 ^b ± 2,08

^{a,b,c,d} Les moyennes dans une même colonne, suivies des lettres différentes sont significativement différents au seuil $P \leq 0,05$ selon le test de S-N-K. Les données sont les moyennes quatre expériences. Tr: Traitement; T0: semences n'ayant reçu aucun traitement; T1: semence traitée à 20% NaCl; T2: semence traitée à 20% NaCl plus 1% d'extrait; T3: semence traitée à 20% NaCl plus 2% d'extrait; T4: semence traitée à 20% NaCl plus 4% d'extrait

Il ressort de ce tableau que les semences témoins T0 (n'ayant reçu aucun traitement) ont eu la plus petite germination sur blotter et la plus faible émergence en serre (**Figure 36**), tant avec les extraits d'*O. barrelieri* que ceux de *C. citratus*. La germination et l'émergence des semences de T1, T2 et T3 ont été en général assez rapprochées, avec une plus-value non significative pour le traitement T1, dans les traitements avec *O. barrelieri*. Les traitements T4 ont été significativement inférieurs à T1, T2 et T3 aussi bien pour la germination (blotter) que pour l'émergence. Il faut aussi noter que l'analyse de la **Figure 36 droite** ci-dessous ressort une stimulation de la croissance des traitements T1, T2 T3 et T4 comparé à T0.



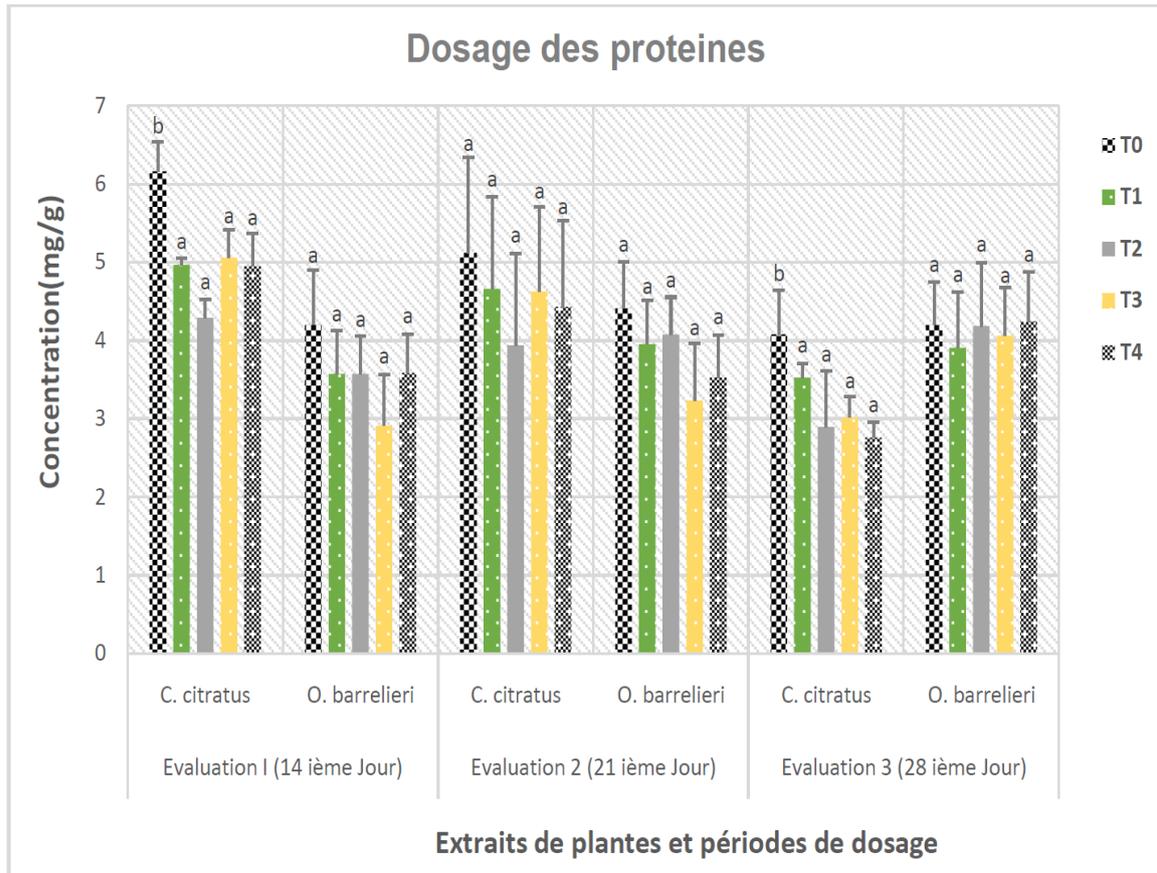
Figure 36: Germination sur blotter à gauche (gauche vers droite: T0, T1, T2, T3 et T4) de l'extrait d'*O. barrelieri*; émergence en serre (droite vers gauche: T0, T1, T2, T3 et T4) de l'extrait de *C. citratus*

III.4.1.2. Effets des traitements par les extraits de plantes sur les marqueurs de l'induction de la résistance chez le riz

Les teneurs en; protéines, groupes thiols, composés phénoliques, β -1,3-glucanase, peroxydases, polyphénols oxydases et amylases ont été déterminées aux 14^{ième}, 21^{ième} et 28^{ième} jours pour les différents traitements (T0, T1, T2, T3 et T4).

III.4.1.2.1. Détection des protéines

Les concentrations en protéines des traitements T0, T1, T2, T3 et T4, exprimées en milligramme par gramme de matériel végétal frais de riz (mg/g), en fonction de la période de quantification, sont ressorties par la **Figure 37**.



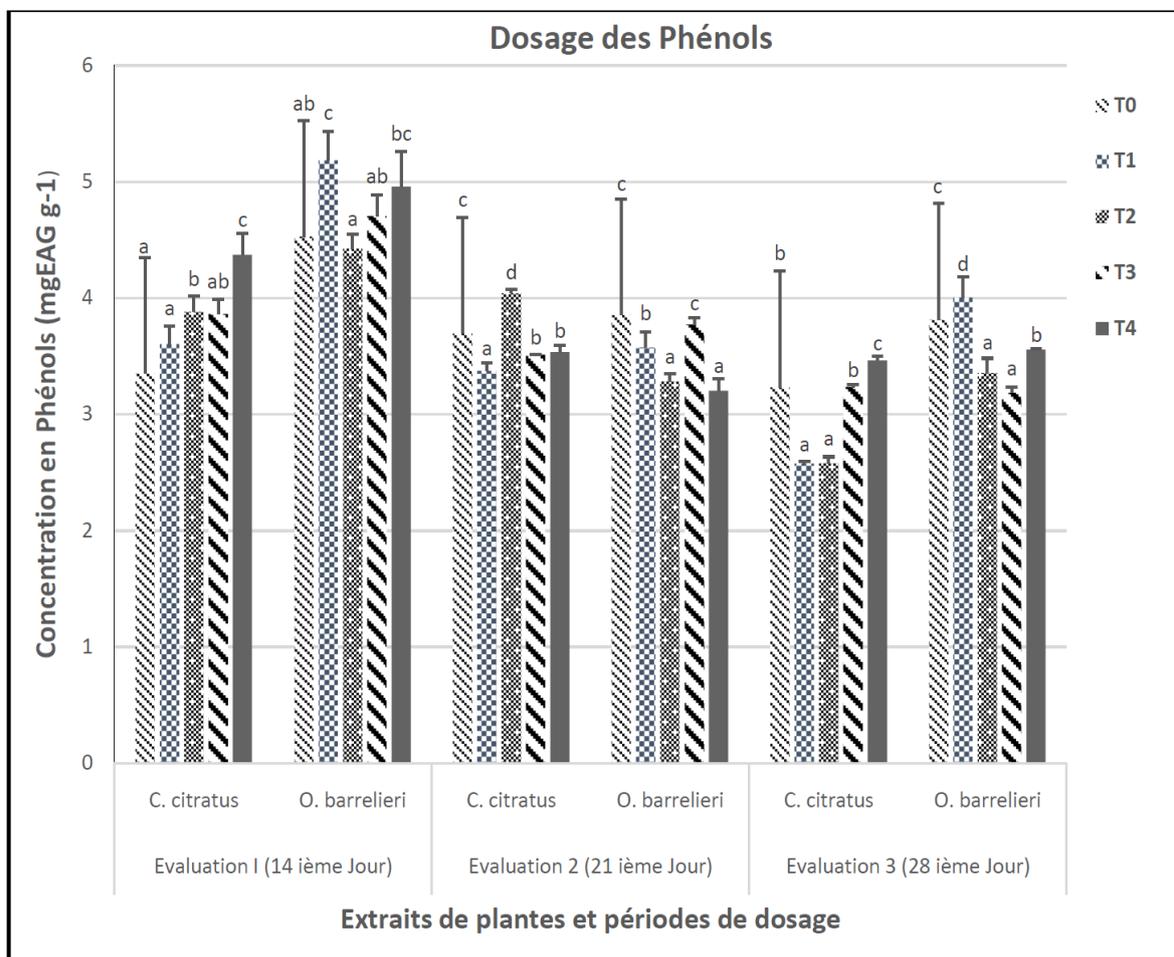
^{a,b} Les moyennes des traitements pour une même période d'évaluation et un même type d'extrait de plante, suivies des lettres identiques ne sont pas significativement différentes au seuil $P \leq 0,05$ selon le test de S-N-K. Les données sont les moyennes de trois expériences. T0: semences n'ayant reçu aucun traitement; T1: semence traitée à 20% NaCl; T2: semence traitée à 20% NaCl plus 1% d'extrait; T3: semence traitée à 20% NaCl plus 2% d'extrait; T4: semence traitée à 20% NaCl plus 4% d'extrait.

Figure 37: Teneur en protéines des plantules de riz en fonction des traitements aux extraits de *C. citratus* et *O. barrelieri*

On peut noter à partir de cette figure que, pour chacun des extraits de plantes (*O. barrelieri* ou *C. citratus*) et à chaque période de quantification, les concentrations en protéines dans les plants de riz n'ayant reçues aucun traitement de semences (T0), sont supérieures à celles des plants donc les semences ont été triées uniquement en solution NaCl 20% (T1) et à celles donc les semences ont été trempées dans les extraits de plantes (T2, T3 et T4). L'évaluation au 14^{ème} et 28^{ème} jour respectif montre que, les concentrations en protéines (mg/g) des traitements T0 (6,16; 4,08) pour l'extrait de *C. citratus*, ont été supérieures et significativement différentes des traitements T1 (4,97; 3,52), T2 (4,29; 2,90), T3 (5,06; 3,02) et T4 (4,95; 2,76) tous statistiquement identiques.

III.4.1.2.2. Teneur en composés phénoliques

Les teneurs en composés phénoliques ont été déterminées et exprimées en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de matériel végétal frais de riz (mg/g), et les résultats sont présentés par la **Figure 38**.



a, b, c, d Les moyennes des traitements pour une même période d'évaluation et un même type d'extrait de plante, suivies des lettres identiques ne sont pas significativement différents au seuil $P \leq 0,05$ selon le test de S-N-K. Les données sont les moyennes de trois expériences. T0: semences n'ayant reçu aucun traitement; T1: semence traitée à 20% NaCl; T2: semence traitée à 20% NaCl plus 1% d'extrait; T3: semence traitée à 20% NaCl plus 2% d'extrait; T4: semence traitée à 20% NaCl plus 4% d'extrait.

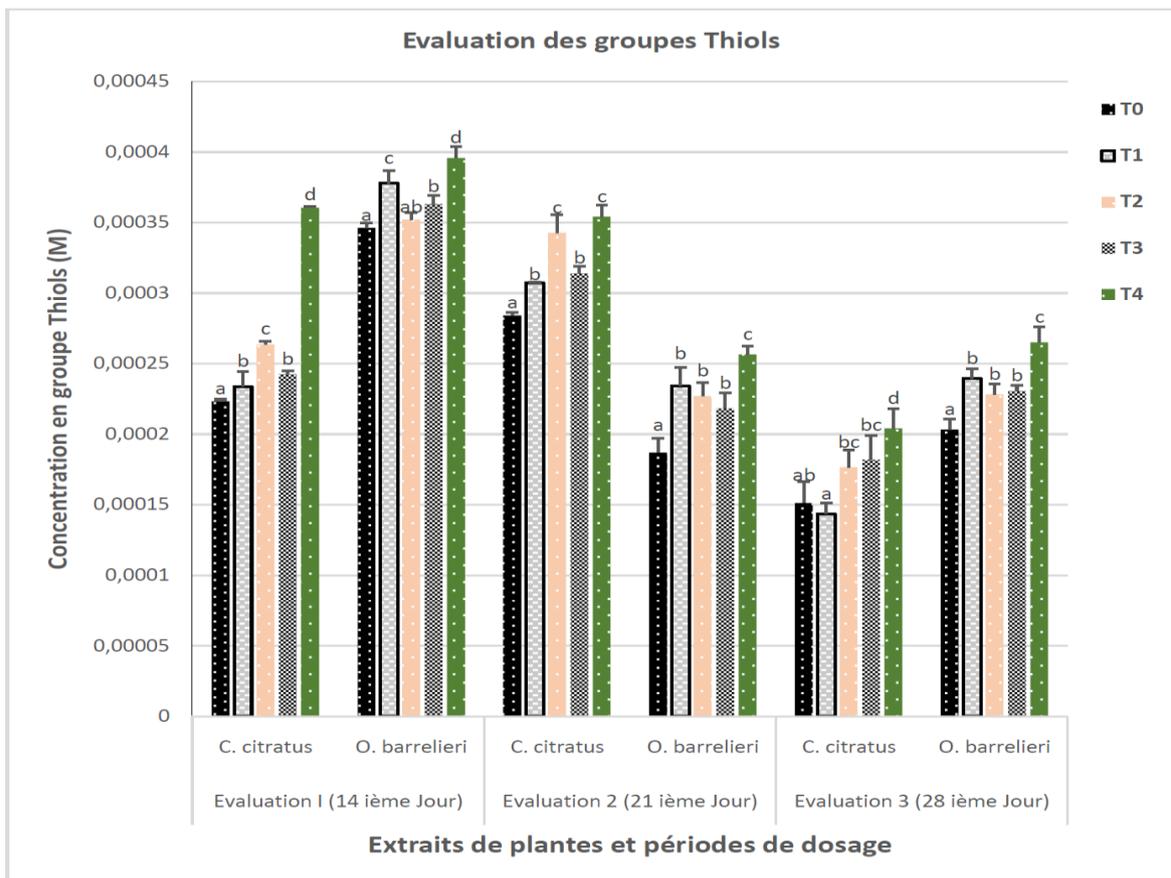
Figure 38: Teneur en composés phénoliques des plantules de riz en fonction des traitements aux extraits de *C. citratus* et *O. barrelieri*

Au 14^{ème} jour après traitement des semences de riz, les teneurs en phénols (mg/g) des plants de riz des traitements T4 (4,27^c), T3 (3,88^{ab}), et T2 (3,88^b) de *C. citratus*; ont été plus importantes et significativement différentes des traitements T1 (3,60^a) et T0 (3,35^a). À cette même période d'évaluation un effet presque inverse a été observé avec *O. barrelieri*; en effet la teneur en phénols du traitement T1 d'*O. barrelieri* a été significativement plus importante que tous les autres traitements; T0 quant à lui, a eu une concentration

supérieure à T2, et statistiquement comparable à T3 et T4. Aux 21^{ème} et 28^{ème} jours de l'évaluation, les teneurs en phénols des traitements T0 (3,85 -3,81) et T1 (3,57-4) ont été significativement plus élevées que les traitements T2 (3,28-3,35), T3 (3,77 - 3,18) et T4 (3,20 - 3,55) ayant reçus à la base les traitements par les extraits d'*O. barrelieri*. Les concentrations en phénols des traitements T3 (3,51^b) et T4 (3,53^b) de *C. citratus*, qui ont été significativement plus basses que T0 (3,69^c) et T2 (4,04^d) au 21^{ème} jour, se sont retrouvées significativement plus importantes que ces dernières au 28^{ème} Jour. Aussi, T2 qui avait la teneur en phénols la plus élevée (4,04) au 21^{ème} jour, enregistrait celle la plus faible (2,58) au 28^{ème} jour.

III.4.1.2.3. Concentration des groupes thiols

Les concentrations des groupes thiols des traitements T0, T1, T2, T3 et T4; exprimées en mol/L à différentes périodes d'évaluation sont données dans la **figure 39**.



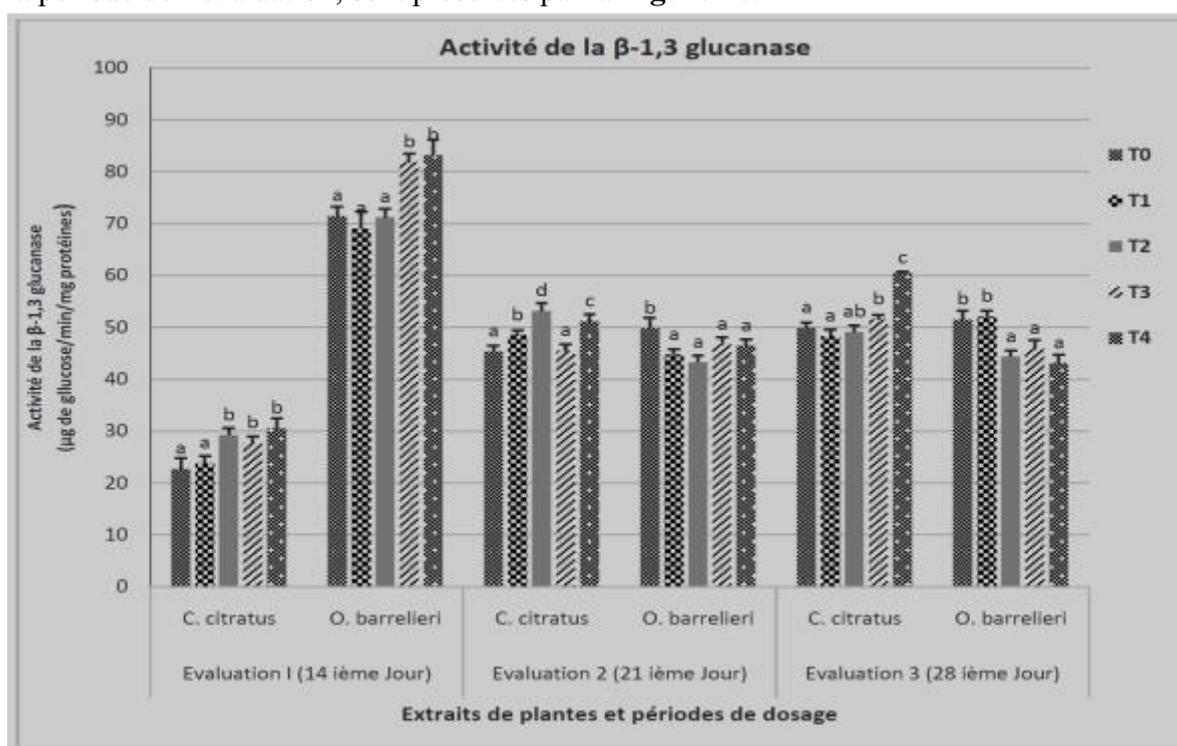
^{a, b, c, d} Les moyennes des traitements pour une même période d'évaluation et un même type d'extrait de plante, suivies des lettres identiques ne sont pas significativement différents au seuil $P \leq 0,05$ selon le test de S-N-K. Les données sont les moyennes de trois expériences. T0: semences n'ayant reçu aucun traitement; T1: semence traitée à 20% NaCl; T2: semence traitée à 20% NaCl plus 1% d'extrait; T3: semence traitée à 20% NaCl plus 2% d'extrait; T4: semence traitée à 20% NaCl plus 4% d'extrait.

Figure 39: Teneur des groupes thiols des plantules de riz en fonction des traitements aux extraits de *C. citratus* et *O. barrelieri*

Il ressort de cette figure que, pour chacune des périodes respectives d'évaluation de la concentration des groupements thiols, le traitement T4 de l'extrait de *C. citratus*, tout comme le traitement T4 à l'extrait d'*O. barrelieri*, sont restés plus élevés et ont été significativement différents de tous les autres traitements (T0, T1, T2 et T3). A une exception près (T0 ($15,1 \times 10^{-5} \text{ M}$) > T1($14,3 \times 10^{-5} \text{ M}$) de l'EEc, à l'évaluation au 28^{ième} jour) les plants issues des semences n'ayant reçues aucun traitement (T0) ont gardé des concentrations en groupement thiols, significativement faibles ($15,1 \times 10^{-5} \text{ M} - 34,6 \times 10^{-5} \text{ M}$), comparées aux autres traitements (T1, T2, T3 et T4), à l'évaluation aux 14^{ième} 21^{ième} et 28^{ième} jours. Pour la plupart des cas, les teneurs en thiols des traitements T2 de *C. citratus* et *O. barrelieri* étaient statistiquement identiques à celles des traitements T3. Aussi les concentrations en thiols des traitements T1 ont été en général proches de celles des traitements T2 et/ou T3 à différentes périodes de dosages.

III.4.1.2.4. Activité de la β -1,3-glucanase

Les activités spécifiques de la β -1,3-glucanase dans les plantules de riz issues des traitements T0, T1, T2, T3 et T4, exprimées en μg glucose/min/mg protéines en fonction de la période de l'évaluation, sont présentés par la **Figure 40**.



a, b, c, d Les moyennes des traitements pour une même période d'évaluation et un même type d'extrait de plante, suivies des lettres identiques ne sont pas significativement différents au seuil $P \leq 0.05$ selon le test de S-N-K. Les données sont les moyennes de trois expériences. T0: semences n'ayant reçu aucun traitement; T1: semence traitée à 20% NaCl ; T2: semence traitée à 20% NaCl plus 1% d'extrait ; T3: semence traitée à 20% NaCl plus 2% d'extrait; T4: semence traitée à 20% NaCl plus 4% d'extrait

Figure 40: Teneur de la β -1,3-glucanase des plants de riz en fonction des traitements aux extraits de *C. citratus* et *O. barrelieri*

A partir de cette figure, on peut noter qu'à la première évaluation (14^{ème} jour après traitement des semences de riz), les activités de la β -1,3-glucanase ($\mu\text{g glucose min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ protéine) des traitements T2, T3 et T4 (29,29 -30,54 $\mu\text{g glucose min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ protéine) de *C. citratus*, sont statistiquement égales et sont significativement différentes des traitements T0 (22,72) et T1 (23,82) statistiquement identiques. La même variation a été observée avec l'extrait d'*O. barrelieri*, à la seule différence que l'activité du traitement T2 était statistiquement comparable à celle de T0 et T1. Aux 14^{ème} et 28^{ème} jours respectif de l'évaluation de l'activité de la β -1,3-glucanase, les résultats convergeaient plus dans les sens que les traitements T2 (53,15-49,10), T3 (45,50-51,60) et T4 (51,18-60,56) aient été significativement plus important que les traitements T0 (45,42-49,94) et T1(48,50-48,33) pour *C. citratus*; au contraire, les tendances de variations d'activités avec *O. barrelieri* montraient que les traitements T0 (41,84-51,55) et T1(44,71-52,06) étaient supérieures et statistiquement différents de T2 (43,30-44,37), T3 (46,72-45,91) et T4 (46,53-43,12).

III.4.1.2.5. Activité des peroxydases

Les activités spécifiques de la peroxydase ($\Delta\text{DO}_{30\text{S}-2\text{min}30} \text{ min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ protéine) des plantules de riz après différents traitements; T0, T1, T2, T3 et T4 de *C. citratus* et d'*O barrelieri*; en fonction de la période de l'évaluation, sont présentés dans le **Tableau XI**.

Tableau XI: Activités des peroxydases dans les feuilles de riz, après différents traitements aux extraits de *C. citratus* et *O barrelieri*

Activité de la peroxydase ($\Delta\text{DO}_{30\text{S}-2\text{min}30} \text{ min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ protéine $\times 10^{-3}$)						
	Evaluation I (14 ^{ème} Jour)		Evaluation 2 (21 ^{ème} Jour)		Evaluation 3 (28 ^{ème} Jour)	
Tr	<i>C. citratus</i>	<i>O. barrelieri</i>	<i>C. citratus</i>	<i>O. barrelieri</i>	<i>C. citratus</i>	<i>O. barrelieri</i>
T0	55,8 ^a \pm 1,5	63,5 ^{ab} \pm 2,9	43,2 ^a \pm 1,4	61,2 ^a \pm 1,7	40,3 ^a \pm 1,9	37,9 ^a \pm 1,5
T1	60,0 ^a \pm 1,9	67,5 ^b \pm 3,6	44,2 ^{ab} \pm 1,5	75,2 ^b \pm 2,3	53,2 ^b \pm 2,2	41,9 ^a \pm 1,7
T2	56,0 ^a \pm 2,1	56,6 ^{ab} \pm 3,5	55,4 ^c \pm 2,0	62,9 ^a \pm 1,8	78,2 ^c \pm 2,7	37,9 ^a \pm 1,5
T3	66,1 ^b \pm 1,8	59,7 ^{ab} \pm 4,5	48,3 ^{ab} \pm 1,7	65,9 ^a \pm 2,4	57,5 ^b \pm 2,7	40,1 ^a \pm 1,6
T4	68,8 ^b \pm 1,8	52,4 ^a \pm 3,7	49,5 ^b \pm 1,7	73,7 ^b \pm 0,3	76,3 ^c \pm 2,8	38,0 ^a \pm 1,4

^{a, b, c} Les moyennes dans une même colonne, suivies des lettres identiques ne sont pas significativement différents au seuil $P \leq 0,05$ selon le test de S-N-K. Les données sont les moyennes de deux expériences. T0: semences n'ayant reçu aucun traitement; T1: semence traitée à 20% NaCl ; T2: semence traitée à 20% NaCl plus 1% d'extrait ; T3: semence traitée à 20% NaCl plus 2% d'extrait; T4: semence traitée à 20% NaCl plus 4% d'extrait.

Au regard de ce tableau, on peut observer qu'au 14^{ème} jour de l'évaluation, les activités des plants de riz issus des traitements des semences par les extraits de *C. citratus* à l'exception de T2 (T3 et T4), sont significativement élevées comparées aux traitements

témoins T0 et T1. L'effet contraire a été observé avec les traitements d'*O. barrelieri* ou les témoins T0 ($63,5 \times 10^{-3}$) et T1 ($67,5 \times 10^{-3}$) ont été supérieures à T2 ($56,6 \times 10^{-3}$), T3 ($59,7 \times 10^{-3}$) et T4 ($52,4 \times 10^{-3}$) mais, avec des différences non significatives. L'évaluation au 21^{ème} jour ressort que T2 > T4 > T3 > T1 > T0 avec *C. citratus* et que T1 > T4 > T3 > T2 > T0 avec *O. barrelieri*. L'évaluation au 28^{ème} jour montre que les activités des traitements T2 et T4 de *C. citratus*, ont été équipollentes et significativement supérieures à celles de T3 et T2 significativement plus grandes que celle de T0; les activités des différents traitements d'*O. barrelieri*, groupées entre $37,9 \times 10^{-3}$ - $41,9 \times 10^{-3} \Delta DO_{30S} \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protéine, ont été toutes statistiquement identiques.

III.4.1.2.6. Activité des polyphénols oxydases

Les activités spécifiques des polyphénols oxydases ($\Delta DO_{30S-2\text{min}30} \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protéine) des plantules de riz après différents traitements; T0, T1, T2, T3 et T4 de *C. citratus* et *O. barrelieri*; en fonction de la période de l'évaluation, sont présentées dans le **Tableau XII**.

Tableau XII: Activités des polyphénols oxydases des plantules de riz, après différents traitements aux extraits de *C. citratus* et d'*O. barrelieri*

Activité de la polyphénol oxydase ($\Delta DO_{30S-2\text{min}30} \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protéine $\times 10^{-3}$)						
	Evaluation I (14 ^{ème} Jour)		Evaluation 2 (21 ^{ème} Jour)		Evaluation 3 (28 ^{ème} Jour)	
Tr	<i>C. citratus</i>	<i>O. barrelieri</i>	<i>C. citratus</i>	<i>O. barrelieri</i>	<i>C. citratus</i>	<i>O. barrelieri</i>
T0	17,0 ^a ± 0,9	8,8 ^a ± 0,9	10,7 ^a ± 0,6	9,9 ^a ± 0,8	8,0 ^a ± 0,8	13,4 ^a ± 0,7
T1	15,0 ^a ± 1,0	10,0 ^{ab} ± 1,0	12,5 ^{ab} ± 0,7	9,0 ^a ± 0,9	8,6 ^a ± 0,9	15,1 ^{ab} ± 0,3
T2	19,0 ^b ± 1,2	10,2 ^{ab} ± 0,9	14,4 ^b ± 0,9	11,1 ^a ± 0,9	10,1 ^a ± 1,1	14,6 ^{ab} ± 0,7
T3	19,6 ^b ± 1,2	14,0 ^b ± 1,2	13,6 ^b ± 0,7	16,0 ^b ± 1,0	8,1 ^a ± 1,0	16,6 ^b ± 0,7
T4	21,0 ^b ± 1,2	10,7 ^{ab} ± 1,5	14,7 ^b ± 0,7	15,9 ^b ± 1,0	9,6 ^a ± 1,0	16,3 ^b ± 0,7

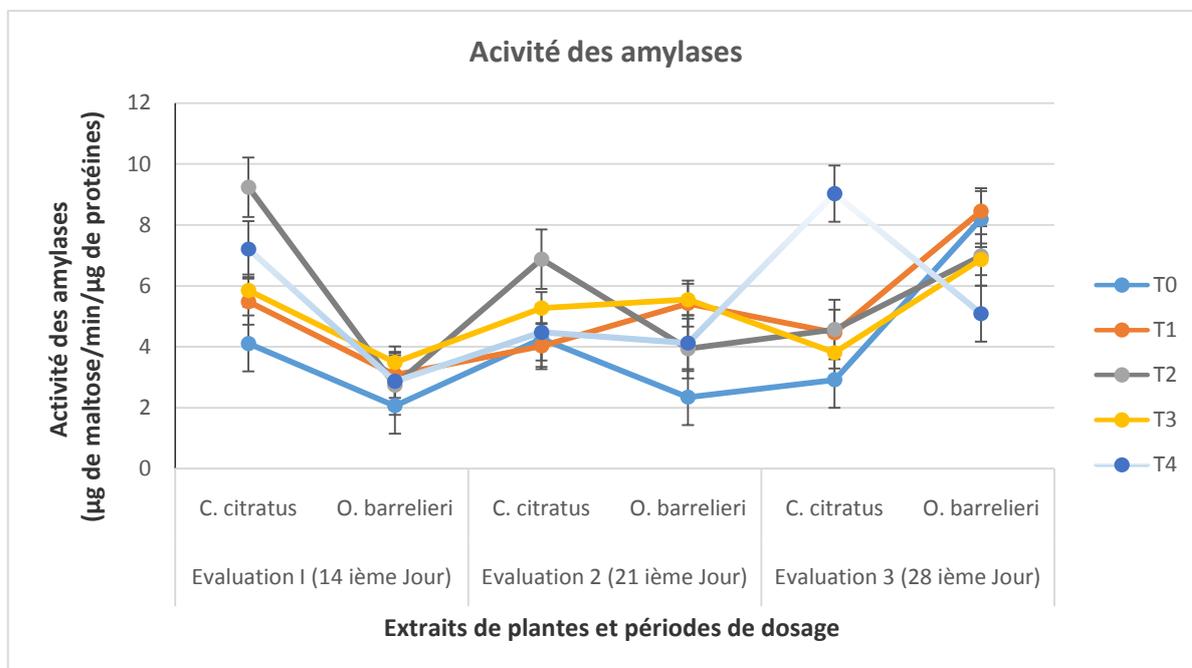
^{a, b} Les moyennes dans une même colonne, suivies des lettres identiques ne sont pas significativement différents au seuil $P \leq 0,05$ selon le test de S-N-K. Les données sont les moyennes de deux expériences. T0: semences n'ayant reçu aucun traitement; T1: semence traitée à 20% NaCl ; T2: semence traitée à 20% NaCl plus 1% d'extrait; T3: semence traitée à 20% NaCl plus 2% d'extrait; T4: semence traitée à 20% NaCl plus 4% d'extrait

On peut dégager de ce tableau l'existence d'au plus deux niveaux de différences entre les traitements d'une même série; à l'évaluation aux 14^{ème} et 21^{ème} Jours de l'activité des polyphénols oxydases, les traitements T2, T3 et T4 ont été presque toutes comparables, et significativement plus grandes que les activités des traitements T0 et T1, tant pour *C. citratus* que pour *O. barrelieri*. À l'évaluation au 28^{ème} Jour tous les traitements de *C. citratus* ont été statistiquement semblables; les traitements d'*O. barrelieri* ont suivi la

même tendance qu'au 14^{ième} et 21^{ième} Jours; sauf que, l'activité de T1 a été supérieure à celle de T2 bien que identique statistiquement à celle-ci.

III.4.1.2.7. Activité de l'amylase

Les activités spécifiques des amylases dans les plantules de riz issues des traitements T0, T1, T2, T3 et T4; exprimées en μg maltose /min/ μg protéine en fonction de la période de l'évaluation, sont présentées par **la figure 41**.



Chaque valeur est présentée \pm erreur standard. Les données sont les moyennes de trois expériences. T0: semences n'ayant reçu aucun traitement; T1: semence traitée à 20% NaCl ; T2: semence traitée à 20% NaCl plus 1% d'extrait; T3: semence traitée à 20% NaCl plus 2% d'extrait; T4: semence traitée à 20% NaCl plus 4% d'extrait

Figure 41: Activités des amylases dans les feuilles de riz en fonction des traitements aux extraits de *C. citratus* et *O. barrelieri*

Cette figure ressort que les activités respectives des amylases du traitement T0 de *C. citratus* ont été maintenues significativement faibles par rapport à celles des autres traitements (T1, T2, T3 et T4), à l'évaluation au 14^{ième}, 21^{ième} et 28^{ième} jour. Aussi, les activités respectives de T0 d'*O. barrelieri* ont été significativement faibles comparées aux activités de T1, T2, T3 et T4 aux 14^{ième} et 21^{ième} jours avant que la tendance ne soit inversée au 28^{ième} jour. L'activité du traitement T2 de *C. citratus* a été significativement plus importante au 14^{ième} (9,24 μg maltose x μg protéine⁻¹ min⁻¹) et 21^{ième} (6,88 μg maltose x μg protéine⁻¹ min⁻¹) jour de l'évaluation, avant de chuter légèrement (à la deuxième place) au 28^{ième} jour. Plutôt, c'est l'activité du traitement T3 d'*O. barrelieri* qui a été significativement plus importante au 14^{ième} (3,49 μg maltose x μg protéine⁻¹ min⁻¹) et 21^{ième}

(5,55 μg maltose \times μg protéine⁻¹ min⁻¹) jour de l'évaluation, avant d'être reléguée à la quatrième place au 28^{ème} jour. De manière globale, Il n'existe pas un sens constant dans la variation de l'activité de l'amylase des traitements de *C. citratus* et d'*O. barrelieri*.

III.4.1.2.8. Observations additionnelles au cours de l'évaluation de l'induction de la résistance

Après avoir fait les coupes des jeunes plants de riz pour la préparation des extraits afin de doser des marqueurs d'induction de la résistance, nous avons remarqué que les taux de repousses des plantules de riz coupées, n'étaient pas les mêmes pour les différents traitements T0, T1, T2, T3 et T4 (**Figure 42 B, C**). Ainsi, en évaluant ces taux de repousses pour l'essai avec *C. citratus*, nous avons eu; 10%, 30%, 70%, 80% ,70%; et avec *O. barrelieri* 14,28%, 25,5%, 33,33%, 50%, 75% respectivement pour T0, T1, T2, T3 et T4. Aussi, il est apparu à la base des tiges de riz, des symptômes de l'helminthosporiose sous forme de décolorations noirs. Ces décolorations étaient très sévères chez les témoins et très faibles pour les traitements à la concentration maximale en extrait T4 (**Figure 42 A**). En plus, les plantules de riz non arrosées pendant trois jours successifs ont montré un assèchement plus prononcé des plantules des traitements témoins (T0), comparé aux plantules des traitements T1, T2, T3 et T4; comme présenté sur **Figure 43 A** avec les extraits de *C. citratus* et sur la **Figure 43 B** avec les extraits d'*O. barrelieri*.



Figure 42: Caractéristiques particulières au cours de l'induction de la résistance. (A) Symptômes de l'helminthosporiose sur les tiges de riz en serre; (B) faible taux de repousse pour le témoin T0; (C) fort taux de repousse pour le traitement T4

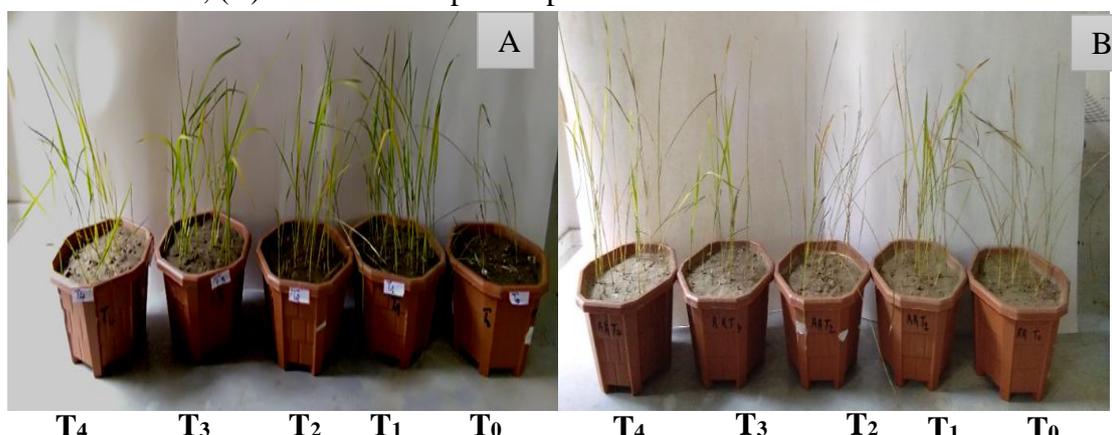


Figure 43: Résistance au stress hydrique. (A) plantules de riz traitées avec les extraits de *C. citratus*; (B) plantules de riz traitées avec les extraits d'*O. barrelieri*. De la droite vers gauche: T0, T1, T2, T3 et T4

III.4.2. Effets des extraits de plantes sur la croissance du riz, la sévérité de l'helminthosporiose et la biologie de l'infection par *B. oryzae*

III.4.2.1. Effet des extraits sur la germination et de la croissance du riz

Tel que présentée photographiquement par la **Figure 45 A, B**; la germination a été considérablement plus élevée pour les semences de riz traitées avec les extraits de *C. citratus*. Les plantules de riz issues des traitements aux extraits de *C. citratus* ont montré une croissance significative comparativement au témoin; la stimulation de la croissance a été plus forte chez les plantules issues des semences traitées avec 4% d'extrait de *C. citratus* (**Figure 44**). On note aussi une plus grande vitalité pour les plants traités aux extraits. Ainsi, pour les deux paramètres que sont la germination et le développement précoce, les effets bénéfiques du traitement peuvent être observés *C. citratus*

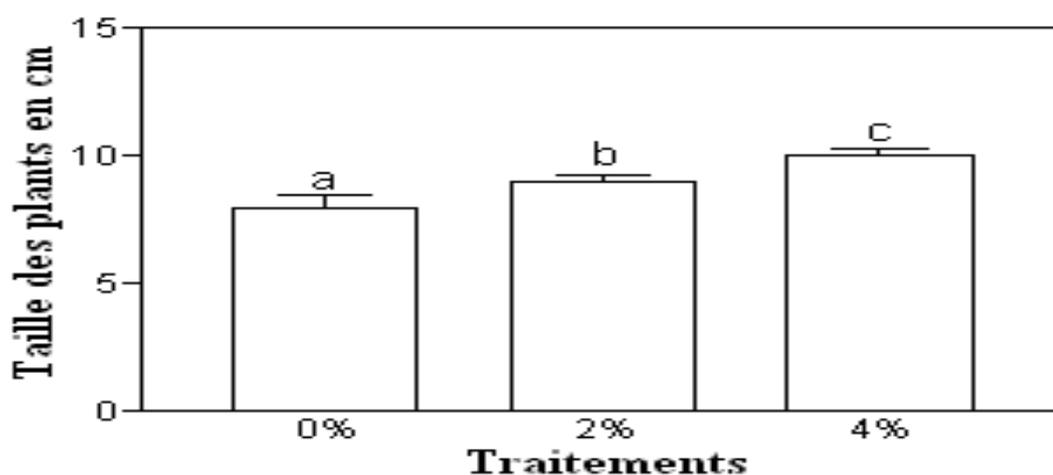


Figure 44: Taille des plantules de riz issues des semences traitées à différentes concentrations d'extraits de *C. citratus*



Figure 45: Stimulation de la croissance et de la germination des semences de riz traitées avec extraits de *C. citratus*. (A) Différences au niveau de l'émergence; les traitements sont dans l'ordre suivant (de la gauche vers la droite: 4% ; 2% et 0% (contrôle)). (B) stimulation de la croissance; les traitements sont dans l'ordre suivant (de la gauche vers la droite: 0% (control), 2% et 4%)

III.4.2.2. Effet des extraits sur la sévérité de la maladie des taches brunes

La sévérité de la maladie des plantules de riz inocuées avec 10000 conidies/mL, a été évaluée 5 jours après l'inoculation, et les données ont été consignées dans le **Tableau XIII** en pourcentage de surface foliaire infestée et nécrosée. Les symptômes de toutes les feuilles par pot ont été rapportés et ont été comparés entre les témoins (0%) et les deux concentrations d'extraits 2% et 4%. La moyenne des surfaces des feuilles infectées chez les témoins est 4-5 fois plus grande, et significativement différente de celle des surfaces de feuilles infectées issues des semences traitées avec les extraits de *C. citratus* (**Tableau XIII**).

Tableau XIII: Score des symptômes causés par *B. oryzae*, 5 jours après inoculation des plantules de riz issues de différents traitements par les extraits de *C. citratus*

Pourcentage de surface foliaire infestée 5 jours après inoculation			
Traitements	0%	2%	4%
	20	5,33*	4*

* = significativement différent du Témoin $P \leq 0,05$

Les symptômes sur les feuilles se présentent sous forme de spots circulaires ou ovales, sont bruns- noirs avec un halo jaune qui est particulièrement bien visible sur les feuilles des plants témoins (**Figure 46A, B, D**). En cas d'attaque sévère, les extrémités des feuilles flétrissent comme matérialisé par la **Figure 46C** montrant l'infection à 30%.



Figure 46: Symptômes de l'helminthosporiose sur les feuilles de riz inocuées par *B. oryzae* dont les semences ont été traitées à l'eau (contrôle A et C) aux extraits de *C. citratus* à 2%(D) et 4%(B)

III.4.2.3. Etude de la biologie de l'infection par *B. oryzae*

Pour apprécier en détail l'interaction du riz avec *B. oryzae*, le développement du champignon et les réactions de la plante au niveau cellulaire ont été étudiées aux jours 1, 3 et 5 à la microscopie optique, à fluorescence et électronique à balayage.

Les spores germent préférentiellement de manière bipolaire en formant deux tubes germinatifs (**Figure 47 et Figure 53**). Pour tous les traitements, aucune différence n'est observée dans la fréquence ou la morphologie des hyphes. On peut observer qu'au premier jour, les hyphes sont moins abondants qu'aux troisième et cinquième jours, et que dans plusieurs cas, la pénétration n'a pas eu lieu. La pénétration a quelques fois, causée une coloration marron au DAB pour un petit nombre de cellules (**Figure 48**). Au cours du développement de la maladie, la densité des hyphes a augmentée et les tubes germinatifs n'ayant pas causé la pénétration ont formés plus de branches. Des lésions apparaissent de plus en plus larges et noires, et les tissus plus dégradés (**Figure 47**)

La pénétration a eu lieu principalement à partir des appressoria au-dessus de la surface de la paroi cellulaire (**Figure 48**), mais aussi à travers les stomates (**Figure 49; Figure 50A**). L'apparition des appressoria varie du simple gonflement à la fin des tubes germinatifs à un nombre élevé le long de ce tube (Certains tubes germinatifs deviennent très longs avant de former l'appressorium, alors que d'autres le font directement). Les appressoria étaient clairement observés au microscope électronique à balayage; ils apparaissent sur la **Figure 50B** et la **Figure 51** fusionnés avec la surface de la feuilles de riz.

Un bon indicateur de la pénétration de *B. oryzae* était la survenue de la réaction d'hypersensibilité des cellules de l'épiderme des feuilles de riz; ce phénomène est bien visualisé par microscopie à fluorescence (**Figure 52**). Particulièrement en présence du *B. oryzae*, le plant de riz réagissait entraînant l'augmentation de la production de H₂O₂ (**Figure 53**). D'autre part il était vraiment difficile de déceler s'il y a eu formation des papilles pour prévenir l'entrée du champignon.

Le premier trait analysé par microscopie optique était la germination des conidies aux jours 1, 3 et 5 (**Tableau XIV**). Au premier jour, les plantes témoins ont présenté 96,7% de conidies germés, alors que seulement 46,7% et 73,3% de spores ont germé sur les plantes issues des semences traitées respectivement avec 2% et 4% d'extrait de *C. citratus*; il existe ici une différence significative entre les différents traitements. Aux troisième et cinquième jours, les taux de germination convergent vers des valeurs élevées et il n'y a pas de différences significatives entre les différents traitements.

Le deuxième trait observé était la formation des appressoriums qui sont nécessaires au champignon pour établir le contact avec l'hôte. Il n'y avait pas de différence significative entre les différents traitements pour ce caractère, aussi bien au jour 1 qu'aux jours 3 et 5. Si la spore pénétrait dans la cellule de la plante avec succès, la réponse hypersensible dans le tissu de la plante pouvait être détectée comme cellule épidermale fluorescente. Aucune différence significative n'est observée entre les différents traitements à toutes les dates. Aux jours 3 et 5, la HR était difficile à distinguer des symptômes marron naturels de l'infection et par conséquent il était difficile de déterminer si la plante a réagi par HR ou si c'est le champignon qui a causé la nécrose.

Tableau XIV: Evaluation quantitative du processus d'infection de *B. oryzae*, sur les feuilles de riz issues des semences traitées à l'eau (control) aux extraits de *C. citratus* à 2% et 4%

Traits caractérisant le processus de l'infection		Traitements			Odds ratio ^{a)}			
		2%	4%	Eau	2%	4%	Eau	
Pourcentage de conidies	Spores germées	J1	46,7	73,3	96,7	0,03**	0,09*	1
		J3	83,3	90,0	93,3	0,36NS	0,64 NS	1
		J5	90,0	86,7	86,7	1,40 NS	1,00 NS	1
	Appressoriums formés	J1	43,3	66,7	73,3	0,27 NS	0,72 NS	1
		J3	76,7	76,7	80,0	0,82 NS	0,82 NS	1
		J5	90,0	80,0	76,7	2,82 NS	1,23 NS	1
	Réaction d'hypersensibilité	J1	36,7	66,7	56,7	0,44 NS	1,53 NS	1
		J3	80,0	70,00	80,0	1,00 NS	0,58 NS	1
		J5	83,3	80,0	80,0	1,25 NS	1,00 NS	1

Odds ratio pour comparaison des traitements 2% et 4% au control (Odds ratio=1). Le nombre d'astérisque indique le niveau de significativité **=significatif à $P \leq 0,01$; *=significatif à $P \leq 0,05$ et NS= pas de différence significative

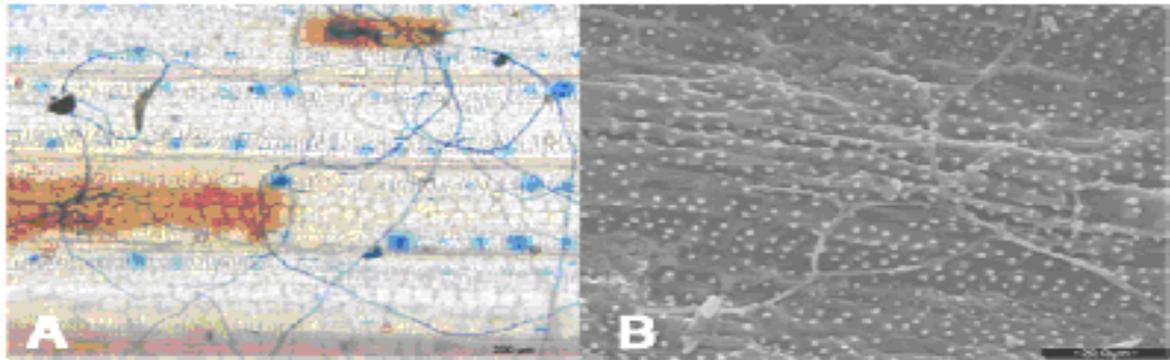


Figure 47: Croissance des hyphes de *B. oryzae* enregistrée au 3^{ième} jour, sur les feuilles de riz issues des semences traitées avec: (A) 4% d'extrait de *C. citratus* (microscopie optique); (B): 2% d'extrait de *C. citratus* (microscopie électronique à balayage)

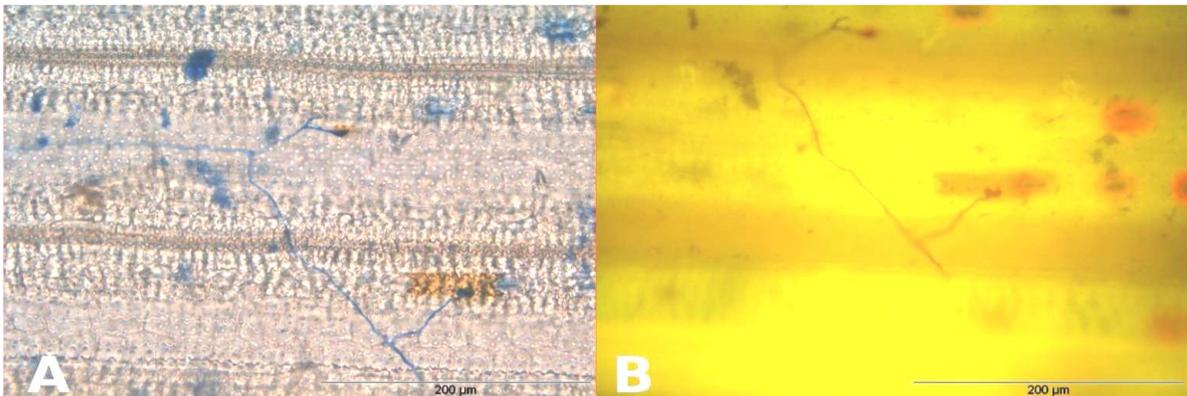


Figure 48: Pénétration de *B. oryzae* à travers la surface de la paroi cellulaire. (A) Accumulation de H_2O_2 dans une seule cellule, indiquant la réaction d'hypersensibilité (coloration marron); (B) montre le même motif en microscopie à fluorescence. Les photos ont été prises (au 1^{ier} jour) des feuilles de riz issues des semences traitées avec 2% d'extrait de *C. citratus* et colorées au DAB

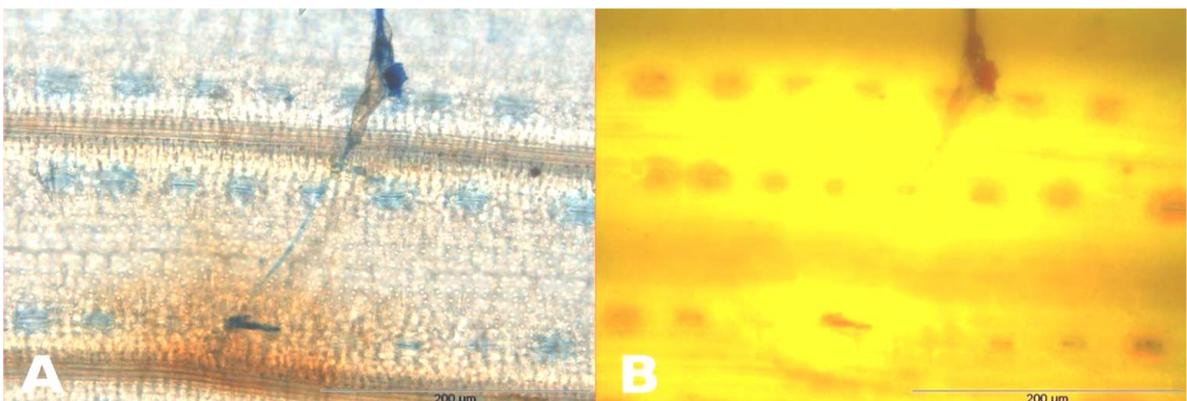


Figure 49: A) Pénétration de *B. oryzae* à travers le stomate sur la feuille de riz colorée au DAB pour la localisation de H_2O_2 ; (B) Montre le même motif en microscopie à fluorescence. La HR de la cellule pénétrée est clairement observée en utilisant la lumière à fluorescence. Les photos ont été prises (au 1^{ier} jour) des feuilles de riz issues des semences traitées l'eau et colorées au DAB

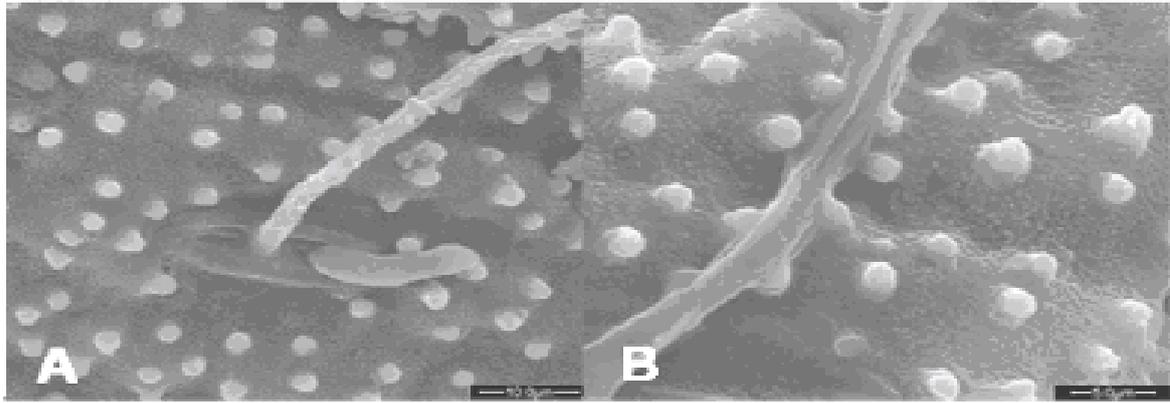


Figure 50: Microscopie électronique à balayage de la pénétration de *B. oryzae* à travers le stomate. (A) Le tube germinatif du champignon croît dans la feuille à travers le stomate; au même moment, un hyphe est probablement en croissance du stomate vers l'extérieur; (B) montre la liaison étroite de l'hyphe sur l'épiderme de la feuille de riz. Les photos ont été prises (au 3^{ième} jour) des feuilles de riz issues des semences traitées avec 4% d'extrait de *C. citratus*

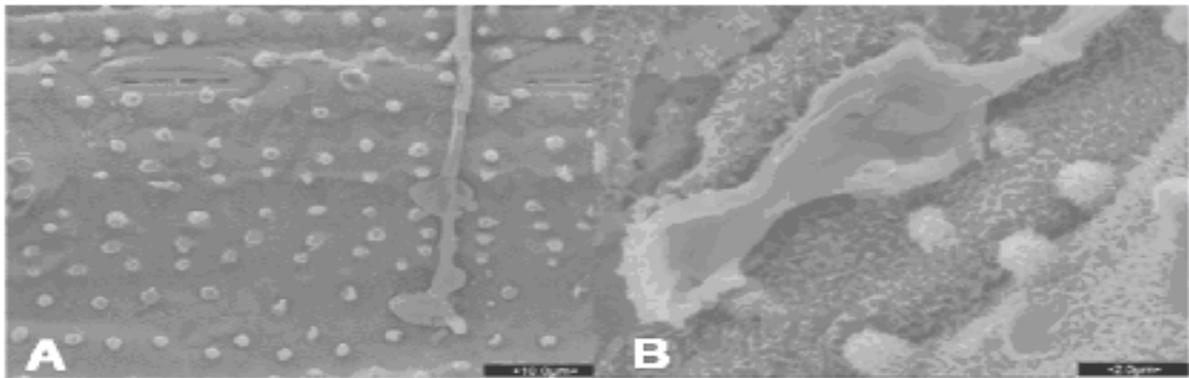


Figure 51: Appressorium ou structure d'attache du champignon, observé en microscopie électronique à balayage. Les photos ont été prises des feuilles de riz issues des semences traitées. (A) avec l'eau (contrôle); (B) avec 4% d'extrait de *C. citratus* au 5^{ième} jour

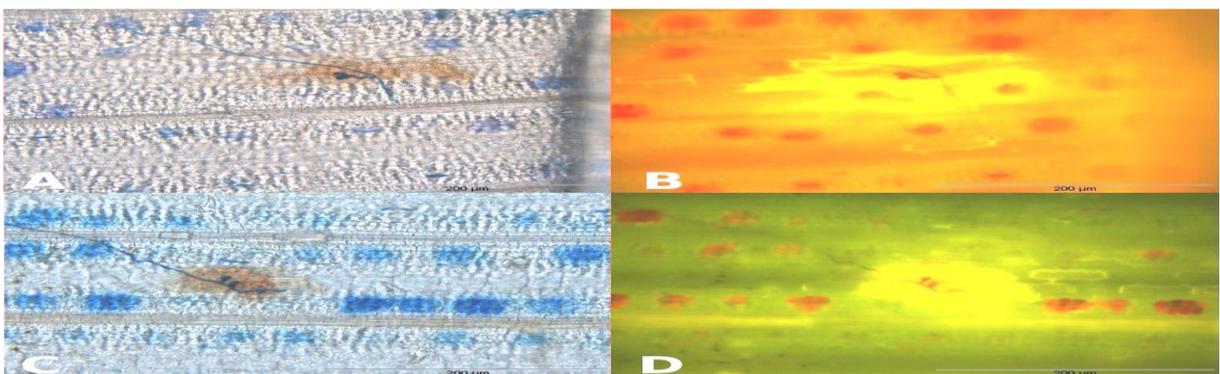


Figure 52: Réaction d'hypersensibilité (HR) multi cellulaire du riz en réponse à l'infection de *B. oryzae*, (A-C) microscopie optique après coloration au DAB pour la localisation de H_2O_2 ; (B-D) montre le même motif en microscopie à fluorescence; (A-B). Les feuilles de riz sont issues des semences traitées avec 2% d'extrait de *C. citratus* au 3^{ième} jour; (C-D) Les feuilles de riz sont issues des semences traitées avec 4% d'extrait de *C. citratus* au 3^{ième} jour après inoculation

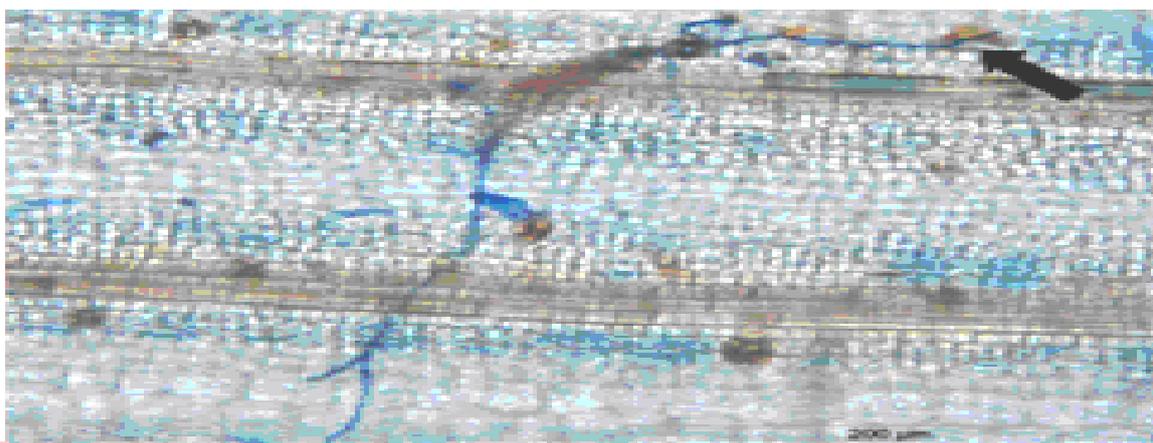


Figure 53: Accumulation de H₂O₂ indiquée par la coloration au DAB en relation avec la présence de *B. oryzae*, sur les feuilles de riz issues des semences traitées avec 2% d'extrait de *C. citratus* 12h après inoculation

III.4.3. Analyse des données des effets des extraits sur les marqueurs d'induction de la résistance, la croissance du riz, la sévérité de l'helminthosporiose et de la biologie de l'infection

III.4.3.1. Analyse des données des effets des extraits de plantes, sur des marqueurs d'induction de la résistance

En étudiant les mécanismes de défenses contre *B. oryzae* chez 12 variétés, **Bisen et al. (2015)** ont établi le lien selon lequel la forte concentration de protéines solubles dans les feuilles de riz entraînait la baisse de l'incidence de l'helminthosporiose. **Chinmay et al. (2010)** ont également montré que les traitements des semences de riz par *Trichoderma harzianum* et *Trichoderma viride* induisaient la résistance contre *B. oryzae*, avec réduction de la sévérité des taches brunes. L'induction était associée à plusieurs changements biochimiques incluant l'augmentation de la concentration des protéines solubles. Ces deux observations ne corroborent pas avec les résultats de ce travail, qui ont montré qu'en général, les teneurs en protéines solubles des plants de riz issus des semences traitées aux extraits de *C. citratus* et d'*O. barrelieri* (T2, T3 et T4) étaient plus faibles (bien que pour la plupart non significatives) comparé aux teneurs en protéines des plants témoins non traités (T0) qui par ailleurs ont eu une forte incidence d'infection. Ces analyses laissent penser que la réduction de l'incidence de la maladie ne serait pas fonction de la concentration des protéines solubles induites, mais tiendrait plutôt compte du type (qualité) de protéines impliquées dans le processus de défense activé; en spéculant que la nature (type) des protéines stimulées par les extraits de plantes chez le riz est différente des celles produites par les plants de riz témoins.

Matern et Kneusal (1988) ont proposé que, l'une des premières lignes importantes de la défense contre les agents pathogènes, est assurée par une accumulation rapide des composés phénoliques (phytoalexines) et leur polymérisation dans la membrane cellulaire; l'accumulation des phytoalexines peut précéder l'exposition de la plante à l'agent pathogène et/ou à un inducteur. **Kagale et al. (2004)** ont relevé un fort taux de phénols dans les feuilles de riz traitées avec les extraits de feuilles de *Datura metel* et inoculé par *Rhizoctonia solani* ou *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. Une plus grande accumulation en phénols a été observée chez les plants de riz traités aux extraits de *C. citratus* et d'*O. barrelieri*, à l'évaluation au 14^{ième} jour (**Figure 38**). Il a été nonobstant constaté une évolution en dent de scie du taux de phénols des différents traitements, durant toute la période de l'évaluation; cette observation peut laisser présager à une probable autorégulation de la concentration en phénol; cette dernière pouvant aussi être en équilibre avec d'autres molécules se trouvant dans le milieu.

Le soufre (S) élémentaire (Thiol) a été identifié comme une nouvelle phytoalexine susceptible de persister à plus de 60 jours dans certains tissus comme le xylème de *Theobroma cacao* (**Cooper et al., 1996**). A l'analyse du dosage des thiols de ce travail, Il apparaît évident de comprendre que les plants de riz issus des semences traitées avec les extraits de plantes de *C. citratus* et d'*O. barrelieri*, aient été plus résistantes à l'infection par *B. oryzae*; car, leurs concentrations en thiols ont été maintenues élevées à toute les périodes de l'évaluation, comparées à celles des témoins non traités. Dans le même ordre d'idée, **Williams et al. (2002)**, ont mis en évidence, une plus rapide et forte accumulation des thiols (cystéine S) dans les tissus vasculaires des plants de tomate résistants aux maladies fongiques. **Meyer, et al. (2012)** suggèrent que les thiols protéiques, notamment les thioredoxines et les glutaredoxines présents chez les plantes supérieures, sont en général parmi les éventuels composés à être impliqués dans le mécanisme de défense.

Il a été établi que le déficit en sel et en eau (**Miller et al., 2010**) peut conduire à l'augmentation des espèces oxygénés réactives (ROS) et conduire à une altération en aval du signal oxydatif; des évidences émergent que, le nombre de thiols protéiques et non protéiques ensemble avec le réseau de molécules contenant le soufre et les composés apparentés, contribuent fondamentalement à la tolérance de la plante au stress (**Colville et Kranner, 2010**). Ceci pourrait expliquer la plus grande sensibilité au stress hydrique observée chez les plants de riz issus des semences non traitées (faible concentration en groupes thiols) comparée à celle des plants de riz issus du traitement des semences avec les extraits de *C. citratus* et d'*O. barrelieri*. Plusieurs PR protéines incluant la β -1,3-

glucanase ont été détectées chez les plants de riz (**Sudisha et al., 2012**). Avec une réserve que les aléas environnementaux aient interféré dans les résultats de l'activité de la β -1,3-glucanase; et comme aussi observé par **Mosch et al. (1995)**; différents extraits de plantes ont différents comportements à l'égard de la stimulation d'un marqueur de l'induction. En effet, les traitements des semences et des plants de riz d'une part avec les extraits de *C. citratus* et d'autre par les extraits d'*O. barrelieri*, ont eu des comportements différents eu égard à l'activité de la β -1, 3-glucanase: l'activité de la β -1,3-glucanase a été significativement plus élevée pour les essais ayant été traités à l'évaluation au 14^{ième} jour; cependant, à l'évaluation au 21^{ième} jour et au 28^{ième} jour, les activités de la β -1,3-glucanase ont en général été significativement plus grandes pour les essais traités avec l'extrait de *C. citratus*, comparées aux témoins, alors que les activités de la β -1,3-glucanase des essais témoins non traités, ont été significativement plus grande que les activités des essais traités avec *O. barrelieri*. **Gupta et al. (2013)** ont montré que l'activité de la β -1,3-glucanase était plus importante chez les plantes jeunes (10 jours) comparé aux plantes plus âgées (30 jours); ils ont suggéré la forte activité métabolique des cellules en croissance pour expliquer cela chez les jeunes plantes. En se référant à nos résultats, nous pouvons aussi noter la forte activité de la β -1,3-glucanase à l'évaluation au 14^{ième} jour comparée à l'activité aux 21^{ième} et 28^{ième} jours, pour ce qui est des traitements avec *O. barrelieri*; l'effet contraire a été observé pour les traitements avec *C. citratus*, mais, cette dernière observation corrobore avec la remarque de **Sudisha et al. (2012)** selon laquelle «l'induction des PR-protéines, lorsque mesurée en tenant compte de l'échelle de temps est un phénomène tardif, et son effet sur l'infection précoce est limité»; toutefois, des études extensives sont nécessaires pour maîtriser l'échelle de temps en relation avec l'expression des PR protéines.

Les activités des peroxydases des plants de riz traités avec les extraits de *C. citratus* ont été significativement supérieures aux activités des témoins dans toutes les périodes de l'évaluation; ce qui est conforme avec les résultats de **Navodit et Prabir (2015)** qui ont relevé une accumulation des peroxydases après traitement des tomates par les extraits de fruits de *neem*; cependant ces mêmes auteurs ont établi que l'expression et la capacité d'induction des peroxydases par un facteur biotique varie avec l'âge de la plante; chose que nous n'avons pas vraiment appréciée dans notre travail. Tout à l'inverse les activités des peroxydases des plants de riz traités avec les extraits d'*O. barrelieri* ont été comparables, voir inférieures à celles des témoins aux évaluations aux 14^{ième}, 21^{ième} et

28^{ième} jours, laissant ainsi croire à l'existence d'un plausible métabolite inhibiteur de la peroxydase dans l'extrait d'*O. barrelieri*.

Németh et al. (2009) ont établi une corrélation linéaire entre l'activité des peroxydases et celles des polyphénols oxydase chez les plants de haricot; ces auteurs ont d'ailleurs été plus précis en spécifiant que; s'il y a une faible activité spécifique des peroxydases, une faible activité des polyphénols oxydases y sera associé. Un effet totalement contraire a été observé avec les plants de riz traités avec les extraits d'*O. barrelieri*; en effet les activités des polyphénols oxydases pour les plants de riz traités avec les extraits d'*O. barrelieri* ont été significativement plus importantes que celles des témoins, alors que dans l'évaluation de l'activité des peroxydases, les activités des plants de riz traités avec les extraits d'*O. barrelieri* étaient moins importantes que celles des témoins.

En dehors de l'évaluation 28^{ième} jour, où l'activité de l'amylase du traitement témoin (T0) a été significativement supérieure aux activités des plants de riz traités avec *O. barrelieri*, tous les autres essais ont montré une forte activité des plants riz traités par les extraits de plantes; cependant, cette activité n'est pas fonction de la concentration de l'extrait de plante; ce résultat corrobore avec ceux de **Wang et al. (2015)** qui ont par ailleurs établi que le prétraitement des semences et des plantules de riz était associé à une meilleure germination/émergence et une croissance rapide des plantules. L'état de bonne croissance pouvant aussi être le gage de bonne santé.

Comme les compositions chimiques en métabolites des extraits de plantes (EEc, EEO, EAc et EAo) utilisés pour induire la résistance, sont différentes, il ne serait pas anormal de penser que les différences de teneurs en métabolites même des extraits soient déjà un facteur discriminatoire pour faire la différence au niveau de l'induction de la résistance; On peut dès lors, comprendre que les extraits éthanoliques et aqueux de *C. citratus* (EEc et EAo) qui ont été plus riches en acide salicylique comparés aux extraits d'*O. barrelieri* qui d'ailleurs en étaient dépourvus soient meilleurs à induire la résistance. En fait l'acide salicylique fait partie des molécules qui induisent la résistance systémique acquise chez la plante (**Guleria et al., 2005**). Il est aussi bien connu que l'application exogène, des concentrations même micro molaires de divers éliciteurs abiotiques, entre autre l'acide salicylique, induisent la production de divers PR protéines et les gènes des PR protéine: PR-1, 2, 5, 8, 11 chez le riz (**Sudisha et al., 2012**).

III.4.3.2. Analyse des effets des traitements par les extraits de plantes, sur la germination et la croissance des plantes de riz

Tripathi et Shukla (2010) ont signalé que les extraits de plantes peuvent stimuler la croissance des espèces végétales ciblées. Dans nos essais, les semences traitées avec les extraits de *C. citratus* et d'*O. barrelieri* ont montré une meilleure performance en ce qui concerne la germination et la croissance par rapport aux témoins. En outre, les hauteurs des plantes dont les semences ont été traitées par l'extrait de *C. citratus* ont été significativement augmentées par rapport aux hauteurs des plantes témoins; cela montre que le traitement des semences a eu un effet positif général pour le développement précoce de la plante. Une stimulation de la germination et de la vigueur de la plante après les traitements de semences du blé avec différents extraits de plantes a également été démontrée par **Hasan et al. (2005)**; avec les extraits à l'éthanol de *neem* (*Azadirachta indica*) et d'ail (*Allium sativum*) particulièrement efficaces.

Un aspect controversé de la résistance induite est le coût de l'énergie pour la culture (**Walters et Heil, 2007**); ceci n'est pas le cas si l'on s'en tient aux données quantitatives de la germination en présence des extraits de *C. citratus* et d'*O. barrelieri*, dans lesquelles, les performances des témoins (T0) ont été inférieures à celles des traitements aux extraits T2, T3 et T4 (pas de diminution de la performance de la culture). Cependant, si l'on compare les traitements aux extraits de plantes T2, T3 et T4 entre eux, on se rendra compte que le traitement T4 qui est plus concentré en extrait, a plus diminué la sévérité de l'infection (par *B. oryzae*); mais son taux de germination est resté inférieur à ceux de T2 et T3, qui sont moins concentrés en extrait (diminution de la performance de la culture). Ainsi, une adéquation entre la concentration de l'extrait de plante contrôlant un certain niveau d'infection de l'agent pathogène, et le maintien des performances de la plante (germination, vigueur, biomasse...), devrait être prise en considération dans ce type de travail pour une exploitation pratique (en champ) des résultats.

III.4.3.3. Analyse des effets des extraits de plantes sur de la sévérité de l'helminthosporiose et la biologie de l'infection

La gravité de la maladie est un bon indicateur de l'effet d'un traitement pour la lutte contre la maladie dans l'agriculture pratique. Le score de la gravité de la maladie a montré que les plantes traitées à l'eau présentaient des symptômes de 4 à 5 fois plus élevés que ceux des plantes traitées aux extraits. Pour des raisons expérimentales, les plantes ont été inoculées avec une concentration très élevée de spores (10000 conidies / mL), ce qui pourrait se produire rarement dans des conditions naturelles; ceci était cependant,

nécessaire pour assurer une infection suffisante; par exemple pour pouvoir détecter les différences de taux de germination des spores dans les études microscopiques. Ces conditions extrêmes pour le test doivent être prises en considération lors de l'interprétation des résultats. D'autres expériences pourraient être menées avec une concentration qui reflète un niveau d'inoculum plus naturel.

Les études de la biologie des infections faites au moyen du microscope n'ont révélé que des différences significatives dans le taux de germination des spores, au 1^{ier} jour après inoculation. En ce qui concerne la formation de l'appressorium et la survenue de la réaction d'hypersensibilité (HR), il n'y avait pas de différences significatives. Aux 3^{ième} et 5^{ième} jours, aucun trait n'a montré une différence significative. Ce résultat implique que, la germination des spores de *B. oryzae* sur les plants de riz traités par les extraits de *C. citratus*, est inhibée pendant les premiers stades de l'infection.

Les données dans le **Tableau XIII** montrent que les plantes traitées avec l'extrait de *C. citratus* 4% sont en général moins infectées que les plantes traitées à 2%. Ce résultat ne correspond pas avec les classements respectifs de la germination des spores, de la formation d'appressoriums et de la réaction d'hypersensibilité du **Tableau XIV** montrant que les plantes traitées avec 2% d'extrait semblaient moins affectées par *B. oryzae* au 1^{ier} jour après inoculation. L'explication de ce contraste peut être justifiée par: premièrement, la germination des spores, la formation d'appressoriums et la réaction d'hypersensibilité représentent des événements clés dans la biologie de l'infection, mais ne peuvent pas expliquer à eux seuls les niveaux d'infection finaux car, d'autres réactions de défenses non étudiées dans le présent travail seraient aussi entrées en jeu. Deuxièmement, selon **Steiner et Schönbeck (1995)**, l'un des critères de vérification de l'implication de la résistance induite dans la protection contre la maladie, est l'absence typique d'une corrélation dose-réponse; ainsi, même de faibles quantités d'éliciteurs peuvent induire une résistance.

À l'aide d'un microscope optique, il était difficile de suivre la pénétration du champignon (*B. oryzae*) ou de voir les réactions de la plante sous la surface de la feuille; cependant, Il est très probable que la plante forme des papilles qui sont associées au dépôt de callose afin d'éviter une pénétration fongique, si l'on se rappelle que **Huy et al. (2002)** ont identifié des papilles au moyen de microscopie à fluorescence dans l'interaction de *B. oryzae* et du riz.

Une observation intéressante a été faite au microscope électronique à balayage: les hyphes semblent fusionner avec la surface de la plante. Ainsi, Il existe probablement une interaction intime entre l'hôte et l'agent pathogène peut-être liée au fait que le champignon

a produit des polysaccharides extracellulaires ou des enzymes qui peuvent dégrader les parois cellulaires de la plante. En effet, l'interaction champignon-plante peut libérer des enzymes qui commencent à dégrader le pathogène, de sorte que le champignon libère des éliciteurs qui pourraient déclencher des réponses de défense dans la plante (Deacon, 2006). Le fait que certains tubes germinaux aient augmenté pendant de très longues distances avant que la pénétration n'ait eu lieu, indique que *B. oryzae* n'a pas eu les conditions optimales pour se développer ou pour faire la pénétration.

III.5. Effets des traitements sur les paramètres de production en champ

III.5.1. Effets des traitements sur les paramètres de production en riziculture irriguée et en riziculture pluviale

III.5.1.1. Riz pluvial (Upland rice)

L'analyse multivariée de la variance (MANOVA) à deux facteurs a été utilisée pour rechercher l'existence de différences entre les traitements aux extraits de plantes (T₀, T₁, T₂, T₃, T₄), les variétés de riz (RR, N₃, N₁₃) et l'interaction traitement* variété; sur la combinaison linéaire de la levée, du tallage/m², du nombre de panicules/m², de la sévérité de l'helminthosporiose à la floraison, de la sévérité de l'helminthosporiose à la maturité et la production/m². Les tests multivariés de significativité pour les effets principaux des variables inter-groupes (**Tableau XV**) ont révélé que; pour les quatre tests multivariés (Pillai's, Wilks', Hotelling's, Roy's), les effets principaux pour; le traitement (critère de Pillai = 2,263; F (24, 112) = 6,082, $p < 0,001$, multivariate $\eta^2 = 0,566$), la variété (critère de Pillai = 1,859; F (12, 56) = 57,051, $p < 0,001$, multivariate $\eta^2 = 0,929$) et l'interaction traitement* variété (critère de Pillai = 3,353; F (48, 180) = 4,752, $p < 0,001$, multivariate $\eta^2 = 0,559$) sont significatifs ($P < 0,01$); indiquant que, T₀ lorsque comparé à T₁ T₂, T₃ et T₄; RR lorsque comparé à N₃,et N₁₃, diffèrent significativement quant à leurs levée, tallage/m², panicules/m², sévérité de l'helminthosporiose à la floraison, sévérité de l'helminthosporiose à la maturité et production/m².

Tableau XV: Tests multivariés de significativité pour les effets principaux des variables intra-groupes

Tests multivariés^a

Effet		Valeur	F	ddl de l'hypothèse	Erreur ddl	Signification	Eta-carré partiel
Variété	Trace de Pillai	1,859	57,051	12,000	52,000	,000	,929
	Lambda de Wilks	,001	179,557 ^b	12,000	50,000	,000	,977
	Trace de Hotelling	272,502	545,004	12,000	48,000	,000	,993
	Plus grande racine de Roy	266,226	1153,647 ^c	6,000	26,000	,000	,996
Traitement	Trace de Pillai	2,263	6,082	24,000	112,000	,000	,566
	Lambda de Wilks	,003	15,625	24,000	88,425	,000	,764
	Trace de Hotelling	50,763	49,706	24,000	94,000	,000	,927
	Plus grande racine de Roy	47,623	222,240 ^c	6,000	28,000	,000	,979
Variété * Traitement	Trace de Pillai	3,353	4,752	48,000	180,000	,000	,559
	Lambda de Wilks	,001	9,026	48,000	127,073	,000	,704
	Trace de Hotelling	43,123	20,962	48,000	140,000	,000	,878
	Plus grande racine de Roy	36,665	137,492 ^c	8,000	30,000	,000	,973

a. Plan : Variété + Traitement + Variété * Traitement

b. Statistique exacte

c. La statistique est une borne supérieure de F qui produit une borne inférieure sur le niveau de signification.

Les résultats des tests inter-sujets montrant les effets principaux des variables indépendantes (Traitement, variété et interaction traitement* variété) sur chacune des six (6) variables dépendantes (levée, tallage/m², panicules/m², sévérité de l'helminthosporiose à la floraison, sévérité de l'helminthosporiose à la maturité et production/m²), sont présentés dans le **Tableau XVI**. A l'exception de la production/m² ($F(2, 30) = 3,274$, $p = 0,052$, $\eta^2 = 0,015$), les différences significatives ($p < 0,05$) au regard de la variété, ont été trouvées pour toutes les variables dépendantes. Les différences significatives de traitement ($p < 0,05$) existent pour toutes les variables dépendantes. L'effet de l'interaction traitement* variété sur le nombre de panicule/m² n'a pas été significatif ($F(8, 30) = 2,123$, $p = 0,065$, $\eta^2 = 0,143$). Les variances dans; la levée (48,9%), la sévérité de l'helminthosporiose à la floraison (75,7%) et la sévérité de l'helminthosporiose à la maturité (90,5%) ont été essentiellement expliquées par la variété; alors que les variances dans le tallage/m² (37,2%), le nombre de panicules/m² (32,9%) et la production/m² (80,0%) l'étaient par le traitement.

Tableau XVI: Effets du traitement et de la variété sur; la levée, le tallage/m², le nombre de panicules/m², la sévérité de l'helminthosporiose à la floraison, la sévérité de l'helminthosporiose à la maturité et la production/m² en riziculture pluviale

Sources	Variables dpt	∑ Carée (III)	Ddl	CM	F	P	η ²
Variété	Levée (%)	1317,197	2	658,599	81,009	<0,001	0,489
	Tallage/m ²	26684,4	2	13342,2	29,708	<0,001	0,339
	Panicules/m ²	25252,044	2	12626,022	16,325	<0,001	0,275
	Production/m ² (g)	9121,785	2	4560,893	3,274	0,052	0,015
	S. H. F	225,122	2	112,561	1305,07	<0,001	0,757
	S. H. M	3092,962	2	1546,481	2470,87	<0,001	0,905
Traitement	Levée (%)	619,815	4	154,954	19,060	<0,001	0,230
	Tallage/m ²	29271,333	4	7317,833	16,294	<0,001	0,372
	Panicules/m ²	30219,867	4	7554,967	9,769	<0,001	0,329
	Production/m ² (g)	470773,38	4	117693,34	84,496	<0,001	0,800
	S. H. F	39,383	4	9,846	114,154	<0,001	0,116
	S. H. M	196,189	4	49,047	78,365	<0,001	0,057
Variété *	Levée (%)	511,253	8	63,907	7,861	<0,001	0,189
Traitement	Tallage/m ²	9214,933	8	1151,867	2,565	0,029	0,011
	Panicules/m ²	13134,4	8	1641,8	2,123	0,065	0,143
	Production/m ² (g)	66152,057	8	8269,007	5,937	<0,001	0,104
	S. H. F	69,64	8	8,705	100,929	<0,001	0,206
	S. H. M	109,669	8	13,709	21,903	<0,001	0,053
Erreur	Levée (%)	243,9	30	8,13			
	Tallage/m ²	13473,333	30	449,111			
	Panicules/m ²	23202	30	773,4			
	Production/m ² (g)	41786,677	30	1392,889			
	S. H. F	2,587	30	0,086			
	S. H. M	18,777	30	0,626			

ddl: degré de liberté; η^2 : Eta carré **CM**: Carrée Moyen; **dpt**: dépendante; **S.H.F**: Sévérité de l'helminthosporiose à la floraison; **S.H.M**: Sévérité de l'helminthosporiose à la maturité

Le test de comparaison multiple de student Newman keul's a été utilisé pour détecter les natures des différences entre les modalités des variables indépendantes; traitements (T₀, T₁, T₂, T₃ et T₄) d'une part et variétés (RR, N₃, et N₁₃) d'autre part pour chacune des variables dépendant; les résultats sont présentés dans le **Tableau XVII**. En ce qui concerne la variété; la levée de RR (M = 75%) est plus importante et significativement différente de celle de N₁₃ (M = 63,7%), mais identique à celle de N₃ (M = 75,1%); le tallage/m² et le nombre de panicules/m² suivent une tendance comparable à la levée. La production/m² qui a été plus importante pour la variété N₃ (M = 509,6g) est statistiquement

similaire à la production/m² de N₁₃ (M=494,8g) et significativement différente de à la production/m² de RR (M = 474,8g). La sévérité de *B. oryzae* à la floraison (M = 6,6%) comme à la maturité (M = 25,3%) a été maintenu significativement élevée pour RR comparé à N₃ (1,8-7,5%) et N₁₃ (1,5-7,8%); il peut être remarqué un bon important (quatre fois) de la sévérité de l'helminthosporiose du passage du stage de floraison au stage de la maturité.

Tableau XVII: Comparaisons des moyennes marginales pour le traitement et la variété comme une fonction de la levée, tallage/m², du nombre de panicules/m², de la sévérité de l'helminthosporiose à la floraison, de la sévérité de l'helminthosporiose à la maturité et de la production/m² en riziculture pluviale

G		n	Levée (%)	Tallage/m ²	Panicules/m ²	Production/m ²	S. H. F	S. H. M
Trait	T ₀	9	64,5 ^a ± 5	278,6 ^a ± 46,9	239,6 ^a ± 43,7	309 ^a ± 76,3	4,4 ^a ± 3,7	16,8 ^a ± 11,8
	T ₁	9	71,5 ^b ± 9,7	304,1 ^b ± 36,4	267,5 ^a ± 35,9	483,6 ^b ± 52	4,2 ^a ± 3,5	14,9 ^b ± 9,3
	T ₂	9	72,4 ^{bc} ± 4,3	280,7 ^a ± 38,5	252 ^a ± 40,8	499 ^b ± 24,7	3,8 ^b ± 3	13,3 ^c ± 8,1
	T ₃	9	75,6 ^c ± 7,5	334,6 ^c ± 23,9	286,5 ^{bc} ± 45,2	606,6 ^d ± 44,3	2,3 ^c ± 0,8	11,6 ^d ± 7,6
	T ₄	9	72,9 ^{bc} ± 7,8	338,4 ^c ± 24,13	313 ^c ± 27,7	566,6 ^c ± 115,5	2,2 ^c ± 0,7	11,1 ^d ± 7,1
Var	RR	15	75,3 ^b ± 7,6	325,9 ^b ± 33,6	291,1 ^b ± 33,6	474,8 ^a ± 142,7	6,6 ^b ± 2,8	25,3 ^b ± 4,4
	N ₃	15	75,1 ^b ± 5,2	323,1 ^b ± 21,8	285,7 ^b ± 25,47	509,6 ^b ± 76,5	1,8 ^a ± 0,18	7,5 ^a ± 1,36
	N ₁₃	15	63,7 ^a ± 3,5	272,9 ^a ± 45,8	238,4 ^a ± 54,5	494,8 ^b ± 122,9	1,8 ^a ± 0,17	7,8 ^a ± 1,04

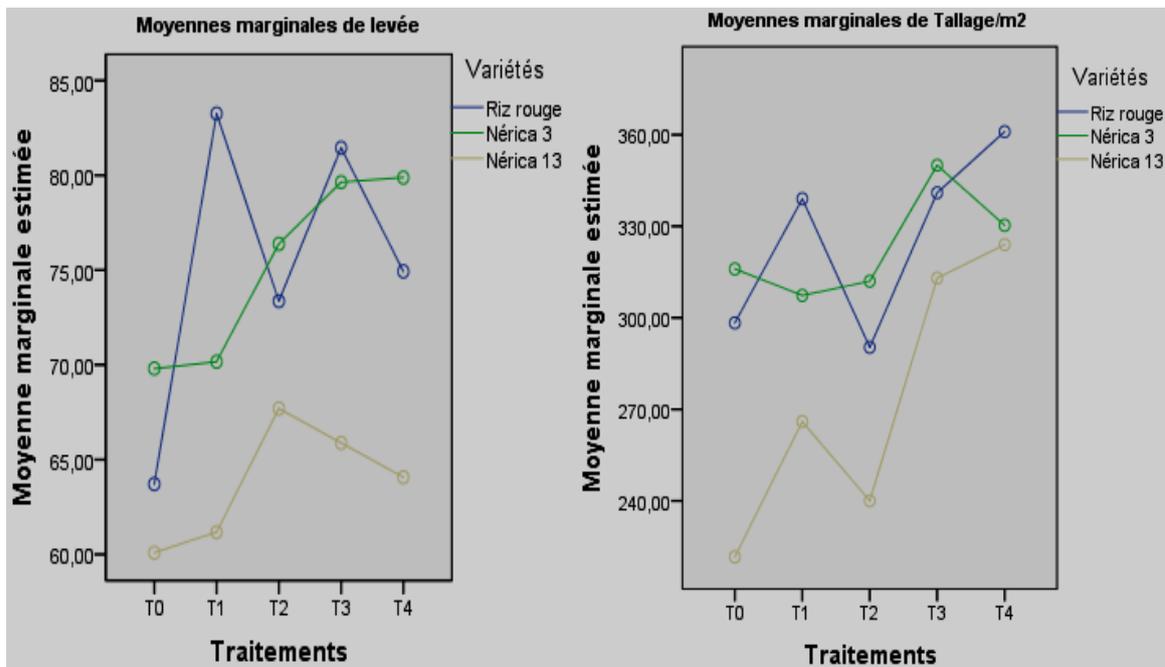
G: Groupe; **Trait:** Traitement; **Var:** Variété; **S.H.F:** Sévérité de l'helminthosporiose à la floraison; **S.H.M:** Sévérité de l'helminthosporiose à la maturité. Les valeurs des groupes différents (traitement et variété) sur une même colonne et portant des lettres différentes sont significativement différentes au seuil 95% ($p < 0,05$) selon S-N-K. Témoin non traité (**T₀**); Traitement avec le NaCl 20% (**T₁**); Traitement avec 20% de NaCl + Trempage dans la solution 1% de l'extrait à l'éthanol d'*O. barrelieri* pendant 24H (**T₂**); Traitement avec 20% de NaCl + Trempage dans la solution 1% de l'extrait à l'éthanol d'*O. barrelieri* pendant 24H + Pulvérisation de 2% de l'extrait à l'éthanol d'*O. barrelieri* à 300L/Ha au 14^{ième} jour + pulvérisation de l'extrait aqueux d'*O. barrelieri* (20g de poudre par litre d'eau) à 556L/Ha chaque deux semaines jusqu'au stade de grain dur (**T₃**); Traitement avec 20% de NaCl + Trempage dans la solution 1% de l'extrait à l'éthanol d'*O. barrelieri* pendant 24H + Pulvérisation de 2% de l'extrait à l'éthanol de *C. citratus* à 300L/Ha au 14^{ième} jour + Pulvérisation de l'extrait aqueux de *C. citratus* (20g de poudre par litre d'eau) à 556L/Ha chaque deux semaines jusqu'au stade de grain dur (**T₄**).

L'infection de *B. oryzae* se présentait, non seulement sous forme de spots, mais aussi comme de toiles d'araignées (**Figure 54A**), et colonisait souvent les grains des plants du riz rouge (**Figure 54B**); par ailleurs, sa verse à la suite des intempéries (vent fort), était sans aucun doute plus importante que celle du NERICA (**Figure 54C**)



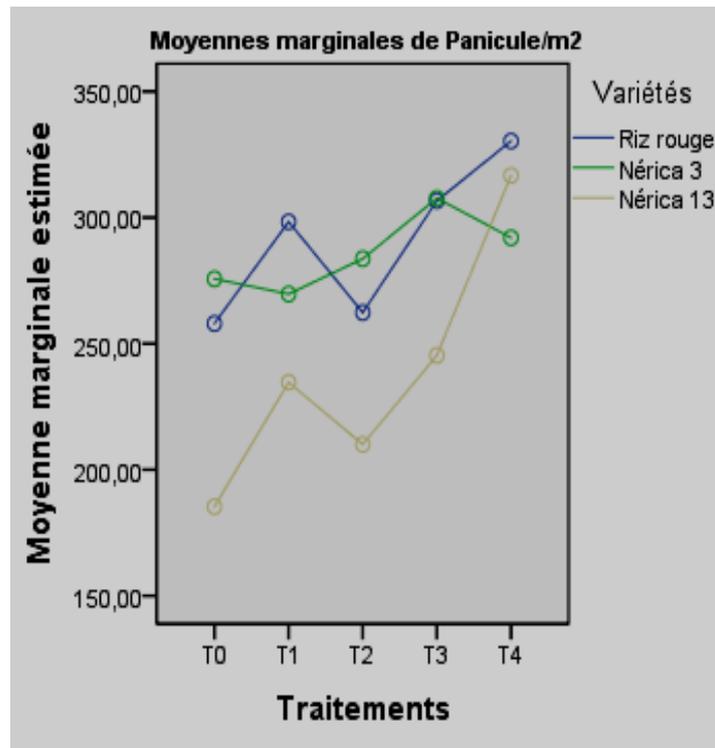
Figure 54: Riz rouge présentant la colonisation de la feuille par *B. oryzae* sous forme de toile d'araignée (A), la colonisation de la panicule par *B. oryzae* (B) et la sensibilité à la verve (C)

Pour ce qui est de la variable traitement; la levée de T₀ (64,5%) a été la moins importante, et a été significativement différente de celle de T₁ (71,5%); la levée a été plus importante pour les semences traitées aux extraits de plantes (T₂, T₃ et T₄), cependant avec de légers écarts (**Figure 55A**) entre ces traitements qui étaient pourtant identiques à la base. Le tallage/m² et le nombre de panicule/m² de T₄ (338,4 - 313) et T₃ (334,6 - 338,4), statistiquement identiques, ont été les plus importants; ceux de T₂ sont assez faibles, particulièrement pour RR et N₁₃, au point d'être comparables à ceux des semences non traités T₀ (**Figure 55B**). La production/m² a été très hétérogène; et les lots qui en plus du traitement des semences ont reçu des traitements en champ (T₃ et T₄) ont eu les plus grands rendements chez toute les trois variétés de riz (**Figure 55C**); suivant l'ordre de production/m² décroissante on a: T₃ (606,6^d), T₄ (566,6^c), T₂ (499^b), T₁ (483,6^b) et T₀ (309^a). On peut remarquer que T₂ et T₃, dont le tallage/m² et nombre de panicules/m² étaient respectivement inférieur à ceux de T₁ et T₄, se retrouvent avec des rendements plus grands que ceux de ces derniers. La S. H. F est nettement inférieur à la S. H. M, ceci pour tous les traitements; cette sévérité a été la maximale pour T₀ de RR, avec des taux respectifs de 9,36% et 32,44% aux deux stades d'évaluations. Les lots du RR qui en plus du traitement des semences ont reçu des traitements en champ (T₃ et T₄) ont été moins sensibles à l'attaque de *B. oryzae*, dans les deux stades de développements; ceci était moins perceptible pour les variétés N₃ et N₁₃ (**Figure 56**).



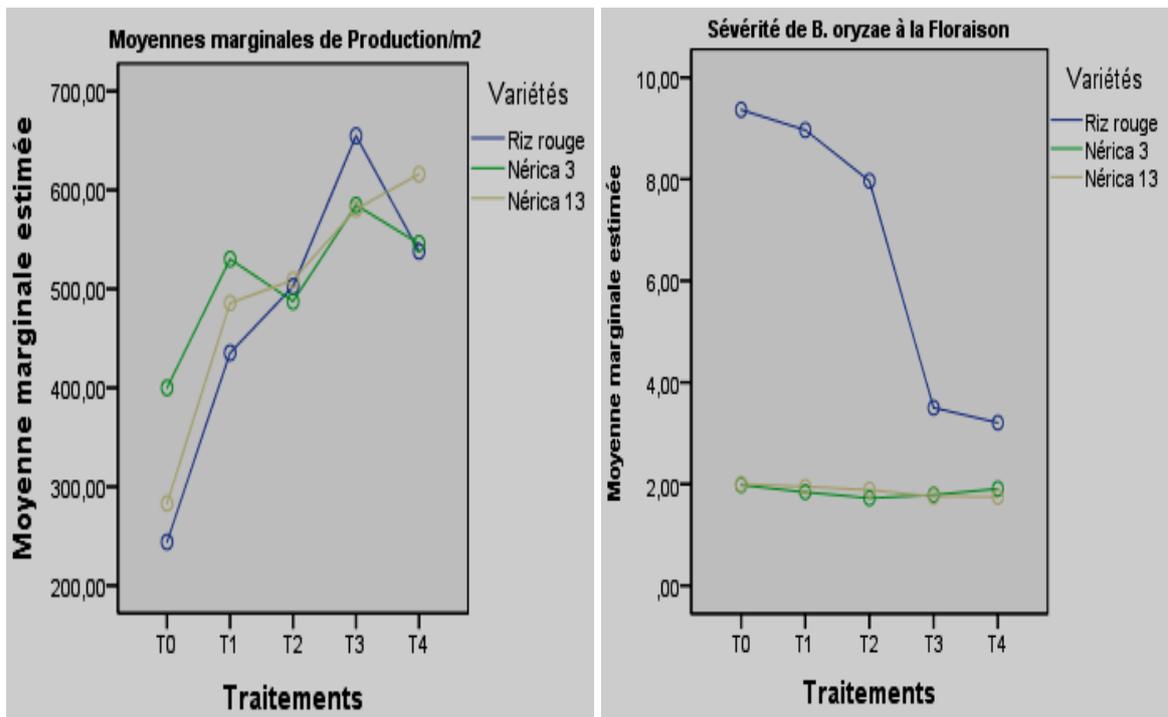
A

B



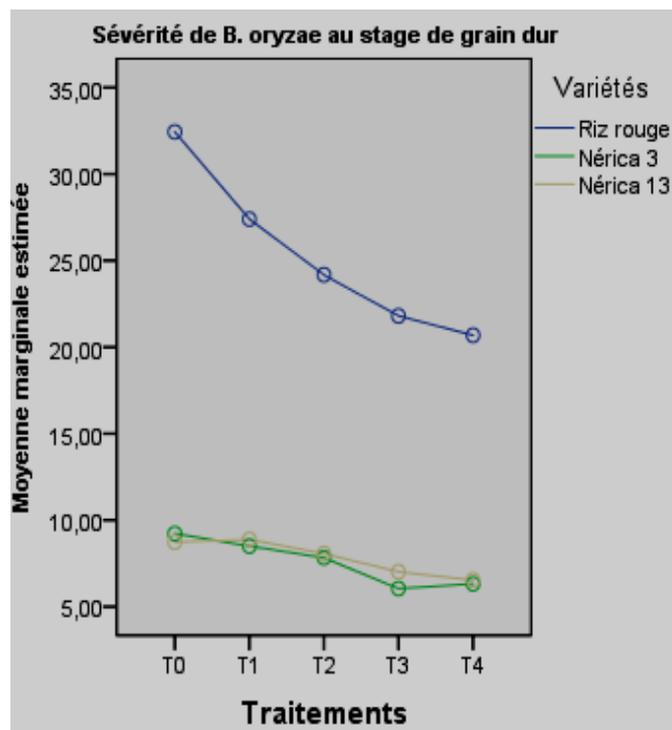
C

Figure 55: Moyennes marginales de (A) levée, (B) tallage/m², (C) panicule/m² en fonction des différents traitements et suivant les variétés de riz RR, N₃ et N₁₃



A

B



C

Figure 56: Moyennes marginales de (A) production/m², (B) S.H.F, (C) S.H.M en fonction des différents traitements et suivant les variétés de riz RR, N₃ et N₁₃

Pour apprécier de près si les variations du principal paramètre ciblé (production/m²) pour différents traitements et variétés de riz n'étaient pas exclusivement due à la levée initiale, les données ont été réentrées pour l'analyse multivariée de la variance à deux

facteurs, avec comme variables dépendantes: degré de tallage (tallage/levée), panicules/levée, panicule/tallage, production/levée production/tallage et production /panicule.

A partir des tests multivariés de significativité pour les effets principaux des variables inter - groupes (**Tableau XVIII**), on peut dire que les effets principaux pour; le traitement (critère de Pillai = 1,644; $F(24, 112) = 3,256, p < 0,001$, multivariate $\eta^2 = 0,411$), la variété (critère de Pillai = 0,741; $F(12, 52) = 2,552, p = 0,01$, multivariate $\eta^2 = 0,371$) et l'interaction traitement* variété (critère de Pillai = 2,143; $F(48, 180) = 2,084, p < 0,001$, multivariate $\eta^2 = 0,357$) sont significatifs ($P < 0,01$); indiquant que, T₀ lorsque comparé à T₁ T₂, T₃ et T₄; RR lorsque comparé à N₃, et N₁₃ diffèrent significativement quant à leurs degré de tallage, panicules/levée, panicule/tallage, production/levée, production/tallage et production/panicule.

Tableau XVIII: Tests multivariés de significativité pour les effets principaux des variables inter–groupes

Tests multivariés ^a							
Effet		Valeur	F	ddl de l'hypothèse	Erreur ddl	Signification	Eta-carré partiel
Constante	Trace de Pillai	1,000	228788,928 ^b	6,000	25,000	,000	1,000
	Lambda de Wilks	,000	228788,928 ^b	6,000	25,000	,000	1,000
	Trace de Hotelling	54909,343	228788,928 ^b	6,000	25,000	,000	1,000
	Plus grande racine de Roy	54909,343	228788,928 ^b	6,000	25,000	,000	1,000
Variété	Trace de Pillai	,741	2,552	12,000	52,000	,010	,371
	Lambda de Wilks	,285	3,645 ^b	12,000	50,000	,001	,467
	Trace de Hotelling	2,424	4,848	12,000	48,000	,000	,548
	Plus grande racine de Roy	2,386	10,340 ^c	6,000	26,000	,000	,705
Traitement	Trace de Pillai	1,644	3,256	24,000	112,000	,000	,411
	Lambda de Wilks	,042	5,486	24,000	88,425	,000	,549
	Trace de Hotelling	9,141	8,950	24,000	94,000	,000	,696
	Plus grande racine de Roy	7,691	35,893 ^c	6,000	28,000	,000	,885
Variété * Traitement	Trace de Pillai	2,143	2,084	48,000	180,000	,000	,357
	Lambda de Wilks	,041	2,408	48,000	127,073	,000	,412
	Trace de Hotelling	5,238	2,546	48,000	140,000	,000	,466
	Plus grande racine de Roy	2,434	9,128 ^c	8,000	30,000	,000	,709

a. Plan : Constante + Variété + traitemnt + Variété * traitemnt

b. Statistique exacte

c. La statistique est une borne supérieure de F qui produit une borne inférieure sur le niveau de signification.

Les résultats des tests inter - sujets montrant les effets principaux du traitement, de la variété et de leur interaction sur chacune des variables dépendantes (degré de tallage, panicules/levée, panicule/tallage, production/levée, production/tallage et

production/panicule) sont présentés dans le **Tableau XIX**. On peut y voir que, exception faite du degré de tallage ($F(2, 30) = 0,119$, $p = 0,888$, $\eta^2 = 0,0028$), du nombre de panicules/levée ($F(2, 30) = 0,448$, $p = 0,643$, $\eta^2 = 0,010$), de panicule/tallage ($F(2, 30) = 0,262$, $p = 0,772$, $\eta^2 = 0,012$) regardant la variété; de panicule/tallage ($F(4, 30) = 1,358$, $p = 0,272$, $\eta^2 = 0,126$) à l'égard du traitement; et de panicule/tallage ($F(8, 30) = 0,028$, $p = 0,585$, $\eta^2 = 0,155$) et production/panicule ($F(8, 30) = 1,788$, $p = 0,119$, $\eta^2 = 0,114$) relativement à l'interaction traitement* variété; les différences significatives ($p < 0,05$) ont été trouvées pour toutes les variables dépendantes. Les variances dans la production/levée (57,1%), la production/tallage (54,1%) et la production/panicule (43,8%) ont été mieux justifiées par le traitement alors que celles du degré de tallage (36,4%), du nombre de panicules/levée (30,9%), et de la production/levée (15,5%), l'étaient par l'interaction variété * traitement.

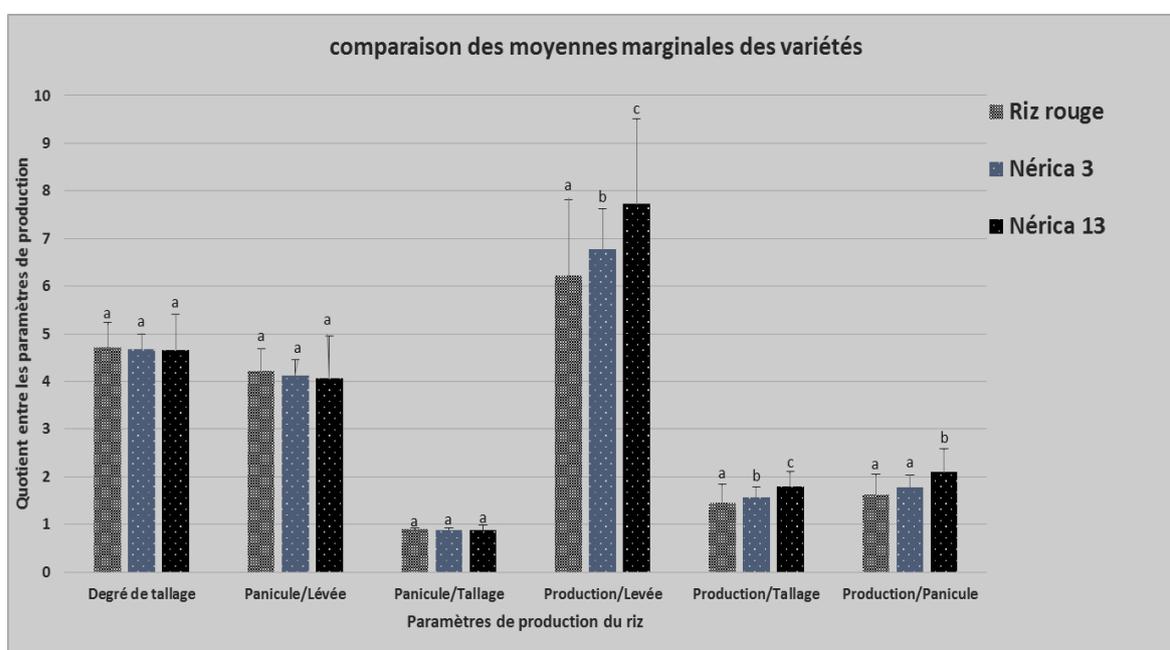
Tableau XIX: Effets du traitement et de la variété sur le degré de tallage, le nombre de panicules/levée, la production/levée, la production/tallage et la production/panicule en riziculture pluviale

Sources	Variables dpt	Σ Carée (III)	Ddl	CM	F	Sig	η^2
Variété	Degré de Tallage	0,039	2	0,019	0,119	0,888	0,0028
	Panicules/levée	0,178	2	0,089	0,448	0,643	0,010
	panicule/tallage	0,003	2	0,001	0,262	0,772	0,012
	Production/levée	17,274	2	8,637	27,356	<0,001	0,157
	Production/tallage	0,954	2	0,477	22,222	<0,001	0,179
	Production/panicule	1,783	2	0,892	12,809	<0,001	0,102
Traitement	Degré de tallage	3,889	4	0,972	5,969	0,001	0,280
	Panicules/levée	4,432	4	1,108	5,579	0,002	0,271
	panicule/tallage,	0,030	4	0,008	1,358	0,272	0,126
	Production/levée	62,580	4	15,645	49,550	<0,001	0,571
	Production/tallage	2,886	4	0,722	33,608	<0,001	0,541
	production/panicule	3,805	4	0,951	13,664	<0,001	0,438
Variété *	Degré de tallage	5,063	8	0,633	3,885	0,003	0,364
Traitement	Panicules/levée	5,776	8	0,722	3,635	0,005	0,309
	panicule/tallage	0,037	8	0,005	0,028	0,585	0,155
	Production/levée	20,099	8	2,512	7,957	0,000	0,183
	Production/tallage	0,842	8	0,105	4,900	0,001	0,178
	Production/panicule	0,996	8	0,124	1,788	0,119	0,114
Erreur	Degré de tallage	4,887	30	0,163			
	Panicules/levée	5,958	30	0,199			
	panicule/tallage	0,167	30	0,006			
	Production/levée	9,472	30	0,316			
	Production/tallage	0,644	30	0,021			
	Production/panicule	2,088	30	0,070			

ddl: degré de liberté; η^2 : Eta carré **CM**: Carrée Moyen; **dpt**: dépendante; **S.H.F**: Sévérité de l'helminthosporiose à la floraison; **S.H.M**: Sévérité de l'helminthosporiose à la maturité

Les natures des différences entre les modalités des variables indépendantes; traitement (T₀, T₁, T₂, T₃, T₄) d'une part et variétés (RR, N₃, N₁₃) d'autre part, pour chacune des variables dépendantes sont présentées respectivement par **la Figure 57** et la

Figure 58. Concernant la variété, on peut constater que; contrairement à la levée, au tallage et au nombre de panicule qui étaient significativement différents dans le traitement de données décrites plus haut, le degré de tallage tout comme le nombre de panicules/levée de RR, N₃ et N₁₃ ne sont pas significativement différents, impliquant ainsi que le tallage et le nombre de panicule de RR, N₃ et N₁₃ sont proportionnelles à leurs levées respectives. Les pourcentages de talles fertiles (panicule x 100/tallage) de RR, N₃ et N₁₃ sont respectivement de 89,2%, 88,4% et 87,3% et ne sont pas significativement différents. La production/levée (7,72), la production/tallage (1,8) et la production/panicule (2,1) de N₁₃ ont été plus importantes et significativement différentes de celles (6,77; 1,57 et 1,78) de N₃, plus importantes et significativement différentes de celles (6,22; 1,45 et 1,62) du RR (**Figure 57**); on doit se rappeler que l'analyse faite plus haut ressortait que le N₃ et non N₁₃ avait le meilleur rendement de production.

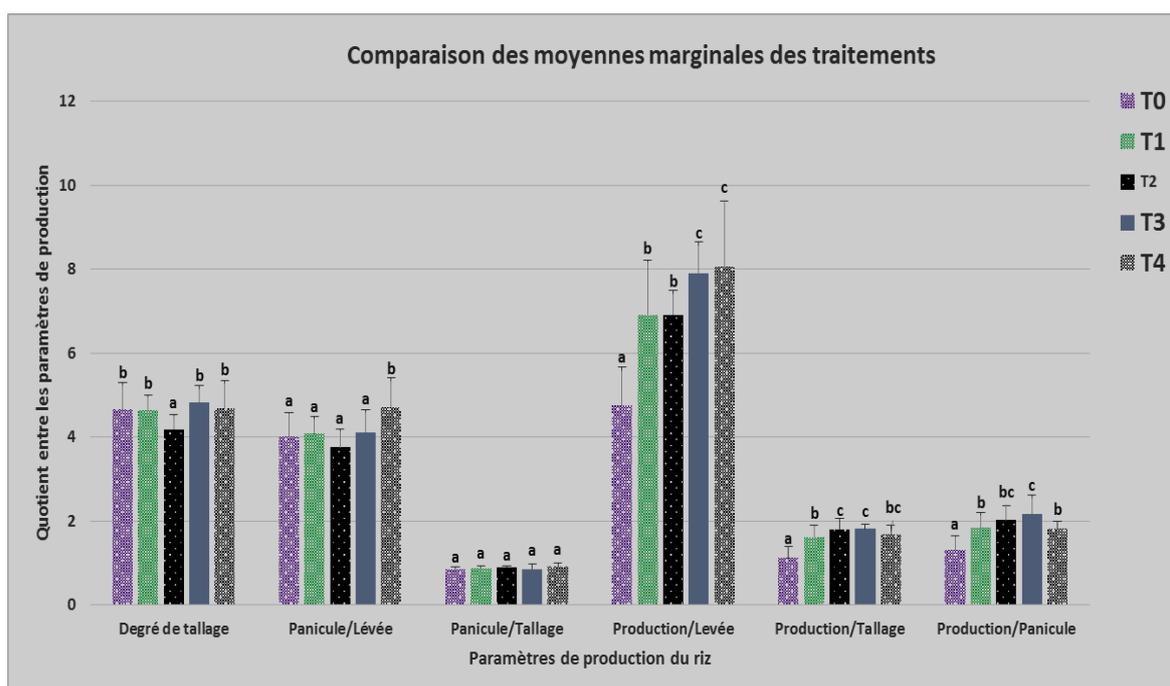


Les valeurs d'une même variable portant des lettres différentes sont significativement différentes au seuil 95% ($p < 0,05$) selon S-N-K.

Figure 57: Comparaisons des moyennes marginales des variétés de riz (RR, N₃, N₁₃) pour leurs degré de tallage, panicules/levée, production/levée, production/tallage et production/panicule en riziculture pluviale

A l'égard du traitement, on peut dire qu'à une exception près; T₂ pour le degré de tallage et T₄ pour le nombre de panicule/levée, tous les traitements sont statistiquement comparables pour ces deux variables dépendantes; une plus large hétérogénéité avait été observée pour la levée, le tallage/m² et le nombre de panicules/m² lors de l'analyse faite plus haut. Les pourcentages de talles fertiles (panicule x 100/tallage) de T₀, T₁, T₂, T₃ et T₄

sont respectivement de 85,8%, 87,9%, 89,5%, 85,6% et 92,6% et sont statistiquement identiques. La production/levée a scindé les traitements en trois groupes significativement différents les uns des autres; T₄ (8,06) et T₃ (7,89) d'une part T₂ (6,91) et T₁ (6,90) d'autre part et enfin T₀ (4,75). La production/tallage et la production/panicule ont été également scindées en trois groupes significativement différents les uns des autres, cependant avec une répartition un peu différente; T₃ et T₂ > T₄ et T₁ > T₀ (**Figure 58**). On fera l'observation selon laquelle le traitement T₂ qui se retrouve parmi les meilleures productions (production/tallage et production/panicule) avait un degré de tallage et un nombre de panicule/levée considérablement faible.



Les valeurs d'une même variable portant des lettres différentes sont significativement différentes au seuil 95% ($p < 0,05$) selon S-N-K.

Figure 58: Comparaisons des moyennes marginales des traitements (T₀, T₁, T₂, T₃ et T₄) pour leur degré de tallage, panicules/levée, production/levée, production/tallage et production/panicule en riziculture pluviale

La régression multiple avec entrée forcée (Simultaneous multiple regression) a été menée pour déterminer les meilleurs variables (levée, tallage/m², panicules/m² et sévérité de l'helminthosporiose à la floraison) permettant de prédire la production/m². Les moyennes, les écart-types et les inters corrélations sont présentés dans le **Tableau XX**. Il peut y être noté que toutes les variables de prédiction sont modérément significativement corrélées à la production/m²; aussi trois de ces variables sont fortement corrélées entre elles (**Hopkins, 1997**). La combinaison de ces quatre variables a significativement prédit la

production/m²; $F(4, 40) = 10,184, p < 0,001 (p < 0.05)$, avec une seule variable y contribuant significativement. Les coefficients standardisés β et t indiquant les degrés d'influences de chaque variable de prédiction sur la production/m² sont regroupés dans le **Tableau XXI** à partie duquel on peut noter que la sévérité de l'helminthosporiose à la floraison ($\beta = -0,499, t = -4,400, p < 0.05$) contribue significativement plus à la prédiction de la production/m² quand la levée, tallage/m², panicules/m² et sévérité de l'helminthosporiose à la floraison sont inclus. La valeur de R^2 ajustée est de 0,455 indiquant que 45,5% de la variance de la production/m² est expliquée par ce modèle; qui selon **Cohen (1988)** est un large effet.

Tableau XX: Moyennes, écart-types et inter-corrélations pour la production/m² et les variables de prédiction (N = 45) en riziculture pluviale

Variabiles	M	ET	Levée	Tallage/m ²	Panicule/m ²	S. H. F
Production/m ²	493,11	115,5	0,411*	0,479**	0,478**	-0,414*
Variabiles. de prédiction						
Levée	71,4	7,8	-	0,608**	0,571**	0,186
Tallage/m ²	307,33	42,2	-	-	0,861**	0,095
Panicules/m ²	271,75	45,6	-	-	-	0,077
S. H. F	3,4	2,7	-	-	-	-

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

S.H.F: Sévérité de l'helminthosporiose à la floraison; **M:**Moyenne; **ET:** Ecart-Type

Tableau XXI: Sommaire de l'analyse de la régression multiple avec entrée forcée pour la levée, tallage/m², panicules/m² et sévérité de l'helminthosporiose à la floraison; prédisant la production/m² (N = 45) en riziculture pluviale

Variabiles	B	ES B	β	t	Sig
Levée	4,080	2,114	0,276	1,930	0,061
Tallage/m ²	0,525	0,622	0,192	0,844	0,403
Panicule/m ²	0,490	0,557	0,194	0,880	0,384
S. H. F	- 20,836	4,736	- 0,499	- 4,400	< 0,001
(Constante)	-21,278	122,721			

Note: $R^2 = 0,505$; $F(4,40) = 10,184, P < 0,05$

B: coefficient non standardisé; **ES:** erreur standard **β** et **t:** coefficients standardisés

III.5.1.2. Riziculture irriguée (Low land Rice)

L'analyse multivariée de la variance à deux facteurs a été aussi utilisée dans l'analyse des données de la riziculture irriguée, dans le but de rechercher de l'existence de différences entre les traitements (T₀, T₁, T₂, T₃, T₄), les variétés de riz (Tox, NL₄₂, NL₅₂) et

l'interaction traitement* variété; sur la combinaison linéaire de la levée, du tallage/m², du nombre de panicules/m², de la sévérité de l'helminthosporiose à la floraison, de la sévérité de l'helminthosporiose à la maturité et la production/m².

Les tests multivariés de significativité pour les effets principaux des variables inter - groupes (**Tableau XXII**) ressortent que les effets principaux pour; le traitement (critère de Pillai = 1,772; F (24, 112) = 3,710, $p = 0,000$, multivariate $\eta^2 = 0,443$), la variété (critère de Pillai = 1,885; F (12, 52) = 11,117, $p < 0,001$, multivariate $\eta^2 = 0,943$) et l'interaction traitement * variété (critère de Pillai = 1,849; F (48, 180) = 1,670, $p = 0,009$, multivariate $\eta^2 = 0,308$) sont significatifs ($P < 0,01$); indiquant que, T₀ lorsque comparé à T₁ T₂, T₃ et T₄; Tox lorsque comparé à NL₄₂, NL₅₂, diffèrent significativement quant à leurs levée, tallage/m², nombre de panicules/m², sévérité de l'helminthosporiose à la floraison, sévérité de l'helminthosporiose à la maturité et production/m².

Tableau XXII: Tests multivariés de significativité pour les effets principaux des variables inter–groupes en riziculture irriguée

Tests multivariés ^a							
Effet		Valeur	F	ddl de l'hypothèse	Erreur ddl	Signification	Eta-carré partiel
Variété	Trace de Pillai	1,885	71,117	12,000	52,000	,000	,943
	Lambda de Wilks	,001	132,664 ^b	12,000	50,000	,000	,970
	Trace de Hotelling	121,875	243,749	12,000	48,000	,000	,984
	Plus grande racine de Roy	113,452	491,626 ^c	6,000	26,000	,000	,991
Traitement	Trace de Pillai	1,772	3,710	24,000	112,000	,000	,443
	Lambda de Wilks	,007	11,458	24,000	88,425	,000	,708
	Trace de Hotelling	41,736	40,867	24,000	94,000	,000	,913
	Plus grande racine de Roy	39,632	184,950 ^c	6,000	28,000	,000	,975
Variété * Traitement	Trace de Pillai	1,849	1,670	48,000	180,000	,009	,308
	Lambda de Wilks	,055	2,127	48,000	127,073	,000	,383
	Trace de Hotelling	5,315	2,584	48,000	140,000	,000	,470
	Plus grande racine de Roy	3,140	11,775 ^c	8,000	30,000	,000	,758

a. Plan : Variété + Traitement + Variété * Traitement

b. Statistique exacte

c. La statistique est une borne supérieure de F qui produit une borne inférieure sur le niveau de signification.

Etant donnée la significativité de l'ensemble des tests multivariés, les effets principaux (ANOVA univarié) des variables indépendantes (traitement, variété et interaction traitement * variété) ont été examinés sur chacune des variables dépendantes; les résultats sont présentés dans le **Tableau XXIII**. Ces résultats indiquent des différences significatives ($P < 0,05$) au regard du traitement pour toutes les variables dépendantes. Relativement à la variété il n'existe pas de différences significatives pour le tallage/m² ($F (2, 30) = 0,706$, $p = 0,502$, $\eta^2 = 0,022$) et Panicule /m² ($F (2, 30) = 1,105$, $p = 0,344$, η^2

=0,031). L'interaction traitement * variété est significatif pour 4 des 6 variables dépendantes; ainsi la levée, tallage/m², panicules/m² et sévérité de l'helminthosporiose à la floraison sont dépendantes de l'effet associé du traitement et de la variété. Les variances dans la production/m² (33,1%), la sévérité de l'helminthosporiose à la floraison (66,1%) et la sévérité de l'helminthosporiose à la maturité (95%) ont été plus justifiées par la variété; celle de la levée (56,5%) par le traitement et celles du tallage/m² (29,4%) et du nombre de panicules/m² (31,6%) par l'effet combiné du traitement et de la variété.

Tableau XXIII: Effets du traitement et de la variété sur la levée, le tallage/m², le nombre de panicules/m², la sévérité de l'helminthosporiose à la floraison, la sévérité de l'helminthosporiose à la maturité et la production/m² en riziculture irriguée

Sources	Variables dpt	Σ Carrée III	ddl	CM	F	P	η ²
Variété	Levée (%)	3089,806	2	1544,903	323,794	< 0,001	0,378
	Tallage/m ²	934,978	2	467,489	0,706	0,502	0,022
	Panicules/m ²	1047,511	2	523,756	1,105	0,344	0,031
	Production/m ² (g)	80946,202	2	40473,101	12,144	< 0,001	0,331
	S. H. F	73,045	2	36,522	134,107	< 0,001	0,661
	S. H. M	1451,962	2	725,981	1160,554	< 0,001	0,950
Traitement	Levée (%)	4534,925	4	1133,731	237,617	< 0,001	0,556
	Tallage/m ²	9096,756	4	2274,189	3,434	0,020	0,214
	Panicules/m ²	7131,911	4	1782,978	3,764	0,013	0,217
	Production/m ² (g)	40047,541	4	10011,885	3,004	0,034	0,164
	S. H. F	19,322	4	4,831	17,737	< 0,001	0,174
	S. H. M	47,655	4	11,914	19,045	< 0,001	0,031
Variété*	Levée (%)	387,319	8	48,415	10,147	< 0,001	0,047
Traitement	Tallage/m ²	12478,578	8	1559,822	2,355	0,043	0,294
	Panicules/m ²	10344,489	8	1293,061	2,730	0,022	0,316
	Production/m ² (g)	22893,98	8	2861,748	0,858	0,561	0,093
	S. H. F	9,878	8	1,235	4,534	0,001	0,089
	S. H. M	8,845	8	1,106	1,767	0,123	0,0057
Erreur	Levée (%)	143,137	30	4,771			
	Tallage/m ²	19864	30	662,133			
	Panicules/m ²	14208,667	30	473,622			
	Production/m ² (g)	99977,537	30	3332,585			
	S. H. F	8,17	30	0,272			
	S. H. M	18,766	30	0,626			

ddl: degré de liberté; η^2 : Eta carré *CM*: Carrée Moyen; *dpt*: dépendante; *S.H.F*: Sévérité de l'helminthosporiose à la floraison; *S.H.M*: Sévérité de l'helminthosporiose à la maturité

Les natures des différences entre les modalités des variables indépendantes; traitement (T₀, T₁, T₂, T₃, T₄) d'une part et variétés (Tox, NL₄₂, NL₅₂) d'autre part, pour chacune des variables dépendant sont présentés dans le **Tableau XXIV** se rapportant à la variable variété, on peut noter que les levées des trois variétés de riz ont été significativement différentes les unes des autres, avec le plus grand pourcentage pour NL₄₂ (69,6%). Tout en rappelant que nous sommes partis sur une même base au repiquage (trois

plants par poquet), le tallage (295) et le nombre de Panicules (259,4) du Tox ont été plus importants mais pas de manière significative par rapport à NL₄₂ et NL₅₂. La production du Tox (584g) a été significativement plus importante que celles de NL₄₂ et NL₅₂. La S.H. F, et la S. H. M de Tox ont été environ deux fois supérieur à celles de NL₄₂ et NL₅₂.

Tableau XXIV: Comparaisons des moyennes marginales pour le traitement et la variété comme une fonction de la levée, tallage/m², du nombre de panicules/m², de la sévérité de l'helminthosporiose à la floraison, de la sévérité de l'helminthosporiose à la maturité et de la production/m² en riziculture irriguée

G	N	Levée (%)	Tallage/m ²	Panicules/m ²	Production/m ²	S. H. F	S. H. M.	
Trait	T ₀	9	38,7 ^a ± 5,2	270,5 ^a ± 27,3	232 ^a ± 26,2	483,1 ^a ± 51,8	6 ^b ± 2	13,7 ^c ± 6,6
	T ₁	9	61,5 ^b ± 14,7	309,4 ^b ± 32,8	268,8 ^b ± 20,7	519,3 ^{ab} ± 61,1	5,7 ^b ± 1,8	12,6 ^b ± 6,5
	T ₂	9	64,4 ^c ± 8,2	299,7 ^{ab} ± 30,5	262,8 ^b ± 27,2	522 ^{ab} ± 81,5	5,7 ^b ± 1,4	11,8 ^a ± 5,9
	T ₃	9	64,4 ^c ± 8,2	285,6 ^{ab} ± 32,4	256 ^{ab} ± 29	557,6 ^b ± 55,5	4,6 ^a ± 0,9	11,1 ^a ± 5,6
	T ₄	9	64,4 ^c ± 8,2	277,7 ^{ab} ± 18,4	252 ^{ab} ± 22,2	566,1 ^b ± 96,5	4,4 ^a ± 0,9	10,9 ^a ± 5,4
Var	Tox	15	49,6 ^a ± 9,4	295 ^a ± 35,6	259,4 ^a ± 31,3	584,5 ^b ± 70,06	7,1 ^b ± 1,3	20 ^b ± 0,6
	NL ₄₂	15	69,6 ^c ± 12,8	284,5 ^a ± 17,6	255,8 ^a ± 21,1	523,04 ^a ± 72,3	4,2 ^a ± 0,6	8,2 ^a ± 0,9
	NL ₅₂	15	56,7 ^b ± 10,3	286,4 ^a ± 36,1	247,86 ^a ± 28,8	481,2 ^a ± 38,6	4,6 ^a ± 0,5	7,8 ^a ± 0,8

G: Groupe; **Trait:** Traitement; **Var:** Variété; **S.H.F:** Sévérité de l'helminthosporiose à la floraison; **S.H.M:** Sévérité de l'helminthosporiose à la maturité. Les valeurs des groupes différents (traitement et variété) sur une même colonne et portant des lettres différentes sont significativement différentes au seuil 95% ($p < 0,05$) selon S-N-K.. Témoin non traité (T₀); Traitement avec le NaCl 20% (T₁); Traitement avec 20% de NaCl + Trempage dans la solution 1% de l'extrait à l'éthanol d'*O. barrelieri* pendant 24H (T₂); Traitement avec 20% de NaCl + Trempage dans la solution 1% de l'extrait à l'éthanol d'*O. barrelieri* pendant 24H + Pulvérisation de 2% de l'extrait à l'éthanol d'*O. barrelieri* à 300L/Ha au 14^{ième} jour + pulvérisation de l'extrait aqueux d'*O. barrelieri* (20g de poudre par litre d'eau) à 556L/Ha chaque deux semaines jusqu'au stade de grain dur (T₃); Traitement avec 20% de NaCl + Trempage dans la solution 1% de l'extrait à l'éthanol d'*O. barrelieri* pendant 24H + Pulvérisation de 2% de l'extrait à l'éthanol de *C. citratus* à 300L/Ha au 14^{ième} jour + Pulvérisation de l'extrait aqueux de *C. citratus* (20g de poudre par litre d'eau) à 556L/Ha chaque deux semaines jusqu'au stade de grain dur (T₄)

En ce qui concerne la variable traitement, la levée (64,4%) des semences traitées aux extraits de plantes (T₂, T₃, T₄) a été significativement plus importante que celle (61,8%) de T₁ (uniquement sélectionné en solution NaCl), significativement plus importante que celle des semences non traitées T₀ (38,7%); cette levée a été maximale au traitement T₁ pour la variété Tox. En plus l'aspect quantitatif de la levée, les traitements (T₂, T₃, T₄) ont été plus vigoureux que les témoins T₀ (**Figure 59A**). Globalement, les états des pépinières de tous nos essais n'étaient pas comparables à ceux des essais des producteurs locaux, donc les plantules étaient fréquemment très chlorosées (**Figure 59B**) et

sujettes aux fortes attaques de pathogènes (*B. oryzae*) dès la pépinière (**Figure 59C**). Le tallage et le nombre de panicules des différents traitements suivent approximativement la même variation pour Tox, NL₄₂ et NL₅₂ (**Figure 60B et C**), avec les traitements T₂, T₃ et T₄, supérieurs au témoin T₀, mais pas de manière significative. T₄ (566,1g) et T₃ (557,6g) ont eu de meilleurs rendements; ceux-ci sont significativement différents de T₀ (483,1g), mais ne le sont pas par comparaison à T₁ et T₂. Les productions maximales par m² ont été obtenues au traitement T₄ (667,09g) de la variété Tox et aux traitements T₃ de NL₄₂ (571,01g) et NL₅₂ (512,43g) (**Figure 61 gauche**). À la floraison tout comme à la maturité, la sévérité de *B. oryzae* a été moindre pour les lots ayant reçus les traitements aux extraits de plantes (T₃, T₄ et T₂). A la maturité, les écarts entre les différents traitements sont assez réduits (**Figure 61 milieu et droite**).

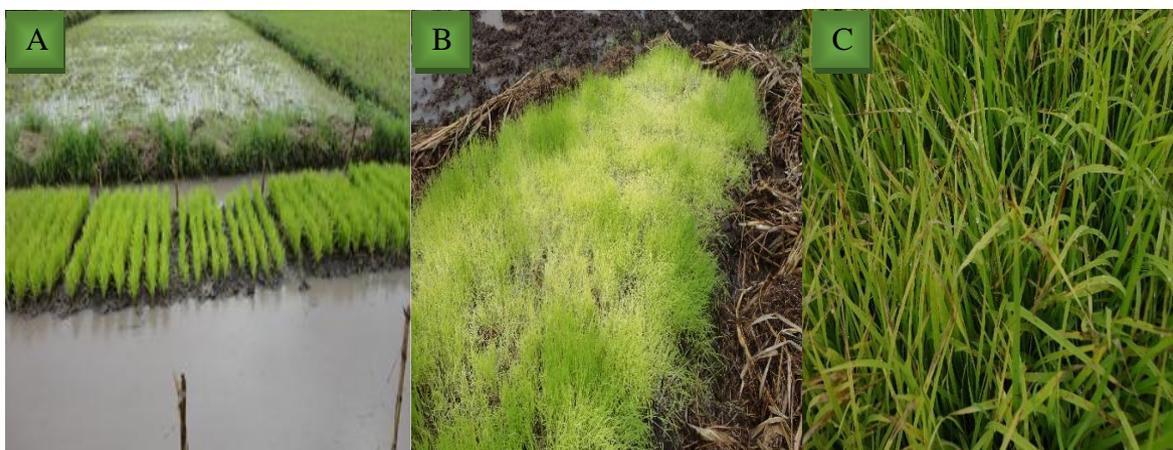


Figure 59: Pépinières présentant (A) la vigueur de plantules traitées aux extraits de plantes comparée à celle des plantules non traitées, (B) les plantules chlorosés de la pépinière des producteurs (C) pépinières des producteurs ayant des plantules infectées par *B. oryzae*

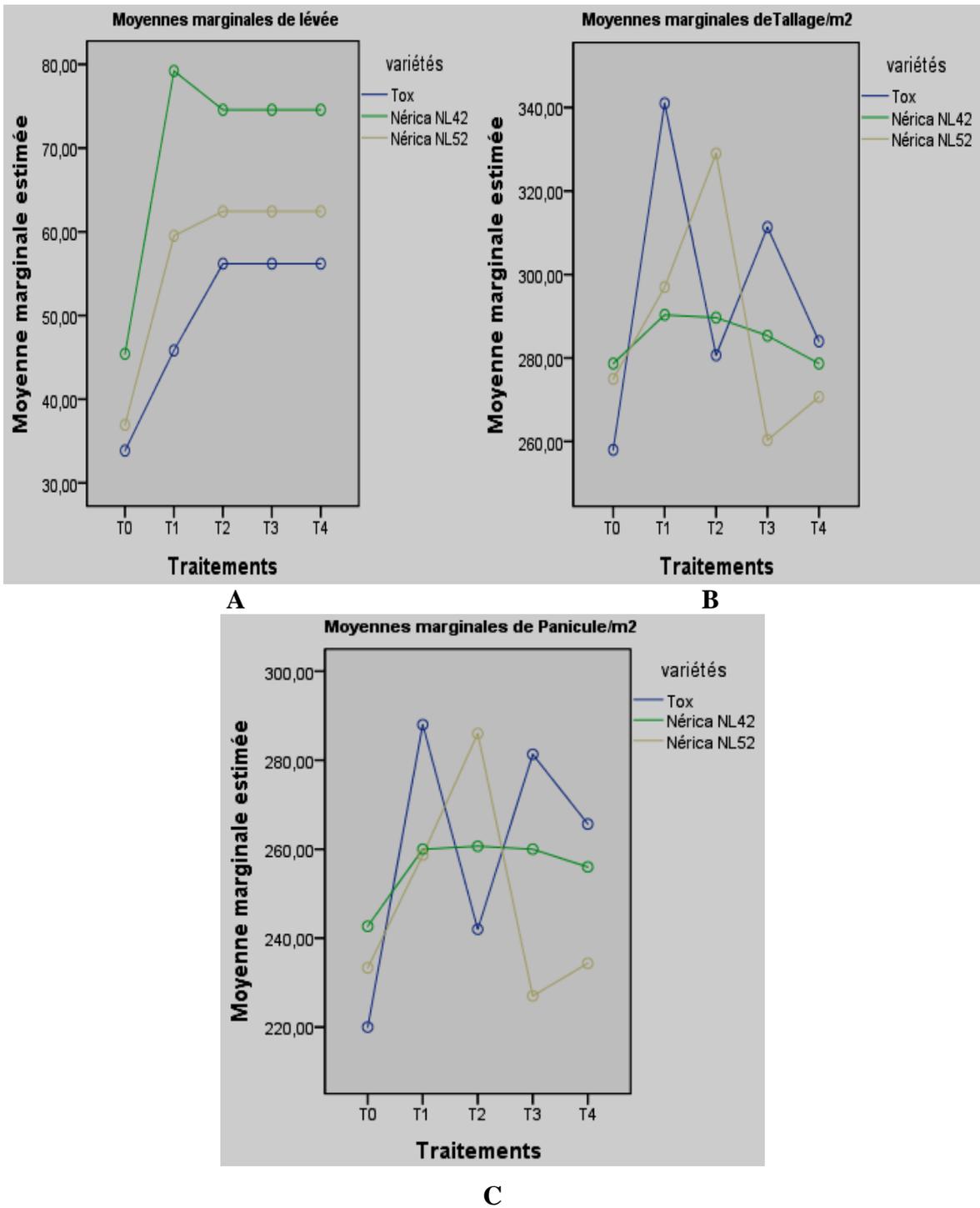


Figure 60: Moyennes marginales de; (A) levée, (B) tallage/m², (C) panicule/m² en fonction des différents traitements et suivant les variétés de riz Tox, NL₄₂ et NL₅₂

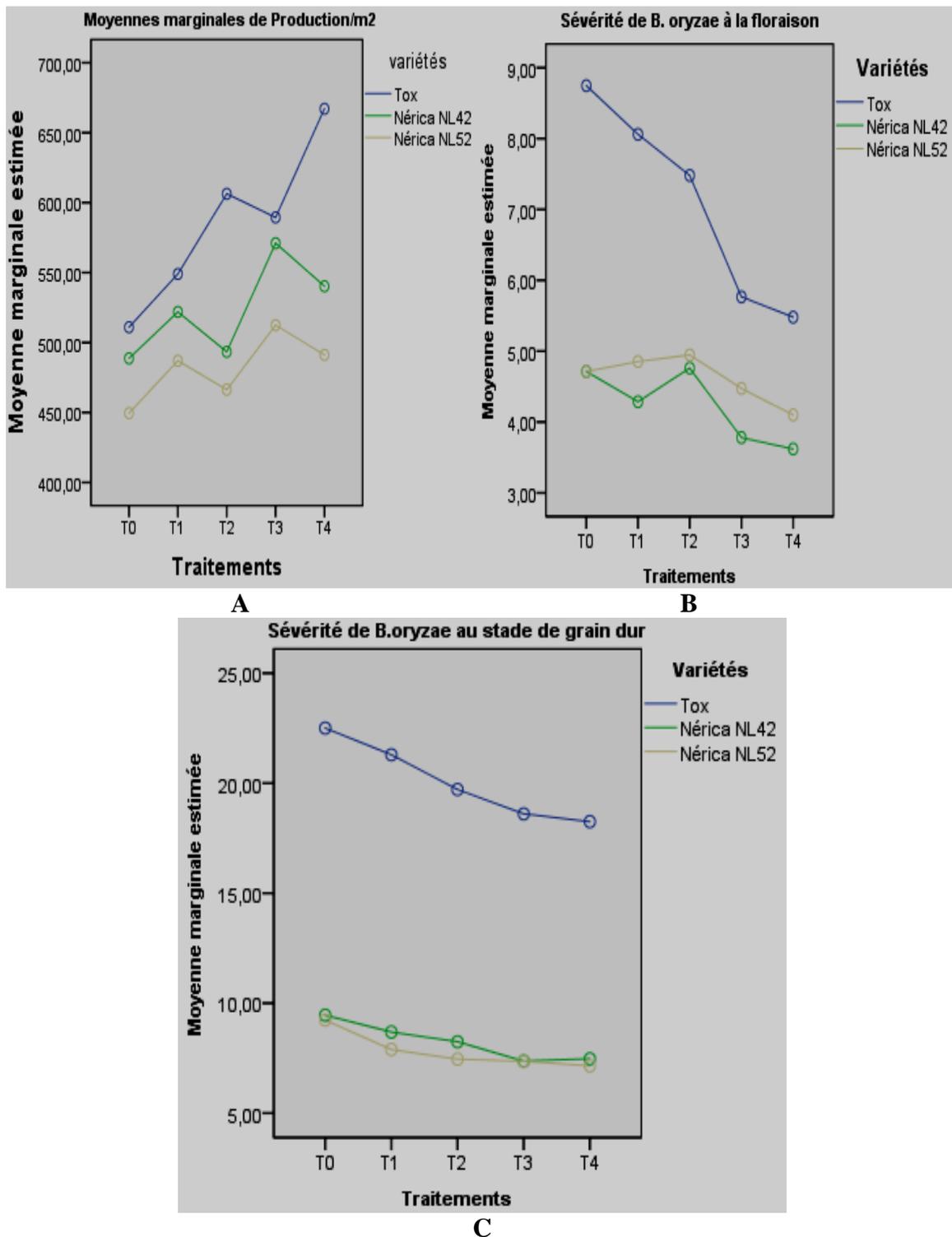


Figure 61: Moyennes marginales de ; (A) production/m², (B) S.H.F. (C) S.H.M en fonction des différents traitements et suivant les variétés de riz Tox, NL₄₂ et NL₅₂

Tenant compte du fait que nous sommes partis sur la même base du nombre de plants repiqués pour tous les traitements en riziculture irriguée, nous nous sommes essayés de voir lesquels parmi les variables; tallage/m², panicules/m² et sévérité de l’helminthosporiose à la floraison contribuaient le mieux à justifier la production/m². Pour

cela, la régression multiple avec entrée forcée (Simultaneous multiple regression) a été utilisée. Les moyennes, les écart-types et les inters corrélations sont présentés dans le **Tableau XXV**, à partir duquel on peut noter que les variables de prédiction sont faiblement et non significativement corrélées avec à la production/m²; le tallage/m² est fortement corrélé avec le nombre de panicules/m². La combinaison des trois variables de prédictions prédit significativement la production/m²: $F(3, 41) = 3.999, p=0.014 (<0.05)$, avec toutes ces variables contribuant significativement à l'équation de prédiction. Les coefficients standardisés β et t indiquant les degrés d'influences de chaque variable de prédiction sur la production/m², sont regroupés dans le **Tableau XXVI**. Il y ressort que, les panicules/m² ($\beta = 1.016, t=3.198, p < 0.05$) et tallage/m² ($\beta = - 0.996, t = - 3.089, p < 0.05$) contribuent significativement plus à la prédiction de la production/m². La valeur de R² ajustée est de 0,170 indiquant que, 17% de la variance de la production/m² est expliqué par ce modèle.

Tableau XXV: Moyennes, écart-types et inter-corrélations pour la production/m² et les variables de prédiction (N = 45) en riziculture irriguée

Variables	M	ET	Tallage/m2	Panicule/m2	S. H. F
Production/m2	529,63	74,4	-0,040	0,130	0,170
Var. de prédiction					
Tallage/m2	288,64	31,1	-	0,892**	0,142
Panicule/m2	254,37	27,2	-	-	-0,002
S. H. F	5,53	1,5	-	-	-

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

S.H.F: Sévérité de l'helminthosporiose à la floraison; **M:** Moyenne; **ET:** Ecart-Type

Tableau XXVI: Sommaire de l'analyse de la régression multiple avec entrée forcée pour la levée, tallage/m², panicules/m² et sévérité de l'helminthosporiose à la floraison; prédisant la production/m² (N = 45) en riziculture irriguée

Variables	B	ES B	β	t	Sig
Tallage/m2	-2,378	0,770	-0,991	-3,089	0,004
Panicule/m2	2,773	0,867	1,016	3,198	0,003
S. H. F	14,695	6,807	0,313	2,159	0,037
(Constante)	432,483	102,610			

Note: $R^2 = 0,226$; $F(3,41) = 3,999$, $P < 0,05$

B: coefficient non standardisé; **ES:** erreur standard **β** et **t:** coefficients standardisés

III.5.2. Analyse des résultats obtenus des expérimentations en champ

Tout comme le montre nos résultats, quelques auteurs ont eu à montrer que le tri (traitement) des semences en solution salée (T₁) améliore la germination et les rendements de production du riz en champ (Anowarul Hoque et al., 2002; Pham et al., 2003); d'autres ont également établis les effets positifs des extraits de plantes (T₂, T₃ et T₄) sur le control des agents phytopathogènes et l'amélioration des rendements de production du riz (Islam et Monjil, 2016; Nguiefack et al., 2013; Netam et al., 2011). Ce travail a la particularité d'intégrer ces deux aspects pour l'optimisation générale des rendements de production du riz, en incluant les essences nouvelles comme *oxalis barrelieri*.

Il est généralement connu que bon nombres de facteurs intrinsèques peuvent expliquer les différences de germination entre les variétés de riz notamment; la date de récolte des semences, les conditions de stockage, la génération de la semence et, l'origine de la semence; relativement à ce dernière facteur, on pourrait penser que les meilleures germinations des semences de NL₄₂ et NL₅₂ comparé à Tox 3145-38-2-3 se justifient par le fait que ces semences nous provenait de l'IRAD de Nkolbisson «produites dans les meilleurs conditions» que le tox 3145-38-2-3 qui venait des producteurs.

En dépit des différents types de traitements appliqués et indifféremment de leurs nombres, l'incidence de *B. oryzae* / sévérité des taches brunes, a augmenté avec le stade de développement du riz; Vu et Somsiri (2006) ont fait cette même observation sur la progression de la sévérité de l'helminthosporiose, mais en absence d'un quelconque traitement.

Les variétés NERICA en pluvial (N₃ et N₁₃) tout comme en irrigué (NL₄₂ et NL₅₂), ont été moins sensibles à l'infection par *B. oryzae* comparé respectivement au riz rouge de Tonga et au Tox 3145-38-2-3, deux variétés *Oryzae sativa* L; cette faible sensibilité viendrait du fait que la variété NERICA est issue du croisement *Oryzae sativa* x *Oryzae glabérima*, et possède dès lors certaines propriétés de la variété *Oryzae glabérima*, entre autres la résistance aux agents pathogènes (Linares, 2002).

La faible sévérité de l'helminthosporiose à la floraison, dans les parcelles traitées par les extraits de plantes (T₂, T₃ et T₄) ne pourrait se justifier que par les traitements appliqués; Nguiefack et al. (2013) ont eu aussi à montrer que les huiles essentielles et les extraits aux solvants de *Callistemon citrinus* et *C. citratus* réduisaient la sévérité de l'helminthosporiose en champ. Ces extraits de plantes agiraient directement sur l'inhibition l'agent pathogène (*B. oryzae*). On ne saurait à l'avance, écarter totalement des mécanismes tels que: une plausible interférence avec le gène BMK1 qui a été isolé chez *B. oryzae* et

prouvé que sa rupture entraînait un développement anormale des hyphes, l'absence de production de conidies et la perte de virulence (**Moriwaki et al., 2007**); une éventuelle inhibition de la production des substances phytotoxiques (l'ophiobolin A et l'ophiobolin B) produites par *B. oryzae* et inductrices de la chlorose au niveau des feuilles (**Xiao et al., 1991**); et une possible induction de la résistance (formation des groupes thiols) chez le riz.

Au stade de maturité à ~90% en irrigué et en pluvial, de faibles écarts ont été observés entre les sévérités de l'helminthosporiose sur les parcelles traitées aux extraits de plantes (T₂, T₃ et T₄) et les parcelles non traitées (T₀ et T₁); en faisant une extension à la maturité ~95%, on ne pouvait plus facilement distinguer les parcelles traitées de celles non traitées, en ce qui concerne la sévérité des taches brunes, en particulier chez le riz rouge et le Tox 3145-38-2-3. Ces observations peuvent trouver explication par le fait que; les plants déjà assez bien développés entretiennent des contacts sporadiques directs, entraînant la transmission de l'agent pathogène de proche en proche, des plants infectés (T₀) vers les plants «sains»; de plus, d'autres infections secondaires notamment celles véhiculées par les spores entraînées par le vent (**Almaguer-Chavez et al., 2012; Picco et Rodolfi, 2002**) à travers les débris de pailles et de chaume de riz (**Sato et al., 2008**) et/ou celles véhiculées par le sol et certaines mauvaises herbes (**Biswas et al., 2008**) peuvent significativement contribuer à généraliser l'infection à ce stade de développement des plantes. D'autre part, très souvent environ un mois avant la fin du cycle (référence au riz rouge) de riziculture, les pluies deviennent très intermittentes et laissent la place à d'abondantes rosées matinales sur les plants riz; or, **Sherf et al. (1947)** ont conclu de leurs travaux que la présence régulière des pluies réduit l'incidence des taches brunes en lavant l'inoculum du feuillage, mais que la présence de l'eau libre (rosé) sur le feuillage favorise le développement de l'infection. Ainsi, les conditions climatiques et la concentration de l'inoculum sont généralement favorables à l'augmentation de l'infection durant les derniers stades de développement de la plante (**Kohls et al., 1987**). On peut penser que le NERICA (N₃ et N₁₃) avec son cycle assez court comparé à *O. sativa* (RR), échappe partiellement à cette pression d'attaque d'agents pathogènes associée aux conditions climatiques.

La pulvérisation de nos extraits s'est étendue jusqu'au stade de grain dur; peut-être ce fût un gâchis d'étendre les traitements jusqu'à ce stage de développement de la plante car, selon **Kohls et al. (1987)** l'application des fongicides (mancozeb) pendant ou après le stade grain laiteux, dans le but de protéger les plants de riz contre l'helminthosporiose, n'impacte pas son rendement de production et de ce fait, n'est pas recommandée.

La différence de rendements entre N₃ (N₁₃) et RR d'une part, NL₄₂ (NL₅₂) et Tox d'autre part s'expliquerait tout simplement par la différence de variété; car selon **Pham et al. (2004)** différentes variétés de riz ont différents rendements. Comme aussi rapporté par **Sekiya et al. (2013)**, les rendements de production en pluvial ont été plus importants chez la variété NERICA comparé à la variété *Orizae sativa* L (RR); ce qui peut sembler contrastant quand on sait que c'est *Orizae sativa* L qui confère au NERICA son potentiel de haut rendement; mais, peut se comprendre dans la mesure le NERICA est sensé mieux résister aux conditions difficiles; nos résultats relèvent par ailleurs que la moyenne des données des pluviométriques enregistrées (environ 699,9 mm) à Tonga, pendant nos deux saisons agricoles (2011-2012) était en-dessous du minimum de 900 mm indiqué par **Winch (2006)** pour le bon développement du riz et en particulier celui du riz rouge qui a un cycle long.

Les moyennes des rendements des témoins (T₀) des variétés N₃ (400g/m²) et N₁₃ (282,98g/m²) ont été bien en dessous des moyennes rapportées par **AfricaRice (2008)**: 450g/m² (4,5t/ha) et 600g/m²(6t/ha) respectivement; bien que AfricaRice soit la référence mondiale en matière de NERICA, la comparaison faite ici, ne peut être qu'à titre indicatif, car nous n'avons pas à notre possession des éléments tel que la densité de semi, les taux de germination et les taux de fertilisation utilisés dans les expérimentations pour fournir les rendements de AfricaRice. Dans une étude avec les conditions expérimentales un peu plus précises (7 à 10 grains/poquet, les écarts de 0.3 × 0.125 m entre les poquets et une fertilisation minérale de 80kg ha⁻¹), **Sekiya et al. (2013)** ont obtenu des rendements proches des nôtres dans la localité de kizimbani en Tanzanie; 343g/m² pour N₃ et 276g/m² pour N₁₃. Cependant, en prenant en compte le taux de germination de notre travail, (Production/levée), nous avons trouvé que le rendement N₁₃ est significativement plus grand comparé à celui de N₃, évoluant ainsi dans le même sens que celui d'AfricaRice ci-dessus mentionné. Toujours selon **AfricaRice (2008)** la maturité de N₃ et N₁₃ se situe entre 90- 100 jours; nous avons trouvé des moyennes de maturités à 90%, respectives d'environ 111 jours pour N₃ et 121 jours pour N₁₃; outre, **Sewagegne et Tadesse (2016)** ont trouvé que la durée moyenne du cycle de N₁₃ était de 131,3 jours: les durées des cycles des variétés de NERICA varieraient ainsi selon la localisation géographique, et peut être en association avec les facteurs comme la nature du sol et les conditions climatiques.

En évaluant l'effet de l'enherbement sur 64 variétés irriguées de NERICA, pendant deux campagnes agricoles consécutives (2006 et 2007), **Rodenburg et al. (2009)** ont relevé qu'en absence de l'enherbement, les rendements moyens de NL₄₂ et NL₅₂ sont de

l'ordre de 618,5g/m² et de 585,5g/m²; ceux-ci étant supérieurs respectivement à NL₄₂T₀ (488,7g/m²) et NL₅₂T₀ (449,5g/m²) que nous avons obtenus (**Tableau XXVII**); cette différence serait très probablement due à la forte densité de semis utilisé dans leur expérimentation; celle-ci était de 6 plants par poquet avec 20 x 20 cm entre les poquets, alors de que nous avons utilisé 3 plants par poquet avec 25 x 25 cm entre les poquets.

Par opposition à **Okeleye et al. (2006)** qui ont rapporté une grande habileté de tallage de la variété NERICA par rapport à *Oryzae sativa* L, nos résultats ont montré que le tallage (degré de tallage) des variétés NERICA était comparable à celui de *Oryzae sativa* L (Riz rouge); si non avec une petite plus-value pour *Oryzae sativa* L (Tox 3145-38-2-3) dans la riziculture irriguée. En irrigué ($r = 0,892$) et en pluvial ($r = 0,861$), les analyses de corrélations ont montré une très forte (**Hopkins, 1997**) association positive et significative entre le tallage et le nombre de panicules; selon **Zhong et al. (2002)** le tallage est étroitement associé au nombre de panicules; il varie avec la densité de semis et la variété (**Counce, 1996**) et constitue donc un paramètre agronomique important dans la production du riz (**Xueyong et al., 2003**); dans notre travail, il a été significativement associé au rendement en pluvial et y a significativement contribué en riziculture irriguée. Nous avons cependant constaté qu'en riziculture pluviale que; N₃ qui avait une levée, un tallage et un nombre de panicule respectivement environ 11,3%; 18% et 18% inférieures à ceux de N₁₃ et RR, s'est retrouvé avec un rendement plus élevé; de même, T₂ qui avait un degré de tallage significativement plus faible comparé à T₄, s'est retrouvé avec une production/panicule comparable à celle de ce dernier, indiquant ainsi une baisse du rendement paniculaire avec l'augmentation du tallage; ceci étant en accord avec les travaux de **Wang et al. (2007)** qui ressortent que l'abondance de talles impacte négativement le nombre de grains par panicule et conduit à la réduction du poids de cette dernière; outre, l'excès de talles engendre beaucoup de talles stériles, de petits panicules, une mauvaise qualité du grain et une réduction conséquente du rendement. (**Peng et al., 1994**). Au regard des éléments qui précèdent, et vue que l'impact négatif du tallage n'a pas été observé en riziculture irriguée, il serait par conséquent capital de déterminer le niveau limite de tallage (densité) garantissant un meilleur rendement en assurant la qualité du grain, pour toutes les variétés de riz cultivés au Cameroun, ou dans une moindre mesure, celui des principales variétés cultivées dans les grands bassins de production; ce qui servira aussi de point de référence pour la mise en place des champs semenciers car ceux-ci ne sauraient avoir la même densité que celle des champs de production pour consommation.

Dans un essai comparable, à l'exception du fait que les semences (Riz rouge) furent directement traitées au préalable avec les huiles essentielles de *Callistemon citrinus* suivies de la pulvérisation avec 2% de l'extrait hydroéthanolique de la même plante après deux semaines du semis, **Nguefack et al. (2013)** ont trouvé les rendements (riz rouge) entre 1,5 - 1,8 fois inférieurs aux nôtres en riziculture pluviale (Tonga). En plus des différences dans les traitements avec nos essais, les facteurs tels que la date de semis et la pluviométrie seraient les plus indiqués pour expliquer une aussi importante différence; en effet dans les premières années de nos expérimentations en champ (2007, 2008), les limitations en organisation et en expériences faisaient à ce que la saison sèche rattrapaient souvent les plants en phase de grains laiteux, ce qui affectait considérablement les rendements de manière négative; au fil des années (2009, 2011, 2012), nous maîtrisions mieux la planification de nos expérimentations en pluvial. En revanche, les rendements de Tox 3145-38-2-3 qu'ils (**Nguefack et al., 2013**) ont obtenu en riziculture irriguée, quoique légèrement supérieurs (probablement liés aux espacements de 20 x 20 entre les poquets) ont été comparables; peut-être parce que l'un des facteurs critiques de production, à savoir l'eau est mieux contrôlé dans cet agrosystème.

Les paramètres de production et les rendements ont été assez tassées en riziculture irriguée, avec seulement deux niveaux de différences entre les différents traitements aux extraits de plantes (**Tableau XXIV**); en analysant séparément les données en fonction de l'année d'expérimentations, certains auteurs ont montré que les paramètres associés à la production (germination tallages, panicules) du riz et ses rendements variaient significativement (**Rodenburg et al., 2009**); ainsi conduire une expérience en champ sur plusieurs années consécutives et faire les analyses statistiques en blocs peut s'accompagner de grands écarts types au sein des groupes et entrainer leur homogénéité sur le plan statistique.

Suivant les analyses de régression multiple, la maladie (helminthosporiose) au stade de floraison a été le principal contributeur en riziculture pluviale et a significativement contribué en riziculture irriguée à la prédiction des rendements; on sait par ailleurs que les sévérités des taches brunes étaient significativement moins importantes dans les parcelles traitées aux extraits de plantes (T2, T3 et T4); ceci peut se comprendre dans la mesure où l'infection à *B. oryzae* réduit le nombre de graines par panicule et la masse des graines (**Picco et Rodolfi, 2002**). Toutefois, étant donné que très souvent les extraits de plantes sont caractérisés par un large spectre d'action (**Aqil et Ahmad, 2003**; **Bussmann et al., 2010**), il ne serait pas très correct d'expliquer l'augmentation des

rendements des parcelles traitées (T2, T3 et T4), par la seule faible sévérité des taches brunes sur ces traitements, mais songer aussi aux effets plausibles sur d'autres agents pathogènes de bon nombre de maladies donc les évaluations n'ont pas été faites dans ce travail. On pourrait par exemple songer aux effets de ces extraits sur *F. moniliforme* dont l'infection cause la formation des panicules vides à maturité (**Mew et Gonzales, 2002**).

Les rendements des parcelles ayant reçues en plus du traitement des semences, des traitements en champs (T3 et T4) ont été meilleurs en riziculture irriguée et en riziculture pluviale; cependant leurs nombres de talles (degré de tallage) et de panicules (panicules/lavée) étaient fondamentalement similaire à ceux de T0, T1 et T2. Il apparaît donc évident que les traitements par les extraits de *C. citratus* et *O. barrelieri* auraient aussi contribué à accroître le nombre d'épillet (branche secondaires) par panicule et/ou à augmenter le nombre de grains pleins; ces deux traits agronomiques ont été identifiés par **Sekiya et al. (2013)**, être responsables de la variation des rendements de plusieurs variétés de *O sativa L* et NERICA.

Les rendements des parcelles traitées par extraits de plantes (T3, T2 et T4), ceux des parcelles dont les semences ont été sélectionnées uniquement au sel (T1) et plus particulièrement ceux des parcelles témoins (T0); en irrigué ($MT_0 = 483,1 \text{ g/m}^2$) tout comme en pluvial ($MT_0 = 309 \text{ g/m}^2$), étaient au minimum 3 fois supérieurs au rendement moyen national (Cameroun) de riz qui est d'environ $107,9 \text{ g/m}^2$ ($1,079 \text{ t/ha}$) selon **Faostat (2017)**; plusieurs raisons peuvent être avancées pour expliquer cette différence: premièrement nos expérimentations ont été conduites en suivant une géométrie et une densité bien précise (3 plants par poquet avec $25 \times 25 \text{ cm}$ entre les poquets), alors que les parcelles des producteurs locaux sont généralement caractérisées par une surcharge de la densité sans aucune géométrie (plus de 7 plants par poquet avec moins de 15 cm entre les poquets irréguliers); or selon **Faisul-ur-Rasool et al. (2012)**, la densité de semis est l'une des composantes importantes parmi les technologies culturales, dont la manipulation peut déboucher à l'optimisation des rendements de production; de plus, quand la densité de semis excède le niveau optimum (limite), la compétition entre les plantes pour la lumière ou pour les nutriments du sol devient sévère et comme conséquence, la croissance de la plante est ralenti et le rendement décroît (**Kandil et al., 2010**); pour renchérir, l'usage de beaucoup de plant par poquet augmente non seulement les coûts de production, mais aussi un simple gaspillage de ressources naturelles (**Baloch et al., 2006**). Deuxièmement, nous avons épandu au total 200 kg ha^{-1} et 250 kg ha^{-1} d'engrais minéral en pluvial et en irrigué respectivement, ce que font peu de producteurs, si oui à un faible taux; alors qu'il est bien

documenté que l'engrais minéral augmente les rendements de la production de riz (**Huang et al., 2008; kandil et al., 2010, Pramanik et Bera, 2013, Getachew et Birhan, 2015**). En fin, il est vrai que notre expérimentation a été un peu plus laborieuse à mettre en place, mais la compensation a été certainement recouverte par la facilité de sanitation, qui aurait apporté un plus dans l'amélioration du rendement.

En considérant le model incluant la levée, tallage/m², panicules/m² et sévérité de l'helminthosporiose à la floraison en riziculture pluviale d'une part et le model incluant le tallage/m², panicules/m² et sévérité de l'helminthosporiose à la floraison en riziculture irriguée d'autre part, respectivement 45% (R² ajustée = 0,455) et 17% (R² ajustée = 0,170) de la variance de la production/m² sont expliquées par ces models; avec la sévérité de l'helminthosporiose à la floraison contribuant significativement à la prédiction de la production/m² dans les deux systhèmes. Ceci montre combien de fois ce facteur (sévérité de l'helminthosporiose) est déterminant dans la prédiction des rendements de production du riz.

III.6. Composition chimique des extraits plantes utilisés et discussion

III.6.1. Compositions chimiques des extraits de *C. citratus* et *O. barrelieri*

III.6.1.1. Compositions chimiques des fractions d'HE de *C. citratus*

Le chromatogramme du standard n-alkanes C7-C40 (**Annexe VII**); les chromatogrammes et les temps de rétentions des pics des composés identifiés des fractions d'huiles essentielles des plantes fraîches et des plantes sèches de *C. citratus* sont respectivement présentés par la **Figure 62** et la **Figure 63**.

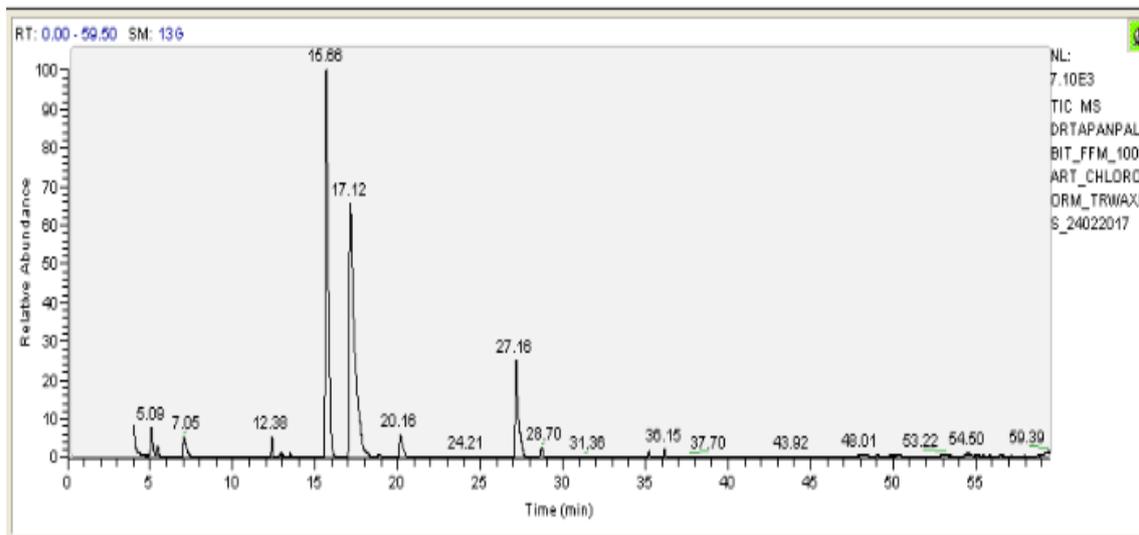
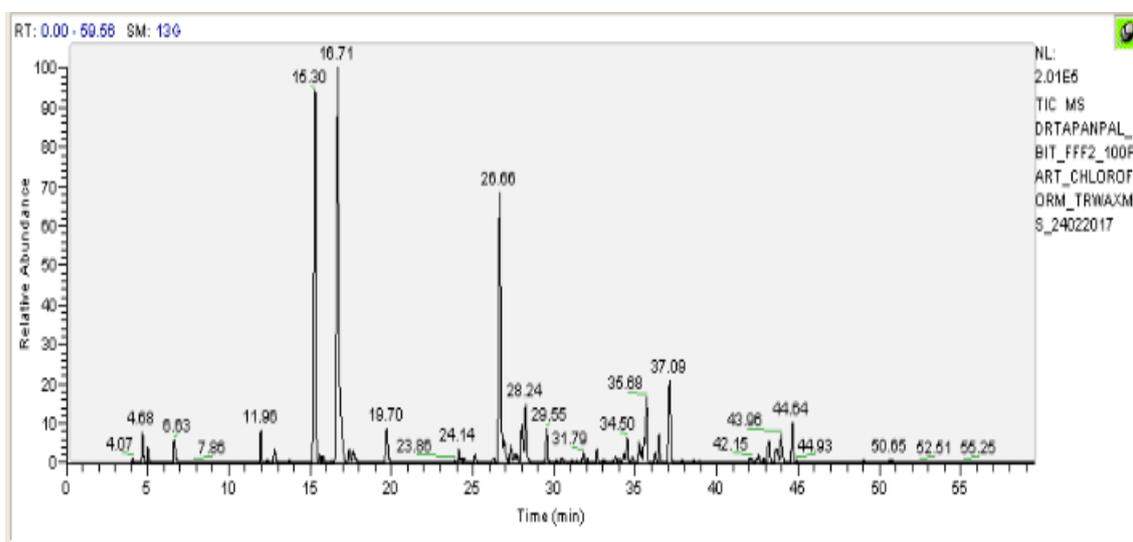
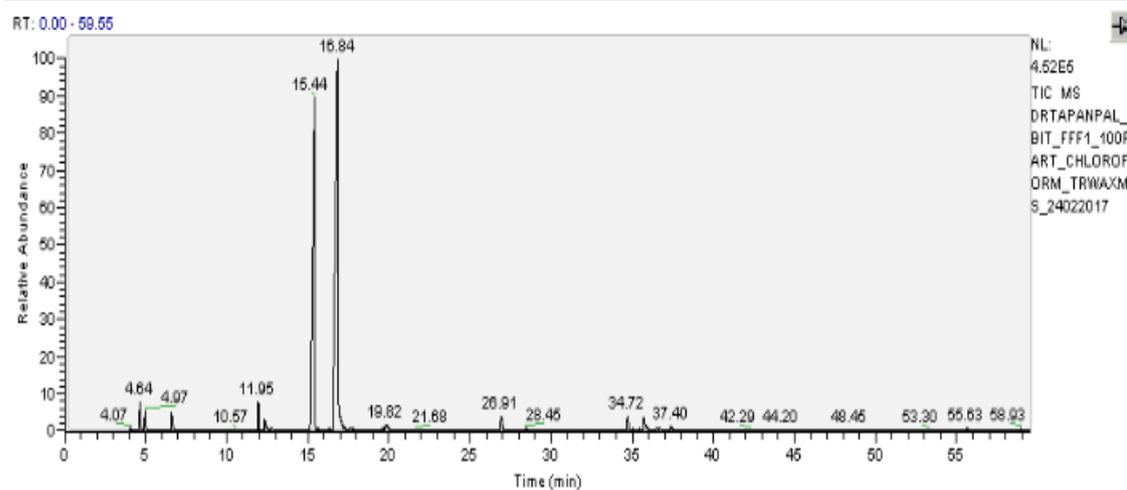


Figure 62: Chromatogrammes des fractions d'HE des plantes fraîches de *C. citratus*: du haut vers le bas; CF₁, (FF₁) CF₂ (FF₂) et CF_M(FF_M)

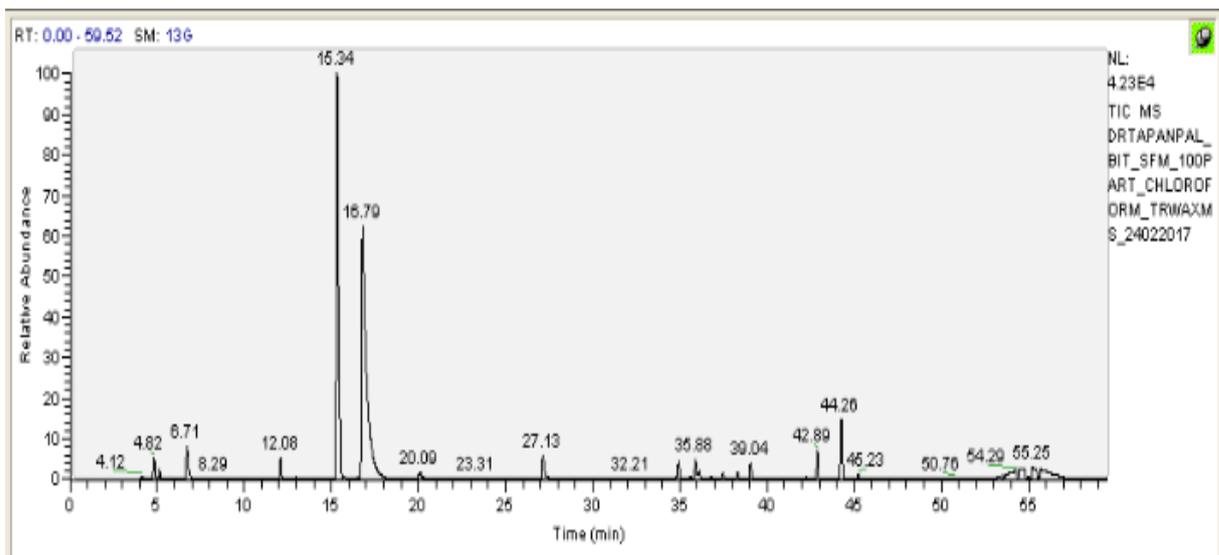
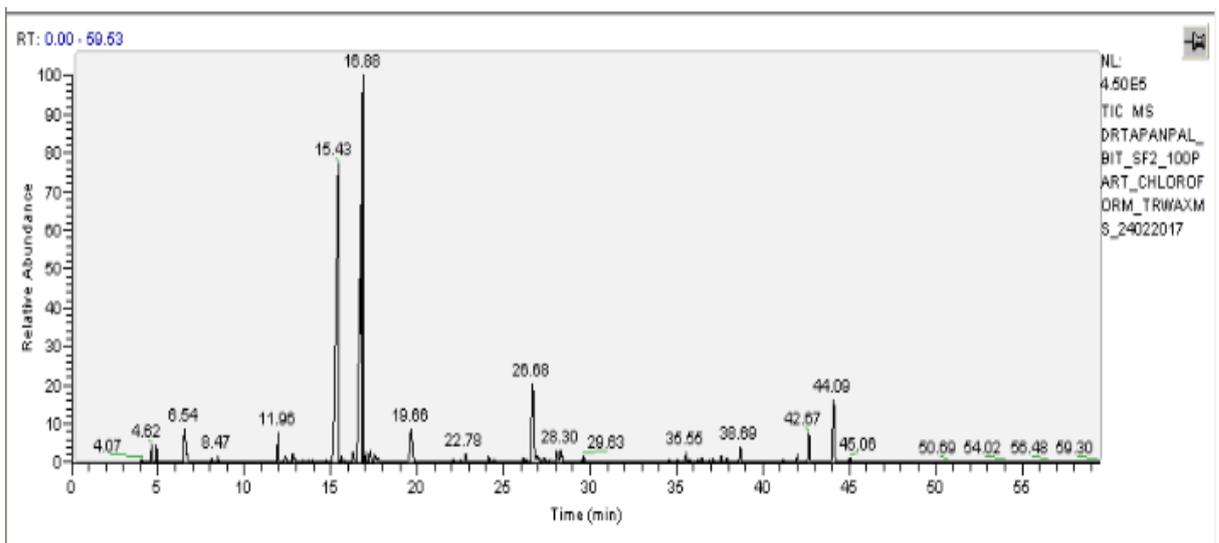
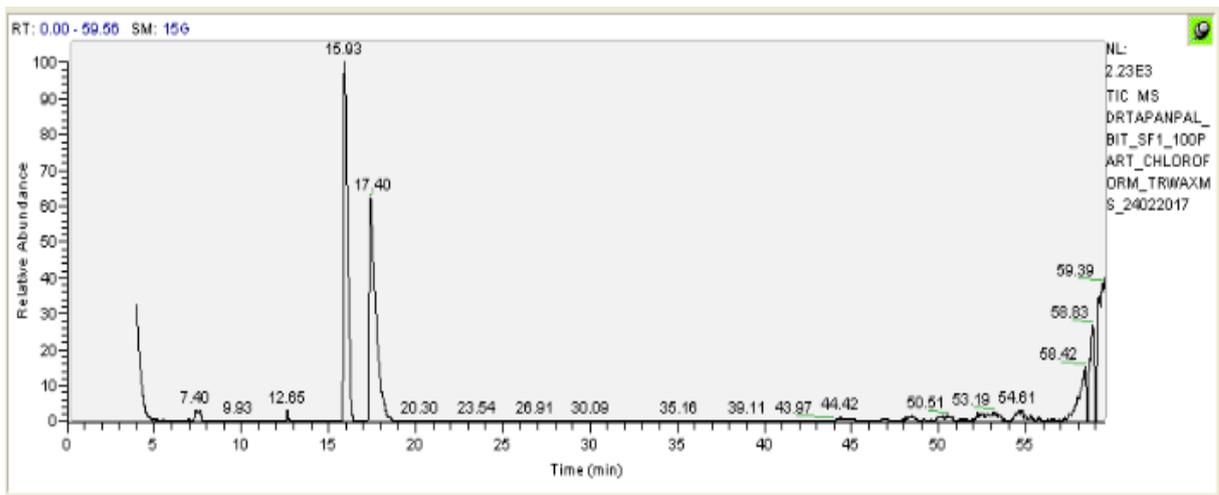


Figure 63: Chromatogrammes des fractions d'HE des plantes sèches de *C. citratus*: du haut vers le bas; CS₁(SF₁), CS₂(SF₂) et CS_M(SF_M)

A l'analyse de ces chromatogrammes, on peut remarquer qu'autour des temps de rétention 15 min et 17 min, il ressort pour chacune des fractions d'huile essentielle deux pics bien distincts. CS₂ et CS_M d'une part, CF₂ et CF_M d'autre part ont également présenté un autre pic remarquable autour du temps de rétention 27 min. Les indices de rétention calculés et comparés avec les indices spectraux des échantillons de référence publiés dans la littérature et associé aux spectres de masse comparés la base des données des spectres de masse NIST ont permis d'obtenir les composés présentés dans le **tableau XXVII**.

Tableau XXVIII: Composition chimique des fractions d'huiles Essentielles de *Cymbopogon citratus*

Composition (%)										
N	Composés	IR	Plantes fraîches			Plantes sèches			Formule	MI
			CF ₁	CF ₂	CF _M	CS ₁	CS ₂	CS _M		
1	β-Pinène		/	/	/	0,02	/	/	C ₁₀ H ₁₆	SM
2	δ-2-Carène	1129	0,08	0,06	/	0,05	0,05		C ₁₀ H ₁₆	IR-SM
3	3-carène	1135	/	/	/	/	/	0,21	C ₁₀ H ₁₆	IR-SM
4	Myrcène	1155	1,43	1,26	2,23	0,03	0,49	1,23	C ₁₀ H ₁₆	IR-SM
5	α-Terpinène	1170	/	/	/	0,03	/	/	C ₁₀ H ₁₆	IR-SM
6	2-Heptanone	1180	/	/	/	0,04	/	/	C ₇ H ₁₄ O	IR-SM
7	1,4-Cineole	1183	/	/	/	/	0,43	/	C ₁₀ H ₁₈ O	IR-SM
8	Dehydro-1,8-cineole	1185	/	/	/	/	0,05	/	C ₁₀ H ₁₆ O	IR-SM
9	Limonène	1192	1,01	0,54	0,84	0,02	0,03	0,48	C ₁₀ H ₁₆	IR-SM
10	1,8-cinéole	1204	/	/	/	0,08	/	/	C ₁₀ H ₁₈ O	IR-SM
11	β-Ocimène, (Z)-	1232	/	/	/	0,02	/	/	C ₁₀ H ₁₆	IR-SM
12	β-Ocimène, (E)-	1247	/	/	/	0,15	/	/	C ₁₀ H ₁₄	IR-SM
13	p-Cymène	1265	/	/	/	0,03	0,03	/	C ₁₀ H ₁₄	IR-SM
14	Terpinolène	1270	1,49	1,22	2,23	0,06	/	2,92	C ₁₀ H ₁₆	IR-SM
15	Isopentyl isovalerate	1289	/	/	/	0,54	/	/	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	IR-SM
16	o-Cymène	1299	/	/	/	0,93	/	/	C ₁₀ H ₁₆	IR-SM
17	6-Méthyl-5-hepten-2-one	1324	/	/	/	/	0,15	/	C ₈ H ₁₄ O	IR-SM
18	α-Pinène oxide	1349	/	/	/	/	0,18	0,07	C ₁₆ H ₁₆ O	IR-SM
19	allo-Ocimène	1358	/	/	/	/	/	0,07	C ₁₀ H ₁₆	IR-SM
20	Hexylbutanoate	1408	/	0,96	/	/	/	/	C ₁₀ H ₂₀ O	IR-SM
21	Linalool oxide cis-	1445	0,03	/	/	/	0,02	/	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	IR-SM
22	α-Gurjunène	1519	1,06	0,13	1,08	0,44	0,89	1,09	C ₁₅ H ₂₄	IR-SM
23	Linalool	1542	1,04	/	0,4	/	0,35	0,03	C ₁₀ H ₁₈ O	IR-SM
24	α-Bergamotène, cis-	1548	0,19	0,62	/	/	0,81	0,1	C ₁₅ H ₂₄	IR-SM
25	Myrcénol	1587	/	/	0,23	/	0,05	/	C ₁₀ H ₁₈ O	IR-SM
26	Caryophyllène, (E)-	1589	/	0,07	/	/	0,09	/	C ₁₅ H ₂₄	IR-SM
27	Terpinèn-4-ol	1597	/	/	/	/	0,06	/	C ₁₀ H ₁₈ O	IR-SM
28	Dihydrocarvone trans	1607					0,06	/	C ₁₀ H ₁₆ O	IR-SM
29	α-Guaiène	1625	/	/	/	/	0,05	/	C ₁₅ H ₂₄	IR-SM
30	Néral	1672	38,83	19,95	41,56	35,21	27,24	38,15	C ₁₀ H ₁₆ O	IR-SM
31	δ-Terpineol	1681	/	/	/	/	0,24	/	C ₁₀ H ₁₈ O	IR-SM
32	Lavandulol	1683	/	/	/	/	0,3	/	C ₁₀ H ₁₈ O	IR-SM
33	γ-Muuroène	1694	0,05	0,23	/	/	/	0,3	C ₁₅ H ₂₄	IR-SM

34	α -Terpineol	1697	/	0,27	/	/	/	/	C ₁₀ H ₁₈ O	IR-SM
35	Germacrène D	1707	0,13	/	/	/	/	/	C ₁₅ H ₂₄	IR-SM
36	Neryl acétate	1709	/	0,05	0,04	/	0,59	0,12	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	IR-SM
37	Géranial	1729	45,64	23,17	28,13	24,59	19,79	28,75	C ₁₀ H ₁₆ O	IR-SM
38	Carvone	1738	/	/	/	/	18,79	/	C ₁₀ H ₁₄ O	IR-SM
39	α -Farnésène, (E,E)-	1745	/	/	/	/	0,22	/	C ₁₅ H ₂₄	IR-SM
40	γ -Bisabolène (E)	1749	/	/	/	/	0,08	/	C ₁₅ H ₂₄	IR-SM
41	Géranyl acetate	1756	0,04	/	/	/	0,75	/	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	IR-SM
42	γ -Cadinène	1767	/	/	/	/	0,08	/	C ₁₅ H ₂₄	IR-SM
43	Citronellol	1769	/	0,52	0,02	/	0,4	/	C ₁₀ H ₂₀ O	IR-SM
44	α -Cadinène	1774	0,2	0,82	0,05	0,09	0,29	/	C ₁₅ H ₂₄	IR-SM
45	Néryl propanoate	1786	0,21	/	/	0,06	/	/	C ₁₃ H ₂₂ O ₂	IR-SM
46	Nérol	1792	/	/	0,02	/	0,09	/	C ₁₀ H ₁₈ O	IR-SM
47	2-Tridécane	1807	/	0,06	/	/	0,05	/	C ₁₃ H ₂₆ O	IR-SM
48	Carveol, (trans)	1828	/	/	0,35	/	/	/	C ₁₀ H ₁₆ O	IR-SM
49	Carveol, (cis)	1845	0,19	/	/	/	0,04	/	C ₁₀ H ₁₆ O	IR-SM
50	2-dodécanal cis	1866	/	0,05	/	/	/	/	C ₁₂ H ₂₂ O	IR-SM
51	Géranyl butanoate	1877	/	/	/	/	3,03	0,63	C ₁₄ H ₂₄ O ₂	IR-SM
52	Carvacrol acétate (E)	1881	0,93	1,87	2,56	/	/	/	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	IR-SM
53	β -Calacorène	1935	/	/	/	/	0,05	0,11	C ₁₅ H ₂₀	IR-SM
54	Caryophyllène oxide	1971	0,03	/	/	/	0,08	/	C ₁₅ H ₂₄ O	IR-SM
55	α -Humulène oxide	2012	/	/	/	/	0,06	/	C ₁₅ H ₂₄ O	IR-SM
56	Elémol	2079	/	0,05	/	/	0,55	0,08	C ₁₅ H ₂₆ O	IR-SM
57	Cédrol	2123	/	0,5	/	/	0,13	/	C ₁₅ H ₂₆ O	IR-SM
58	Hexahydrofarnesyl acétone	2127	/	0,16	/	/	0,11	/	C ₁₈ H ₃₆ O	IR-SM
59	γ -Décalactone	2238	/	0,18	/	/	0,15	/	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	IR-SM
60	β -Bisabolol	2247	/	0,01	/	/	0,06	/	C ₁₅ H ₂₆ O	IR-SM
61	α -Muurolool	2179	/	0,04	/	/	0,08	/	C ₁₅ H ₂₆ O	IR-SM
62	Carvacrol	2205	/	0,29	/	/	0,04	/	C ₁₀ H ₁₄ O	IR-SM
63	α -Cadinol	2218	/	/	/	/	0,12	/	C ₁₅ H ₂₆ O	IR-SM
64	β -Sinensal	2227	/	/	/	/	0,07	/	C ₁₅ H ₂₂ O	IR-SM
65	β -Eudesmol	2240	/	0,24	/	/	0,12	/	C ₁₅ H ₂₆ O	IR-SM
66	Eugénol acétate	2272	1,58	14,68	10,94	/	6,13	2,32	C ₁₂ H ₁₄ O ₃	IR-SM
67	Acide décanoïque	2275	/	1,28	/	/	/	/	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	IR-SM
68	Isophytol	2289	0,09	0,8	/	/	0,38	/	C ₂₀ H ₄₀ O	IR-SM
69	Farnésol, (2Z,6Z)-	2318	/	0,32	/	/	0,14	/	C ₁₅ H ₂₆ O	IR-SM
70	Juniper Camphor	2325	/	0,34	/	/	0,15	/	C ₁₅ H ₂₆ O	IR-SM
71	Farnésol, (2E,6Z)-	2361	0,12	1,77	0,06	/	/	/	C ₁₅ H ₂₆ O	IR-SM
72	Farnésol, (2Z,6E)-	2381	0,19	2,87	0,94	/	0,79	/	C ₁₅ H ₂₆ O	IR-SM
Composition par classes										
I	Monoterpènes hydrogénés	4,01	3,08	4,46	1,34	0,60	4,91			
II	Monoterpènes oxygénés	85,73	48,98	71,55	60,42	69,9	66,9			
III	Sesquiterpènes hydrogénés	1,63	1,87	1,13	0,53	2,56	1,6			
IV	Sesquiterpènes oxygénés	0,34	2,30	1,00	0,00	2,35	0,08			
V	Autres classes	3,93	18,15	13,54	0,10	12,54	3,14			
	%Total, composés identifiés	95,67	74,38	91,68	62,39	87,97	76,66			

IR: Indice de rétention; **MI:** Méthode d'identification; **SM:** spectrométrie de masse. **CF₁:** Fraction 1 de l'HE des plantes fraîches de *C. citratus*, collectées pendant les 60 premières minutes depuis le début de l'écoulement des principes actifs lors de l'hydrodistillation; **CF₂:** Fraction 2 de l'HE des plantes fraîches de

C. citratus, collectées de la 61^{ème} minute jusqu'à la fin de l'hydrodistillation; **CF_M**: HE complète des plantes fraîches de *C. citratus*; **CS₁**: Fraction 1 de l'HE des plantes sèches de *C. citratus*, collectées pendant les 60 premières minutes depuis le début de l'écoulement des principes actifs lors de l'hydrodistillation; **CS₂**: Fraction 2 de l'HE des plantes sèches de *C. citratus*, collectées de la 61^{ème} minute jusqu'à la fin de l'hydrodistillation; **CS_M**: HE complète des plantes sèches de *C. citratus*.

A l'analyse du tableau, on peut ressortir que :

Au total 72 composés (les structures de certains des composés identifiés se trouvent en **Annexe III**) ont été identifiés dans les fractions d'HE; chaque fraction d'huile essentielle est constituée d'un mélange complexe de plusieurs composés; 22, 31, 17, 18, 52 et 17 composés représentant respectivement 95,67%, 74,38%, 91,68%, 62,39%, 87,97% et 76,66% de la composition de CF₁, CF₂, CF_M, CS₁, CS₂ et CS_M.

Toutes les fractions d'HE contiennent le myrcène, le limonène, l' α -gurjunène, le néral et le gèranial; mais à des proportions différents les unes des autres. Les constituants prédominants de toutes ces fractions d'HE sont le Néral (19,95 - 41,56%) et le gèranial (18,79 - 45,64%); avec une prédominance du néral dans les fractions CS₁, CS₂, CS_M, CF_M et une prédominance du gèranial dans CF₁ et CF₂. Certains composés à l'instar du carvacrol acétate et du farnésol (2E, 6Z) se retrouvent uniquement dans les fractions des HE des plantes fraîches de *C. citratus* (CF₁, CF₂, et CF_M); par ailleurs, ces dernières ont été considérablement plus riches en eugénol acétate (phénol). Le cédrol, l'hexahydrofarnesyl acétone, le γ -dècalactone, le β -bisabolol, l' α -muurolol, le cavacrol le β -eudesmol et bien d'autres composés ont été détectés à de faibles proportions seulement dans les fractions d'HE collectées entre la 61^{ème} minute à la fin de l'Hydrodistillation (CF₂ et CS₂).

Les monoterpènes oxygénés ont été la classe la plus abondante de composés identifiés dans toutes les fractions d'huiles essentielles, et leurs pourcentages respectifs ont été de 85,73%, 45,34%, 71,55%, 60,42% 69,9% et 66,9% pour CF₁, CF₂, CF_M, CS₁, CS₂ et CS_M. En dehors des monoterpènes hydrocarbonés(0,6-4,91%), des monoterpènes oxygénés (48,98-85,73%), des sesquiterpènes hydrocarbonés(0,53-2,56%) et des sesquiterpènes oxygénés(0-2,35%), les autres classes de composés ont été essentiellement représentées par l'Eugénol acétate (plus concentré dans les fractions CF_M et CS_M), le carvacrol acétate et le gèranyl butanoate.

Contrairement au chromatogramme de la fraction CF₁, les chromatogrammes des fractions CF₂, CF_M, CS₁, CS₂ et CS_M (**Figure 62 et 63**) ont présenté plusieurs pics d'aires considérables, correspondant à des temps de rétentions élevés, et dont les structures n'ont pas pu être élucidées; CS₁ par exemple a présenté des pics (composés) à des temps de

réention 58,43, 58,62, 58,79, 59,13 représentant respectivement 6,25%, 2,13%, 9,23% et 9,83% de la composition totale du mélange (**Figure 63**).

III.6.1.2. Screening phytochimique des extraits aqueux et éthanoliqes de *C. citratus* et d'*oxalis barrelieri*

Le screening phytochimiques de plusieurs classes de métabolites, dans les extraits aqueux et éthanoliqes de *C. citratus* et d'*O. barrelieri*.a été fait et les résultats sont consignées dans le **Tableau XXVIII**.

Tableau XXIX: Screening phytochimique des extraits aqueux et éthanoliqes de *C. citratus* et d'*O. barrelieri*

Familles de métabolites secondaires	Extraits aqueux		Extraits éthanoliqes	
	<i>EAO</i>	<i>EAC</i>	<i>EEo</i>	<i>EEc</i>
Alcaloïdes	++	-	++	-
Anthocyanines	-	-	-	-
Anthraquinones	++	-	++	+
Flavonoïdes	++	-	+++	+++
Phénols	++	-	+++	++
Stérols	++	-	++	-
Saponines	+++	-	+	+
Triterpènes	+	-	+	-
Tanins galliques	++	-	++	-
Tanins ellagiques	-	-	-	++
Coumarines	++	+	++	-
Glycosides	-	+	-	+

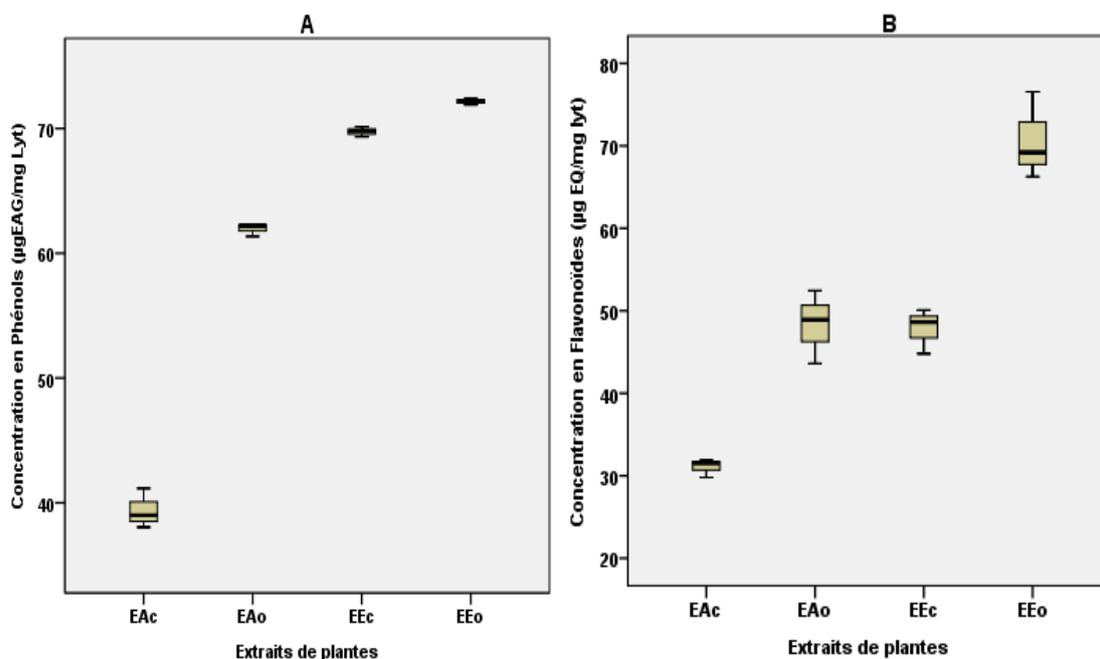
EAO: Extrait aqueux *O. barrelieri*; EEo: Extrait à l'éthanol *O. barrelieri* ; EAC: Extrait aqueux *C. citratus*; EEc: Extrait à l'éthanol *C. citratus*.

Tous les extraits utilisés (*EAO*, *EEo*, *EAC* et *EEc*) ne contiennent pas d'anthocyanines. Les tannins ellagiques ont été identifiés seulement dans *EEc*. Les terpènes, les alcaloïdes, les stérols et les tannins galliques ont été détectés exclusivement dans les extraits d'*O. barrelieri* (*EAO* et *EEo*); qui par ailleurs ne contiennent pas de glycosides présent dans les extraits de *C. citratus*. Chacun des métabolites secondaires suivants: phénols, flavonoïdes, anthraquinones, saponines et coumarines; se retrouve au

moins dans trois des quatre extraits utilisés dans ce travail Les phénols et les flavonoïdes semblent plus concentrés dans EEO et EEC alors que les saponines le sont dans EAO.

III.6.1.3 Dosage des métabolites primaires et secondaires des extraits aqueux et ethanoliques de *C. citratus* et d'*Oxalis barrelieri*

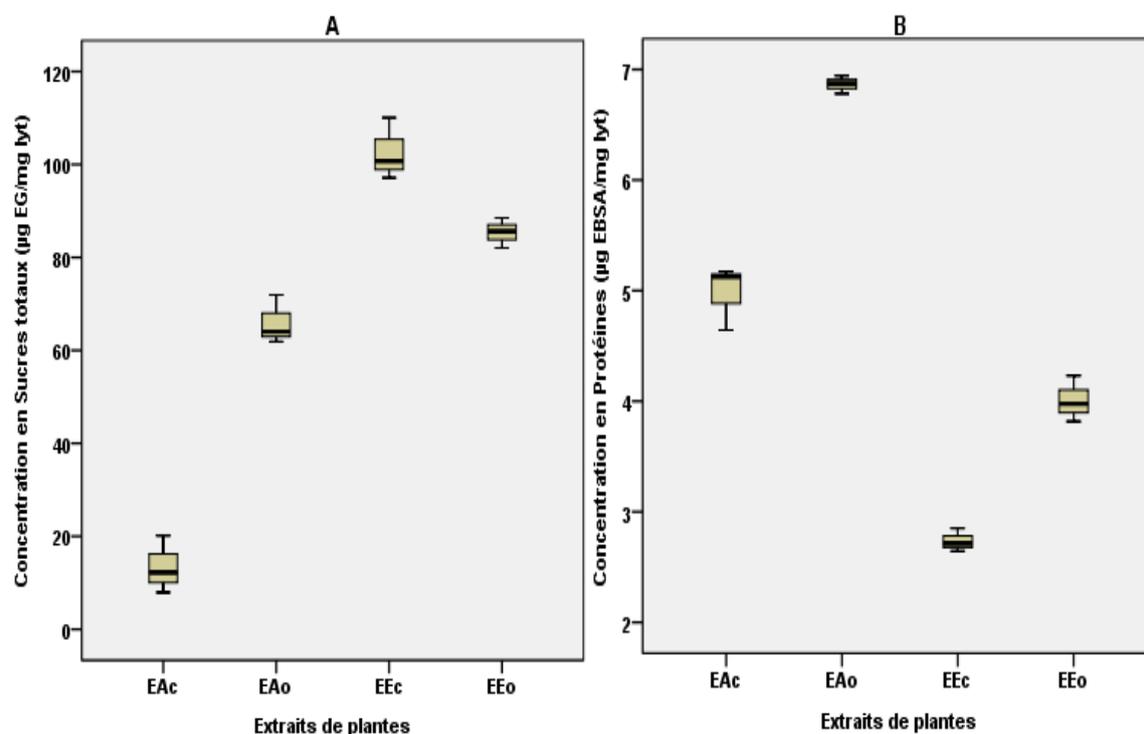
Les moyennes avec les écarts types des teneurs en métabolites secondaires (phénols totaux et flavonoïdes) et en métabolites primaires (sucres totaux et protéines) sont respectivement présentées par les histogrammes des boîtes à moustaches de la **Figure 64** et de la **Figure 65**.



EAo: Extrait aqueux d'*O. barrelieri*; EEO: Extrait à l'éthanol d'*O. barrelieri* ; EAc: Extrait aqueux de *C. citratus*; EEc: Extrait à l'éthanol de *C. citratus*; EAG: Equivalent Acide Gallique; EQ: Equivalent Quercétine; Lyt: Lyophilisat

Figure 64: Teneur des extraits aux solvants de *C. citratus* et d'*O. barrelieri* en métabolites secondaires (A) Phénols totaux; (B) Flavonoïdes totaux

Relativement aux métabolites secondaires, on peut noter que, les teneurs en phénols totaux (µg EAG/mg Lyt) des extraits de plantes sont toutes significativement différentes les unes des autres; elles sont de $39,4 \pm 1,59^a$, $61,96 \pm 0,52^b$, $69,74 \pm 0,40^c$ et $72,15 \pm 0,25^d$. respectivement pour EAc, EAo, EEc et EEO. La teneur en flavonoïdes (µg EQ/mg lyt) de l'EAc ($31,06 \pm 1,11^a$) a été la plus faible et, celle de l'EEO ($70,67 \pm 5,30^c$) la plus forte; EAo ($48,32 \pm 4,44^b$) et EEc ($47,83 \pm 2,73^b$) ont été statistiquement identiques. Globalement, les concentrations en métabolites secondaires (phénols et flavonoïdes) des extraits éthanoliques ont été significativement plus importantes que celles des extraits aqueux des plantes correspondantes.



EAo: Extrait aqueux d'*O. barrelieri*; **EEO:** Extrait à l'éthanol d'*O. barrelieri*; **EAc:** Extrait aqueux de *C. citratus*; **EEc:** Extrait à l'éthanol de *C. citratus*; **BSA:** L'Albumine Bovine Sérique; **EQ:** Equivalent Glucose; **Lyt:** Lyophilisat

Figure 65: Teneur des extraits aux solvants de *C. citratus* et d'*O. barrelieri* en métabolites primaires. (A) Sucres totaux; (B) Protéines totaux

En ce qui concerne les métabolites primaires, les teneurs en sucres totaux (µg EG/mg lyt) des extraits éthanoliques (EEO = 85,37 ± 3,24^c; EEc = 102,63 ± 6,68^d) ont été significativement importantes comparer à celles des extraits aqueux (EAo = 65,94 ± 5,30^b; EAc = 13,42 ± 6,20^a). Les extraits aqueux ont été plus concentrés (µg EBSA/mg lyt) en protéines (EAo = 6,86 ± 0,08^d; EAc = 4,98 ± 0,29^c) que les extraits éthanoliques (4,00 ± 0,20^b, EEc = 2,73 ± 0,10^a).

III.6.1.4. Détection des composés quantitative dans les extraits aqueux et éthanoliques de *C. citratus* et d'*oxalis barrelieri*

Les chromatogrammes et les temps de rétentions des composés détectés par CLHP, dans EEc, EAc, EEO et EAo sont respectivement présentés par les **Figures; 66, 67, 68** et **69** ci-dessous.

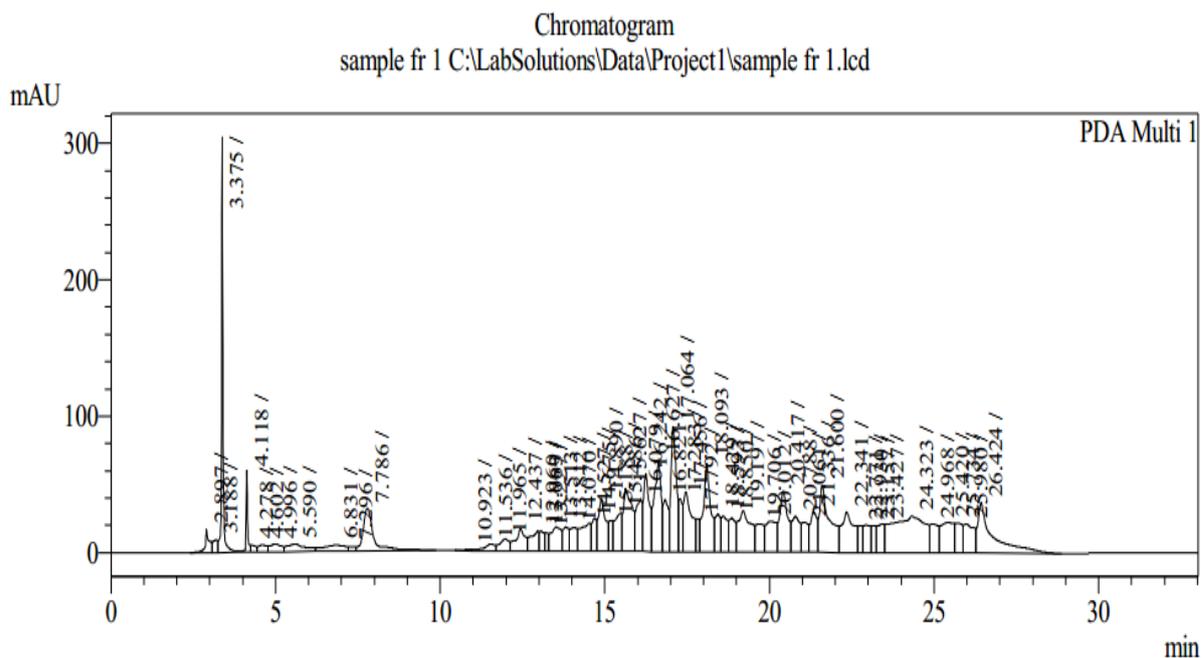


Figure 66: Chromatogramme de l'analyse par CLHP de l'extrait éthanolique de *C. citratus* (EEc) à la longueur d'onde $\lambda = 280$ nm

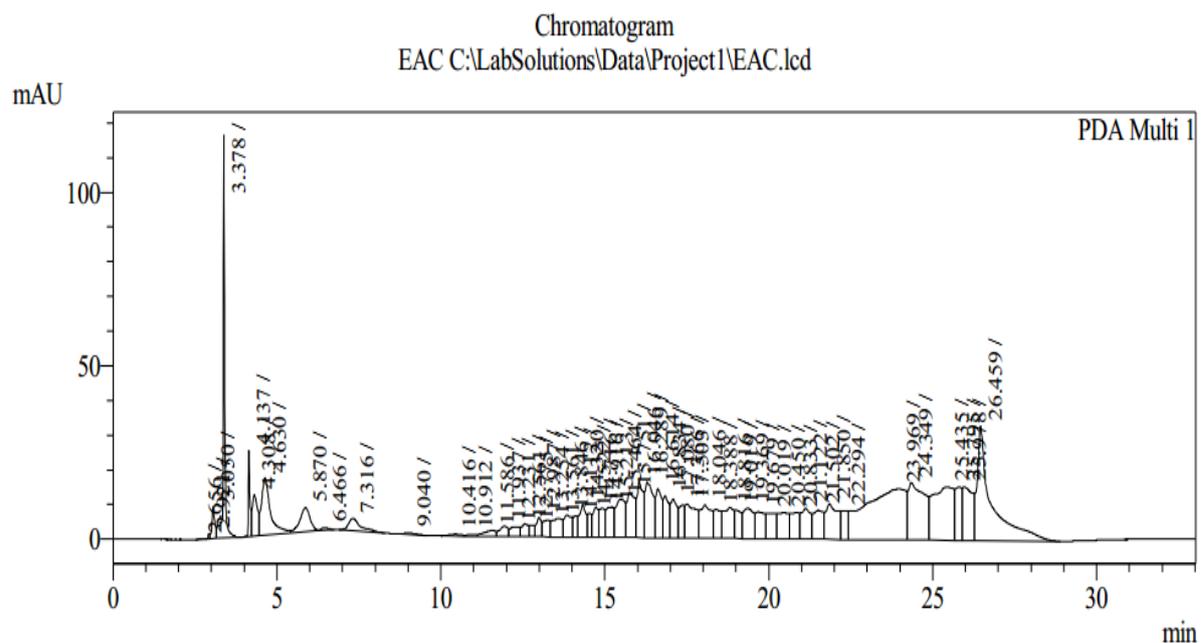


Figure 67: Chromatogramme de l'analyse par CLHP de l'extrait aqueux de *C. citratus* (EAc) à la longueur d'onde $\lambda = 280$ nm

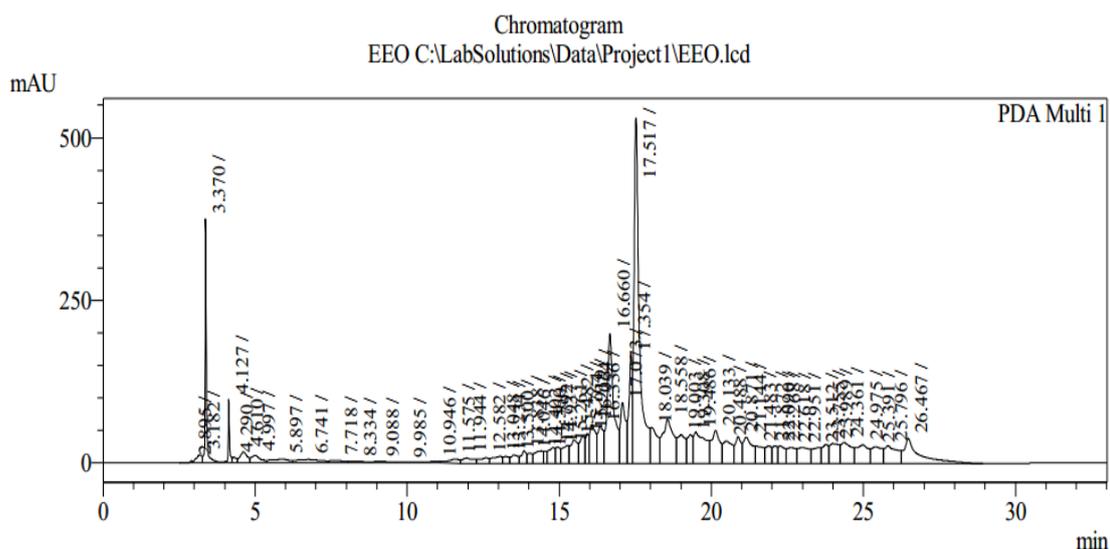


Figure 68: Chromatogramme de l'analyse par CLHP de l'extrait éthanolique d'*O. barrelieri* (EEo) à la longueur d'onde $\lambda = 280$ nm

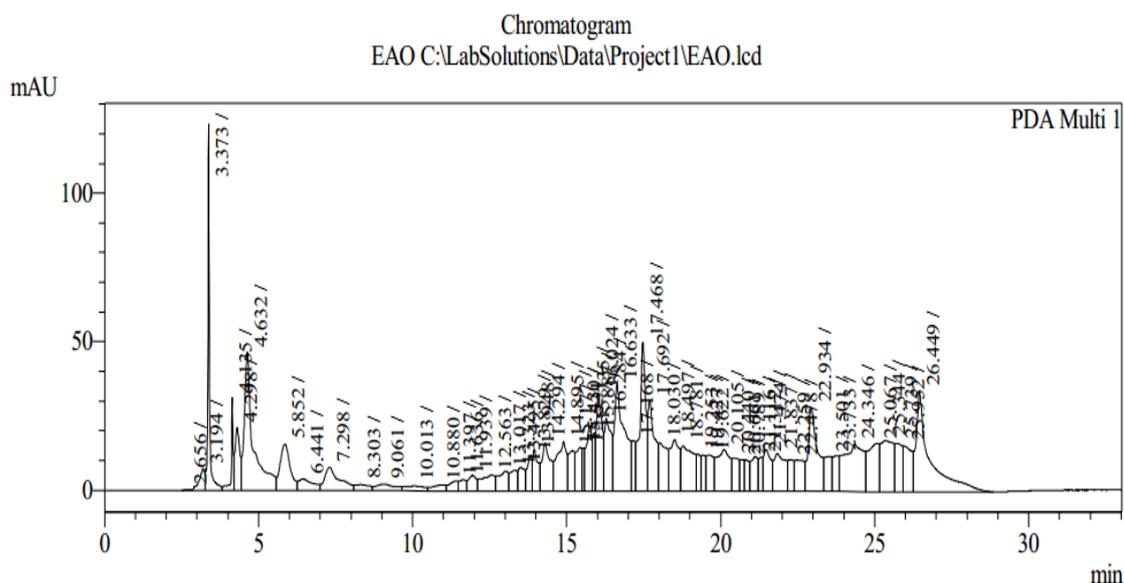


Figure 69: Chromatogramme de l'analyse par CLHP de l'extrait aqueux d'*O. barrelieri* (EAo) à la longueur d'onde $\lambda = 280$ nm

A partir des données de ces chromatogrammes, on peut relever que 58 composés ont été identifiés dans EEO. Le composé le plus abondant ici (7,3%) a un temps de rétention de 24,32 min. Le constituant avec le temps de rétention de 23,9 min (12,1%) a été le plus abondant parmi les 56 composés identifiés dans EAO. Sur respectivement 59 et 60 pics ressortis à 280 nm pour EEO et EAO, ceux avec les temps de rétention respectifs de 17,5min (17,01%) et 26,4 min (6,54%) ont eu les plus grandes aires. Les temps de rétention et les pourcentages relatifs de ces sept premiers composés les plus abondants sont présentés dans le **Tableau XXIX**.

Tableau XXX: Temps de rétention et proportions des principaux composés détectés dans EEc, EAc EEO et EAo à 280 nm

Comp	EEc		EAc		EEO		EAo	
	Tr (min)	Pourcent	Tr (min)	pourcent	Tr (min)	pourcent	Tr (min)	pourcent
1	3,375	3,594	3,375	3,636	3,370	3,050	16,633	5,254
2	15,627	3,294	4,630	3,054	16,660	7,777	17,468	4,101
3	16,627	3,692	23,969	12,149	17,354	3,459	17,692	2,958
4	17,064	4,121	24,349	5,536	17,517	17,018	22,334	3,700
5	18,093	3,900	25,435	6,309	18,558	4,315	24,34	4,399
6	24,323	7,304	25,978	3,128	19,486	3,491	25,344	3,063
7	26,424	4,639	26,459	9,757	26,467	3,505	26,449	6,544

Tr= Temps de Rétention; **EEc** = Extrait éthanolique de *C. citratus*; **EAc** =Extrait aqueux de *C. citratus*; **EEO** = Extrait éthanolique d'*O. barrelieri*; **EAo** = Extrait aqueux d'*O. barrelieri*.

Bien que quelques composés soient communs à presque tous les extraits (Tr= 3,3 et Tr= 16,6), leurs compositions chimiques sont différentes tant quantitativement que qualitativement. Les chromatogrammes individuels des composés phénoliques standards montrant leurs temps de rétention dans la colonne de CLHP ont été obtenus (données non présentés). Celui représentant le mélange de l'ensemble de ces standards est présenté par la **Figure 70**. À l'analyse de ces chromatogrammes, on peut remarquer que les temps de rétention de certains standards (Catéchine, Quercétine, Acide salicylique) dans le mélange sont décalés de -0,2 à -0,05 unités comparé à lorsqu'ils sont pris individuellement. Pour l'analyse de nos données, nous avons privilégié les temps de rétention des standards sous forme de mélange; considérant que les composés phénoliques contenus dans les extraits de plantes (EEc, EAc, EEO et EEO) se trouvent sous forme de mélange. Par ailleurs, l'acide tanique, le pyrogallol et l'acide gallique ayant les temps de rétention respectifs de 6,458, 6,44 et 6,613 dans leurs chromatogrammes individuels se sont retrouvés être combinés en un seul pic (Tr = 6,441) lorsque les standards étaient mélangés. Le chromatogramme de l'acide ascorbique (individuel comme dans le mélange de standards) a ressorti deux pic majeurs qui représentent ses deux énantiomères: l'acide ascorbique (Tr = 3,38) et l'acide iso ascorbique (Tr = 4,41).

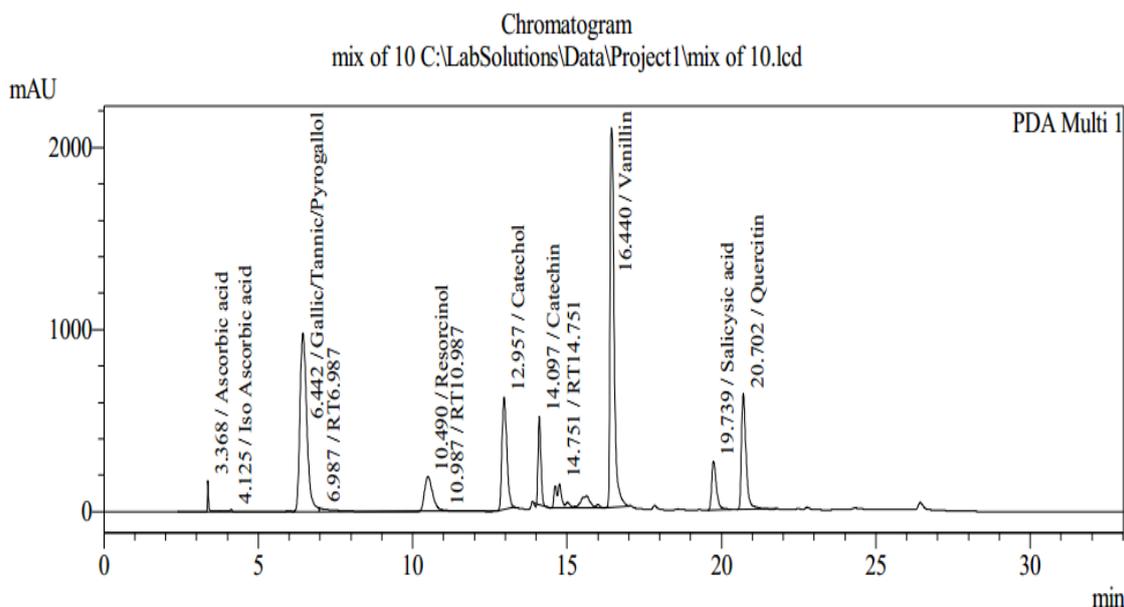


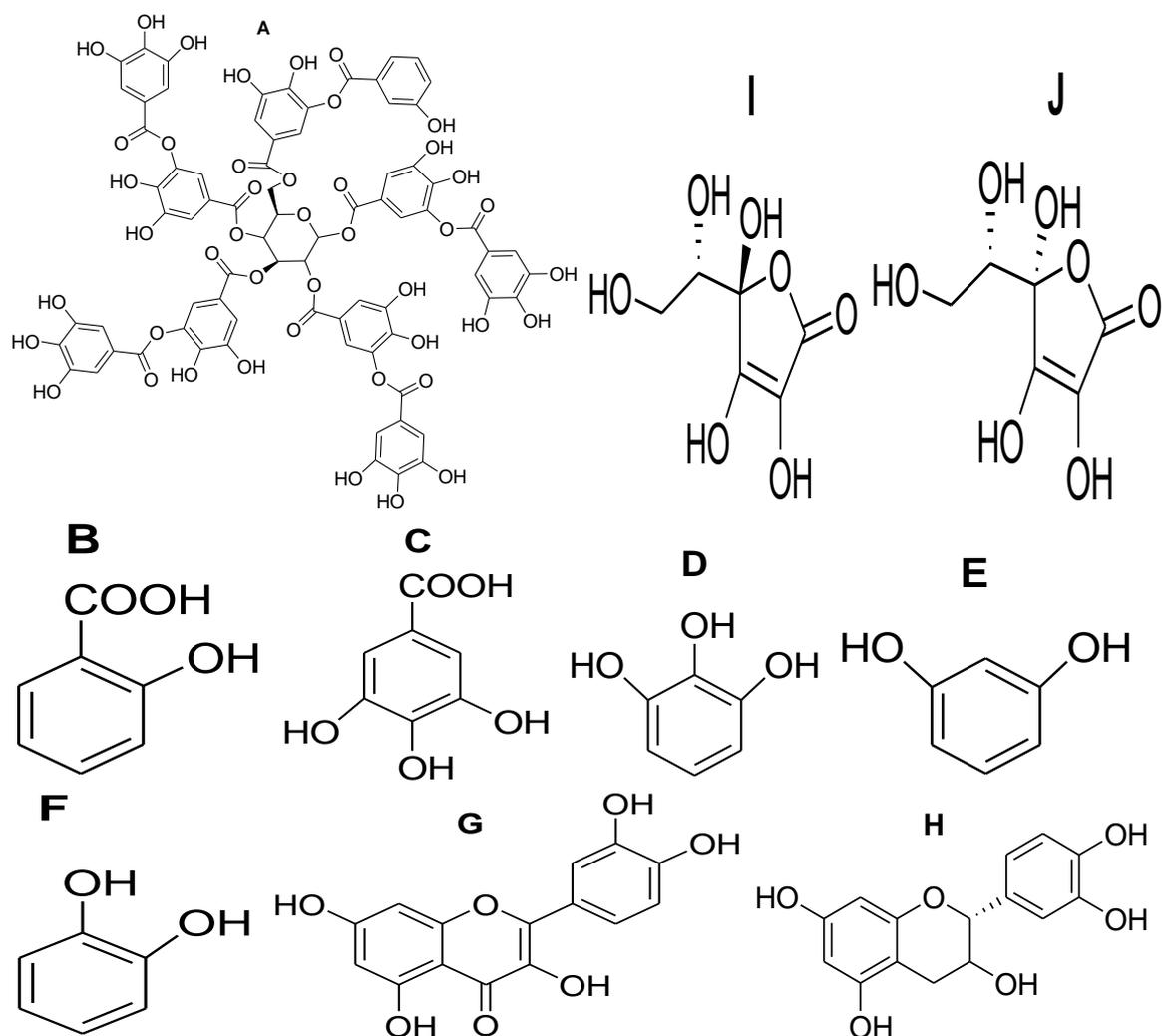
Figure 70: Chromatogramme de l'analyse par CLHP de l'extrait du mélange de standards phénoliques à la longueur d'onde $\lambda = 280$ nm

En comparant le chromatogramme de la **Figure 70** à ceux des différents extraits de plantes mentionnés plus haut et en tenant compte des quantités injectées en CLHP, nous avons ressorti le **Tableau XXX** qui présente les concentrations des différents composés phénoliques identifiés dans EEc, EAc, EEO et EEO. On peut y noter que: aucun des extraits ne contient la vanilline. L'acide tannique / Pyrogallol / Acide gallique se retrouve dans les extraits aqueux (EAc et EAO) et non dans les extraits éthanoliques (EEc, EEO). Tous les extraits contiennent l'acide L-ascorbique et l'acide iso ascorbique mais, ils sont plus concentrés dans EEc et EEO. La concentration en acide salicylique d'EEc (6,68 $\mu\text{g}/\text{mg}$) est un peu plus de deux fois celle d'EAc (2,64 $\mu\text{g}/\text{mg}$); EAO et EEO en sont dépourvus. Bien que présent dans tous les extraits de plantes, les catéchols sont un peu plus abondants dans EEc et EEO. La teneur en catéchine est plus de quatre fois, plus concentrée dans EEc (4,012 $\mu\text{g}/\text{mg}$) par rapport EAc (0,90 $\mu\text{g}/\text{mg}$); elle est absente dans EAO et présente en faible concentration dans EEO. La quercétine est présente dans tous les extraits, cependant avec une plus forte concentration dans les extraits éthanoliques de chacune des plantes comparativement aux extraits aqueux respectifs; EEc en est le plus riche. Les structures des composés identifiés sont présentées par la **Figure 71**. Parmi les sept (7) premiers composés majoritaires de chaque extrait des plantes, seul l'acide ascorbique a été identifié dans tous les extraits ($T_r = 3,3$ min). Les concentrations totales en composés phénoliques identifiés respectivement dans EAO, EEO, EAc, et. EEc sont de 2,34, 8,57, 5,04 et 16,04 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de lyophilisat.

Tableau XXXI: Teneur en composés phénoliques identifiés dans les extraits EEc, EAc, EEO et EEc

		Concentration ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de lyophilisat)						
Composés	Classe du composé	Tr	<i>O. barrelieri</i>		<i>C. citratus</i>		Formule	PM
			EAO	EEo	EAc	EEc		
Acide L-Ascorbique	Acide	3,368	51,53	132,0	43,03	104,6	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$	176,1
Acide isoascorbique	Acide	4,1	78,94	186,5	53,29	116,3	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$	176,1
Acide Gallique	Acide phénolique						$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$	170,1
Acide Tannique	Tannins	6,442	0,43	ND	0,037	ND	$\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_4$	1701,1
Pyrogallol	Simple phénol						$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$	126,1
Résorcinol	Simple phénol	10,49	ND	ND	ND	ND	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$	110,1
Catéchol	Simple phénol	12,95	1,11	1,68	0,447	1,875	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$	110,1
Catéchine	Flavonoïde	14,09	ND	2,69	0,903	4,012	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$	290,2
Vanilline	Aldehyde phénolique	16,44	ND	ND	ND	ND	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$	152,1
Acide Salicylique	Acide Phénolique	19,73	ND	ND	2,64	6,685	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$	138,1
Quercétine dihydrate	Flavonoïde	21,45	0,81	4,20	1,019	3,468	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$	302,2
Phenols totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$)			2,34	8,57	5,046	16,04		

EAO: Extrait aqueux d'*O. barrelieri*; **EEo:** Extrait à l'éthanol d'*O. barrelieri* ; **EAc:** Extrait aqueux de *C. citratus*; **EEc:** Extrait à l'éthanol de *C. citratus*; **Tr:** temps de rétention; **PM:** Poids Moléculaire (g/mol); **ND:** Non détecté



A = Acide Tannique; B = Acide Salicylique; C= Acide Gallique; D= Pyrogallol; E= Résorcinol; F = Catéchol; G= Quercétine dihydrate; H= Catéchine; I= Acide L-Ascorbique; J= Acide isoascorbique

Figure 71: Structure des composés identifiés dans les extraits EEc, EAc, EEo et EEc

III.6.1.5. Fractionnement bioguidé de l'extrait éthanolique de *C. citratus*

Les spectres RMN ^1H des composés obtenus, ont montré par corrélation, des pics caractéristiques des triterpènes pentacyclique (**Annexe VIII**). L'analyse des spectres RMN ^1H et RMN ^{13}C des composés BC-7, BC-101, BC-421 et les déplacements chimiques de leurs protons anomériques suivi de la comparaison avec les données de la littérature (**Douglas et al., 2016; Vidhu et al., 2012 Wen-Yi et al., 2011**), nous ont permis d'identifier le composé BC-7 comme étant le 3-O- β -D-glucopyranosyl-28-hydroxy- α -amyrine et les composés BC-101 et BC-421 identiques (les spectres du composé BC-421, étaient semblables à ceux de BC 101): le 3-O- β -D-glucopyranosyl- α -amyrine. Leurs structures sont présentées par la **Figure 72**. Les bioautographies des sous sous fractions issues du fractionnement de la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait éthanolique de

Cymbopogon citratus, ont présenté des zones d'inhibitions clairement distinctes, à l'égard de *Xanthomonas vesicatoria* ATCC 11633/ *Escherichia coli* ATCC 29425, traduisant ainsi leurs pouvoirs antimicrobiens; par exemple la **Figure 23B**, montre l'effet de la sous sous fraction B.

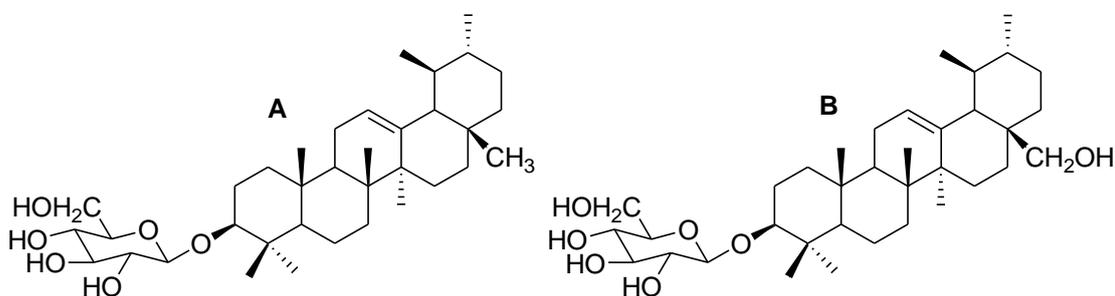


Figure 72: Composés identifiés dans les extraits éthanoliques de *Cymbopogon citratus*. (A) 3-O-β-D-glucopyranosyl-α-amyrine; (B) 3-O-β-D-glucopyranosyl-28-hydroxy-α-amyrine ou. 3-O-β-D-glucopyranosyl-uvaole.

III.6.2. Analyse des résultats phytochimiques des extraits de plantes

III.6. 2.1. Analyse de la composition des fractions d'huiles essentielles de *C. citratus*

Le géraniol a été majoritaire dans CF₁, CF₂, et le néral dans CF_M, CS₁, CS₂ et CS_M; bon nombre d'auteurs ont trouvé le géraniol comme composé majoritaire de la composition chimique de l'HE des plantes fraîches et/ou sèches de *C. citratus* (**Mohamed Hanaa et al., 2012; Barbosa et al., 2008; Pinto et al., 2015**); d'autres auteurs ont plutôt trouvé le néral comme composé majoritaire de l'HE de *C. citratus* (**Aziz et Gad, 2011**). Étant donné que le néral et le géraniol ne se volatilisent pas facilement à température ambiante (**Kumar et al., 2015**), les variations de concentrations de ces deux composés, entre les fractions d'HE des plantes fraîches et celles des plantes sèches peuvent être liées à de plausibles inter-conversions spontanées entre les deux composés (**Kumar et al., 2015**). La baisse observée de la teneur de citral dans certaines fractions d'HE serait due à la conversion de ce dernier en d'autres composés; par exemple, SF₂ qui a eu une faible proportion de géraniol (27,24%) et de néral (19,79%) s'est retrouvé avec une part considérable de carvone (18,79%) de formule C₁₀H₁₄O qui serait probablement issue de l'oxydation (déshydrogénation) du citral/géraniol, de formule C₁₀H₁₆O. En effet, les constituants de l'HE sont connus comme pouvant s'inter-converter entre eux à travers des réactions d'oxydation, d'isomérisation, de cyclisation, de polymérisation, de déshydrogénation ou de réarrangement thermique survenu biochimiquement ou chimiquement (**Turek et Stintzing, 2013**). Le fait que le géraniol distinctement majoritaire dans les fractions CF₁ et CF₂, ne le soit pas dans CF_M; peut laisser penser que la composition chimique du mélange d'HE

influence les plausibles réactions chimiques pouvant se dérouler dans le mélange d'HE, et affecter entre autres les teneurs des composés majoritaires.

Les différences en nombre et types de composés identifiés dans les différentes fractions d'HE, avec un nombre considérablement plus élevés pour les fractions collectées entre la 61^{ème} minute et la fin de l'hydrodistillation (CF₂ et CS₂), montrent bien que la distillation en fonction du temps est susceptible de réduire la concentration d'un composé donné dans une fraction pour favoriser la détection d'autres constituants ayant généralement des faibles concentrations dans une autre fraction.

Seule la fraction CF₁ (citral = 84,87%) a rempli les normes (citral >75%) pour être qualifié de produit de haute qualité (**Schaneberg et Khan, 2002**). L'existence des pics à des temps de rétentions élevés, explique les faibles pourcentages de composés identifiés dans les autres fractions d'HE (CF₂, CF_M, CS₁, CS₂ et CS_M), et en particulier ceux des fractions issues des plantes sèches; **Mohamed Hanaa et al. (2012)** ont trouvé des résultats similaires en analysant la composition chimique de l'HE des feuilles fraîches et sèches de *C citratus*. Selon **Barbosa et al. (2008)**, ces composés non identifiables sont associés avec la dégradation et l'oxydation de produit du citral; Ils pourraient aussi être liés à la dégradation de la silice constituant le support de séparation de la colonne chromatographique.

Le géraniol et le citronellal qui sont aussi souvent identifiés comme marqueurs de l'HE de *C citratus* (**Shah et al., 2011**), n'ont pas été détectés dans les six fractions d'HE. Comparer aux résultats trouvés par **Matasyoh et al. (2011)**; **Pinto et al. (2015)**, CF_M est qualitativement et quantitativement différent par au moins une dizaine de composés identifiés dans les feuilles fraîches de *C citratus*; aussi CS_M déjà différent de CF_M par 9 composés, est différent à des degrés variables, des quatorze échantillons d'HE des feuilles sèches de *C. citratus* analysés par **Barbosa et al. (2008)**. Ces différences qualitatives et quantitatives de composition chimique pourraient se justifier par le fait que la composition chimique de l'huile essentielle varie selon l'organe de la plante (**Tilaoui et al., 2015**), les conditions de stockage/séchage, la localisation géographique (**Shahhoseini et al., 2013**; **Priya et al., 2015**), l'âge/stade de maturité et de la saison de récolte (**Dutta et al., 2016**). Ces mêmes facteurs de variations impacteraient aussi par ricochet sur les différentes activités biologiques des HE (**Tilaoui et al., 2015**).

Les sesquiterpènes ont été plus concentrés dans les fractions d'HE collectées entre la 61^{ème} minute et la fin de l'hydrodistillation (CF₂ et CS₂); ce résultat corrobore avec l'hypothèse de **Khangholi et Rezaeinodehi (2008)**, indiquant une libération différée des

sesquiterpènes au cours de l'hydrodistillation, du fait de leurs poids moléculaires élevés: La méthodologie de fractionnement proposée dans ce travail apparaît ainsi être rapide et efficace à une certaine limite, pour la concentration d'un groupe précis de métabolites contenus dans le mélange complexe d'HE.

Les activités antifongiques du citral (néral et géraniol) ont été rapportées dans plusieurs travaux (**Lee et al., 2008; Zhou et al., 2014**); celles des fractions d'HE à l'égard de *B. oryzae* et *F. moniliforme*, seraient très probablement liées à la présence de ces deux composés. Une tentative de corrélation entre l'activité biologique et la teneur en composés majoritaires (Néral + géraniol) a montré que les fractions CF₁ (84,87%) et CF_M (69,56%), plus riches en citral, ont les activités anti fongiques les plus importantes à l'égard de *B. oryzae* (CMI CF₁=800ppm; CMI CF_M=1000 ppm); ce qui mime avec l'observation de **Hamdy et al. (2012)**; selon laquelle, les composés majoritaires des huiles essentielles déterminent généralement leurs propriétés biologiques. A l'inverse, CS₁ (59,8%) moins riche en citral que CS_M (66,85%), a été plus active que cette dernière vis à de *B. oryzae* et *F. moniliforme*, suggérant une plausible influence quantitative et /ou qualitative des constituants autres que le citral dans le mélange; en effets les composés tels que le 1,8-cinéole (**Shukla et al., 2012**), l'o-cymène (**Tangarife et al., 2011**) à activités antifongiques bien connues, sont présents dans CS₁ et absents dans CS_M. Le farnésol (2E, 6Z) présent dans CF_M est susceptible de justifier sa plus forte activité antifongique comparer à CS_M car, son groupe hydroxyl (OH) libre a été prouvé essentiel à conférer l'activité antimicrobienne (**Ben Arfa et al., 2006**). Deplus, CF_M est plus riche en eugénol acetate, qui sont connus posséder une activité antifongique parmi les groupes de composés identifiés dans les huiles essentielles originaires des plantes (**Jing, et al., 2017**). La concentration des composés mineurs dans les fractions d'HE collectées entre la 61^{ème} minute et la fin de l'hydrodistillation (CF₂ et CS₂) pourraient affecter les composés majeurs, réduisant leurs propriétés et justifiant ainsi les faibles activités antifongique de ces fractions comparées aux autres fractions (CS₁-CS_M, et CF₂-CF_M); en effet **Bakkali et al. (2008)** ont postulé que les activités des composés majeurs peuvent être modulées par les composés mineurs présents dans l'huile essentielle.

Si l'on se réfère au fait que, l'activité antifongique est dépendante de la fonction chimique impliquée: phénols > aldéhydes ≥ cétones > éthers > hydrocarbones (**Kalemba et Kunicka (2003)**); CS_M qui a une teneur en aldéhydes plus élevée que CS₁ serait présagé à être plus active vis-à-vis de *B. oryzae* et *F. moniliforme*; ce qui n'a pas été le cas; par ailleurs, le fait que les activités de CF_M et CS_M aient été respectivement intermédiaires à

CF₁ - CF₂ et CS₁ - CS₂ à l'égard de l'inhibition des deux agents pathogènes, montre à suffisance que les constituants du mélange complexe d'huile essentielle interagissent pour définir l'activité biologique globale.

III.6.2.2. Analyse du screening phytochimique des extraits aqueux et éthanoliques de *C. citratus* et *O. barrelieri*

Tout au contraire de ce qu'ont trouvé **Jyoti et al. (2015)**; EAc de nos résultats ne contient pas d'alcaloïdes, de flavonoïdes, de tannins et de stérols. Cette différence aussi marquante peut résider au niveau de la méthodologie de l'extraction; en fait, en plus du trempage du matériel végétal dans le solvant (eau) comme nous l'avons fait, ces auteurs ont utilisé la méthode de reflux sur les extraits obtenus, avant de faire leurs screening phytochimiques. La présence des phénols, des flavonoïdes, des tannins et des saponines dans l'extrait éthanolique de *C. citratus* (EEc) corrobore avec les résultats des travaux de plusieurs autres chercheurs ayant fondamentalement utilisés les méthodes d'extraction comparables; en l'occurrence les travaux de **Aziman et al. (2012)**; **Soares et al. (2013)**; **Umar et al. (2016)**.

En général très peu de recherches ont été faites sur les extraits d'*O. barrelieri*, encore moins sur les extraits aqueux et éthanoliques en particulier; néanmoins **Fokam et al. (2015)** ont établi que l'extrait aqueux (EAo) contient les phénols, les terpenoïdes, les anthocyanidines, anthraquinones, coumarines, saponines et les traces d'alcaloïdes; résultats à similarité parfaite une exception près comparé aux résultats que nous avons obtenus. Aussi, **Dakole et al. (2016)**; ont trouvé des résultats comparables aux nôtres à l'égard du screening phytochimique de l'EEo.

Au vu des résultats phytochimiques présentés dans cette partie, les extraits aqueux et éthanoliques de *O. barrelieri* apparaissent être plus riches en métabolites secondaires actifs comparé à leurs correspondants respectifs de *C. citratus*. Mais en contraste, les résultats des activités biologiques détaillés plus haut (**Section III.1.4**), ont révélé que l'activité antifongique de EAc a été comparable à celle de EAo; et même que EEc a été significativement plus actif que EEo sur les deux pathogènes testés. Ainsi l'absence ou la présence d'un métabolite particulier dans un mélange est susceptible de modifier l'activité biologique du mélange, indiquant l'existence d'une certaine interaction entre les groupes de composés.

III.6. 2.3. Analyse de la teneur en métabolites secondaires et primaires des extraits aqueux et éthanoliques de *C. citratus* et *O. barrelieri*

Les extraits éthanoliques des deux plantes (EEc et EEO) ont été significativement plus riches en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes comparés aux extraits aqueux (EAc et EAo), résultats qui corroborent avec ceux de **Mahmoudi et al. (2013)**; **Quy et al. (2013)**; et seraient expliqués par la modulation de la polarité de la solution hydro éthanolique (éthanol 70%) augmentant la solubilité des polyphénols (**Mohammedi et Atik, 2011**); cette richesse des extraits éthanoliques en métabolites phénols et en flavonoïdes justifierait les fortes activités antifongiques présentées par ces extraits.

La forte concentration en sucres totaux dans les extraits éthanoliques comparativement aux extraits aqueux est divergente des résultats de **Cowan (1999)**, qui a relevé une plus grande richesse des extraits aqueux en polysaccharides. Toutefois, ces résultats pourraient clairement se justifier; en effet il est bien connu que les composés phénoliques ne se retrouvent pas sous forme libres mais, le plus souvent sous forme d'hétérosides glycosylés (**Khoddami et al., 2013**); les sucres des glycosides de EEc et EEO seraient ainsi libérés lors du processus d'hydrolyse au cours du dosage des sucres totaux, afin d'accroître la concentration de ces derniers.

L'activité stimulatrice à faible dose (1000 ppm) des extraits aqueux (EAo et EAc), à l'égard de *B. oryzae*, s'expliquerait par la teneur élevée en protéines qui serviraient comme substrat du métabolisme primaire à l'agent pathogène; de plus EAo et EAc sont moins concentrés en phénols à 1000 ppm et, selon **Mohapotra et al. (2000)**, les faibles concentrations de phénols sont impliquées dans le métabolisme normal des champignons. En plus du fait que la glycosylation des métabolites (flavonoïdes et phénols) actifs des extraits aux solvants réduit l'activité biologique (**Hu et Kitts, 2004**), les fortes activités des fractions d'HE comparativement à celle des extraits aux solvants, peuvent aussi s'expliquer par le fait que les HE sont un concentré essentiellement constitué de métabolites secondaires, alors que les extraits aux solvants (eau et éthanol) comprennent en plus des métabolites secondaires (flavonoïdes et phénols), des métabolites primaires et probablement des facteurs de croissance susceptibles d'exercer une action antagoniste à l'inhibition de la croissance microbienne.

III.6.2.4. Analyse des composés identifiés par HPLC dans les extraits aqueux et éthanoliques de *C. citratus* et *O. barrelieri*

Les composés identifiés dans les extraits aux solvants de *C. citratus* et d'*O. barrelieri* sont différents de ceux obtenus par hydrodistillation, traduisant ainsi la variation

de la composition chimique d'un extrait selon la méthode d'extraction (**Ewansiha et al., 2012**); cette composition chimique peut être aussi fonction du solvant d'extraction, car L'acide tannique / Pyrogallol / Acide gallique s'est retrouvé uniquement dans les extraits aqueux de *C. citratus* et d'*O. barrelieri*; ou bien fonction de l'espèce botanique puisque l'acide salicylique n'a été retrouvé que dans les extraits de *C. citratus*.

La vitamine C (acide L-ascorbique et acide isoascorbique), par ailleurs détecté en quantité considérable dans les extraits de *C. citratus* et d'*O. barrelieri*; est plus connue pour sa propriété anti oxydante; ce qui peut justifier pourquoi plusieurs auteurs ont établis les propriétés anti oxydantes de *C. citratus* (**Cheel et al., 2005; Francisco et al., 2011**). La vitamine C est d'ailleurs très souvent utilisée dans les travaux, comme molécule de référence (control positif) dans les tests anti oxydants (**Panpatil et al., 2013**); Il faut néanmoins noter que, quelques auteurs ont rapporté ses activités antibactériennes (**Kallio et al., 2012**) et antifongiques (**Hauwenhuyse et al., 2014**); ce qui pourrait laisser présager une contribution dans l'activité des extraits vis-à-vis *B. oryzae* et *F. moniliforme*; encore que EEc et EEO qui en ont été plus riches ont été plus actifs.

Plusieurs composés phénoliques identifiés dans les extraits aqueux et éthanolique de *C. citratus* dans ce travail, ont été rapportés par d'autres auteurs; il s'agit des flavonoïdes quercétine (**Miean et Mohamed, 2001; Shah et al., 2011**) et catéchine (**Costa et al., 2015**); et du phénol simple, catéchol (**Faruq, 1994**). La quercétine, le catéchol, la céthécine ainsi que l'acide L-ascorbique et l'acide isoascorbique dans les extraits d'*O. barrelieri* sont ici rapportés pour la première fois. Bien que quelques composés aient été identifiés, les structures de nombreux composés majeurs dans les différents extraits de *C. citratus* et d'*O. barrelieri* restent encore non élucidées.

Les propriétés antimicrobiennes et plus particulièrement antifongiques établies et/ou attribuées à la quercétine, la catéchine, le catéchol et le pyrogallol, ont été discutés dans plusieurs travaux. Par exemple: **Omezzine et al. (2014)** ont montré que les extraits de *Trigonella foenum-graecum L* contenaient les flavonols glycosides, entre autres la quercétine suggérée responsable de activité antifongique à l'égard de *Fusarium oxysporum f. sp*; la catéchine a été prouvée avoir une forte activité antifongique vis-à-vis de *Trichoderma reesi*, *Trichoderma Viridins*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, et *Penicillium sp* (**Veluri et al., 2004**); le catéchol et le pyrogallol ont été testés inhiber la croissance de *Fusarium oxysporum*, et *Penicillium ital.icum* (**Kocacaliskan et al., 2006**). Les teneurs en ces composés, plus élevées dans les extraits éthanoliques comparées aux extraits aqueux, auraient dès lors constitué un élément important quant à la prédiction de

l'activité antifongique vis-à-vis de *B. oryzae* et de *F. moniliforme*; aussi, l'effet stimulateur de la vitamine C pourrait avoir joué un rôle dans l'activité biologique finale des extraits; en effet, bien que testé sur une bactérie (*E. coli*), **Kallio et al. (2012)** a établi que la vitamine C augmente l'effet inhibiteur de la quercétine.

III.6.2.5. Analyse du fractionnement bio-guidé de l'extrait éthanolique de *C. citratus*

Les composés isolés de la fraction à l'acétate d'éthyle de l'extrait à l'éthanol de *C. citratus* sont le 3-O- β -D-glucopyranosyl- α -amyrine et le 3-O- β -D-glucopyranosyl-28-hydroxy- α -amyrine). Le 3-O- β -D-glucopyranosyl- α -amyrine est bien connu et a été déjà isolé de *Cyperus rotundus* Linn (**Vidhu et al., 2012**); au vu de la littérature consultée, le 3-O- β -D-glucopyranosyl-28-hydroxy- α -amyrine, semble nouveau. Les deux composés ont cependant été très souvent isolés ou détectés sous leurs formes non glycosylés (α -amyrine et 28-hydroxy- α -amyrine ou Uvaole) chez certaines espèces, notamment, *Arctostaphylos uva-ursi* (**Jäger et al., 2009**). Les données de littérature en notre possession ne nous ont pas permis de dire que ces composés ont été au paravent isolés de *Cymbopogon citratus*. Les propriétés des triterpènes incluant α -amyrine (**Aragão et al., 2006**) et l'uvaole (**Douglas et al., 2016**) ont été plus investiguées pour l'amélioration de la santé humaine, notamment pour leurs capacités anti inflammatoire, anxiolytique, antidépressive analgésique. Il a cependant été aussi rapporté leurs propriétés antibactériennes et antifongiques (**Douglas et al., 2016**). En plus des résultats obtenus en bio autographie, Il est très probable que les composés isolés de l'extrait éthanolique de *C. citratus*, bien que glycosylés, aient contribué dans l'activité antifongique et/ou aient contribué à réduire la charge bactérienne des semences de riz traitées.

**CONCLUSION ET
PERSPECTIVES**

Conclusion

L'intérêt de ce travail reposait sur la protection de la culture de riz par les extraits de plantes facilement accessibles; associé au tri des semences en solution salée à travers la mesure de leurs effets sur l'incidence des agents pathogènes responsables de l'helminthosporiose et le gigantisme, l'induction de la résistance et les effets sur les paramètres de production dans le but ultime d'accroître les rendements de production du riz (*Oryzae sativa*. L). il y ressort que:

Les concentrations minimales inhibitrices des fractions d'HE, ont été de 800 ppm, 1000 ppm, 1200 ppm, 1200 ppm, 1400 ppm et 1600 ppm respectivement pour CF₁, CF_M, CF₂, CS₁, CS_M et CS₂ à l'égard de *B. oryzae*; et de 1600 ppm, 1800 ppm, 2000 ppm, 2000 ppm, 2200 ppm et 2400 ppm respectivement pour CF₂, CF_M, CF₁, CS₁, CS_M et CS₂ relativement à *F. moniliforme*. Toutes les HE/Fractions ont été fongitoxiques à leurs CMI vis-à-vis des deux agents pathogènes. Les extraits éthanoliques (EEc et EEO) ont été en général plus actifs comparés aux extraits aqueux (EAc et EAo), l'extrait éthanolique de *C. citratus* a présenté le plus grand potentiel inhibiteur à 10000 ppm; 58,51%, vis-à-vis *F. moniliforme* et 55.9% à l'égard de *B. oryzae* parmi les extraits aux solvants

Les semences triées en solution NaCl 20% ont présenté le meilleur potentiel germinatif; 12,5% supérieur à celui des semences sélectionnées à l'eau et 19,5% supérieur à celui des semences non triées. Le tri des semences en solution NaCl 20%, couplé au traitement par les extraits à l'éthanol d'*O. barrelieri* et de *C. citratus* ont stimulé à un degré comparable, la germination des semences de riz, de l'ordre de 15,15-22,06% sur blotter et de 11,1-16,2% en serre. La concentration 1% de l'extrait à l'éthanol de *C. citratus* et de l'extrait d'*O. barrelieri* sont apparues meilleures pour le traitement des semences de riz et ont réduit l'infestation par *B. oryzae* et *F. moniliforme* de 25,25% et 9,83% respectivement. Soumis au test de vigueur par vieillissement accéléré, la baisse de la capacité germinative des semences traitées aux extraits de plantes, était moins prononcée (5,08%) que celle des semences non traitées (25,5%).

Dans l'évaluation des marqueurs de l'induction de la résistance, les concentrations en protéines chez les plants de riz n'ayant reçus aucun traitement semences (T0), ont été supérieures à celles des plants de riz donc les semences ont été uniquement triées en solution NaCl 20% (T1) et à celles des plants de riz donc les semences ont été traitées avec les extraits de *O. barrelieri* ou *C. citratus* (T2, T3 et T4). Une évolution en dent de scie du taux de phénols des différents traitements a été observée durant toute la période de

l'évaluation de ce marqueur. Les plants de riz n'ayant reçus aucun traitement (T0) ont eu des concentrations en groupement thiols, significativement faibles comparées aux autres traitements (T1, T2, T3 et T4) à l'évaluation aux 14^{ième}, 21^{ième} et 28^{ième} Jours. Dans l'ensemble, les activités des enzymes marqueurs d'induction de la résistance; β -1,3-glucanase, polyphénols oxydases, amylases et peroxydases des plants de riz traités avec les extraits de *C. citratus* ont été significativement supérieures à celles des plants de riz témoins aux 14^{ième}, 21^{ième} et 28^{ième} jours; celles des plants de riz traitées aux extraits d'*O. barrelieri* ont eu les mêmes allures qu'avec *C. citratus*, à l'exception de l'activité des peroxydases. Les études de la biologie de l'infection par *B. oryzae* faites au moyen de la microscopie ont révélé des différences significatives du taux de germination des spores de *B. oryzae*, entre les plants issus de riz traités et non traités, uniquement au stade précoce de l'infection.

Les essais en champ ont montré qu'en riziculture pluviale les variables degré de tallage et panicule/levée ont été statistiquement comparables à une exception près, pour tous les traitements. Les pourcentages de talles fertiles (panicule x 100/tallage) de T₀, T₁, T₂, T₃ et T₄, ont été de 85,8%, 87,9%, 89,5%, 85,6%, 92,6% respectivement; et sont statistiquement similaires. Relativement à la variable production/levée les traitements ont été scindés en trois groupes significativement différents les uns des autres; T₄ (8,06^c) et T₃ (7,89^c) d'une part T₂ (6,91^b) et T₁ (6,90^b) d'autre part et T₀ (4,75^a). En riziculture irriguée; l'émergence (64,4%) des semences traitées aux extraits d'*O. barrelieri* (T₂, T₃, T₄) a été significativement plus importante que celles des semences uniquement triées en solution NaCl (T₁ = 61,8%) et des semences non traitées (T₀ = 38,7%). Le tallage et le nombre de panicules des traitements T₂, T₃ et T₄ ont été comparables aux témoins T₀. T₄ (566,1g) et T₃ (557,6g) ont eu de meilleurs rendements/m²; ceux-ci ont été significativement différents de T₀ (483,1g), mais ne l'ont pas été par comparaison à T₁ (519,3g) et T₂ (522g). À la floraison et à la maturité, la sévérité de *B. oryzae* a été moindre pour les lots ayant reçus les traitements aux extraits de plantes (T₃, T₄ et T₂), dans les écosystèmes irrigué et pluvial. Le score de la gravité de la maladie (helminthosporiose) a montré que les plants de riz non traités présentaient des symptômes 4 à 5 fois plus élevés que les plants de riz traités avec les extraits de plantes.

Toutes les fractions d'HE de *C. citratus* contiennent le myrcène, le limonène, l' α -gurjunène, le néral et le géranial mais à des proportions différentes. Les constituants prédominants de toutes ces fractions d'HE ont été le néral (19,95 - 41,56%) et le géranial (18,79 - 45,64%); avec une prédominance du néral dans les fractions CS₁, CS₂, CS_M, CF_M

et une prédominance du gèranial dans les fractions CF₁ et CF₂. La corrélation positive entre l'activité biologique et la teneur en composé majoritaire citral (néral + gèranial) n'était pas toujours justifié. Certains composés à l'instar du carvacrol acétate et du Farnésol (2E, 6Z) se retrouvent uniquement dans les fractions des HE des plantes fraîches de *C. citratus* (CF₁, CF₂, et CF_M) et pourraient justifier leurs fortes activités par rapport à celles des plantes sèches de *C. citratus* (SF₁, SF₂, et SF_M). Les extraits éthanoliques de *C. citratus* et d'*O. barrelieri* (EEc et EEO) qui ont été biologiquement plus actifs, ont été significativement ($p < 0,05$) plus concentrés en; composés phénoliques, flavonoïdes et sucres totaux comparés aux extraits aqueux (EAc et EAo), qui avaient plutôt une teneur en protéines significativement plus importante. La quercétine, la catéchine, le catéchol, l'acide L-ascorbique et l'acide iso ascorbique sont présents dans tous les extraits aux solvants (EAc, EAo, EEc et EEO), mais les extraits éthanoliques (EEc et EEO).en ont été plus concentrés; EEc avec 16,04µg/mg est le plus riche en composés phénoliques identifiés. L'acide salicylique a été uniquement présent dans les extraits de *C. citratus* (EAc et EEc), et serait un éliciteur direct des marqueurs d'induction de la résistance. Le fractionnement bio guidé de l'extrait à l'éthanol de *C. citratus* a permis d'identifier le 3-O-β-D-glucopyranosyl-α-amyrine et le 3-O-β-D-glucopyranosyl-uvaole, dont les dérivés non glycosylés (α-amyrine et Uvaole) possèdent des activités antimicrobiennes.

Perspectives

Les résultats du couplage du tri des semences en solution NaCl et du traitement par les extraits de *C. citratus* et d'*O. barrelieri*, obtenus lors de ce travail sont assez intéressants et constituent une avancé sérieuse dans la recherche des techniques écofavorables visant l'amélioration des rendements de production du riz; cependant, avant leurs applications en agriculture pratique, plusieurs autres travaux complémentaires devraient être faits; notamment:

- ✓ Poursuivre l'étude de la caractérisation phytochimique des extraits aqueux et éthanoliques de *C. citratus* et d'*O. barrelieri* afin d'identifier d'autres plausibles composés majoritaires responsables des activités biologiques et/ou élicitrices.
- ✓ Etendre l'étude du potentiel d'induction de la résistance à d'autres marqueurs d'induction de la résistance chez le riz contre d'autres champignons pathogènes.
- ✓ Intensifier les essais en plein champ pour: se rapprocher des données réelles de rendement qui pourrait être obtenu, et mieux cerner les effets que peuvent avoir les traitements sur les autres paramètres de production.
- ✓ Faire des formulations biopesticides pour le traitement des semences et/ou la pulvérisation des plants de riz en champ, à partir des extraits de *C. citratus* et d'*O. barrelieri*.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

Acquaah G. Understanding biotechnology: An integrated and cyber-based approach. 1st Edition. New Jersey: Pearson Education, Inc. 2004; 402p.

Adriana TI, João BTJ, Kátia RF, Schwan-Estrada. *Cymbopogon citratus* essential oil bioactivity and the induction of enzymes related to the pathogenesis of *Alternaria solani* on tomato plants. IDESIA (Chile). 2013; 31(4): 11-17.

AFNOR. Recueil des normes françaises huiles essentielles. Tome 2. 2000; 1: 79-86.

AfricaRice Center (WARDA)/FAO/SAA. NERICA: the New Rice for Africa - a Compendium. Somado EA, Guei RG, Keya SO (Editors). Cotonou, Benin: Africa Rice Center (WARDA); Rome, Italy: FAO; Tokyo, Japan: Sasakawa Africa Association. 2008; pp.190-201.

Agarwal PC., Mortensen CN, Mathur SB. Seed borne diseases and seed health testing of rice. CTA-ADRO. 1994; 106: 10-12.

Agrios GN. Plant Pathology. Fifth Edition. San Diego: Academic Press, Inc. 2005; 922p.

Agrios GN. Plant pathology. 4th Edition. San Diego: Academic Press, Inc. 1997; 635p.

Ahmed A, Randhawa MA, Yusuf MJ, Khalid N. Effect of processing on pesticide residues in food crops. Journal of Agricultural Research. 2011; 49(3): 379-390.

Ahmed MF, Khalequzzaman KM, Islam MN, Anam MK, Islam MT. Effect of fungicides against *Bipolaris oryzae* of rice under in vitro condition. Pakistan Journal of Plant Pathology. 2002; 1(1): 4-7.

Ahmed RS, Vandana S, Pasha ST, Banerjee BD. Influence of dietary ginger (*Zingiber officinalis* Rosc) on oxidative stress induced by malathion in rats. Food and Chemical Toxicology. 2000; 38: 443-450.

Akila R, Ebenezar EG. Ecofriendly approaches for the management of grain discolouration in rice. Journal of Biological Control. 2009; 23(2):175-180.

Alakonya AE, Monda E, Owino PO, Ajanga S. Use of organic soil amendments in management of *Fusarium moniliforme*. African Crop Science Conference Proceedings. 2013; 6: 277-281.

Almaguer-Chavez M, Rojas-Flores T, Dobal-Amador V, Batista-Mainegra A, Rives-Rodríguez N, Jesus-Aira M, Hernandez-Lauzardo AN, Hernandez-Rodriguez A. Aerobiological dynamics of potentially pathogenic fungi in a rice agroecosystem in La Habana, Cuba. *Aerobiologia*. 2012; 28: 177-183.

Amadiolha AC. Controlling rice blast in vitro with plant extracts of *Azadirachta indica*. *Crop Protection*. 2000; 19: 287-290.

Amatulli MT, Spadaro D, Gullino ML, Garibaldi A. Molecular identification of *Fusarium spp.* associated with bakanae disease of rice in Italy and assessment of their pathogenicity *Plant Pathology*. 2010; 59: 839-844.

Anowarul Hoque AKM, Alam MR, Nazrul Islam M, Anam MK, Asad-ud-doullah, Hossain MM. Effect of seed cleaning and washing on the incidence of Bacterial Blight of rice. *Online Journal of Biological sciences*. 2002; 2 (9): 565-568.

Aqil F, Ahmad I. Broad-spectrum antibacterial and antifungal properties of certain traditionally used Indian medicinal plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2003; 19: 653-657.

Aragão GF, Carneiro LMV, Junior APF, Vieira LC, Bandeira PN, Lemos TLG, Viana GS de B. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 2006; 85:827-834.

Arshad HMI, Khan JA, Naz S, Khan SN, Akram M. Grain discoloration disease complex: a new threat for rice crop and its management. *Pakistan Journal of Phytopathology*. 2009; 21 (1): 31-33.

Asad-ud-doullah M, Aman MK, Narul Islam MD, Rahman M, Fakir GA, Hossain I. Effect of seed cleaning, washing and seed treatment on seedling, disease incidence and yield of rice. *Pakistan journal of Biological Science*. 2002; 5(7): 767-769.

Atreya K, Sitaula KB, Bajracharya MR. Pesticide use in agriculture: The philosophy, complexities and opportunities. *Scientific Research and Essays*. 2012; 7(25): 2168-2173.

Aziman N, Abdullah N, Noor ZM, Zulkifli KS, Kamarudin WSS. Phytochemical constituents and In Vitro bioactivity of ethanolic aromatic herb extracts. *Sains Malaysiana*. 2012; 41(11): 1437-1444.

Aziz EE, Gad N. physiological and chemical response of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L) to cobalt nutrition. A herb yield essential oil content and composition. *Journal of Applied sciences Research*. 2011; 7(11): 1732-1736.

Babushok VI, Linstrom PJ, Zenkevich IG. Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *The Journal of Physical Chemistry*. 2011; 40(4): 1-47.

Bacon CW, Yates IE, Hinton DM, Meredith F. Biological control of *Fusarium moniliforme* in Maize. *Environmental Health Perspectives*. 2001; 109(2): 325-332.

Bailey KL, Lazarovits G. Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments. *Soil Tillage Research*. 2003; 72: 169-180.

Bajaj S, Mohanty A. Recent advances in rice biotechnology-towards genetically superior transgenic rice. *Plant Biotechnology Journal*. 2005; 3:275-307.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils: a review. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46: 446-475.

Baloch MS, Awan IU, Hassan G. Growth and yield of rice as affected by transplanting dates and seedlings per hill under high temperature of Dera Ismail Khan *Journal of Zhejiang University Science B*. 2006; 7(7): 572-579.

Barbosa CA, Pereira UA, Martinazzo AP, Maltha CRA, Teixeira RR, Melo EC. Evaluation of the Chemical Composition of Brazilian Commercial *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf Samples Luiz. *Molecules*. 2008; 13: 1864-1874.

Barnwal MK, Kotasthane A, Magculia N, Mukherjee PK, Savary S, Sharma AK, Singh HB, Singh US, Sparks AH, Variar M, Zaidi N. A review on crop losses, epidemiology and disease management of rice brown spot to identify research priorities and knowledge gaps. *European Journal Plant Pathology*. 2013; 136: 443-457.

Ben Arfa A, Combes S, Preziosi-Belloy L, Gontard N, Chalier P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in Applied Microbiology*. 2006; 43:149-154.

Benhamou N, Kloepper JW, Tuzun S. Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Planta*. 1998; 204: 153-168.

Benhamou N, Lafontaine PJ, Nicole M. Induction of systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. *Phytopathology*. 1994; 84: 1432-1444.

Benhamou N, Picard K. La résistance induite: une nouvelle stratégie de défense des plantes contre les agents pathogènes. *Phytoprotection*. 2000; 80:137-168.

Benhamou N, Rey P. Stimulateurs des défenses naturelles des plantes: une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'écoproduction durable.II. Intérêt des SDN en protection des cultures. *Phytoprotection*. 2012a; 92: 24-35.

Benhamou N, Rey P. Stimulateurs des défenses naturelles des plantes: une nouvelle stratégie phytosanitaire dans un contexte d'éco-production durable. Principes de la résistance induite. *Phytoprotection*. 2012b; 92: 1-23.

Bernard T, Perineau F, Bravo R, Delamas M, Gaset A. Extraction des huiles essentielles: chimie et technologie. *Informations Chimie*. 1988; 298: 179-184.

Bhalli JA, Aurangzeb M, Ilyas MB. Chemical control of bakanae disease of rice caused by *Fusarium moniliforme*. *Journal of Biological Sciences*. 2001; 1: 483-484.

Bisen K, Biswas SK, Kumar V, Lal K, Kumar R, Kumar N. Biochemical changes in relation to brown leaf spot (*Drechslera oryzae*) resistance in different rice genotypes. *Journal of Plant Studies*. 2015; 4(2): 81-91.

Biswas SK, Ratan V, Srivastava SSL and Singh R. Influence of seed treatment with biocides and foliar spray with fungicides for management of brown leaf spot and sheath blight of paddy. *Indian Phytopathology*. 2008; 61: 55-59.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72: 248-254.

Brigita L, Mirko P, Alenka JW. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction times. *Journal of Food Engineering*. 2005; 71: 214-222.

Bussmann RW, Malca-García G, Glenn A, Sharon D, Chait G, Díaz D, Pourmand K, Jonat B, Somogy S, Guardado G, Aguirre C, Chan R, Meyer K, Kuhlman A, Townesmith A, Effio-Carbajal J, Frías-Fernandez F, Benito M. Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010; 132 (1): 101-108.

Cannon JB, Cantrell CL, Astatkie T, Zheljaskov VD. Modification of yield and composition of essential oils by distillation time. *Industrial Crops and Products*. 2013; 41: 214-220.

Cantrell CL, Dayan FE, Duke SO. Natural products as Sources for new pesticides. *Journal of Natural Product* 2012; 75: 1231-1242.

Carlini EA, Contar J, Silva-Filho A, Da Silveira-Filho N, Frochtengarten M, Bueno O. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus Stapf*). Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. *Journal of Ethnopharmacology*. 1986; 17: 37-64.

Carney JA. The Role of African Rice and Slaves in the History of Rice Cultivation in the Americas. *Human Ecology* 1998; 26(4): 525-545.

Chabrolin R. Le secteur expérimental de modernisation de la riziculture de Yagoua (Cameroun): étude critique, possibilités de développement. *Riz et riziculture et cultures vivrières tropicales*. 1961; 48: 57-80.

Chance B, Maehly AC. Assay of Catalases and Peroxidases. *Methods in Enzymology*. 1955; 2: 773-775.

Chandrasekaran B, Annadurai K, Somasundaram E. *A Textbook of Agronomy*. New Delhi: New Age International (P) Ltd., Publishers. 2010; 835p.

Cheel J, Theoduloz C, Rodriáquez J, Hirschmann SG. Free Radical Scavengers and Antioxidants from Lemongrass (*Cymbopogon citratus Stapf*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53:2511-2517.

Chen H, Lin Y, Zhang Q. Rice. In: Kempken F, Jung C. (Editors). *Genetic modification of plants: agriculture, horticulture and forestry*. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2010; pp. 423-472.

Chinmay B, Srivastava SSL, Biswas SK. Biochemical changes associated with induction of resistance by *Trichoderma* spp. in paddy against brown spot disease. *Indian Phytopathology*. 2010; 63(3): 269-272.

CIRAD. Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement des Plantes des rizières de Guyane. [http://plantes-rizieres-guyane.cirad.fr/Informations légales](http://plantes-rizieres-guyane.cirad.fr/Informations_légales). 2007 (Consulté le 21 mai 2010).

Clevenger JF. Apparatus for the determination of volatile oil. *American Pharmaceutical Association*. 1928; 17: 345-346.

CNWG. Catalogue of New World Grasses: *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf TSN 41613. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=41613#null. 2018 (Consulté le 21 Août 2018).

Cohen YR. β -Aminobutyric acid-induced resistance against plant pathogens. *Plant disease*. 2002; 86 (5): 448-457.

Cohen J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. 2nd Edition. New York, NY: Routledge Academic. 1988; 400p.

Collett D. *Modelling binary data*. London: Chapman and Hall, UK. 1991; 369p.

Colville L, Kranner I. Desiccation tolerant plants as model systems to study redox regulation of protein thiols. *Plant Growth Regulation*. 2010; 62: 241-255.

Conrath U, Beckers GJM, Flors V, García-Agustín P, Jakab G, Mauch F, Newman M, Pieterse CMJ, Poinssot B, Pozo MJ, Pugin A, Schaffrath U, Ton J, Wendehenne D, Zimmerli L, Mauch-Mani B. Priming: getting ready for battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2006; 19(10): 1062-1071.

Conrath U, Pieterse CMJ, Mauch-Mani B. Priming in plant-pathogen interactions *Trends in Plant Science*. 2002; 7(5): 210-216.

Conrath U, Thulke O, Katz V, Schwindling S, Kohler A. Priming as a mechanism in induced systemic resistance of plants. *European Journal of Plant Pathology*. 2001; 107: 113-119.

Cooper RM, Resende MLV, Flood J, Rowan MG, Beale MH, Potter U. Detection and cellular localization of elemental sulphur in disease resistant genotypes of *Theobroma cacao*. *Nature*. 1996; 379: 159-162.

Costa G, González-Manzano S, González-Paramás A, Figueiredo IV, Santos-Buelga CE, Batista MT. Flavan hetero-dimers in the *Cymbopogon citratus* infusion: Tannin fraction obtaining, evaluation of its contribution to the antioxidant activity and structural elucidation . *Food and Function*. 2015; 6: 932-937.

Cottyn B, Cerez MT, Mew TW. Bacterial pathogens. In: Mew TW, Misra JK (Editors). *A Manual of Rice Seed Health Testing*. Los Baños, Laguna, Philippines: International Rice Research Institute (IRRI). 1994; pp. 91-96.

Couch BC, Fudal I, Lebrun MH, Tharreau D, Valent B, Kim PV, Nottéghem JL, Kohn LM. Origins of host-specific populations of the blast pathogen *Magnaporthe oryzae* in crop domestication with subsequent expansion of pandemic clones on rice and weeds of rice. *Genetics*. 2005; 170: 613-630.

Counce PA, Siebenmorgen TJ, Poag MA, Holloway GE, Kocher MF, Lu RF. Panicle emergence of tiller types and grain yield of tiller order for direct-seeded rice cultivars. *Field Crops Research*. 1996; 47: 235-242.

Cowan M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999; 12: 564-582.

Dakole DC, Nguéfack J, Dongmo LJB, Galani YJH, Azah UR, Somda I, Amvam Z PH. Antifungal potential of essential oils, aqueous and ethanol extracts of thirteen plants against *Fusarium oxysporum* f. sp *Lycopersici* and *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary as major tomato pathogens in Cameroon. *International Journal of Current Science*. 2016; 19(2): 128-145.

Dat JF, Pellinen R, Tom B, Van De Cotte B, Langebartels C, Kangasjärvi J, Inzé D, Van Breusegem F. Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *The Plant Journal*. 2003; 33: 621-632.

Datta K, Velazhahan R, Oliva N, Ona I, Mew T, Khush GS, Muthukrishnan S, Datta SK. Over-expression of the cloned rice thaumatin-like protein (PR-5) gene in transgenic rice plants enhances environmental friendly resistance to *Rhizoctonia solani* causing sheath blight disease. Theoretical and Applied Genetics. 1999; 98:1138-1145.

Davies NW. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. Journal of chromatography. 1989; 503(1990): 1-24.

Deacon, J. Fungi as plant pathogens. In: Deacon J (Editor). Fungal biology. 4th Edition Oxford: Blackwell Publishing Ltd; 2006. pp. 279-307.

Delouche JC, Baskin CC. Accelerated ageing techniques for predicting the relative storability of seed lots. Seed Science and Technology. 1973; 1:427-452.

Dianz F, Santos M, Blanco R, Tello JC. Fungicide resistance in *Botrytis cinerea*, isolate from strawberry crops in Huelva. Phytoparasitica. 2002; 30: 529-534.

Donelian A, Carlson LHC, Lopes TJ, Machado RAF. Comparison of extraction of patchouli (*Pogostemon cablin*) essential oil with supercritical CO₂ and by steam distillation. Journal of Supercritical Fluids. 2009; 48:15-20.

Dongmo LJB. Contrôle des maladies fongiques à *Alternaria padwickii* et *Bipolaris oryzae* du riz (*Oryza sativa* L.) par les extraits de trois plantes. Thèse de Doctorat PhD de biochimie, Université de Yaoundé I. 2017; 211p.

Dorosh PA, Wailes E. The international rice trade: structure, conduct, and performance. In: Pandey S, Byerlee D, Dawe D, Dobermann A, Mohanty S, Rozelle S, Hardy B. (Editors) The Global Economy: Strategic Research and Policy Issues for Food Security. Los Baños (Philippines): International Rice Research Institute. 2010; pp. 359-379.

Douglas K, Kiplimo JJ, Chirchir D. Phytochemistry and antibacterial activity of extracts from medicinal plant *Olea Africana*. African Journal of Pharmacy and Pharmacology 2016; 10(15):330-336.

Dubey NK, Kumar R, Tripathi P. Global promotion of herbal medicine: India's opportunity. Current Science. 2004; 86: 37-41.

Dubey NK, Ravindra S, Ashok K, Priyanka S, Bhanu P. Global scenario on the application of natural products in integrated pest management programmes. In: Dubey NK (Editor). Natural products in plant pest management. Wallingford: CAB International. 2011; pp. 1-20.

Dubey NK, Srivastava B, Kumar Ashok. Current status of plant products as botanical pesticides in storage pest management. Journal of Biopesticides. 2008; 1(2): 182-186.

Duckworth HW, Coleman JE. Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase. The Journal of Biological Chemistry. 1970; 245 (7): 1613- 1625.

Dure LS. Site of origin and extent of activity of amylases in maize germination. Plant Physiology. 1960; 35(6): 925-934.

Durrant W, Dong X. Systemic acquired resistance. Annual. Review of Phytopathology. 2004; 42:185-209.

Dutta S, Munda S, Lal M, Bhattacharyya PR. A short review on chemical composition therapeutic use and enzyme inhibition activities of *Cymbopogon* species. Indian Journal of Science and Technology. 2016; 9(46): 1-9.

Dzhavakhiya G, Ozeretskovskaya OL, Zinovyeva SV. Immune response. In: Dyakov YT, Dzhavakhiya VG and Korpela T. (Editors) Comprehensive and molecular phytopathology. 1st edition. Amsterdam: Elsevier. 2007; pp. 265-314.

Edreva A. A novel strategy for plant protection: induced resistance. Journal of Cell and Molecular Biology. 2004; 3: 61-69.

Eilenberg J, Hajek A, Lomer C. Suggestions for unifying the terminology in biological control. Biocontrol. 2001; 46: 387-400.

Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. Archives of Biochemistry and Biophysics. 1959; 82: 70-77.

Estrella L, Toby JAB, Michael RR, Victor F, Jurriaan T. Next-generation systemic acquired resistance. Plant Physiology. 2012; 158: 844-853.

Ewansiha JU, Garba SA, Mawak JD, Oyewole OA. Antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* (lemon grass) and its phytochemical properties. Frontiers in Science. 2012; 2(6): 214-220.

Faisul-ur-Rasool R, Habib, Bhat MI. Evaluation of plant spacing and seedlings per hill on rice (*Oryza sativa* L.) productivity under temperate conditions. Pakistan Journal of Agricultural Sciences. 2012; 49: 169-172.

FAOSTAT, 2017. FAO Statistical Databases. <http://www.fao.org>. (Consulté le 3 avril, 2017).

Faruq M. TLC technique in the component characterization and quality determination of Bangladeshi lemongrass oil (*Cymbopogon citratus*) (DC) Stapf.). Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research. 1994; 29: 27-38.

Fininsa C, Yuen J. Temporal progression of bean bacterial blight (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*) in sole and intercropping systems. European Journal of Plant Pathology. 2002; 108: 485-495.

Fink W, Liefland M and Mendgen K. Chitinases and, β -1, 3 -Glucanases in the Apoplastic Compartment of Oat Leaves (*Avena sativa* L.) Plant Physiology. 1988; 88: 270-275.

Fiori ACG, Schwan-estrada KRF, Stangarlin JR, Vida JB, Scapim CA, Cruz MES Pascholati SF. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *didymella bryoniae*. Journal of Phytopathology. 2000; 148: 483-487.

Fokam Tagne MA, Kamgang R, Noubissi PA, Essame Oyono JL. Activity of *Oxalis barrelieri* aqueous extract on rat secretory diarrhea and intestine transit. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2015; 5 (01): 058-062.

Food and Agriculture Organization (FAO): <http://www.fao.org>; (Consulté le 03 octobre 2010).

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). The FAO Statistical Yearbook (2012 Edition). New York: Food and Agriculture Organization. 2012; 362p.

Francisco V, Figueirinha A, Neves BM, García-Rodríguez C, Lopes MC, Cruz M, Batista MT. *Cymbopogon citratus* as source of new and safe anti-inflammatory drugs: bio-guided assay using lipopolysaccharide-stimulated macrophages. Journal of Ethnopharmacology. 2011; 133: 818-827.

Galani YJH, Nguefack J, Dakole DC, Fotio D, Petchayo TS, Fouelefack FR, Amvam ZPH. Antifungal potential and phytochemical analysis of extracts from seven Cameroonian plants against late blight pathogen *Phytophthora infestans*. International Journal of Current Microbiology and Applied Science. 2013; 2(5): 140-154.

Gamal M, Abdel-Fattah, Yasser M, Shabana, Ismail AE, Rashad YM. Trichoderma harzianum: a biocontrol agent against *Bipolaris oryzae*. Mycopathologia. 2007; 164: 81-89.

Ganjewala D. Cymbopogon essential oils: Chemical compositions and bioactivities International Journal of Essential Oil Therapeutics. 2009; 3: 56-65.

Garcion C, Lamotte O, Cacas JL, Métraux JP. Mechanisms of defence to pathogens: biochemistry and physiology. In: Walters DR, Newton AC; Lyon GD (Editors). Induced resistance for plant defence: A Sustainable approach to crop protection. Oxford: Blackwell Publishing. 2015; pp 106-125.

Germplasm Resources Information Network ('GRIN') [Online Database]. URL: <http://www.ars-grin.gov/4/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?447742>. (Consulté le 27 Juillet 2015).

Getachew M, Birhan T. Growth and Yield of Rice (*Oryza sativa* L.) as Affected by Time and Ratio of Nitrogen Application at Jimma, South-West Ethiopia. International Journal of Agriculture Innovations and Research. 2015; 4(1): 2319-1473.

Gnanamanickam SS (Editor). Biological control of rice diseases. Dallas: Springer Science+Business Media B.V. 2009; 108p.

Goufo Piebiep. Rice production in Cameroon: A review. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences. 2008; 4(6): 745-756.

Grover RK, Moore JD. Toximetric studies of fungicides against brown rot organism. *Sclerotia fructicola* and *S. laxa*. Phytopathology. 1962; 52: 876-880.

Guleria S, Kumar A. *Azadirachta indica* leaf extract induces resistance in sesame against Alternaria leaf spot disease. Journal of Cell and Molecular Biology. 2006; 5: 81-86.

Guleria S, Sohal BS, Mann APS. Salicylic acid treatment and/or Erysiphe polygoni inoculation on phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase content and accumulation of phenolics in pea leaves. Journal of Vegetation Science. 2005; 11:71-79.

Gupta M, Sasmal S, Majumdar S, Mukherjee A. HPLC Profiles of standard phenolic compounds present in medicinal plants. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research. 2012; 4(3): 162-167.

Gupta P, Ravi I, Sharma V. Induction of β -1,3-glucanase and chitinase activity in the defense response of *Eruca sativa* plants against the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*, *Journal of Plant Interactions*. 2013; 8(2): 155-161.

Gutzeit HO, Ludwig-Muller J. *Plant natural products: Synthesis, biological functions and practical applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 2014; 421p.

Hamdy AE, Shaaban AH, El-Ghorab, Takayuki S. Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review, *Journal of Essential Oil Research*. 2012; 24: (2) 203-212.

Hammerschmidt R, Métraux JP, van Loon LC. Inducing resistance: a summary of papers presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases. *European Journal of Plant Pathology*. 2001; 107: 1-6.

Harbone JB. *Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis*. London: Chapman and Hall. 1976; 150p.

Harish K, Shafaat A, Sunil Z, Surender K, Arif A. Impact of different fungicides combination against brown leaf spot (*Drechslera oryzae*) of rice under the *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2017; 6(1): 341-344.

Hasan MM, Chowdhury SP, Shahidul A, Hossain B, Alam MS. Antifungal effects of plant extracts on seed-borne fungi of wheat seed regarding seed germination, seedling health and vigour index. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2005; 8:1284-1289.

Hauwenhuyse FV, Fiori A, Van Dijck P. Ascorbic acid inhibition of *Candida albicans* Hsp90-mediated morphogenesis occurs via the transcriptional regulator Upc2. *Eukaryotic Cell*. 2014; 13 (10): 1278-1289.

Hedge JE, Hofreiter BT. Methods of estimating starch and carbohydrates. In: Whistler RL, Miller JNB (Editors). *Carbohydrate chemistry*. New York: Academic Press. 1962; pp. 163-201.

Herms S, Seehaus K, Koehle H, Conrath U. A strobilurin fungicide enhances the resistance of tobacco against tobacco mosaic virus and *Pseudomonas syringae pv tabaci*. *Plant Physiology*. 2002; 130: 120-127.

Hopkins WG. New view of statistics. Retrieved from <http://www.sportsci.org/resource/stats/effectmag.html>. 1997 (Consulté le 12 février 2017).

- Hossain MT, Khan A, Chung EJ, Md-Rashid HO, Chung YR.** Biological control of rice bakanae by an endophytic *bacillus oryzicola* YC7007. *Plant Pathology Journal*. 2016; 32(3): 228-241.
- Howard RJ, Valent B.** Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Microbiology*. 1996; 50: 491-512.
- Hu C, Kitts DD.** Luteolin and luteolin-7-O-glucoside from dandelion flower suppress NOS and COX in RAW 264.7 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2004; 265(1-2): 107-113.
- Huang J, He F, Cui K, Buresh RJ, Xu B, Gong W, Peng S.** Determination of optimal nitrogen rate for rice varieties using a chlorophyll meter *Field Crops Research*. 2008; 105: 70-80.
- Huy TTT.** Infection biology of *Bipolaris oryzae* in rice and its pathogenic variation in the Mekong Delta, Vietnam. PhD Thesis. 2002; 113p.
- Ibrahim EAM, Abo El-Dahab MS.** Seed discoloration and their effect on seedlings growth of Egyptian hybrid rice. *Research journal of seed science*. 2014; 7(3): 63-74.
- Imolehin ED.** Rice seed borne fungi and their effect on seed germination. *Plant Disease*. 1983; 67: 1334-1336.
- Islam MM, Monjil MS.** Effect of aqueous extracts of some indigenous medicinal plants on sheath blight of rice. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*. 2016; 14(1): 7-12.
- IRRI.** International Rice research institute Standard Evaluation System for Rice. Los Baños: IRRI. 2002; 54p.
- Isman M.** Pesticides based on the plant essential oil. *Pesticide Outlook*. 1999; 106: 68-72.
- ISTA.** International rules for seed testing. Rules 1996. *Seed Science and Technology*. 1996; 24, 155-180.
- Jäger S, Trojan H, Kopp T, Laszczyk MN, Scheffler A.** Pentacyclic triterpene distribution in various plants-rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules*. 2009. 14: 2016-2031.
- Janvier C, Villeneuve F, Alabouvette C, Edel-Hermann V, Mateille T, Steinberg C.** Soil health through soil disease suppression: Which strategy descriptors to indicators? *Soil Biology and Biochemistry*. 2007; 39: 1-23.

Jardinetti VA, Schwan-Estrada KRF, Maia AJ, da Costa WF, De Freitas RN. Effect of seasons on chemical composition and fungitoxicity of *Cymbopogon citratus* (DC) Staf essential oil. African. Journal of Agricultural Research. 2016; 11(12): 1048-1055.

Jing C, Gou J, Han X, Wu Q, Zhang C. In vitro and in vivo activities of eugenol against tobacco black shank caused by *Phytophthora nicotianae*, Pesticide Biochemistry and Physiology. 2017; 142:148-154.

Jung HW, Tschaplinski TJ, Wang L, Glazebrook J, Greenberg JT. Priming in systemic plant immunity. Science. 2009; 324: 89-91.

Jyoti D, Swati S, Poonam S, Jaspreet. Study of antibacterial activity and biochemical analysis of some medicinal plants against selected pathogens causing human intestinal disturbances. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2015; 4(4): 808-817.

Kagale S, Marimuthu T, Thayumanavan B, Nandakumar R, Samiyappan R. Antimicrobial activity and induction of systemic acquired resistance in rice by leaf extract of *Datura metel* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*. Physiological and Molecular Plant Pathology. 2004; 65: 991-1000.

Kalemba D, Kunicka A. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. Current Medicinal Chemistry. 2003; 10:813-829.

Kallio J, Jaakkola M, Mäki M, Kilpeläinen P, Virtanen V. Vitamin C inhibits *staphylococcus aureus* growth and enhances the inhibitory effect of quercetin on growth of *Escherichia coli* in vitro. Planta Medica. 2012; 78(17): 1824-1830.

Kamal MM, Mia MAT. Diversity and pathogenicity of the rice brown spot pathogen, *bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoem in Bangladesh assessed by genetic fingerprint analysis. Bangladesh Journal of Botany. 2009; 38(2): 119-125.

Kandan A, Akhtar J, Singh B, Dixit D, Chand D, Roy A, Rajkumar S, Agarwal PC. Molecular diversity of *Bipolaris oryzae* infecting *Oryza sativa* in India. Phytoparasitica. 2015; 43(1):5-14 .

Kandil AA, El-Kalla SE, Badawi AT, El-Shayb OM. Effect of hill spacing, nitrogen levels and harvest date on rice productivity and grain quality. Crop Environ. 2010; 1: 22-26.

Ken-Ichi M, Jun-Ichi S. Effects of seed hydropriming on germination and seedling vigor during emergence of rice under different soil moisture conditions. *American Journal Plant Sciences*. 2013; 4:1584-1593.

Kerruish RM, Unger PW, Walkington AL (Editors). *Plant Protection 1: Pests, diseases and weeds*. 4th edition. Australia: RootRot Press –ACT. 2010; 504p.

Kessmann H, Staub T, Hofmann C, Maetzke T, Herzog J, Ward E, Uknes S, Ryals J. Induction of systemic acquired resistance in plants by chemicals. *Annual Review of Phytopathology*. 1994; 32, 439-459.

Khalili E, Sadravi M, Naeimi S, Khosravi V. Biological control of rice brown spot with native isolates of three *trichoderma species*. *Brazilian journal of microbiology*. 2012; 43(1): 297-305.

Khangholi S, Rezaeinodehi A. Effect of drying temperature on essential oil content and composition of sweet wormwood (*Artemisia annua*) growing wild in Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2008; 11(6): 934-937.

Khoa ND. Control of sheat blight and other rice diseases by induced resistance using an extract of the plant *Chromolaena odorata*. PhD Thesis. 2010; 98p.

Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*. 2013; 18: 2328-2375.

Khush GS. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. *Plant Molecular Biology*. 1997; 35: 25-34.

Kishore N, Mishra AK, Chansouria JP. Fongitoxicity of essential oils against dermatophytes. *Mycoses*. 1993; 36: 211-215.

Klarzynski O, Plesse B, Joubert JM, Yvin JC, Kopp M, Kloareg B, Fritig B. Linear β -1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiology*. 2000; 124: 1027-1037.

Kocacaliskana I, Talanb I, Terzic I. Antimicrobial activity of catechol and pyrogallol as allelochemicals. *z. Naturforsch.* 2006; 61(c): 639-642.

Kohls CL, Percich JA, Huot JA. Wild rice yield losses associated with growth-stage-specific fungal brown spot epidemics. *Plant disease*. 1987; 71(5): 419-422.

- Kumar P, Sunder S, Singh R Kumar A.** Management of foot rot and bakanae of rice through fungicides Indian Phytopathology. 2016; 69 (2): 124-127.
- Kumar R, Mishra AK, Dubey NK, Tripathi YB.** Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, anti aflatoxigenic and antioxidant activity. International Journal of Food Microbiology. 2007; 115: 159-164.
- Kumar V, Tewari R, Singh K.** Comparative Studies of Drying Methods on Yield and Composition of the Essential Oil of *Cymbopogon citratus*. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 2015; 18 (3): 744-750.
- Lee Y, Kim J, Shin S, Lee S, Park I.** Antifungal activity of *Myrtaceae* essential oils and their components against three phytopathogenic fungi. Flavour Fragrance Journal. 2008; 23(1): 23-28.
- Lewinsohn E, Dudai N, Tadmor Y, Katzir I, Ravid U, Putievsky E, Joel DM.** Histochemical localization of citral accumulation in lemongrass leaves *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, Poaceae). Annals of Botany. 1998; 81: 35-39.
- Linares OF.** African rice (*Oryza glaberrima*): History and future potential. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2002; 99(25):16360-16365.
- Londo JP, Chiang YC, Hung KH, Chiang TY, Schaal BA.** Phylogeography of Asian wild rice, *Oryza rufipogon*, reveals multiple independent domestications of cultivated rice, *Oryza sativa*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2006; 103(25):9578-9583.
- Luiz CAB , Ulisses AP, Ana PM, Célia RÁM, Róbson RT, Evandro CM.** Evaluation of the chemical composition of Brazilian commercial *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf Samples. Molecules. 2008; 13: 1864-1874.
- Lyon G.** Agents that can elicit induced resistance. In: Walters D, Newton A; Lyon G (Editors). Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection. Oxford: Blackwell Publishing. 2007; pp. 9-30.
- Mahmoudi S, Khali M, Mahmoudi N.** Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.) Revue « Nature & Technologie ». B- Sciences Agronomiques et Biologiques. 2013; 9: 35-40.

Mansour AF, Fikry RM, Saad MM, Mohamed AM. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of (*Cymbopogon citratus*) essential oil cultivated in Madinah monawara, Saudi Arabia and its comparison to the Egyptian chemotype. *International Journal of Food and Nutritional Sciences*. 2015; 4(4): 29-33.

Matasyoh JC, Wagara IN, Nakavuma JL, Kiburai AM. Chemical composition of *Cymbopogon citratus* essential oil and its effect on mycotoxigenic *Aspergillus species*. *African Journal of Food Science*. 2011; 5(3): 138-142.

Matern U, Kneusal RE. Phenolic compounds in plant disease resistance. *Phytoparasitica*. 1988; 16: 153-170.

Mathur SB, Kongsdal O. Common laboratory seed health testing methods for detecting fungi. 1st Edition. Baserdorf, CH-Switzerland: International Seed Testing Association. 2003; 425p.

Mekam P. Effet des extraits de deux plantes (*Eucalyptus tereticornis* et *Oxalis barrelieri*) sur *Colletotrichum coccodes* et sur la germination des semences de tomate. Mémoire de Master II de Biochimie. Université de Yaoundé I. 2011; 69p.

Métraux JP, Nawrath C, Genoud T. Systemic acquired resistance. *Euphytica*. 2002; 124: 237-243.

Mew TW, Gonzales P. A handbook of rice seed-borne fungi. Los Banos, Philippines: International Rice Research Institute (IRRI) and Enfield, N.H., USA: Science Publishers, Inc. 2002; 406p.

Meyer Y; Belin C, Delorme-Hinoux V, Reichheld JP, Riondet C. Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants: Molecular mechanisms, crosstalks, and functional significance. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2012; 17: 1124-1160.

Miean KH, Mohamed S. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001; 49: 3106-3112.

Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell & Environment*. 2010; 33: 453-467.

- Minader.** Liste des pesticides homologués au Cameroun au 31 juillet 2013. 2013; 39p.
- Minader.** Strategie nationale de développement de la riziculture au cameroun. 2009; 19p.
- Misra JK, Merca SD and Mew TW.** Fungal pathogens. In: Mew TW, Misra JK (Editors). A Manual of Rice Seed Health Testing. Los Baños, Laguna: The International Rice Research Institute (IRRI). 1994; pp. 75-89.
- Misra JK, Mew TW, Huelma CC.** Seed treatment. In: Mew TW, Misra JK (Editors). A Manual of Rice Seed Health Testing. Los Baños: International Rice Research Institute. 1994; pp. 59-61.
- Misra JK, MewTW, Merca SD.** Field inspection. In: Mew TW, Misra JK, (Editors). A Manual of Rice Seed Health Testing. Los Baños, Laguna: The International Rice Research Institute (IRRI). 1994; pp. 51-56.
- Mohamed Hanaa AR, Sallam YI, El-Leithy AS, Safaa EA.** Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as affected by drying methods. Annals of Agricultural Science. 2012; 57 (2): 113-116.
- Mohammedi Z, Atik F.** Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla* (L.) International Journal of Pharma and Bio Sciences. 2011; 2: 609-615.
- Mohapotra NP, Pati SP, Ray RC.** *In vitro* inhibition of *Botryodiplodia theobromae* (Pat) causing Java black rot in sweet potato by phenolic compound. Annal of Plant Protection Science. 2000; 8: 106-109.
- Morgan GA, Leech NL, Gloeckner GW, Barrett KC.** IBM SPSS for introductory statistics: use and interpretation, 4th Edition. Routledge Taylor & Francis Group. 2011; 229p.
- Moriwaki A, Kihara J, Mori C, Arase S.** A MAP kinase gene, BMK1, is required for conidiation and pathogenicity in the rice leaf spot pathogen *Bipolaris oryzae*. Microbiological Research. 2007; 162: 108-114.
- Mosch J, Zeller W, Rieck M, Ullrich W.** Further studies on plant extracts with a resistance induction effect against *Erwinia amylovora*. VII International Workshop on Fire Blight ISHS Acta Horticulturae. 1995; 411p.

Mulinacci N, Prucher D, Peruzzi M, Romani A, Pinelli P, Giaccherini C, Vincieri FF. Commercial and laboratory extracts from *artichoke* leaves: estimation of caffeoyl esters and flavonoidic compound content. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2004; 34: 349-357.

Muthukumar A, Sanaeetha G, Naveenkumar R. Antimicrobial activity of essential oils against seed borne fungi of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Environmental Biology*. 2016; 37:1429-1436.

Navodit G, Prabir KP. Induction and expression of peroxidase in tomato is age-dependent, *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 2015; 48(7): 555-568.

Negrelle RRB, Gomes EC. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: chemical composition and biological activities. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s. 2007; 9: 80-92.

Németh ZI, Pozsgai-Harsányi M, Gálos B, Albert L. Stress sensitivity of correlation between POD and PPO Activities in plants. *Acta Silvatica & Lignaria Hungarica*. 2009; 5: 27-45.

Netam RS, Bahadur AN, Tiwari U, Tiwari RKS. Efficacy of plants extracts for the control of (*Pyricularia grisea*) Blast of rice under field condition of Bastar, Chhattisgarh. *Research Journal of Agricultural Sciences*. 2011; 2(2): 269- 271.

Nethsinghe C, Paskaranathan U. Lemongrass-A literature Survey. CISIR (Ceylon Institute of Scientific and Industrial Research) and National Science Council of Sri Lanka. 1976; 45p.

Nguefack J, Leth V, Lekagne DJB, Torp J, Amvam ZPH, Nyasse S. Use of three essential oils as seed treatments against seed-borne fungi of rice (*Oryza sativa* L.). *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science*. 2008; 4: 554-560.

Nguefack J, Nguikwie SK, Fotio D, Dongmo B, Amvam Zollo PH, Leth V, Nkengfack AE, Poll L. Fungicidal potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* to control *Alternaria padwickii* and *Bipolaris oryzae*, two seed-borne fungi of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Essential Oil Research*. 2007; 19: 581-587.

Nguefack J, Somda I, Mortensen CN, Amvam ZPH. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling seedborne bacteria of rice (*Oryza sativa* L.). *Seed Science and Technology*. 2005; 33: 397-407.

Nguefack J, Wulff GE , Dongmo Lekagne JB , Fouelefack FR, Fotio D, Mbo J, Torp J. Effect of plant extracts and an essential oil on the control of brown spot disease, tillering, number of panicles and yield increase in rice. *European Journal Plant Pathology*. 2013; 137: 871-882.

Nguefack J. Potentiel antifongique et antibactérien de quelques huiles essentielles contre les champignons et bactéries véhiculés par les semences de riz (*Oryza sativa* L.) et les aliments. Thèse de doctorat d'état de Biochimie, Université de Yaoundé I. 2005; 184p.

Nishizawa Y, Saruta M, Nakazono K, Nishio Z, Soma M, Yoshida T, Nakajima E, Hibi T. Characterization of transgenic rice plants over-expressing the stress-inducible beta-glucanase gene Gns1. *Plant Molecular Biology*. 2003; 51:143-152.

Odebeyi OO, Sofowora FH. Antimicrobial alkaloids from Nigerian chewing stick (*Fagara zanthoxyloides*). *Planta Medicine*. 1979; 36. 204-207.

Oerke EC. Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*. 2006; 144: 31-43.

Okeleye KA Adeoti AYA, Tayo TO. Farmers participatory Rice variety selection trials at Ibogun Olaogun village, Ogun state, Nigeria. *International Journal of Tropical Agriculture*. 2006; 24: 643-649.

Omezzine F, Bouaziz M, Daami-Remadi M, Simmonds MSJ, Haouala R. Chemical composition and antifungal activity of *Trigonella foenum-graecum* L. varied with plant ploidy level and developmental stage. *Arabian Journal of Chemistry*. 2014; 15: 1-10.

Ozeretskovskaya OL. Abiogenic elicitors. In: Yu. T. Dyakov, V. G. Dzhavakhiya, T. Korpela (Editors) *Comprehensive and molecular phytopathology*. 1st Edition. Amsterdam: Elsevier. 2007; pp. 187-198.

Padmanabhan SY. The great Bengal famine. *Annual Review of Phytopathology*. 1973; 11: 11-24.

Pandey DK, Chandra H, Tripathi NN. Volatile fungi toxic activity in higher plants with special reference to that of *Cal.listemon lanceolatus* DC. *Phytopathology*. 1982; 105: 175-182.

Panneton B, Vincent C, Fleurat-Lessard F. Place de la lutte physique en phytoprotection In: Vincent C, Panneton B, Fleurat-Lessard F (éditeurs).un point sur la lutte physique en phytoprotection. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique. 2000; pp 1-25.

Panpatil VV, Tattari S, Kota N, Nimgulkar C, Polasa K. *In vitro* evaluation on antioxidant and antimicrobial activity of spice extracts of ginger, turmeric and garlic. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2013; 2 (3): 143-148.

Park JY, Jin J, Lee YW, Kang S, Lee YH. Rice blast fungus (*Magnaporthe oryzae*) infects *arabidopsis* via a mechanism distinct from that required for the infection of rice. *Plant Physiology*. 2009; 149: 474-486.

Peng S, Khush GS, Cassman KG. Evolution of the new plant ideotype for increased yield potential. In: Cassman KG (Editor.). *Breaking the yield barrier, proceedings of a workshop on rice yield potential in favorable environments*. Los Banos, Philippines: International Rice Research Institute. 1994; pp. 5-20.

Pham QD, Mitsugu H, Satoru S, Eiki K. Varietal differences in tillering and yield responses of rice plants to nitrogen-free basal dressing accompanied with sparse planting density in the tohoku region of japan. *Plant Production Science*. 2004; 7(1): 3-10.

Pham VD, Huynh VN, Nguyen DC. Application of seed cleaning in management of seed-borne diseases of rice. *Omonrice*. 2003; 11: 103-109.

Picco AM and Rodolfi M. *Pyricularia grisea* and *Bipolaris oryzae*: a preliminary study on the occurrence of airborne spores in a rice field. *Aerobiologia*. 2002; 18(2): 163-167.

Pieterse CMJ, Van Loon LC. NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*. 2004; 7: 456-464.

Pieterse CMJ, Van Wees SCM, Van Pelt JA, Knoester M, Laan R, Gerrits H, Weisbeck PJ, Van Loon LC. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 1998; 10: 1571-1580.

Pilon-Smits EAH, Quinn CF, Tapken W, Malagoli M, Schiavon M. Physiological functions of beneficial elements. *Current Opinion in Plant Biology*. 2009; 12: 267-274.

Pinto ZT, Sánchez FF, Ramos A, Amaral ACF, Ferreira JLP, Escalona-Arranz JC, Queiroz MMC. Chemical composition and insecticidal activity of *Cymbopogon citratus* essential oil from Cuba and Brazil against housefly. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*. 2015; 24(1): 36-44.

Pramanik K, Bera AK. Effect of seedling age and nitrogen fertilizer on growth, chlorophyll content, yield and economics of hybrid rice (*Oryza sativa* L.) International Journal of Agronomy and Plant Production. 2013; 4 (S): 3489-3499.

Priya ES, Selvan PS, Yavanarajan A. Chemotypic variation in clove oil and lemongrass oil obtained from three different geographical locations of India. Journal of Pharmacognosy and Natural Product. 2015; 1(1): 1-4.

Quy DD, Artik EA, Phuong LTN, Lien HH, Felycia ES, Suryadi I, Yi HJ. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila* aromatic. Journal of Food and Drug Analysis. 2014; 22: 296-302.

Ramamoorthy V, Viswanathan R, Raguchander T, Prakasam V, Samiyappan R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting *rhizobacteria* in crop plants against pests and diseases. Crop Protection. 2001; 20:1-11.

Raveesha KA. Antimicrobials of plant origin to prevent the biodeterioration of grains. In: Dubey NK (Editor). Natural products in plant pest management. Wallingford: CAB International. 2011; pp. 91-108.

Raymond C, George N (Editors). Natural products chemistry: Sources, separations, and structures. New York: CRC Press. 2015; 176p.

Rodenburg J, Saito K, Kakai RG, Toure A, Mariko M, Kiepe P. Weed competitiveness of the lowland rice varieties of NERICA in the Southern Guinea Savanna. Field Crops Research. 2009; 114: 411-418.

Ross IA. Medicinal Plants of the World Volume 3: Chemical constituents, traditional and modern medicinal uses. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc. 2005; 463p.

Roy SKS, Hamid A, Miah MG, Hashem A. Seed size variation and its effects on germination and seedling vigour in rice. Journal of Agronomy and Crop Science. 1996; 176(2): 79-82.

Ryals J, Lawton KA, Delaney TP, Friedrich L, Kessmanns H, Neuenschwander U, Uknes S, Vernooij B, Weymann K. Signal transduction in systemic acquired resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1995; 92: 4202-4205.

- Saad NY, Muller CD, Lobstein A.** Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal*. 2013; 28: 269-279.
- Saikia D, Khanuja SPS, Kahol AP, Gupta SC, Kumar S.** Comparative antifungal activity of essential oils and constituents from three distinct genotypes of *Cymbopogon spp.* *Current Science*. 2001; 80(10): 1264-1266.
- Sarla N, Mallikarjuna Swamy BP.** *Oryza glaberrima*: A source for the improvement of *Oryza sativa*. *Current Science*. 2005; 89(6): 955-963.
- Sasidharan, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Yatha Y.** Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines*. 2011; 8(1): 1-10.
- Sateesh K, Thambiayya M, Jayashree K, Balsamy T, Ramasamy S.** Induction of systemic resistance in rice by leaf extracts of *Zizyphus jujube* and *Ipomoea carnea* against *Rhizoctonia solani*. *Plant Signaling and Behavior*. 2011; 6 (7): 919-923.
- Satish S, Mohana, DC, Ranhavendra MP, Raveesha KA.** Antifungal activity of some plant extracts against important seed borne pathogens of *Aspergillus sp.* *Journal of Agricultural Technology*. 2007; 3: 109-119.
- Sato H, Ando I, Hirabayashi H, Takeuchi Y, Arase S, Kihara J, Kato H, Imbe T, Nemoto H.** QTL analysis of brown spot resistance in rice (*Oryza sativa* L.). *Breeding Science*. 2008; 58: 93-96.
- Sato H, Ando I, Hirabayashi H, Takeuchi Y, Arase S, Kiharai J, Kato H, Irnbe T, Nemoto H.** QTL analysis of brown spot resistance in rice (*Oryza sativa* L.). *Breeding Science*. 2008; 58: 93-96.
- Savary S, Willocquet L, Elazegui FA, Castilla NP, Teng PS.** Rice pests constraints in tropical Asia: quantification of yield losses due torice pests in a range of production situations. *Plant Disease*. 2000; 84(3): 357-369.
- Schaneberg BT, Khan IA.** Comparison of extraction methods for marker compounds in the essential oil of Lemon Grass by GC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 50: 1345-1349.

- Schoppe CV.** Chemistry of the steroids. 2nd Edition. London: Butterworth England. 1964; 124p.
- Schreiner M, Huyskens-Keil S.** Phytochemicals in fruit and vegetables: Health promotion and postharvest elicitors. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2006; 25: 267-278.
- Sekiya N, Khatib KJ, Makame SM, Tomitaka M, Oizumi N, Araki H.** Performance of a number of NERICA cultivars in Zanzibar, Tanzania: Yield, yield Components and grain quality. *Plant production Science*. 2013; 16: (2): 141-153.
- Semal J.** *Traité de phytopathologie végétale*. Gembloux: Les Presses Agronomiques de Gembloux A.S.B.L. 1989; 621p.
- Sesma A, Osbourn AE.** The rice blast pathogen undergoes developmental processes typical of root-infecting fungi. *Nature*. 2004; 431: 582-586.
- Sewagegne T, Tadesse L.** Performance of upland NERICA and non -NERICA rice genotypes in multi-environment yield trials as analyzed using GGE biplot model. *Journal of Life Science and Biotechnology*. 2016; 1: 20-31.
- Shah G, Shri R, Panchal V, Sharma N, Singh B, Mann AS.** Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, Stapf (Lemon grass). *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. 2011; 2 (1): 1-8.
- Shahhoseini R, Estaji A, Hosseini N, Ghorbanpour M, Omidbaigi R.** The Effect of different drying methods on the content and chemical composition of essential oil of *lemon verbena* (*Lippia citriodora*). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2013; 16 (4): 474-481.
- Sharma SD.** Domestication and Diaspora of Rice. In. Sharma SD (Editors). *Rice: Origin, Antiquity and History*. Enfield, New Hampshire: Science Publishers. 2010; pp. 1-25.
- Sherf AF, Page RM, Tullis EC, Morgan TL.** Studies on factors affecting the infectivity of *Helminthosporium oryzae*. *Phytopathology*. 1947; 37: 281-290.
- Shukla R, Singh P, Prakash B, Dubey NK.** Antifungal, aflatoxin inhibition and antioxidant activity of *Cal.listemon lanceolatus* (Sm.) Sweet essential oil and its major component 1,8-cineole against fungal isolates from chickpea seeds. *Food Control*. 2012; 25: 27-33.
- Singh RK, Singh CV, Shukla VD.** Phosphorus nutrition reduces brown spot incidence in rainfed upland rice. *International Rice Research Notes*. 2005; 30(2): 31-32.

Singh VP, Singh RK. (Editors). Rainfed rice: A sourcebook of best practices and strategies in Eastern India. Los Baños: International Rice Research Institute. 2000; 292p.

Small E. Top 100 Food Plants the World's Most Important Culinary crops. Ottawa: National Research Council press of Canada. 2009; 636p.

Soares MO, Alves RC, Pires PC, Oliveira MBPP, Vinha AF. Angolan *Cymbopogon citratus* used for therapeutic benefits: Nutritional composition and influence of solvents in phytochemicals content and antioxidant activity of leaf extracts. Food and Chemical Toxicology. 2013; 60: 413-418.

Song F, Goodman RM. Molecular biology of disease resistance in rice. Physiological and Molecular Plant Pathology. 2001; 59: 1-11.

Srinivasachary, Willocquet L, Savary S. Resistance to rice sheath blight (*Rhizoctonia solani* Kuhn) [(Teleomorph: *Thanatophorus cucumeris* (A.B Frank) Donk.)] disease: current status and perspectives. Euphytica. 2011; 178: 1-22.

Srivastava P, Sheeja G, Marois JJ, Wright DL, Walker DR. Saccharin-induced systemic acquired resistance against rust (*Phakopsora pachyrhizi*) infection in soybean: Effects on growth and development. Crop Protection. 2011; 30: 726-732.

Steiner U, Schönbeck F. Induced disease resistance in monocots. In: Hammerschmidt R, Kuc, Kluwer J (Editors). Induced resistance to disease in plants. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 1995; pp. 86-110.

Steven MC, Russell JM. An Introduction and overview In: Steven MC, Russell JM (Editors). Bioactive natural products: Detection, isolation, and structural determination. 2nd Edition. New York: CRC Press. 2008; pp. 1-10.

Stoytcheva M. Pesticides in the modern World - risks and benefits. Rijeka: InTech. 2011; 560p.

Sudisha J, Sharathchandra RG, Amruthesh KN, Kumar A, Shekar H. Shetty pathogenesis related proteins in plant defense response In: Mérillon JM, Ramawat KG (Editors), Plant defense: Biological control, progress in biological control 12th edition. Springer Science+Business Media B.V. 2012; pp. 11-32.

Sunder S, Ram Singh, Dodan DS. Management of bakanae disease of rice caused by *Fusarium moniliforme*. Indian Journal of Agricultural Sciences. 2014; 84 (1): 48-52.

- Suraj C, Thawatchai T.** Identification of accelerated aging conditions for seed vigor test in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of renewable Natural resource Bhutan*. 2010; 6(1):13-23.
- Sweeney M, McCouch S.** The complex history of the domestication of rice. *Annals of Botany*. 2007; 100: 951-957.
- Tajidin NE, Ahmad SH, Rosenani AB, Azimah H and Munirah M.** Chemical composition and citral content in lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil at three maturity stages. *African Journal of Biotechnology*. 2012; 11(11): 2685-2693.
- Takatsuji H, Sugano S, Chang-Jie J.** Salicylic acid signaling pathway in rice and the potential applications of its Regulators. *Japan Agricultural Research Quarterly*. 2010; 44:2176223. DOI10.6090/jarq.44.217
- Tangarife CV, Correa RJ, Zapata LB, Durán C, Stanshenko E, Mesa AC.** Anti-*Candida albicans* activity, cytotoxicity and interaction with antifungal drugs of essential oils and extracts from aromatic and medicinal plants. *Infectio*. 2011; 15: 160-167.
- Tapan KP, Saurav B, Krishanu C.** Induction of systemic resistance in rice by leaf extract of *Cymbopogon citratus* and *Ocimum sanctum* against sheath blight disease. *Archives of Applied Science Research*. 2011; 3 (1):392-400.
- Teng S, Vergara BS, Alejar AA.** Relationship of grain length, width, and weight to seedling vigor in rice (*Oryza sativa* L). *Crop Science*. 1992; 17(1): 63-74.
- Teniente LM, Pacheco IT, Chavira MMG, Velazquez RVO, Ruiz GH, Chapa-Oliver AM, González RGG.** Use of elicitors as an approach for sustainable agriculture. *African Journal of Biotechnology*. 2010; 9 (54): 9155-9162.
- Terrence AL (Editor).** *A Beginner's Guide to mass spectral interpretation*. New York: John Wiley & Sons Ltd. 1998; 186p.
- Thompson DP.** Fungitoxic activity of essential oil components of food storage fungi. *Mycologia*. 1989; 81(1): 151- 153.
- Tilaoui M, Ait MH, Jaafari A, Ziyad A.** Comparative phytochemical analysis of essential oils from different biological parts of *Artemisia herba alba* and their cytotoxic effect on cancer cells. *PLoS One*. 2015; 10(7): e0131799.

Trease GE, Evans WC. A test book of pharmacognosy. 13th Edition, Bailliere Londres: Tindall Ltd. 1989; 93p.

Tripathi P, Shukla AK. Exploitation of botanicals in the management of phytopathogenic and storage fungi. In: Arya A, Perelló AE (Editors). Management of fungal plant pathogens. 1st Edition. Wallingford: CABI. 2010; pp. 36-50.

Turek C, Stintzing FC. Stability of essential oils: A Review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2013; 12: 1-53.

Turina AV, Nolan MV, Zygodlo JA, Perillo MA. Natural terpenes: Self-assembly and membrane partitioning. Biophysical Chemistry. 2006; 122:101-113.

Umar M, Mohammed IB, Oko JO, Tafinta IY, Aliko AA, Jobbi DY. Phytochemical analysis and antimicrobial effect of lemon Grass (*Cymbopogon citratus*) obtained from Zaria, Kaduna State, Nigeria. Journal of Complementary and Alternative Medical Research. 2016; 1(2): 1-8.

United States Department of Agriculture. USDA Nutrient Database, <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/nutrients/index> (Consultée le 12 octobre 2017).

Van Loon LC. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. European Journal of Plant Pathology. 1997; 103: 753-765.

Van Loon, LC, Van Strien EA. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiological and Molecular Plant Pathology. 1999; 55: 85-97.

Vasudevan P, Kavitha S, Priyadarisini VB, Babujee L, Gnanamanickam SS. Biological control of rice diseases. In: Gnanamanickam SS (Editor). Biological control of crop diseases. New York: Marcel Dekker Inc. 2002; pp. 11-32.

Veluri R, Weir T, Bais HP, Stermitz, FR, Vivanco JM. Phytotoxic and antimicrobial activities of catechin derivatives. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2004; 52(5): 1077-1082.

Veselova TV, Veselovsky VA. Investigation of atypical germination change during accelerated ageing of pea seeds. Seed Science and Technology. 2003; 31: 517-530.

- Vidhu A, Perwez A, Mohd. A.** Isolation of keto alcohol and triterpenes from tubers of *Cyperus rotundus* Linn. *Journal of Natural Products and Plant Resources*. 2012; 2 (2): 272-280.
- Vieira FA, da Cunha M, Klein DE, Carvalho AO and Gomes VM.** Purification and Characterization of β -1, 3-Glucanase from the Secretion of *Simira glaziovii* Colleters (*Rubiaceae*). *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2006; 49(6): 881-888.
- Vu VB, Somsiri S.** Seed Borne and Transmission of *Bipolaris oryzae*, the Causal pathogen of brown spot of rice. *Kasetsart Journal - Natural Science*. 2006; 40: 353 - 360.
- Wall ME, Eddy CR, Mc-Clenna ML, Klump ME.** Detection and estimation of steroid sapogenins VII. *Agricultural Research Service. CICR. AIC*. 1954; 363p.
- Waller JM. Seed health revised.** In: Waller JM, Lenné JM, Waller SJ (Editors). *Plant pathologist's pocketbook*. 3rd Edition. Wallingford Oxon: CAB International. 2002; pp. 279-286.
- Walters D, Heil M.** Costs and trade-offs associated with induced resistance. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2007; 71: 3-17.
- Walters D, Walsh D, Newton A, Lyon G.** Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors. *Phytopathology*. 2005; 95(12): 1368-1373.
- Walters D, Jaan R, Neil DH.** Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *Journal of Experimental Botany*. 2013; 64(5): 1263-1280.
- Wang F, Cheng F, Zhang G.** Difference in grain yield and quality among tillers in rice genotypes differing in tillering capacity. *Rice Science*. 2007; 14(2): 135-140.
- Wang GS, Han J, Zhao LW, Jiang DX, Liu YT, Liu XL.** Anthelmintic activity of steroidal saponins from *Paris polyphylla*. *Phytomedicine*. 2010; 17: 1102-1105.
- Wang W, Chen Q, Hussain S, Mei J, Dong H, Peng S, Huang J, Cui K, Nie.** Pre-sowing seed treatments in direct-seeded early rice: consequences for emergence, seedling growth and associated metabolic events under chilling stress. *Scientific Reports*. 2016; 6: 19637/DOI: 10.1038/srep19637.
- Weiss EA.** *Essential oil crops*: Wallingford: UK CAB International. 1997; 599p.

- Wen-Yi K, Chang-Qin L, Zhi-Qiang J.** A new carbamic acid from *Dryopteris wallichiana*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2011; 47(1): 91-93.
- Williams JS, Hall SA, Hawkesford MJ, Beale MH, Cooper RM.** Elemental sulfur and thiol accumulation in tomato and defense against a fungal vascular pathogen. *Plant Physiology*. 2002; 128:150-159.
- Wilocquet L, Elazegui FA, Castilla N, Fernandez L, Fischer KS, Peng S, Teng PS, Srivastava RK, Singh HM, Zhu D and Savary S.** Research priorities for rice pest management in tropical Asia: A simulation analysis of yield losses and management efficiencies. *Phytopathology*. 2004; 94:672-682.
- Wilson, CL., Solar JM., El Ghaouth A, Wisniewski ME.** Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*. 1997; 81:204-210.
- Winch T.** *Growing food: A guide to food production*. Dordrecht: Springer; 2006. 333p.
- World Factbook, Field Listing:** Imports - Commodities, Central Intelligence Agency. <http://www.worldstopexports.com/rice-imports-by-country/> (page consultée le 31 Mai 31 2017).
- Xiao JZ, Tsuda M, Doke N, Nishimura S.** phytotoxins produced by germinating spore of *Bipolaris Oryzae*. *Phytopathology*. 1991; 81:58-64.
- Xueyong L, Qian Q, Zhiming F, Yonghong W, Guosheng X, Dali Z, Xiaoqun W, Xinfang L, Sheng T, Fujimoto H, Ming Y, Da L, Bin H, Jiayang L.** Control of tillering in rice. *Nature*. 2003; 422: 618-621.
- Yaouba A, Tatsadjieu NL, Jazet DPM, Etoa FX, Mbofung CM.** Antifungal properties of essential oils and some constituents to reduce foodborne pathogen. *Journal of Yeast and Fungal Research*. 2010; 1(1): 001-008.
- Zeller W.** Status on induced resistance against plant bacterial diseases. *Fitosanidad*. 2006; 10(2): 99-103.
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W.** The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*. 1999; 64:555-559.

Zhong X, Peng S, Sheehy JE, Visperas, Liu H. Relationship between tillering and leaf area index: quantifying critical leaf area index for tillering in rice. *Journal of Agriculture Science*. 2002; 138: 269-279.

Zhou H, Tao N, Jia L. Antifungal activity of citral, octanal and α -terpineol against *Geotrichum citri-aurantii*. *Food Control*. 2014. 37: 277-283.

Zieslin N, Ben-zaken R. Peroxidase activity and presence of phenolic substances in peduncles of rose flowers. *Plant Physiology and Biochemistry*. 1993; 31: 333-339.

Zimmerli L, Métraux JP, Mauch-Mani B. β -aminobutyric acid-induced protection of *Arabidopsis* against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*. 2001; 126: 517-523.

ANNEXES

Annexes

Annexe I: Composition des milieux de cultures

Composition of liquid LB medium: (yeast extract 5 g/l, peptone 10 g/l, NaCl 5 g/l, pH≈ 7.0)

- Extrait de levure: 5 g
- Peptone: 10 g
- NaCl: 5 g
- Eau distillée: 1000 ml et ajuster le PH à 7
- Pour la préparation du milieu de culture solide, ajouter 20/l Agar

NB: Parce que l'extrait de levure est collant, le dissoudre à part dans de l'eau distillée avant de mélanger avec la peptone et le NaCl et porter l'ensemble à l'agitateur magnétique.

Composition du milieu PDA

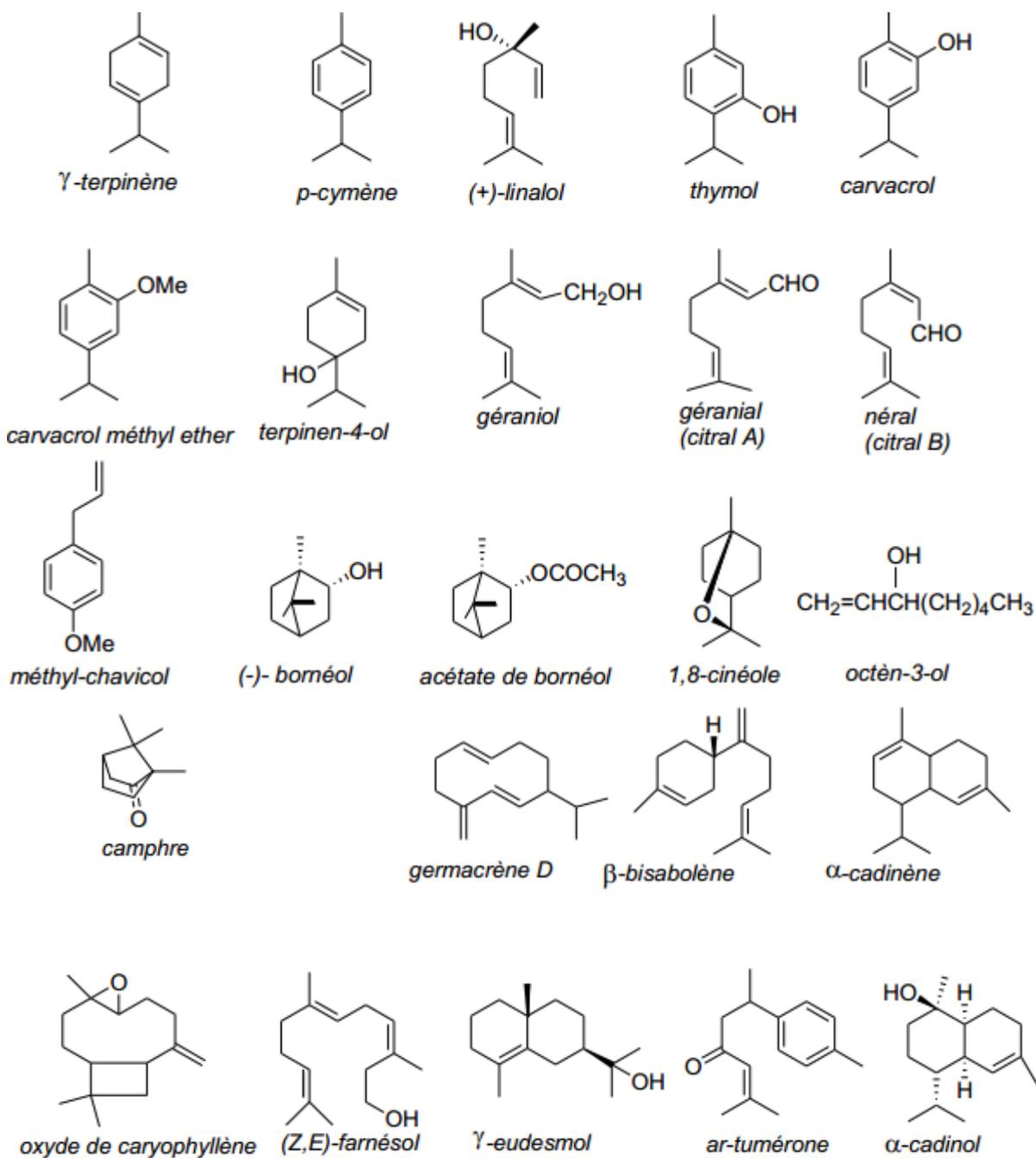
Composition: Pomme de terre: 200g; Dextrose: 20 g; Agar 20g; Eau distillée: 1000 ml
PH≈ 6 ± 0,2

Pour la préparation: Découper les pommes de terre en de petits morceaux et les bouillir jusqu'à ce qu'elles deviennent bien tendres; filtrer directement sans écraser; ajouter du dextrose, homogénéiser, ajuster le volume et homogénéiser, stériliser à l'autoclave, ajouter de l'agar dans les contenus des milieux de de culture qui seront utiliser solidifier.

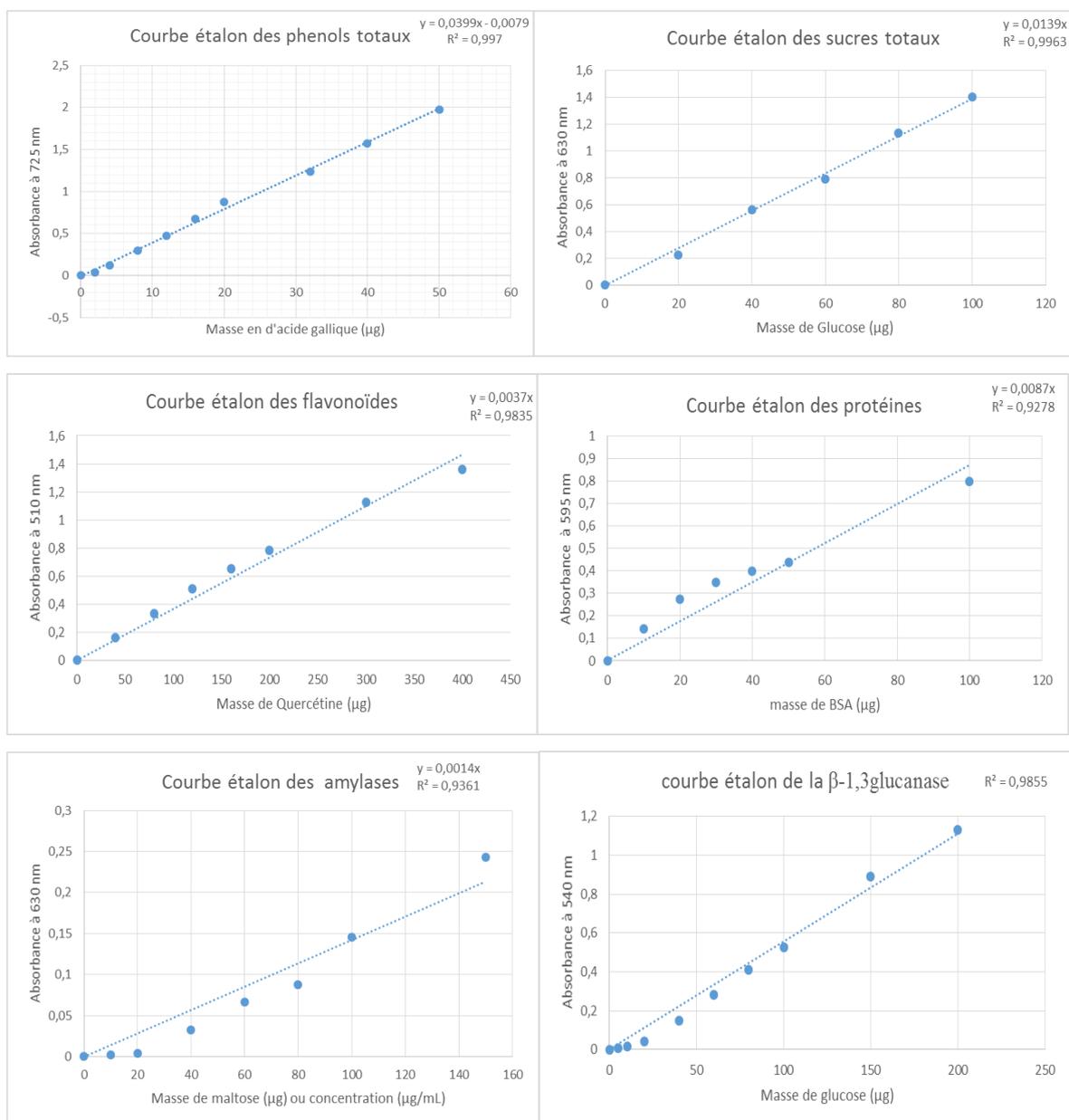
Annexe II : Monographies du fongicide de synthèse, Banko Plus

Classification	: Fongicide agricole
Propriétés	: Systémique, polyvalent, préventif
Teneur en matière active	: Chlorothalonil (550 g/l) et Carbendazime (100 g/l)
Formules chimiques	: C ₈ C ₁₄ N ₂ et C ₉ H ₉ N ₃ O ₂
Présentation	: Liquide dissoluble
Dose	: 75 ml /15 l d'eau
Mode d'application	: Pulvérisation
Conditionnement	: Bidon d'1litre
Maladies traitées	: Mildiou
Cultures concernées	: Tomate, pomme de terre
Fréquence des traitements	: 1 fois/7-14 jours selon la pluviométrie
Délai avant récolte	: 3 jours
Effets toxicologiques	: Irritant pour les yeux et la peau, Toxique pour les poissons.

Annexe III: Structures de quelques composés identifiés dans les fractions d'huiles essentielles de *C. citratus*, obtenues par hydrodistillation



Annexe IV: Courbes standards de quantification des métabolites des extraits et d'évaluation des marqueurs d'induction de résistance.



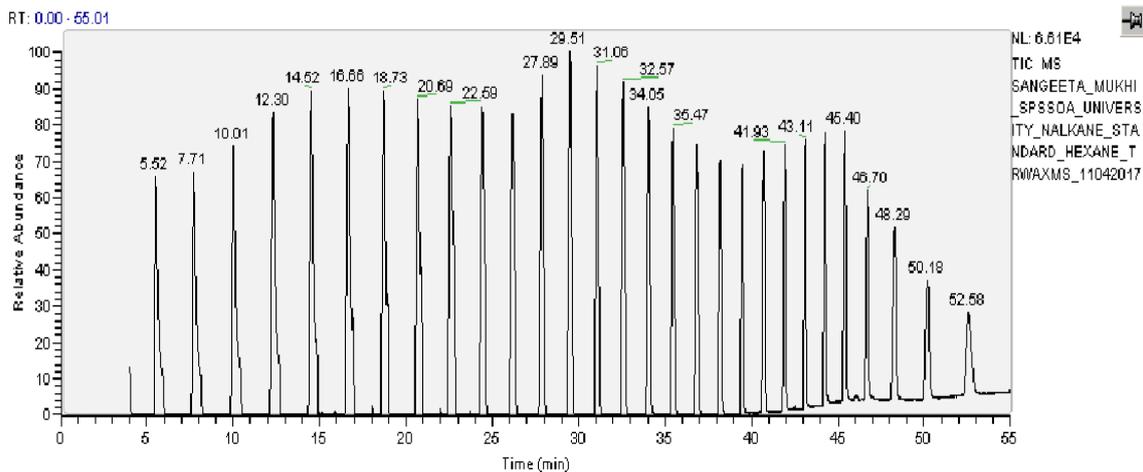
Annexe V: Verrerie et petit matériel

Becher, erlenmeyer, éprouvette, boîtes de pétris, emporte-pièce, micropipettes, embouts, bocaux, lames et lamelles, laine de verre, pissette, papier filtre de type Wattman, papier buvard, toile, aiguille, papier parafilm.

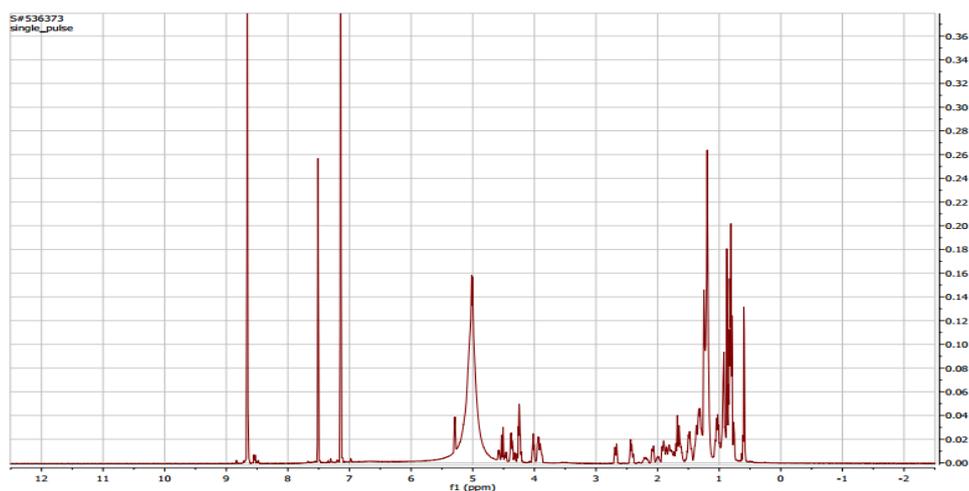
Annexe VI: Quelques Appareils utilisés

Hotte à flux laminaire, évaporateur rotatoire, stéréo microscope, microscope optique, centrifugeuse, lyophilisateur, balance à précision, étuve, autoclave, four micro-onde, frigo, agitateur magnétique, distillateur, clevenger, vortex, spectrophotomètre, incubateur, bain marie, chromatographes (CPG, CLHP, CLMP), spectromètre de masse.

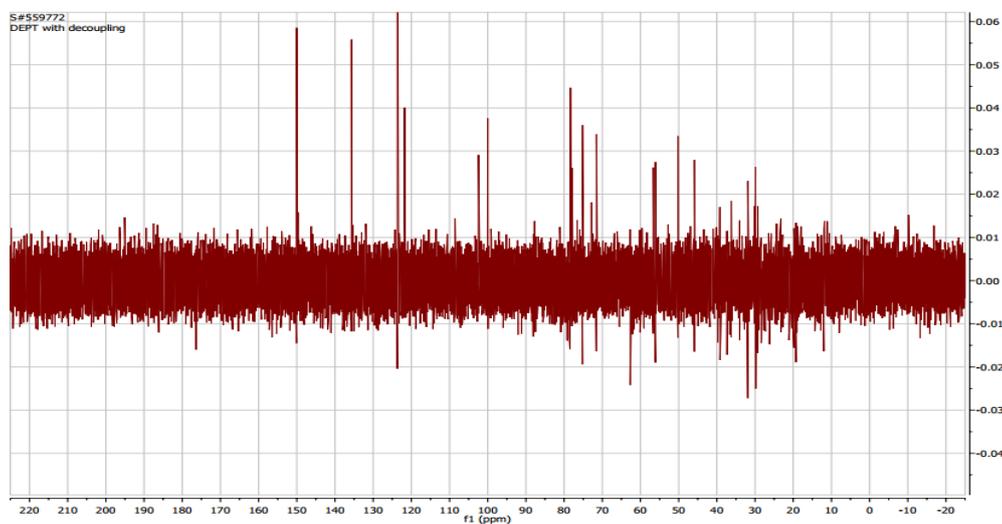
Annexe VII : Chrommatogramme du standard n-Alcanes (C₇-C₄₀) pour détermination des indices de rétention des composés des fractions d'HE.



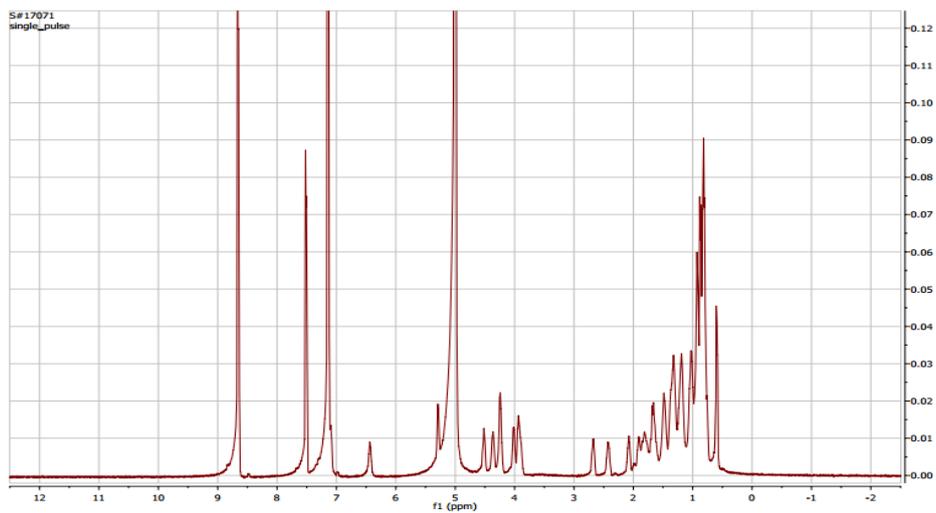
Annexe VIII : Spectres RMN des composés identifiés dans l'extrait éthanolique de *Cymbopogon citratus*.



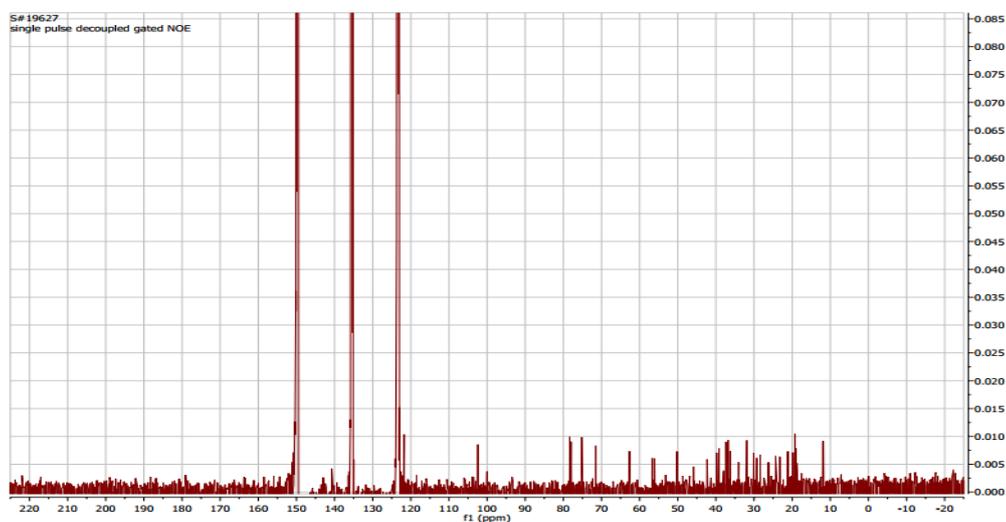
Spectre de RMN ¹H du composé BC7 (C₅D₅N, 500MHZ)



Spectre de RMN ¹³C du composé BC7 (C₅D₅N, 125MHZ)



Spectre de RMN ^1H du composé BC-101 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500MHZ)



Spectre de RMN ^{13}C du composé BC-101 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 125MHZ)

**PUBLICATION ISSUE DE LA
THESE**

Full Length Research Paper

Effects of extracts of *Oxalis barrelieri* L. and *Cymbopogon citratus* stapf, coupled with NaCl sorting on; seed health, germination and seedlings vigor of rice (*Oryzae sativa* L).

Fouelefack François Romain^{1,2*}, Nguefack Julienne¹, Dongmo Lekagne Joseph Blaise¹,
Dongmo Nanfack Albert¹, Azah Udom Rene¹ and Nkengfack Augustin Ephrem³

¹Department of Biochemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé I, P. O. Box 812, Yaoundé, Cameroon.

²Department of Biological Sciences, Faculty of Science, University of Maroua, P. O. Box 814, Maroua, Cameroon.

³Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Yaoundé I, P. O. Box 812, Yaoundé, Cameroon.

Received 26 October, 2017; Accepted 29 November, 2017

The extracts of *Oxalis barrelieri* and *Cymbopogon citratus* were tested for their antifungal activity against *Bipolaris oryzae* and *Fusarium moniliforme*, and use as seed treatment coupled with NaCl treatment to improve the seed germination and the seedlings vigor of treated rice seeds. The significance of the inhibitory activity of the plant extracts against *B. oryzae* and *F. moniliforme* was type of extract and concentration dependent. The ethanolic extract of *C. citratus* at 10000 ppm, showed the highest inhibitory effect, with 58.51 and 55.9% growth inhibition of *F. moniliforme* and *B. oryzae*, respectively. The rice seeds sorted in 20% NaCl solution had a greater mass (quantify), a germination percentage of 12.5% higher as compared to seeds sorted in with water and 19.5% higher than that of unsorted seeds. A moderate positive and significant linear relationship ($Rho(78) = 0.427^{**}$, $p < 0.01$) was shown between weight and germination of rice seeds. The ethanol extracts of *O. barrelieri* and *C. citratus* stimulated rice seed germination at comparable degree; 15.15 to 22.06% from the top of paper method and 11.1 to 16.2% from sand method in green house trials. Rice seed treatments at 1% concentration exhibited the best germination and reduced the infestation of *B. oryzae* and *F. moniliforme* by 25.25 and 9.83%, respectively. Stressed seeds treated with plant extracts showed less pronounced decrease (5.08 %) in germination compared to untreated stressed seed (25.5%). Sorting of rice seeds with 20% NaCl and/or treatment with ethanol extracts of *O. barrelieri* and *C. citratus* showed potential green alternative to reduce seed-borne infestation, improvement of rice vigor and seed germination.

Key words: Rice seeds, NaCl sorting, *Cymbopogon citratus*, *Oxalis barrelieri*, Infestation, *Bipolaris oryzae*, *Fusarium moniliforme*, germination, vigor.

INTRODUCTION

Rice is one of the oldest food crops and constitutes the staple food of more than 60% of people living in the world (Chandrasekaran et al., 2010). Many diseases, including

cryptogamic diseases, cause considerable damage in all areas of rice production (Oerke, 2006). Most of these diseases are mainly seed-borne. *Bipolaris oryzae* and

Fusarium moniliforme, responsible for the brown spot disease and the bakanae disease in rice, respectively, are mainly found in rice seeds (Mew and Gonzales, 2002). Losses due to these pathogens range from 4 to 52% for *B. oryzae* (Barnwal et al., 2013) and 4 to 20% for *F. moniliforme* (Reddy and Sathyanarayana, 2001). Seed dressing of rice to overcome these pathogens has many advantages, including the protection of seed and seedlings against pathogens in the early stages of germination and development. It requires less chemicals application than plants treatment in the field. It is ecofriendly with minor effects as environmental pollutant and on beneficial to soil organisms, specific to the target pathogens (Sharma et al., 2015).

On the other hand, pretreatment of seed is considered as a viable technology to improve rapid and uniform emergence, high vigor and better yields in some crops (Hu et al., 2005). Worldwide and particularly in Cameroon, the majority of rice growers keep seeds from season to season. Most often there is no seed treatment prior to seeding because of lack of knowledge of available chemicals. In addition, some fungicides used for seed treatment are increasingly criticized for their adverse effects (Wilson and Tisdell, 2001); thus, in recent years, there have been considerable pressures on agriculture in reducing their use, and finding better alternatives (Tripathi and Dubey, 2004).

The flora is recognized as the most effective producer of the various biologically active compounds and, some higher plant products have been formulated as botanical pesticides and are used on a large scale as eco-friendly measures in the management of agricultural pests (Dubey et al., 2011). Rice seeds treatment with sodium chloride (NaCl) solutions is an empirical practice. However there has been no investigation on the targets and optimal sorting concentrations, beneficial to the seed health and germination percentage. This work was initiated to study the activity of extracts of *Oxalis barrelieri* and *Cymbopogon citratus*, on two rice seed-borne fungi (*B. oryzae* and *F. moniliforme*), and to assess their effects on the fungal incidence, the germination percent and seedlings vigor of rice seeds sorted in NaCl solutions.

MATERIALS AND METHODS

Rice varieties used

Seeds of red rice from Tonga with rainfed system and Tox 3145-38-2-3 from Ndop with irrigated system; two highly cultivated rice varieties in these localities of the western regions of Cameroon, were used.

Plant material and preparation of plant extracts

C. citratus stapf and *O. barrelieri* L., whole plants were harvested in Yaoundé-Cameroon; They were identified, respectively, in comparison with the specimen of Herbarium Collection No. 18622 SRF / Cam (YA) of the sample of *C. citratus* (De Candolle) Staff of the Collector Daniel Dang No. 202 and the specimen of Herbarium Collection No 19798 SRF / Cam (YA) of the sample of *O. barrelieri* Linn of the Collector A.J.M Leeuwemberg No 6048.

After harvest, the plant material was dried under shade for one and half month and crushed into fine powder. For aqueous extract, the powder was degreased by dipping 100 g in 600 mL of hexane for 2 h. The mixture was filtered with a fine cloth; the residue obtained was recovered and dried under the hood until the hexane was completely evaporated and further macerated in 600 mL of distilled water for 12 h and filtered through a fine cloth.

The resulting filtrate was centrifuged at 6000 g for 20 min and freeze dried to give a powder (AE). For ethanolic extraction, the procedure was roughly the same as for aqueous extraction, except that the residue was macerated in 70% ethanol and the mixture filtered through Whatman paper, and centrifuged. The filtrate obtained was lyophilized (EE).

Synthetic fungicide used

The synthetic fungicide Banko Plus®, made up of 550 g/L chlorotalonil and 100 g/L of carbendanzime was use a positive control.

Evaluation of the *in vitro* antifungal activities of *C. citratus* and *O. barrelieri* extracts

Strains of *B. oryzae* and *F. moniliforme* had been identified and, isolated from infected rice seeds by standard mycological techniques (Mathur and Kongsdal, 2003) at the Plant Pathology Laboratory of the Institute of Agricultural Research for Development, Nkolbisson, Cameroon. The antifungal activities of the extracts (aqueous and ethanolic) of *C. citratus* and *O. barrelieri* were evaluated according to the method described by Grover and Moore (1962) with some modifications. The powders of extracts were dissolved in distilled water and then supplemented at concentrations of 1000, 5000 and 10000 ppm in conical flask containing the Potato Dextrose Agar (PDA) culture media; 5 mg of chloramphenicol was added per liter of culture medium; the whole was autoclaved and poured between 40 to 50°C in the petri dishes. After solidification of the culture medium, 5 mm diameter mycelial disk was removed in the peripheral zones of an aging culture of 6 (*B. oryzae*) and 10 (*F. moniliforme*) days and placed in the center of the petri dish. The dishes thus seeded, were sealed with parafilm and incubated in inverted position at -28°C under a photoperiod of 12 h light aimed at 7 days for *B. oryzae* and 12 days for *F. moniliforme*. Two experiments of three replicates were performed. The mycelial growth diameters were measured and percentage inhibitions (%) was calculated according to the formula:

$$I\% = [(DC-DT) / DC] \times 100$$

With DC, the mycelial mean diameter growth in the control non-

*Corresponding author. E-mail: ffromain@yahoo.com. Tel: (237) 70 00 25 29.

supplemented dish and DT, the mycelial mean diameter growth in the supplemented petri dish (treatment).

Treatments of rice seeds

Treatment of rice seeds with NaCl

NaCl solutions (300 mL) were prepared at various concentrations: 0 (distilled water), 10, 20 and 30%. Sixty (60) g of rice seed was first introduced into a beaker containing only distilled water (NaCl 0%), and then stirred with a glass rod for about 1 min and allowed to stand until stabilization of the water movement.

The floating seeds (S) were recovered by decantation, washed with distilled water and dried (Ts0% S). A portion of the immersed seeds or pellet (C) was recovered, rinsed with distilled water and dried (Ts0% C). The remainder of the pellet was introduced into the 10% NaCl solution and stirred for 1 min; after stabilization of the solution, the supernatant was recovered, rinsed and dried (Ts10% S); a small part of the new pellet was retained, rinsed and dried (Ts10% C). The remainder of the new pellet was introduced into 20% NaCl solution and the cycle was repeated (Ts20% S and Ts20% C) up to the concentration of 30% NaCl (Ts30% S and Ts30% C). Hundred (100) seeds (x 4) of each of the dried lots (Ts0% S, Ts0% C, Ts10% S, Ts10% C, Ts20% S, Ts20% C, Ts30% S and Ts30% C), non-treated seeds (Sec) and total seed soaked in distilled water for 1 min (TM0%), were weighed and the mass expressed in grams. The germination of seeds was also evaluated.

Treatment of rice seeds with plant extracts and synthetic fungicide

The seeds of red rice from Tonga were used due to their low germination potential. The immersed seeds sorted by treatment in the 20% NaCl solution were divided into 5 identical sub samples: 4 sub samples were dipped for 24 h in solutions of ethanol extracts of *C. citratus*/*O. Barrelieri*, at respective concentrations of 0, 1, 2 and 4%. One (1) sub sample was soaked in 0.2% of the Banko Plus fungicide used as positive control.

Simultaneously, the floating seeds from the 20% NaCl sorting were immersed in distilled water (Sur). Dry seeds (Sec) as used by the farmers served as negative control. After these treatments, seed sub samples (T⁰, T¹, T², T⁴%, Banko plus, Sec and T⁺ Sur) were recovered, dried for 1 h and their germination evaluated.

Germination test

The top of paper method (Rao et al., 2006) was used to evaluate the effect of treatments on rice seeds' germination. The above sub samples were divided in four replicates of 50 seeds each. Three moistened blotter papers were placed in 90 mm diameter petri dishes and 25 seeds were seeded per dish and incubated at room temperature (-28°C) under a photoperiod of 12 h of light for 7 days, after which the percent germination was evaluated by, counting the number of normal and abnormal seedlings and dead seeds.

Evaluation of the effect of extracts on, the vigor and the seed health of rice seeds

The accelerated aging test (stress) as described by Delouche and Baskin (1973) was used to evaluate the vigor of the seeds. Dried seeds samples from each of the various treatments described above were deposited on the wire mesh supports. The mesh supports were subsequently placed in transparent plastic boxes

containing 500 mL of distilled water, so as to avoid contact between the seeds and the water. The boxes were hermetically sealed and placed in the oven at a temperature maintained at 44°C for 72 h (Suraj and Thawatchai, 2010). After this stress, seed samples were removed and subjected to the standard germination test.

For the evaluation of the seed health status, seed samples were seeded into the petri dishes containing PDA medium supplemented with 5 g/L of chloramphenicol. Four replicates of 25 seeds each were made, under a photoperiod of 12 h light for 5 days. The infestation incidence of *B. oryzae* and *F. moniliforme* were recorded by counting the number seeds colonized by each of the pathogens and the result expressed as percent infection (I%).

Emergence test

Pots of about 1 L were filled up to 4/5 with a mixture of black soil and sand, in the ratio 4:1. The seed samples from the treatments described in 'treatment of rice seeds with plant extracts and synthetic fungicide' (T⁰%, T¹%, T²%, T⁴%, Banko plus, Dry (Sec) and T⁺ Sur) were sown in pots at 2 cm deep.

Each pot contained 15 seeds chosen randomly and, four replicates were made form each treatment. Watering with 20 mL/pot/day was regularly done using tap water. After 12 days of growth, normal seedlings were counted and results expressed in term of percent emergence.

Statistical analysis

The IBM SPSS 23.0 software was used. In order to carry out the parametric tests, the data were transformed whenever necessary, to determine whether there was any significant difference among the average scores of the levels of the independent variables. One, two and three factor ANOVA were applied, values of $P < 0.05$ were considered as significantly different. The nature of the differences between the means of scores was determined by the Student-Newman-Keuls (S-N-K) multiple comparison test, when the hypothesis of equality of variances was assumed, or by the method of Games-Howell, when this assumption was violated (Morgan et al., 2011).

The correlation coefficient of Pearson or Spearman rho, calculated with 99% confidence interval, was used to establish the relationships amongst variables. All the experiments were arranged in a completely randomized design.

RESULTS

Antifungal activity of the plant extracts

Four extracts were obtained: AEc and EEc of *C. citratus* with yield of 5.50 and 4.78%; and AEo and EEO of *O. barrelieri* with yield of 5.82 and 3.54%, respectively. Two-way factor ANOVA was used to evaluate whether the extract and the concentration each had an effect on the inhibition of fungal growth; and whether the extract effect on fungus inhibition was concentration dependent; the results are shown in Table 1.

The extracts exhibited a significant effect $F(3, 24) = 64.89$, $p < 0.05$ and $F(3, 24) = 143.03$, $p < 0.05$, respectively, for the inhibition of *F. moniliforme* and *B. oryzae*. There was a difference in activity between AEc, EEc, AEo, and EEO. EEs were in general more active than EAs. EEc showed the highest inhibitory activity with

Table 1. Analysis of variance for inhibition percentage as a function of concentration and plant extract.

Source	Type III SS	Df	MS	F	Sig	η^2
<i>B. oryzae</i>						
Extract	1971.48	3	657.16	143.03	0.000	0.15
Conc	9783.30	2	4891.65	1064.67	0.000	0.80
Ext*Conc	59.230	6	9.87	2.148	0.008	0.018
Error	110.268	24	4.594			
<i>F. moniliforme</i>						
Extract	1575.86	3	525.28	64.89	0.000	0.165
Conc	8465.80	2	4232.90	522.92	0.000	0.82
Ext*Conc	322.30	6	53.717	6.636	0.000	0.005
Error	194.27	24	8.09	-	-	-

SS: sum square; MS: Mean Square; Conc: Concentration; Ext: Extract; η^2 : Eta square; df: degree of freedom.

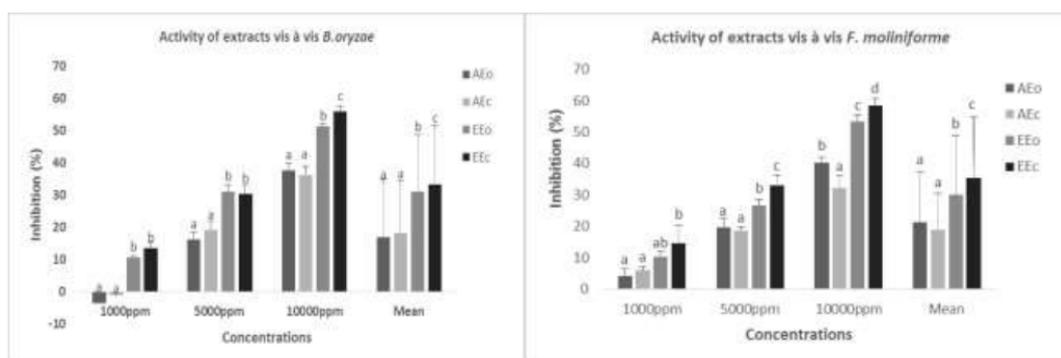


Figure 1. Growth Inhibition of *B. oryzae* and *F. moniliforme* at different concentrations of the extracts of *C. citratus* and *O. barrelieri*.

^{a, b, c} At a given concentration, the extracts bearing different letters are significantly different ($p < 0.05$). Data are averages of three experiments of two replicates AEO: Aqueous extract *O. barrelieri*; EEO: Ethanolic extract *O. barrelieri*; AEC: Aqueous Extract *C. citratus*; EEC: Ethanolic extract *C. citratus*.

58.51% inhibition vis-à-vis *F. moniliforme* and 55.9% inhibition vis-à-vis *B. oryzae*.

The effect of the concentration was significant with $F(2, 24) = 522.92$, $p < 0.05$ for *F. moniliforme* and $F(2, 24) = 1064.67$, $p < 0.05$ for *B. oryzae*. The growth inhibition of both pathogens was dose dependent. For example AEO 1000 ppm (4.07%) < AEO5000 ppm (19.62%) < EAO10000ppm (40.36%) against *F. moniliforme*. At 1000 ppm, AEO (-3.33%) and AEC (-1.1%) stimulated the growth of *B. oryzae* (Figure 1).

The extract *concentrations interaction was significant, $F(6, 24) = 6.636$, $p < 0.05$ and $F(6, 24) = 2.148$, $p < 0.05$, respectively for *F. moniliforme* and *B. oryzae*. This shows that the effect of the extract on inhibition is concentration dependent and increases with the concentration increase. Nevertheless, it should be noted that, even though the extract *concentration interaction was statically significant for the inhibition of *B. oryzae*; the

effect size value (Cohen's $f = 0.07$) did not meet minimum standard (Cohen's $f \geq 0.10$) to be called a "small" effect size (Cohen, 1988).

Effect of rice seed treatments with NaCl solutions on germination and seed weight

One-way ANOVA was used to compare, the means weight and, the means germination of different seed samples treated with the NaCl solutions. A significant difference was found between the seed samples: $F(9, 30) = 143.332$, $p < 0.05$ and $F(9, 30) = 74.114$, $p < 0.05$ for the percentage of germination and $F(9, 30) = 33.64$, $p < 0.05$ and $F(9, 30) = 30.785$, $p < 0.05$ for the weight, respectively for the red rice of Tonga and Tox 3145-38-2-3 of Ndop. The nature of the differences between seeds samples were identified and results reported in

Table 2. Percent germination (%) and weight in gram (g) weight and germination percentage of rice seed samples treated with NaCl solutions.

Variables	Red rice		Tox 3145-38-2-3	
	Germination (%)	Weight (g)	Germination (%)	Weight (g)
Sec	52 ^d ± 3.2	2.84 ^d ± 0.03	91 ^d ± 1.15	2.84 ^d ± 0.02
TM 0%	53.5 ^d ± 3	3 ^{de} ± 0.05	92 ^d ± 1.63	2.87 ^d ± 0.02
Ts0%C	59 ^e ± 4.1	3.03 ^{de} ± 0.08	96 ^{de} ± 1.63	2.92 ^{de} ± 0.04
Ts0%S	10 ^a ± 2.3	1.70 ^a ± 0.09	18 ^a ± 2.82	1.32 ^a ± 0.01
Ts10%C	67 ^f ± 4.7	3.05 ^{de} ± 0.05	98.5 ^{de} ± 3	2.92 ^{de} ± 0.02
Ts10%S	31 ^b ± 2.5	2.33 ^b ± 0.04	52 ^b ± 4.32	2.18 ^b ± 0.02
Ts20%C	71.5 ^f ± 3	3.07 ^{de} ± 0.1	98 ^{de} ± 2.3	2.96 ^{de} ± 0.01
Ts20%S	36 ^c ± 3.6	2.71 ^c ± 0.04	71.5 ^c ± 2.51	2.3 ^b ± 0.04
Ts30%C	72 ^f ± 3.2	3.16 ^e ± 0.03	99.59 ^e ± 1	2.97 ^e ± 0.06
Ts30%S	52.5 ^d ± 1.9	2.93 ^d ± 0.05	81.5 ^c ± 3.41	2.54 ^c ± 0.04

^{a,b,c,d,e,f} Mean values in the same column followed by different letters are significantly different (P < 0.05). Data are means four experiments. Ts: Seed treated with NaCl solution; 0%, 10%, 20%, 30%: NaCl Concentrations; C: Pellet (immersed seeds); S: Supernatant (Floating seeds); TM0%: Total Seed immerse in distilled water; Sec: Non-treated seed.

Table 2.

Regardless the rice variety, the weights and the percent germination of the floating (S) seed fractions were significantly low compared to that of their corresponding immersed (C) seeds. Immersed red rice showed a significant (P < 0.05) improvement of 7% in germination (T0% C-Sec) when the seeds were sorted with water, and of 19.5% (T20% C- Sec) when sorted in 20% NaCl solution. There was no significant difference between the germination of Tox 3145-38-2-3 treated with 20% NaCl and the counterpart immersed in water (T0%C).

Irrespective of the rice variety and the type of salt treatment applied, the Spearman rho correlation coefficient between weight and germination was calculated. According to Hopkins (1997), positive moderate correlation was found (Rho (78) = 0.427**, p < 0.01), indicating a significant linear relationship between the two variables: seed lots of high weight, tend to have a higher percentage of germination.

The correlation between weight and germination was greater and significant when treatments were examined separately; immersed seeds (Rho (78) = 0.606**, p < 0.01) and floated seeds (Rho (78) = 0.543**, P < 0.01) or by variety; Red rice (Rho (78) = 0.895**, p < 0.01) and Tox 3145-38-2-3 (Rho (78) = 0.903**, p < 0.01).

Effect of seed treatment and stress on germination

Three way factor ANOVA was conducted to assess whether the extract, the stress, the treatment had an effect on rice seed germination; and if the germination was affected by the interactions between these independent variables; the results as shown in Table 3.

The effect for extract is not significant, F (1, 84) = 1.87, p > 0.05; the estimated marginal mean germination percentage of seed treated with EEc (57%) is not significantly different from the estimated marginal mean germination percentage of seed treated with EEO (56%).

The main effect of stress (Stress or stress-free) was significant, F (1, 84) = 142.65, p < 0.05; the average marginal germination percentage of seeds subjected to stress by accelerated aging test (52.143%) was lower and significantly different from that of unstressed seeds (60.857%). A significant difference was found among treatments, F (6, 84) = 374.95, p < 0.05; regarding the estimated marginal means germination percentage of different treatments, the decreasing order of the effectiveness is as follow T⁺1% (75.5%) > T⁺2% (70.6%) > T⁺4% (68.12%) > T⁺0% (60%) > Banko Plus (56%) > Sec (43.7%) > T⁺Sur (21%). The S-N-K multiple comparison test revealed that the treatments were significantly different from each other, except for T⁺2% and T⁺4% which were identical. The variance between groups was mainly explained (86.9%) by the effect of treatment.

The extract *stress interaction was significant F (1, 84) = 5.52, p < 0.05. This shows that the effect of stress thought accelerated aging test on the germination of rice seeds is dependent on the plant extract used. The germination percentage decreases when moving from stress-free to stress state; this decline was significant and decreased when seeds were soaked in EEO (61.2 -50.7%), than when they are treated with EEc (60.5 to 53.5%) (Figure 2). Meanwhile, the effect size associated with this interaction (Cohen's f = 0.045) did not satisfy the minimum standard to be called a "small" effect size (Cohen, 1988).

The effect of extract *treatment interaction was not significant F (6, 84) = 1.78, p > 0.05; the effect of

Table 3. Analysis of variance for seed germination percentage, as a function of the extract, the stress and the treatment.

Test Between-Subjects Effects/Percentage of germination							
Source/ Dependents variables	Type III Sum of squares	df	Means square	F	Sig	η^2	
Adjusted Model	394860.000 ^a	28	14102.143	946.150	0.000		
Extract	28.000	1	28.000	1.879	0.174	0.0007	
Stress	2126.286	1	2126.286	142.658	0.000	0.0551	
Treatment	33531.500	6	5588.583	374.953	0.000	0.8691	
Extract * Stress	82.286	1	82.286	5.521	0.021	0.0021	
Extract * Treatment	159.500	6	26.583	1.784	0.112	0.0041	
Stress * Treatment	1380.214	6	230.036	15.434	0.000	0.0357	
Extract * Stress * Treatment	20.214	6	3.369	0.226	0.967	0.0005	
Error	1252.000	84	14.905	-	-	-	
Corrected Total	38580.00	112	-	-	-	-	

a R-Squared = 0.997 (adjusted R-Squared = 0.996)

η^2 : Eta square; df: degree of freedom.

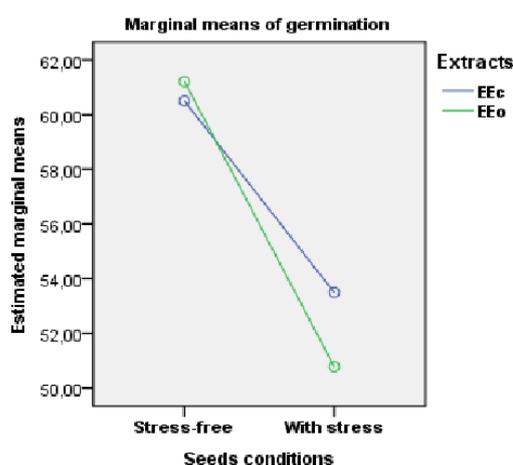


Figure 2. Variation of germination percentage in the presence and absence of stress, according to plant extract. EEo: Ethanol extract *O. bartheletii*; EEc: Ethanol extract *C. citratus*.

treatment was not significantly influenced depending on whether the seeds were treated with EEc or EEo. For example, at T⁺2%, the germination percentage of EEc and EEo were 71.75 and 69.5%, respectively. The plots of the percentage of germination as a function of the treatments according to EEc and EEo were alike (Figure 3B). For both plant extracts T⁺1% treatment showed the highest percentage of germination, EEc (78%) and EEo (73%).

The effect of the treatment *stress interaction was significant, $F(6, 84) = 15.43$, $p < 0.05$; the effect of the treatment on germination was greatly affected depending on whether the seed samples have been stressed or not.

In fact, germination decreases in all seed samples when subjected to vigor test via accelerated aging: T⁺0% (63.7 to 56.25%), T⁺1% (78.75 to 72.5%), T⁺2% (72.25 to 69%), T⁺4% (71 to 65.25%), Banko Plus (60 to 52%), Sec (56.5 to 31% and et T⁺Sur (23.75 to 19.25%) there was a significant decrease of the germination (25.5%) for non-treated seeds (Sec) (Figure 3A)

The effect of extract *stress *treatment interaction was not significant, $F(6, 84) = 0.226$, $p > 0.05$. The effect of the treatment on germination is not significantly affected by the source of extract (EEc or EEo) and whether seed were stressed or not.

Effects of plant extracts on seed infestation by *B. oryzae* and *F. moniliforme*

Two-way factor ANOVA was realized to assess the effects of the extracts, the treatment and the interaction of both factors on the rice seed incidence of *B. oryzae* and *F. moniliforme*; the results presented are in Table 4.

For *B. oryzae* incidence (24.71 to 25.5%) or *F. moniliforme* (14.57 to 16.42%), the effects for extract and extract *treatment interaction were not significant ($p > 0.05$). The incidence of both fungi did not significantly differ after seed treatments with EEc or EEo. The plots of the variations in the incidence of *B. oryzae* and *F. moniliforme*, as a function of treatments with respect of EEc and EEo, respectively are alike (Figure 4A and B).

The effect of treatment was significant, $F(6, 42) = 22.60$, $p < 0.05$ $\eta^2 = 0.750$ vis-à-vis *B. oryzae* incidence and, $F(6, 42) = 11.314$, $p < 0.05$ $\eta^2 = 0.607$ for *F. moniliforme* seed incidence. The S-N-K test used to detect the nature of differences shows that Banko-Plus reduced significantly the seed incidence of *B. oryzae* from 46.5^a% of non-treated control to 15.5^c%; this reduction was statistically same with the treatments T⁺1%

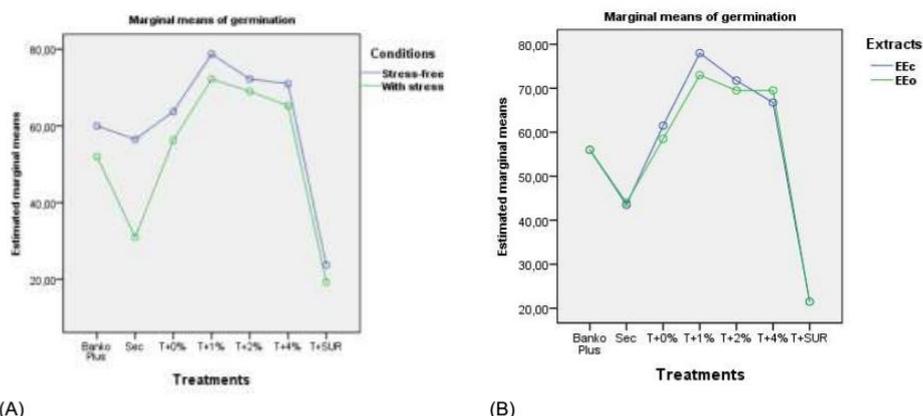


Figure 3. Change in germination percentage of rice seed versus treatments. (A) In the presence and absence of stress; (B) In the presence of plant extracts (EEo and EEc). T⁺: immersed seeds (Pellet) treated in 20% NaCl; 0, 1, 2 and 4%: Plant extracts concentrations T⁺Sur: floating seeds (Supernatant) treated in 20% NaCl; Banko Plus: Fongicide; Sec: Non treated seed; EEo: Ethanolic extract of *O. barrelieri*; EEc: Ethanolic extract of *C. citratus*.

Table 4. Analysis of variance for the rice seed incidence of *B. oryzae* and *F. moniliforme*, as a function of extract and treatment.

Source	Type III SS	Df	MS	F	Sig	η ²
<i>B. oryzae</i>						
Extract	8.64	1	8.643	0.22	0.642	0.0012
Treatment	5331.8	6	8881.6	22.60	0.000	0.750
Extract*Treatment	111.8	6	18.64	0.474	0.0824	0.015
Error	1651	42	3931	-	-	-
<i>F. moniliforme</i>						
Extract	48.28	1	48.28	1.53	0.223	0.137
Treatment	2140	6	356.66	11.31	0.000	0.607
Extract*Treatment	9.71	6	1.619	0.051	0.999	0.0027
Error	1324	42	31.524	-	-	-

SS: sum square; MS: Mean Square; η²: Eta square; df: degree of freedom.

(17.75^c %), T⁺4% (21^c %), T⁺2% (22^c %) and T⁺Sur (22.5^c %). The immersion (T⁺0%) reduced the seed incidence of *B. oryzae* to 30.5^b% as compared to Sec with 46.5^a%. *F. moniliforme* incidence was highest with T⁺Sur (23.5^a %) which was statistically identical to Sec (21.5^{ab} %) and T⁺0% (21^{ab} %); the incidence of *F. moniliforme* on seeds treated with Banko Plus (7.5^c %), T⁺4% (7.5^c %) and T⁺2% (15^{bc} %) were lower and similar statistically.

Effect plant extracts on seed emergence

A 7 (Treatments) x 2 (Extracts) between-subjects factorial ANOVA was calculated to compare the emergence for

subjects, who had one of the seven treatments and subjects who were treated either with EEc or EEo. It was found that the main effects for extract F (1, 42) = 2.335 p = 0.134, η² = 0.015) and extract *treatment interaction F (6, 42) = 2.262, p = 0.56, η² = 0.090) were not statistically significant (p > 0.05); the marginal mean of emergence of seed treatments with EEc (47.02%) and that of seed treatments with EEo (46.66%) are about the same (Figure 5A). The treatment main effect was significant F (6, 42) = 15.48, p < 0.05 η² = 0.612, the major differences among the treatments and their standard deviations are represented in the Figure 5B. The highest emergence was recorded with treatment T⁺1% (59.99%) and the lowest with T⁺Sur (13.33%).

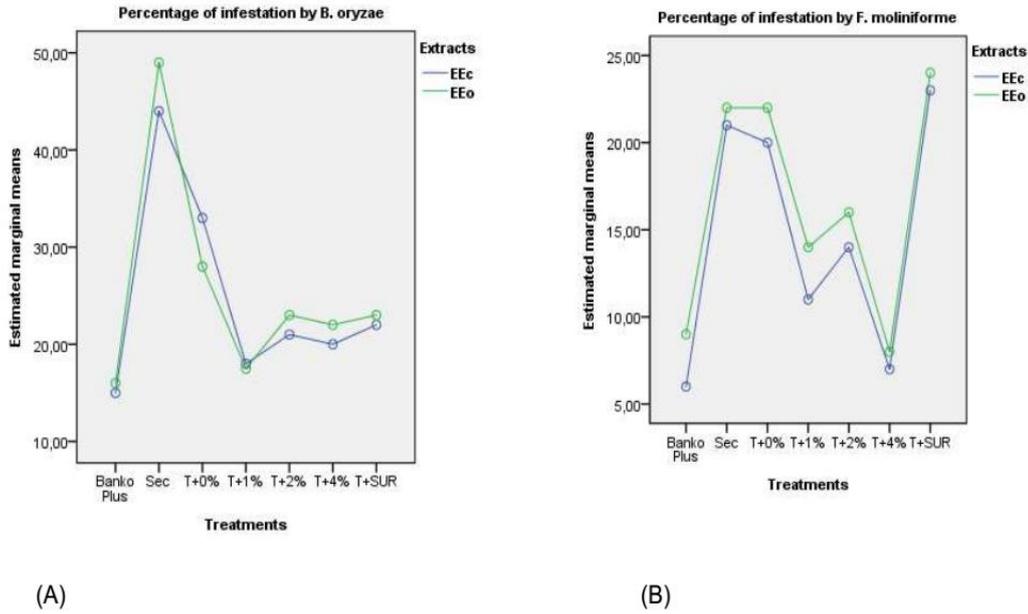


Figure 4. Variation in the incidence of *B. oryzae* (A) and *F. moniliforme* (B), after rice seed treatments with plant extracts (EEO and EEc). T⁺: immersed seeds (Pellet) treated in 20% NaCl; 0%, 1%, 2%, 4%: Plant extracts concentrations T⁺Sur: floating seeds in 20% NaCl; Banko Plus: Fongicide; Sec: Non treated seed; EEO: Ethanolic extract of *O. barrelieri*; EEc: Ethanolic extract of *C. citratus*.

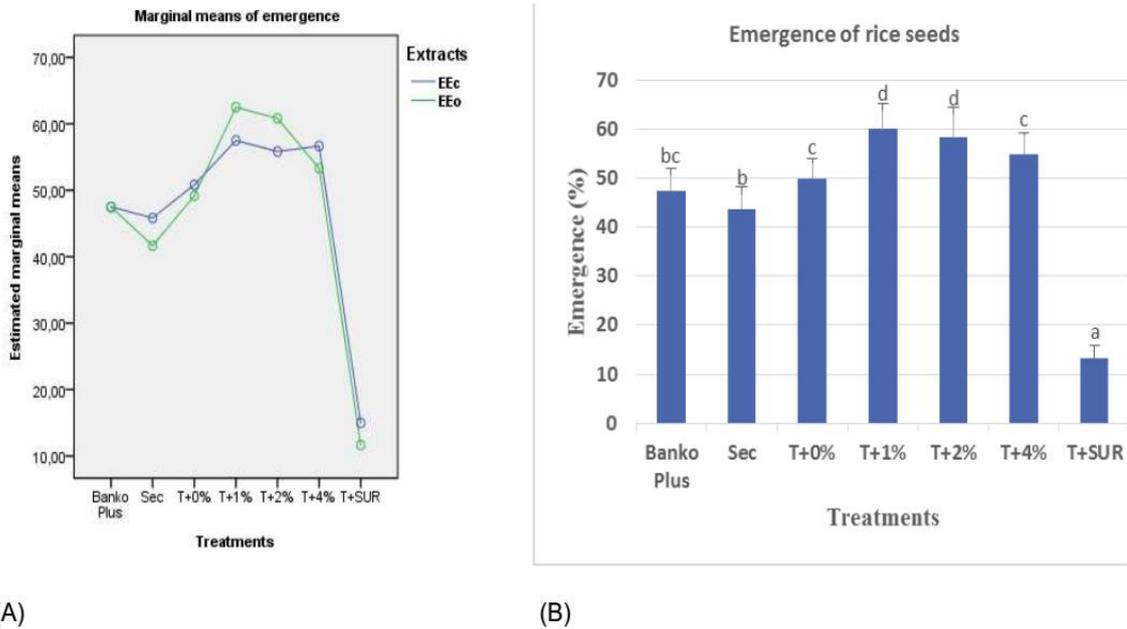


Figure 5. Emergence of rice versus treatments: (A) when comparing the plants extracts used (EEo and EEc); (B) when comparing treatments; ^{a,b,c,d} mean values followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$). T⁺: immersed seeds (Pellet) treated in 20% NaCl; 0, 1, 2 and 4%: Plant extracts concentrations T⁺Sur: floating seeds (Supernatant) treated in 20% NaCl; Banko Plus: Fongicide; Sec: Non treated seed; EEO: Ethanolic extract of *O. barrelieri*; EEc: Ethanolic extract of *C. citratus*

Table 5. Inter-correlations between percentage of germination, seed incidence of *B. oryzae*, and *F. moniliforme*, and the emergence (N=56).

Variables	1	2	3	4	Means	SD
1. Germination <i>in vitro</i>	--	- 0.127	- 0.441**	+ 0.931**	60.85	17.29
2. Infestation of <i>B. oryzae</i>	--	--	+ 0.448**	- 0.106	25.10	11.36
3. Infestation by <i>F. moniliforme</i>	--	--	--	-0.426**	15.50	8.00
4. Emergence	--	--	--	--	46.841	15.47

** $p < 0.01$ 1. Germination *in vitro*; 2. Infestation of *B. oryzae*; 3. Infestation by *F. moniliforme*; 4. Emergence; SD: standard deviation.

Pearson correlations were computed to examine the associations among the four variables; percentage of germination, seed incidence of *B. oryzae*, and *F. moniliforme*, and the emergence. Data in Table 5 showed that four of the six pairs of variables are significantly correlated. The strongest positive correlation, which would be considered to be nearly perfect was found between the germination and the emergence $r(54) = 0.931^{**}$, $p < 0.01$ (Hopkins, 1997).

The correlation between the seed incidence of *F. moniliforme* and *B. oryzae*, was also positive and statistically significant $r(54) = 0.448^{**}$, $p < 0.01$. The germination and the emergence were each negatively correlated with the infestation of both pathogens but the correlation with the seed incidence of *B. oryzae* was not significant ($p > 0.01$), and the correlation with seed incidence of *F. moniliforme* was of medium size effects according to Hopkins (1997)

DISCUSSION

The extracts of *O. barrelieri* and *C. citratus*, were tested against two rice seed-borne fungi (*B. oryzae* and *F. moniliforme*), and their effects as seed treatments evaluated on the seed fungal incidence, the vigor, the percent germination and emergence of rice seeds sorted in NaCl solutions.

In comparison with the findings of Nguetack et al. (2013), in which same methods were used for the evaluation of the antifungal potential, the activities of EEC and AEC against *B. oryzae*, were near but somewhat less important; this slight difference could be explained by the fact that our extraction period last 12 h against 24 h in theirs; the extraction time may have an influence on the content and/or the chemical composition of the secondary metabolites responsible for the biological (antifungal) effects. Very little work has been done on the phytoprotective potential of *O. barrelieri*; Its activities vis-à-vis *B. oryzae* and *F. moniliforme* are reported here for the first time; Nevertheless, Dakole et al. (2016) showed in their work that AEO and EEO completely inhibited the growth of *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* at 50000 and 25000 $\mu\text{g/ml}$ and that of *Phytophthora infestans* at

25000 and 12500 $\mu\text{g/ml}$, respectively; they suggested the presence of phenols, flavonoids and saponins in these extracts being responsible of this inhibitory effect.

The strong antifungal activity of ethanol extracts thought to be mostly due to its richness in phenolic compounds (Quy et al., 2014) compared to aqueous extracts which contain, among other, considerable quantities of primary metabolites, including polypeptides and carbohydrates (Padmalochana and Rajan, 2014). These primary metabolites may constitute a source of nutrients for fungal growth. The observed stimulatory activity found at low concentration of AEO and AEC on *B. oryzae* could however, be exploited in the growing of endophytic fungi for better production of secondary metabolites; in fact *B. oryzae* is capable to produce ophiobolin A and ophiobolin B (Xiao et al, 1991) that could be exploited as herbicide.

In order to avoid the negative effect of the saline solution on the germination as found by Khan et al. (2014); seeds were immediately and abundantly rinsed in distilled water after immersion for 1 min in different salt solution. Some authors have found parallel results regarding to the use of aqueous and saline solutions for the sorting of rice seeds. Notably, Pham et al. (2003); found that rice seed cleaning with water reduce unfilled grains by 5.83 to 8.73% in dry season, and discolored grains by 8.32 to 8.65% in rainy season. In addition, they showed that discolored and spotted rice seeds could be cleaned by treatment in 15% sodium chloride leading to an improvement in the phytosanitary status and germination (4.08 to 14.08%) of seeds; spotted and discolored seeds thus sorted being very often associated with high incidence of pathogens among others, *B. Oryzae* and *F. moniliforme* which are liable to deteriorate the seed (Ibrahim and Abo El-Dahab, 2014). The simple cleaning of rice seeds with water, as traditionally often used to subtract failing rice grains, seems limited; the association of NaCl at the right concentration is necessary; this processing means being simple, easy to implement and above all fairly Eco-friendly.

Contrary to the findings of Pham et al. (2003), who worked on the sorting of rice seeds by arbitrarily, choosing the 15% brine concentrations, the method used in this work describes a simple and correct scientific

approach with end result; the selection of the best NaCl concentration to eliminate the impurities and sort the good qualities grains with maximum germination rate, no matter the state or origin of the grains.

The positive and significant correlation found between the mass of grain and the germination percentage of red and Tox rice varieties corroborate the results obtained by Roy et al. (1996), who showed that the rate of germination and the vigor increase with an increase in the size (weight) of rice seeds; suggesting therefore sorting of heavy grains for a good field establishment. Teng et al. (1992) support this argument by stating that, the best selection criterion for the strength of rice seed is its mass.

The high germination of seeds treated with plant extracts (68.12 to 75.5%) compared to floating seeds (21%) and untreated seeds (43.75%), could be partially associated with high incidence in *F. moniliforme* and *B. oryzae* on these later seeds. In fact, a study carried out by Imolehin (1983), on seed borne fungi of rice and on their incidence on germination revealed an existence of a strong significant and negative correlation ($r = -0.74$) between infestation by these fungi and germination. This seems more true, because we have also found a negative correlation between germination (*in vitro* and in green house trials) and infestation by each of the two pathogens; however, this correlation was average ($r = -0.441$) with respect to *F. moniliforme* and was not significant (-0.127) with regard to *B. oryzae*.

The drastic drop of the order of 25.5% for the set of dry seeds (non-treated), moderate (7.5%) for seeds soaked in water (T0%) and lesser (5.33%) for set of seeds treated with plant extracts after subjecting the seeds to vigor test via accelerated aging; is in accordance with conclusions drawn by Veselova and Veselovsky (2003) that, accelerated aging is manifested by a reduction in the germination percentage and, seeds that succeed in germinating tend to give raise to brittle seedlings. These results also reveal evidence that, simple soaking of rice seeds in water has contributed in consolidating its vigor under stress conditions, as observed by Ken-Ichi and Jun-Ichi (2013).

The plant extracts used in this research could therefore be little more involved in the stimulation of germination than increase in vigor; this being realized through the stimulation of α -amylase activity, the liberation of free soluble sugars and increase in the seeds respiration frequency (Wang et al., 2016) as a result of, the action of their secondary metabolites.

Conclusion

Sorting of rice seeds in 20% NaCl, coupled with their treatment in ethanol extracts of *O. barrelierii*/C. *citratu*s render seeds more homogenous, maintain their vigor, improve on their health status and germination. This

could contribute in; avoiding reseeding, improving the uniformity of growth and maturity stages and finally obtain better yields and good quality seeds for the following campaign.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors have not declared any conflict of interests.

REFERENCES

- Barnwal MK, Kotasthane A, Magculia N, Mukherjee PK, Savary S, Sharma AK, Singh HB, Singh US, Sparks AH, Variar M, Zaidi N (2013). A review on crop losses, epidemiology and disease management of rice brown spot to identify research priorities and knowledge gaps. *Eur. J. Plant Pathol.* 136:443-457.
- Chandrasekaran B, Annadurai K, Somasundaram E (2010). *A Textbook of Agronomy*. New Delhi: New Age International (P) Ltd., Publishers 835p.
- Cohen J (1988). *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. 2nd edition. New York, NY: Routledge Academic, 400p.
- Dakole DC, Nguetack J, Dongmo LJB, Galani YJH, Azah UR, Somda I, Amvam ZPH (2016). Antifungal potential of essential oils, aqueous and ethanol extracts of thirteen plants against *Fusarium oxysporum* f. sp *Lycopersici* and *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary as major tomato pathogens in Cameroon. *Int. J. Curr. Sci.* 19(2):128-145.
- Delouche JC, Baskin CC (1973). Accelerated ageing techniques for predicting the relative storability of seed lots. *Seed Sci. Technol.* 1:427-452.
- Dubey NK, Ravindra S, Ashok K, Priyanka S, Bhanu P (2011). Global scenario on the application of natural products in integrated pest management programmers. In: Dubey NK (ed). *Natural products in plant pest management*. Wallingford: CAB International pp. 1-20.
- Grover RK, Moore JD (1962). Toximetric studies of fungicides against brown rot organism. *Sclerotia fructicola* and *S. laxa*. *Phytopathol.* 52:876-880.
- Hopkins WG (1997). *New view of statistics*. From <http://www.sportsci.org/resource/stats/>
- Hu J, Zhu ZY, Song JW, Wang JC, Hu WM (2005). Effects of sand priming on germination and field performance in direct-sown rice (*Oryza sativa* L.). *Seed Sci. Technol.* 33(1): 243-248.
- Ibrahim EAM, Abo El-Dahab MS (2014). Seed discoloration and their effect on seedlings growth of Egyptian hybrid rice. *Res J. Seed Sci.* 7(3):63-74.
- Imolehin ED (1983). Rice seed borne fungi and their effect on seed germination. *Plant Dis.* 67:1334-1336.
- Ken-Ichi M, Jun-Ichi S (2013). Effects of seed hydropriming on germination and seedling vigor during emergence of rice under different soil moisture conditions. *Am. J. Plant Sci.* 4:1584-1593.
- Khan MHU, Malook I, Atlas A, Jan M, Jan SU, Shah G (2014). The Effect of Sodium Chloride (NaCl) stress on Seed germination and Seedling Growth of Rice (*Oryza sativa* L.). *J. Bio-Mol. Sci.* 2(4):100-107.
- Mathur SB, Kongsdal O (2003). *Common laboratory seed health testing methods for detecting fungi*. 1st ed. International Seed Testing Association, Basersdorf, CH-Switzerland 425p.
- Mew TW, Gonzales PA (2002). *Handbook of rice seed-borne fungi*. Los Banos, Philippines: International Rice Research Institute and Enfield, N.H USA: Science Publishers, Inc. 84p
- Morgan GA, Leech NL, Gloeckner GW, Barrett KC (2011). *IBM SPSS for introductory statistics: use and interpretation*, 4th edition. Routledge Taylor & Francis Group, 229p
- Nguetack J, Wulff GE, Dongmo Lekagne JB, Fouelefack FR, Fotio D, Mbo J, Torp J (2013). Effect of plant extracts and an essential oil on the control of brown spot disease, tillering, number of panicles and yield increase in rice. *Eur. J. Plant Pathol.* 137:871-882.
- Oerke EC (2006). *Crop losses to pests*. *J. Agri. Sci.* 144: 31-43.
- Padmalochana K, Rajan MSD (2014). Antimicrobial activity of

- aqueous, ethanol and acetone extracts of *Sesbania grandiflora* leaves and its phytochemical characterization. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 5(12):957-962.
- Pham VD, Huynh VN, Nguyen DC (2003). Application of seed cleaning in management of seed-borne diseases of rice. *Omonrice* 11:103-109.
- Quy DD, Artik EA, Phuong LTN, Lien HH, Felycia ES, Suryadi I, Yi HJ (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatic*. *J. Food Drug Anal.* 22:296-302.
- Rao NK, Hanson J, Dulloo ME, Ghosh K, Nowell D and Larinde M (2006). Manual of seed handling in genebanks. Rome (Italy): Bioversity International. Handbooks for Genebanks No. 8.
- Reddy OR, Sathyanarayana N (2001). Seed-borne fungi of rice and quarantine significance In Sreenivasaprasad S., Johnson R. (eds.), Major Fungal diseases of Rice Recent Advances Kluwer Academic Publishers pp. 331-345.
- Roy SKS, Hamid A, Miah MG, Hashem A (1996). Seed size variation and its effects on germination and seedling vigour in rice. *J. Agron. Crop Sci.* 176(2):79-82.
- Sharma KK, Singh US, Pankaj S, Ashish K, Lalan S (2015). Seed treatments for sustainable agriculture-A review. *J. Appl. Nat. Sci.* 7(1):521-539.
- Suraj C, Thawatchai T (2010). Identification of accelerated aging conditions for seed vigor test in rice (*Oryza sativa* L.). *J. RNR Bhutan* 6(1):13-23.
- Teng S, Vergara BS, Alejar AA (1992). Relationship of grain length, width, and weight to seedling vigor in rice in rice (*Oryza sativa* L.). *Crop Sci.* 17(1): 63-74
- Tripathi P, Dubey NK (2004). Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharv. Biol. Technol.* 32:235-245.
- Veselova TV, Veselovsky VA (2003). Investigation of atypical germination change during accelerated ageing of pea seeds. *Seed Sci. Technol.* 31:517-530.
- Wang W, Chen Q, Hussain S, Mei J, Dong H, Peng S, Huang J, Cui K, Nie (2016). Pre-sowing seed treatments in direct-seeded early rice: consequences for emergence, seedling growth and associated metabolic events under chilling stress. *Sci. Rep.* 6:19637.
- Wilson C, Tisdell C (2001). Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. *Ecol. Econ.* 39:449-462.
- Xiao JZ, Tsuda M, Doke N, Nishimura S (1991). Phytotoxins produced by germinating spore of *Bipolaris Oryzae*. *Phytopathology* 81:58-64.