

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Blida 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Biotechnologies

Laboratoire de Recherche des Plantes Médicinales et Aromatiques



En vue de l'obtention du diplôme de Master académique en Science de la Nature et de la Vie

Spécialité : Biotechnologie et Valorisation des Plantes

THÈME

Influence de l'indice phénologique sur l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de bigaradier
« *Citrus aurantium L.* »

Présenté par :

Helal Bahia

Laghouiter Zineb

Devant les membres de jury composé de :

| | | | |
|--------------------|------------|------------|--------------|
| Mme. MOUMEN S. | MCA | U. Blida 1 | Présidente |
| Mr. BENDALI A. | MAA | U. Blida 1 | Promoteur |
| Mr. DJAZOULI Z. E. | Professeur | U. Blida 1 | Co-promoteur |
| Mme. BELGUENDOZ R. | MCA | U. Blida 1 | Examinatrice |

Année universitaire 2018/2019

Remerciement

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

*En second lieu, Mes sincères remerciements s'adressent à Mr **BENDALI A.** pour m'avoir fait l'honneur de diriger ce travail.*

*Mes remerciements les plus vifs s'adressent à Pr **DJAZOULI Z/E** pour m'avoir fait l'honneur de diriger ce travail, son aide précieuse, son encouragement sa présence, ses nombreux conseils et son soutien constant tout au long de la réalisation de ce travail.*

*Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury, la présidente **Mme. MOUMEN S.** Et l'examinatrice **Mme. BELGANDOUZE R.** Pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail Et de l'enrichir par leurs propositions.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à
Mme DAGHBOUCHE S. Et **Mr DGAICHIA H.***

*Nous adressons nos sincères remerciements à l'ensemble des personnes qui travaillent aux niveaux de laboratoire de phytopharmacie et surtout **Mme KHEIL S.** et **Mme FLITA K.** l'ingénieure de laboratoire améliorations des plantes.*

A tous mes enseignants et mes professeurs qui ont assuré ma formation sans oublier les personnels du département de Biotechnologie de Blida 1. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail comme preuve d'amour :

*À mes très chers du monde mes parents **Fadhila, Houcine**, qui ont toujours rêvé de me voir arriver à ce stade. Pour leur amour, leur confiance, leur compréhension, leur soutien, leur conseil, leur tendresse, leur orientation et leur sacrifice.*

Je leur souhaite le bonheur et la bonne santé.

*Qu'**ALLAH** me les gardes.*

*À la mémoire de mon grand-père **AHMAD**.*

*À ma grande mère **Fatiha** qui ne m'ont jamais oublié dans ses prières.*

*À Mes très chère frère maroïne, **El Hassan** et **Ibrahim** et **ABDALI** qui ont beaucoup fait pour moi. Dieu me les gardé heureux et à mes coté.*

*À mes très chères sœurs **Khaoula** et **Mazola** et **Asmaa** et **Alaa** qui j'adore de tout mon cœur.*

*À mon très cher mari : **Abd el Fatah**.*

*À ma belle-mère **Hayat** et mon beaux père **Abd el Nasser**.*

*À mes chères tantes **Mariem**.*

*A mon oncle **Abd el ghaní***

*À toute ma famille **Laghouiter** et **Raad**.*

*A ma belle-famille **Mitiche***

*A mes amies **Samira** et **Ahlam** et **Rima***

*A mon cher binôme **Bahia** qu'avec elle j'ai partagé des beaux moments.*

A tous les membres de ma promotion. A tous mes enseignants depuis mes premières années d'études

« Zineb »

Dédicaces

*A la mémoire de mon grand-père Omar et ma grande mère
Bahía*

Vous avez toutes mes pensées. Que vos âmes reposent en paix.

*A mes chers parents Lyes et Rachida auxquels je souhaite que
dieu leur prête le plus longtemps possible.*

*A ma très chère maman la lumière de mes jours, la source de
mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur qui
m'a accompagné durant tout ce parcours laborieux, je t'aime ma
mère.*

*A ma très chère sœur Rania qui je souhaite un avenir radieux
plein de réussite Je te remercie pour ton soutien continu. Je suis
chanceuse de t'avoir à mes côtés, tu es mon plus beau cadeau.*

*A mes très chers frères : Abde elillahe et Islem que dieu me les
gardé heureux et à mes coté.*

A ma grande mère Kadoure Malika (mewima).

À mon Fiancé Bilel qui m'a tellement soutenu

A toute la famille, qui porte le nom Kadoure et Helal et Tifoura

À mes chères tantes et ancle.

A mes chères cousin et cousine

A ma très chère amie qui est plus qu'une sœur Djidal Asmaa

*A mon cher binôme Zineb qu'avec elle j'ai partagé des moments
inoubliables pendant et en dehors de travail.*

*A tous les membres de ma promotion. A tous mes enseignants
depuis mes premières années d'études*

« Bahía »

Influence de l'indice phénologique sur l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de bigaradier« *Citrus aurantium L.* »

Résumé

Les produits biologiques sont recherchés les huiles essentielle pour leur efficacité dans plusieurs secteurs pharmaceutiques et agricoles. Notre étude a porté sur l'évaluation de l'indice phénologique sur l'activité antimicrobienne De l'huile essentielle de *Citrus aurantium L.* à savoir vis à vis des champignons phytopathogènes (*Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* et *Fusarium oxysporum f.sp albedinis*) suivant un seul mode d'administration, diffusion par disque. Les résultats ont montré que le rendement soit faible et pas très différent et que les diverses stade phénologique expriment un fort pouvoir inhibiteur suivant le gradient des concentrations du principe actif. La caractéristique propre que l'huile elle a des différent effets sur les deux champignons et elle a efficace d'un champignon et pas d'un l'autre. Cette approche nous permet de valider l'utilisation des huiles essentielles dans diverse domaines relatifs à la gestion antimicrobienne.

Mots clés : feuilles d'oranger amer, CG/SM, DMSO, champignon phétopathogène, activité anti fongique, diffusion par disque.

تأثير المؤشر الفينولوجي على النشاط المضاد للميكروبات من الزيوت الأساسية من البرتقال المر

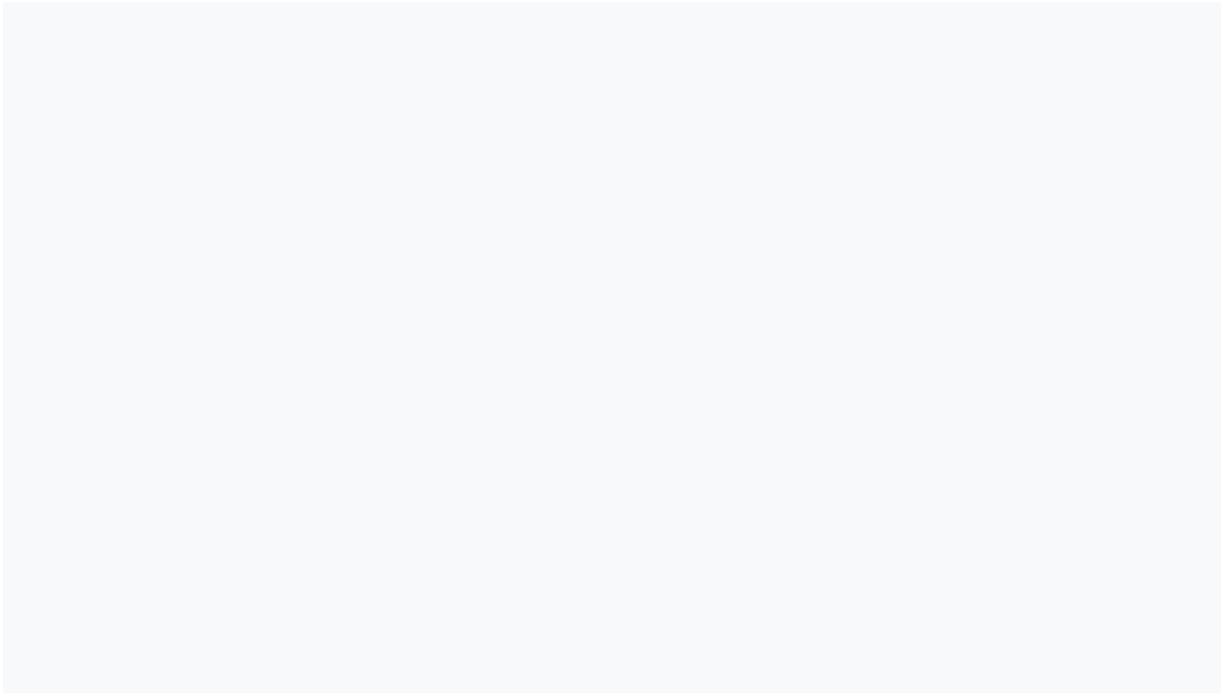
« *Citrus aurantium L.* »

ملخص

يتم البحث عن المواد البيولوجية لفعاليتها في العديد من القطاعات الصيدلانية والزراعية. حيث تساعد الصياغة على تأمين الموارد النباتية والمحافظة عليها، مع حماية المادة الفعالة.

ضد ***Citrus aurantium L.*** ركزت دراستنا على تقييم المؤشر الزمني لاستخلص الزيت العطري ال اساسي (*Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* و *Fusarium oxysporum f.sp albedinis*) (فطريات ممرضة للنبات) من خلال وضع الأقراص بطريقة النشر المباشر. أظهرت النتائج أن المراحل الزمنية المختلفة تعبر عن قوة مثبطة قوية وفقاً لتدرج تركيزات المبدأ النشط. بينت صياغة أن الزيت له تأثيرات مختلفة على كل من الفطرين وله تأثير على واحد أكثر من الآخر. هذا المنهج يسمح لنا بصحة استخدام الزيوت الأساسية في مختلف المجالات المتعلقة بمحاربة الفطريات والبكتريا.

الكلمات الرئيسية: أوراق البرتقال المر، CG / MS، DMSO، الفطريات المسببة للأمراض النباتية، النشاط الفطري، انتشار القرص



Influence of the phenological index on the antimicrobial activity of the essential oil of bitter orange « *Citrus aurantium L.* »

Abstract

Organic products are sought essential oils after for their effectiveness in several pharmaceutical and agricultural sectors. Our study focused on the evaluation of the phenological index on the antimicrobial activity of the essential oil of *Citrus aurantium L.* namely with respect to phytopathogenic fungi (*Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* and *Fusarium oxysporum f.sp albedinis*) following a single mode of administration, broadcast by disk. The results showed that the various phenological stages express a strong inhibitory power according to the gradient of the concentrations of the active principle. The clean characteristic that the oil has different effects on both mushrooms and it has effective one by the other. This approach allows us to validate the use of essential oils in various areas related to antimicrobial management

Key words: leaves of bitter orange, CG / MS, adjuvant, fungus, anti-fungal activity, disk diffusion

Liste des tableaux

| | | |
|--------------------|--|----|
| Tableau. 1. | Pouvoir pathogène de la souche fongique utilisée..... | 16 |
| Tableau. 2. | Composition des huiles essentielles de <i>Citrus aurantium</i> selon l'indice phénologique | 25 |
| Tableau. 3. | Comparaison par paire des paliers temporels de l'évolution de <i>Fusarium oxysporum f. sp Albedinis</i> sous l'effet des huiles essentielles..... | 27 |
| Tableau 4 | Comparaison par paire des paliers temporels de l'évolution de <i>Fusarium oxysporum f.sp lycopersici</i> sous l'effet des huiles essentielles..... | 27 |
| Tableau 5 | Comparaison par paire des paliers temporels de l'évolution de <i>Fusarium f .sp. Albedinis</i> sous l'effet des huiles essentielles.... | 31 |
| Tableau 6 | Comparaison par paire des paliers temporels de l'évolution de <i>Fusarium f.sp lycopersici</i> sous l'effet des huiles essentielles.... | 31 |

Liste des figures

| | | |
|-------------------|---|----|
| Figure. 1 | Présentation de <i>Citrus aurantium L.</i> | 03 |
| Figure. 2 | Schéma d'un montage d'hydro distillation | 08 |
| Figure. 3 | Région de récolte de <i>Citrus aurantium L</i> | 14 |
| Figure. 4 | Présentation de <i>Citrus aurantium</i> dans les deux stades phénologique. | 15 |
| Figure. 5 | Montage de l'appareil Clevenger du procédé de l'hydrodistillation..... | 17 |
| Figure. 6 | Équipement d'analyse CG-SM..... | 18 |
| Figure. 7 | préparation de l'inoculum..... | 20 |
| Figure. 8 | préparation des ensemencements..... | 21 |
| Figure. 9 | application des disques..... | 21 |
| Figure. 10 | Rendement en huiles essentielles selon l'indice phénologique..... | 24 |
| Figure. 11 | Variation temporelle de la croissance mycélienne..... | 27 |
| Figure. 12 | Variation de la vitesse de croissance sous l'effet de l'indice phénologique et les dilutions | 29 |
| Figure. 13 | Etude comparée de la vitesse de croissance sous l'effet de l'indice phénologique et les dilutions | 30 |
| Figure. 14 | Variation temporelle de l'indice d'inhibition | 31 |
| Figure. 15 | Variation de l'indice d'inhibition sous l'effet de l'indice phénologique et les dilutions | 33 |
| Figure. 16 | Etude comparée de l'indice d'inhibition sous l'effet de l'indice phénologique et les dilutions | 34 |

Sommaire

| | |
|--|----|
| Introduction | 01 |
| Chapitre I Synthèse Bibliographique | 02 |
| 1. Les Agrumes..... | 02 |
| 1.1. Généralités sur les Agrumes..... | 02 |
| 1.2. Caractéristiques botaniques..... | 03 |
| 1.3. Taxonomie de <i>Citrus aurantium</i> L..... | 03 |
| 1.3.1. Etymologie..... | 03 |
| 1.3.2. Classification botanique..... | 03 |
| 1.3.3. Propriétés thérapeutiques..... | 03 |
| 1.3.4. Propriétés et usage thérapeutique de l'huile essentielle du bigaradier..... | 04 |
| 2. Généralités sur les huiles essentielles..... | 04 |
| 2.1. Bref historique..... | 04 |
| 2.2. Définition..... | 05 |
| 2.3. Biosynthèse et composition chimique..... | 06 |
| 2.4. Extraction des huiles essentielles..... | 07 |
| 2.5. Conservation des huiles essentielles..... | 07 |
| 2.6. Stabilité des huiles essentielles..... | 07 |
| 2.7. Intérêt de la formulation des huiles essentielles..... | 08 |
| 2.8. Les tensioactifs..... | 08 |
| 2.9. Mécanisme d'action des huiles essentielles des citrus sur les champignons..... | 09 |
| 2.10. Composants volatiles vis-à-vis des champignons phétopathogènes.... | 09 |
| 2.11. Méthodes d'évaluation les plus courants de l'activité antifongique des huiles essentielles in vitro..... | 10 |
| 2.11.1. Méthode des disques..... | 10 |
| 2.12. Facteurs influençant l'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles <i>in vitro</i> | 10 |
| 2.12.1. L'huile essentielle..... | 11 |
| 2.12.2. L'agent dissolvant..... | 11 |
| 3. Aperçu sur l'espèce fongique sélectionnée..... | 12 |
| 3.1 <i>Fusarium</i> | 12 |
| 3.2 <i>Fusarium oxysporum f.sp. Lycopersici</i> | 12 |
| 3.3 <i>Fusarium oxysporum f.sp. Albedinis</i> | 13 |
| Chapitre II : Matériel et méthodes | 14 |
| 1. Lieu et période d'étude..... | 14 |
| 2. Présentation de la région de collecte du matériel végétale..... | 14 |
| 3. Matériel d'étude..... | 15 |
| 3.1. Présentation du matériel végétal..... | 15 |
| 3.2. Reconnaissance botanique..... | 15 |
| 3.3. Présentation de la souche fongique..... | 15 |
| 3.4. Milieu de culture..... | 16 |
| 4. Méthodes d'étude..... | 16 |
| 4.1. Extraction des huiles essentielles de <i>Citrus aurantium</i> L..... | 16 |
| 4.2. Analyse chromatographique des huiles essentielles..... | 17 |
| 4.3. Calcul du rendement en huiles essentielles..... | 18 |
| 4.4. Préparation de la dilution de l'huile essentielle..... | 19 |
| 4.5. Méthodes d'évaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle..... | 19 |
| 4.5.1. Préparation du milieu de culture..... | 19 |
| 4.5.2. Préparation des dilutions | 20 |

| | | |
|--------|---|----|
| 4.5.3. | Préparation des disques..... | 20 |
| 4.5.4 | Préparation de l'inoculum..... | 20 |
| 4.5.5. | Ensemencement | 21 |
| 4.5.6. | Application des disques..... | 22 |
| 4.6. | Expression des résultats..... | 23 |
| 4.6.1. | Cinétique de la croissance mycélienne..... | 23 |
| 4.6.2. | Croissance mycélienne..... | 23 |
| 4.6.3. | Détermination de l'indice antifongique..... | 23 |
| 4.6.4. | Détermination de la vitesse de croissance mycélienne (VC).... | 24 |
| 5. | Analyse statistique des données..... | 24 |
| | Chapitre III : Résultats | 24 |
| 1. | Estimation du rendement en huiles essentielles de <i>Citrus aurantium L.</i> | 24 |
| 2. | Composition chimique des huiles essentielles selon l'indice phénologique | 25 |
| 3. | Estimation de la croissance mycélienne..... | 26 |
| 4. | Estimation de la vitesse de croissance fongique..... | 29 |
| 5 | Estimation de l'indice d'inhibition | 30 |
| | Chapitre IV : Discussion | 37 |
| 1 | Le rendement d'extraction | 37 |
| 2 | Effet de l'indice phénologique sur l'activité antifongique des huiles essentielles de bigaradier <i>Citrus aurantium L.</i> | 38 |
| 3 | Effet des dilutions sur l'activité anti fongique des huiles essentielles de bigaradier <i>Citrus aurantium L.</i> | 38 |
| | Conclusion | 40 |
| | Référence Bibliographiques | 41 |

Introduction

Introduction

Les nouvelles recherches ont soulevé la possibilité d'employer de nouveaux composés naturels qui peuvent agir en tant que biofongicides (**Field et al. 2006 ; Lee, 2007 ; Regnault-Roger, 2012 ; Kassi et al. 2014 ; Xue et al. 2014**). La lutte contre les champignons par l'application de fongicides naturels a pris un envol très important dans les stratégies alternatives aux fongicides de synthèse. Ces derniers sont à l'origine de beaucoup de maladies de plantes. Ils causent de grandes pertes de rendement dans les champs et affectent la qualité des aliments en conservation (**Laplace, 2006**).

Les huiles essentielles avec leurs larges spectres d'action vis-à-vis d'un grand nombre d'espèces fongiques constituent une alternative très prometteuse, sans être une source de danger pour la santé humaine ou de pollution pour l'environnement (**Broydé et Doré, 2013**).

Le potentiel d'utilisation des huiles essentielles et de leurs constituants comme fongicides est renforcé par leur biodégradabilité. Leur utilisation courante par l'homme est sous forme de plantes aromatiques ou médicinales. En outre, l'apparition des souches fongiques résistantes aux fongicides à base d'huiles essentielles est fortement improbable à cause de la composition souvent polymoléculaire de ces huiles et de l'action synergique de leurs constituants (**Bagamboula et al. 2004**).

Les huiles essentielles de *Citrus aurantium* L. sont utilisées dans plusieurs produits comme aromatisants et additives tels que les aliments, les jus, les produits cosmétiques et médicinaux. Elles sont utilisées pour leurs propriétés antioxydants, germicides et anticancérigènes (**Mukhopadhaya, 2000 ; Sawamura, 2010**). Les huiles essentielles de *Citrus aurantium* L. occupent un large spectre des propriétés antifongiques qui sont dévoilées par les différentes stade phénologique en leur permettant d'être considérées comme des agents antimicrobiens efficaces dans le traitement de certaines infections et dans la lutte contre certains organismes phytopathogènes. Le but principale de la présente étude est (i) d'évaluer les potentialités antifongiques d'une même huile essentielle issue de diverses stade et de

(ii) renseigner les variations en composés chimiques des huiles essentielles sous l'influence de l'indice phénologique. Le recours à ce type d'étude apportera une valeur ajoutée aux secteurs pharmaceutique et agricole, compte tenu de l'importance économique de la disponibilité du matériel végétal dans la production de produits antimicrobiens naturels.

Chapitre I :

Partie bibliographique

1. Les Agrumes

1.1. Généralités sur les Agrumes

Les agrumes sont originaires du Sud-Est asiatique où ils sont connus depuis 4200 ans et cultivés depuis 3000 ans (**Jacquemont et al, 2013**).

La diffusion des agrumes à travers le Monde s'est faite très lentement. Le cédratier (*Citrus medica*) fut la première espèce connue en Europe (300 ans av. J.-C). Le bigaradier (*Citrus aurantium L amara*), le citronnier (*Citrus limon L Burm*) et l'oranger (*Citrus sinensis Obseck*) n'ont été introduits dans le bassin méditerranéen que vers la moitié du XIIe siècle, et le mandarinier (*Citrus reticulata Blanco*) au XIX^e siècle (**Goetz, 2014**).

Les agrumes présentent une grande capacité d'adaptation à des conditions pédoclimatiques très différentes. La superficie totale plantée en agrumes dans le monde est évaluée en 2011 à plus de 8 millions hectares (**Faostat, 2014**) répartis sur une aire très large située approximativement entre les 40° de latitudes Nord et Sud tout autour du Monde (**Ndo, 2011**).

Cinq espèces se partagent de façon très inégale le verger agrumicole algérien. La prédominance revient aux orangers qui occupent plus de 62,3 % de la superficie totale. Les clémentiniers et mandarine suivies de loin avec 30,4 %, puis arrivent les espèces qui se vendent plus difficilement : les citronniers (6,2 %), les pomelos (0,4%) et autres (0,7 %) (**Kerboua, 2002**).

En 2011, les agrumes occupaient la première place des productions fruitières dans le monde avec plus de 115 525.2 milles de tonnes produites (**F.A.O, 2012**), en Algérie ils occupent une superficie de 63.589 ha en 2010 (**Bellabas, 2011**) avec une production de 571.000 de tonnes (**F.A.O, 2012**).

Quant aux Plantes à Parfums Aromatiques et Médicinales (PPAM), les huiles essentielles d'agrumes, destinées à des secteurs d'activité aussi divers que l'agroalimentaire, la cosmétologie, l'industrie pharmaceutique ou encore l'aromathérapie, occupent une place importante dans la production mondiale (**Monajemi et al, 2005**). Les trois quarts de la production d'huiles essentielles d'agrumes proviennent de l'aire méditerranéenne et des USA tandis que le Brésil et l'Argentine assurent le dernier quart (**Dugo et Di Giacomo, 2004**).

L'intérêt c'est d'orienter l'extraction de l'huile essentielle des fruits de *Citrus* à celui des feuilles. Elles sont devenues une nouvelle source en huile essentielle vu leurs développements rapides et leurs disponibilités durant toute l'année (**Cheng et Lee, 1981**)

1.2. Caractéristiques botaniques

Le bigaradier est un arbre de 3 à 10 mètres, très ramifié avec une couronne arrondie ; des feuilles simples, elliptiques, à pétiole ailé, luisant, alterné, parsemé de glandes aromatiques et persistantes avec une épine à l'aisselle des feuilles inférieures, pétiole de 2 à 3 cm de long ; fleurs axillaires, très parfumées, de couleur blanchâtre ou rose, plus grandes que celles de l'oranger doux et très odorant. Elles fleurissent au début du printemps. Le fruit rond, de 5 à 8 cm de diamètre, avec 8 à 12 segments, peau rugueuse teintée de vert ou de jaune, fortement aromatique, pulpe très acide et de saveur très amère (**Manner et al., 2006**).



Figure 01 : *Citrus aurantium* L. (Jean-Noël Falcou, 2019)

1.3. Taxonomie de *Citrus aurantium* L.

1.3.1. Etymologie

Nom scientifique : *Citrus aurantium* L.

Nom arabe : la randj ; الرنج (**Farid, 2011**).

Noms communs : bigaradier ; orange amère **Lucienne (2010)**.

1.3.2. Classification botanique

Embranchement : Spermaphytes.

Sous embranchement : Angiospermes.

Classe : Dicotylédones.

Sous classe : Dicotylédone.

Ordre : Rutales.

Famille : Rutacées.

Genre : *Citrus*.

Espèce : *Citrus aurantium*. **Loussert (1989)**.

1.3.3. Propriétés thérapeutiques

-Hypnotiques léger.

-Diminue l'amplitude des contractions cardiaques.

-Son utilisation est recommandée en cas de spasmes cardiaques.

-Palpitations.

-Diarrhée chronique.

-Indigestions.

-Insomnies.

1.3.4. Propriétés et usage thérapeutique de l'huile essentielle du bigaradier

Le Bigaradier (*Citrus aurantium*) contient des essences dans chacun de ses organes : feuilles, fleurs, fruits, écorce, rameaux (**Michelle, 2010**).

Les feuilles de Bigaradier proviennent de la taille annuelle des arbustes ; on distille les rameaux portant des feuilles et de tous jeunes fruits appelés « petits grains », d'où le nom commun de cette huile essentielle. Il faut distiller environ 100 kg de végétaux pour obtenir 1 litre d'huile essentielle. Cette essence à une odeur chaude et un goût très amer (**Michelle, 2010**) ; Obtenue par expression à froid, par distillation ou par solvant, de densité entre 0,845 à 0,860 ; son pouvoir rotatoire de

+95,5° à +99° (**Salle, 1991**). La famille chimique majoritaire de cette huile essentielle, à 60 %, s'appelle les esters, dont l'action principale se situe sur le plan nerveux.

-La composition biochimique de l'essence de, « Petit grain bigarade » (Limonène-aldéhyde-) pour les personnes nerveuses, tendues, souffrant de spasmes en tout genre.

-C'est une huile essentielle forte intéressante sur le plan psychique, qui aide à résoudre certains problèmes relationnels se répercutant au niveau des systèmes respiratoire, nerveux et circulatoire. Elle a une action puissante sur le plan dermatologique, c'est un régénérant cellulaire et des tissus cutanés, utile pour les infections comme l'acné, les dartres, les furoncles (**Michelle, 2010**).

2. Généralités sur les huiles essentielles

2.1. Historique

Les premières preuves de fabrication et d'utilisation des huiles essentielles datent de l'an 3000 avant J.C. (**Baser & Buchbauer, 2010**). Les huiles essentielles semblent donc avoir accompagné la civilisation humaine depuis ses premières genèses. Les égyptiens puis les grecs et les romains ont employé diverses matières premières végétales ainsi que les produits qui en découlent, notamment les huiles essentielles. Ces utilisations concernaient différents domaines : parfumerie, médecine, rites religieux, coutumes païennes, alimentation, etc.

L'étape byzantine de la civilisation a permis l'instauration des bases de la distillation et, avec l'ère arabe de la civilisation, l'huile essentielle devient un des principaux produits de commercialisation internationale. Ainsi, vers l'an mille, le médecin et scientifique persan, a défini précisément le procédé d'entraînement à la vapeur. L'Iran et la Syrie deviennent les principaux centres de production de divers types d'extraits aromatiques.

Par la suite, les huiles essentielles ont bénéficié des avancées scientifiques, au niveau des techniques d'obtention et de l'analyse de leur composition chimique. Parallèlement, a aussi tiré profit de l'avènement de l'aromathérapie. René-Maurice Gatte fosse a créé, en 1928, le terme de l'aromathérapie et il a mené de nombreux travaux concernant les huiles essentielles, notamment leurs propriétés ; ces résultats seront à l'origine de nombreuses autres recherches (**Besombes, 2008**).

2.2. Définition

Pour certains auteurs comme (**Carette 2000**), il est important de distinguer huile essentielle et essence ; cette dernière est une sécrétion naturelle élaborée par l'organisme végétal, contenue dans divers types d'organes producteurs, variables selon la partie de la plante considérée. En revanche, une huile essentielle est un extrait naturel de matières premières d'origine végétale, obtenu par distillation par la vapeur d'eau, c'est-à-dire que l'huile essentielle est l'essence distillée.

Les huiles essentielles n'ont pas une présence générale chez les végétaux. Parmi les 1 500 000 espèces végétales, 10% seulement sont dites « aromatiques », c'est-à-dire qu'elles synthétisent et sécrètent des infimes quantités d'essence aromatique (**Bruneton, 1999 ; Degryse et al, 2008**). Certaines familles se caractérisent par le grand nombre d'espèces à essences qu'elles groupent, en particulier les Labiés, les Ombellifères, les Myrtacées et les Lauracées (**Benayad, 2008**).

Les huiles essentielles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule. Ensuite, elles sont stockées dans des cellules dites cellules à huiles essentielles, dans des poils sécréteurs, dans des poches sécrétrices ou dans des canaux sécréteurs (**Bruneton, 1999 ; Hazzit, 2002 ; Boz et al, 2009**). Elles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : les fleurs, les feuilles, les racines, les rhizomes, les fruits, le bois et/ou les graines (**Bruneton, 1993 ; Anton et Lobstein, 2005**).

2.3. Biosynthèse et composition chimique

La cellule végétale est le siège de la biosynthèse des composés fondamentaux de la matière vivante. Elle est capable de coordonner les multiples réactions enzymatiques conduisant à la production d'huiles essentielles. Certaines cellules prennent en charge ces biosynthèses et également le stockage des métabolites formés. Il s'agit là de tout un ensemble de réactions biochimiques participant à la vie des plantes : respiration, photosynthèse, etc. **Garnéro, (1996)**.

Il en résulte que les huiles essentielles, constituées des mélanges complexes de composés organiques, possèdent des structures et des fonctions chimiques très diverses (**Lahlou, 2004**). Ces constituants appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des trapézoïdes (isopréniques, mono terpènes, les sesquiterpènes. Les diterpènes et les triterpènes) **Bruneton.,(1999) ; Seguin, (2001); Rhayour.,(2002); Bowles.,(2003); Chami.,(2005);Clarke.,(2008);Baser et Buchbauer., (2010)** d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents, d'autre part, elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils **Bruneton.,(1993) ; Bruneton.,(1999)**.

2.4. Extraction des huiles essentielles

Il existe plusieurs méthodes d'extraction des huiles essentielles mais, selon la définition de l'AFNOR et l'ISO, les méthodes utilisées pour l'extractions des huiles essentielles sont: l'hydro distillation « water distillation » où le matériel végétal à extrait est en contact direct avec l'eau en ébullition, la vapeur d'eau produite entraîne avec les essences de la plante **Belleau.,(1990); Pingot,(1998); Bruneton.,(1999);Baser et Buchbauer., (2010)**, entraînement à la vapeur « stem distillation » à la différence de l'hydro distillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter (**Lesley, 1996 ; Marriott et al.,(2001);Lahlou.,(2004); Lucchesi .,(2005)**) et l'expression à froid, ce procédé est réservé surtout aux agrumes (**Lesley, 1996; Afnor, 1996**).

2.5. Conservation des huiles essentielles

Les huiles essentielles se conservent dans un flacon en verre opaque à l'abri de la lumière à une température en 4°C et 6°C.

2.6. Stabilité des huiles essentielles

Les matières actives des produits phytosanitaires ne sont que rarement administrées seules. Les huiles essentielles sont volatiles et généralement très sensibles aux phénomènes d'oxydation. Les procédés qui conduisent à l'altération naturelle sont en générale les activités causées par la chaleur et l'oxygène (O₂) de l'air et sont catalysés par la lumière et la présence de certains métaux. Ils conduisent à une multitude de produits oxygénés souvent très différents. Ces phénomènes d'altération modifient fortement la composition chimique des huiles essentielles lors de l'application du produit (**Chiron, 1996**).

Il est nécessaire de les associer à des composés, appelés formulant ou adjuvants, sans activité biologique propre, mais sans les matières actives n'auraient qu'une efficacité nulle ou insuffisante (**Gauvrit et Cabanne, 1993**).

2.7. Intérêt de la formulation des huiles essentielles

Les buts poursuivis sont principalement d'assurer :

- Les stabilités chimique et physique du produit ;
- Son efficacité biologique et son innocuité à l'égard des cultures ;
- Les sécurités de l'utilisateur et de l'environnement

Lorsque l'adjonction se fait lors de la préparation industrielle, on parle de formulant ; lorsqu'elle se fait lors de l'application du produit, on parle d'adjuvant. Ces buts multiples sont atteints grâce à des composés aux fonctions diverses : tensioactifs, solvants, dispersants (**Gauvrit et Cabanne, 1993**).

2.8. Les tensioactifs

Grace à leur structure particulière, qui combine entre deux parties, hydrophobe et hydrophile, les tensioactifs peuvent faciliter et accentuer le pouvoir émulsifiant, dispersant, étalent, mouillants, solubilisant, et/ou des autres activités intervenant dans la formulation des produits agrochimiques (**Stolzenberg, 1989**).

Les tensioactifs utilisés en agrochimie peuvent agir à différents niveaux :

- Dans la formulation proprement dite, au sein même de la bouillie (émulsifiant, dispersant)
- A la surface de la feuille (agent d'étalement, mouillant) (**Gauvrit, 1994**).
- Sur les membranes et dans les cellules sous-jacentes à la cuticule (activateur, pénétrant) (**Coret et Chamel, 1994**).

2.9. Mécanisme d'action des huiles essentielles des citrus sur les champignons

Le mécanisme d'action des huiles essentielles à l'égard des micro-organismes est complexe. Il est admis que l'action antimicrobienne des huiles essentielles dépend de leur nature hydrophile ou lipophile (**Kalemba et Kunicka, 2003**).

Les huiles essentielles des citrus ont la capacité de pénétrer et perturber la paroi cellulaire fongique, perméabilise les membranes cytoplasmiques et enfin endommager les membranes mitochondriales (**Fisher et Phillips, 2008 ; Akhtar et al, 2014**). Elles provoquent des changements dans le flux des électrons à travers le système de transport des électrons à l'intérieur des mitochondries, endommagent les lipides, les protéines, les acides nucléiques et le contenu des cellules fongiques (**Bakkali et al, 2008 ; Chutia et al, 2009**).

Il s'avère que les terpènes exercent un dysfonctionnement des pompes à protons ATPase pouvant conduire à la mort cellulaire (**Viuda-Martos et al, 2008**). D'un autre côté les mono terpènes hydrocarbonés sont dotés d'un pouvoir pénétrant. Ils ont la possibilité de traverser les membranes cellulaires en établissant des pores (**Jing et al, 2014**). Ils modifient la fluidité de la membrane par l'insertion des mono-terpènes entre les acides gras de la bicouche lipidique membranaire et perturbent par conséquent les fonctions cellulaires (**Prashar et al, 2003 ; Sharma et Tripathi, 2008**).

2.10. Composants volatiles vis-à-vis des champignons phétopathogènes

Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles des citrus ont été longuement reconnues (**Fisher et Phillips, 2008**). La bibliographie consultée rapporte les pouvoirs inhibiteurs des huiles essentielles des citrus et de leurs composants volatils vis-à-vis des champignons phétopathogènes des genres : *Aspergillus* (*Aspergillus. Niger, Aspergillus. Flavus, Aspergillus. Fumigatus, Aspergillus. Et Aspergillus. terreus*), *Fusarium*, *Alternaria* et d'autres espèces (**Gumus et al., 2010 ; Singh et al., 2010 ; Philips et al., 2012 ; Van Hung et al., 2013 ; Vitoratos et al., 2013 ; Jing et al., 2014 ; Regnier et al., 2014 ; Tao et al., 2014**).

Pawar et Thaker (2006), ont étudié l'effet de 75 huiles essentielles extraites de différentes plantes sur la croissance fongique et la formation des spores d'*A. Niger*. Ils remarquent que les huiles essentielles du bigaradier (*Citrus aurantium* L.), bergamote (*Citrus bergamia* Risso et Poit) et *Citrus bigaradia* Hook.f exhibent de forts pouvoirs inhibiteurs.

De nombreux auteurs ont tenté de corrélérer l'activité antifongique des huiles essentielles des citrus et de leurs composants volatils et ils rapportent qu'elle est conditionnée par l'activité de leurs composants tel que les monoterpènes (**Kalemba et Kunicka, 2003 ; Matasyoh et al, 2007 ; Singh et al, 2010**).

Beaucoup de recherches indiquent que le pouvoir antifongique exprimé par l'huile essentielle des citrus peut être associé à son composant majoritaire (**Sharma et Tripathi 2008 ; Chutia et al, 2009 ; Viuda-Martos et al, 2009**).

D'un autre côté (**Hoet et al. 2006**), estiment qu'il est possible que l'activité des principaux composants soit modulée par d'autres molécules mineures. En général, les principaux composants reflètent assez bien les caractéristiques biophysiques et biologiques des huiles essentielles à partir desquelles ils ont été extraits (**Ipek et al, 2005**).

2.11. Méthodes d'évaluation les plus courants de l'activité antifongique des huiles essentielles in vitro

2.11.1. Méthode des disques

La méthode des disques est la technique la plus répandue pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne. La méthode est reconnue comme précise et fiable, quoiqu'elle produise des résultats semi-quantitatifs, et selon quelques auteurs, seulement qualitatifs et non reproductibles (**Janssen et al, 1987**).

Cette méthode a été adoptée pour le criblage des huiles essentielles (**Maruzzella et Sicurella, 1960**). Selon **Kalemba et Kunicka (2003)**, c'est une technique qui convient plus aux bactéries qu'aux champignons. Elle a été utilisée dans 73 % des études recensées et consacrées à l'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles des citrus (**Baser et Buchbauer, 2010**).

Le principe de la technique consiste à placer l'huile essentielle sur une surface d'Agar. Deux voies d'introduction de l'huile essentielle sont possibles : sur un disque en papier ou dans un trou réalisé dans le milieu de gélose (**Aouni et al, 2013**). L'huile essentielle à activité antimicrobienne provoque une zone d'inhibition autour du disque ou du trou après incubation, respectivement et normalement la taille de la zone d'inhibition correspond à la puissance de l'activité antimicrobienne de l'huile

essentielle et elle est évaluée par la mesure du diamètre (en cm ou mm) (**Baser et Buchbauer, 2010**).

2.12. Facteurs influençant l'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles *in vitro*.

L'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est difficile vu leur volatilité, leur insolubilité dans l'eau et leur complexité. Quatre facteurs sont spécialement importants lorsqu'il s'agit de tester les huiles essentielles : le choix de la méthode ; le milieu de culture ; l'origine des espèces à étudier et enfin les huiles essentielles.

2.12.1. L'huile essentielle

Des changements dans la composition de l'huile essentielle peuvent influencer l'activité antifongique et les facteurs suivants devront être pris en considération :

- La source botanique (quelques huiles commerciales sont dérivées d'espèces différentes).
- La localisation géographique du matériel végétal, (**Brada et al. 2007**) mentionnent que la localisation géographique peut induire des modifications dans la composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia*
- La matière végétale étant fraîche ou sèche
- La technique d'extraction influence la composition chimique de l'huile essentielle, **Farhat et al. (2011)** obtiennent deux compositions chimiques quantitativement différentes pour l'huile essentielle d'oranger extraite par deux techniques différentes
- La période de collecte du matériel végétal
- Les conditions de stockage de l'huile essentielle (essentiellement la température d'incubation)

2.12.2. L'agent dissolvant

L'étude de l'activité antifongique des huiles essentielles est difficile vu leurs complexités, leurs insolubilités dans l'eau et leurs volatilités. Les huiles essentielles sont de nature hydrophobe et de haute viscosité. Ces propriétés peuvent réduire la capacité de provoquer une dilution ou une répartition inégale de l'huile à travers le milieu, même si un agent de dispersion ou de solubilisation approprié est utilisé. Plusieurs solvants organiques sont employés comme agents solubilisant ou même des émulsifiants non ioniques. Certains auteurs craignent les effets antimicrobiens des solvants organiques tel les alcools ce qui les conduit à préférer les produits tensioactifs (**Edris et Abd El-Galeel, 2010**). Les tensioactifs sont relativement inactifs et ils sont largement appliqués comme émulsifiants tels le Tween 20 (**Griffin**

et al, 2000) et le Tween 80 (**Delespaul et al, 2000**). Ce sont des composés ayant à la fois des groupes chimiques hydrophiles et lipophiles sur la même molécule de tensioactif. **Kalemba et Kunicka (2003)**, rappellent que l'addition d'un émulsifiant ou d'un solvant doit être appliquée à des concentrations n'affectant pas la croissance ou la différenciation des microorganismes testés.

3. Aperçu sur l'espèce fongique sélectionnée

3.1. *Fusarium*

Le genre *Fusarium* comprend un nombre important d'espèces fongiques qui peuvent être phétopathogènes en provoquant des maladies sur plusieurs cultures d'importance agronomique, y compris les céréales, et peut aussi être nocif pour les êtres humains et animaux (**Weiland et Sundsbak, 2000 ; O'Donnell et al, 2013**).

Le genre *Fusarium* appartient à l'embranchement d'Ascomycota, classe d'Ascomycètes, ordre Hypocreales, les formes téléomorphes des espèces de *Fusarium* sont principalement classées dans le genre *Gibberella*, et pour un petit nombre d'espèces, appartiennent aux genres *Hemanectria* et *Albonectria* (**Leslie et Summerell, 2006**).

Les espèces du genre *Fusarium* produisent trois types de spores : macroconidies, microconidies et chlamydospores. Les macroconidies cloisonnées peuvent être produites sur les monophialides et polyphialides ou dans le mycélium aérien, mais aussi sur monophialides courtes dans des structures spécialisées appelées sporodochie (**Moretti, 2009**).

Les espèces de *Fusarium* sont parmi les champignons telluriques les plus agressifs responsables des flétrissements et des pourritures racinaires chez de nombreuses espèces végétales cultivées (**Desjardins, 2006**).

Bon nombre d'entre eux produisent une large gamme de métabolites secondaires biologiquement actifs (mycotoxines) avec la diversité chimique extraordinaire. L'activité biologique de mycotoxines de *Fusarium* peut être nuisible pour les plantes, et elle est associée au cancer et à d'autres maladies chez l'être humain et les animaux domestiques (**Desjardins et Proctor, 2007**).

3.2. *Fusarium oxysporum f.sp. Lycopersici*

L'espèce la plus commune, *F. oxysporum*, provoque la maladie du flétrissement vasculaire dans une grande variété de cultures économiquement importantes (**Moretti, 2009**).

Fusarium oxysporum fsp lycopersici est l'espèce la plus destructive de la tomate (*Phoenix dactylifera* L.) causant la fusariose vasculaire de la tomate. Elle menace véritablement toutes cultures maraichères. Il se maintient très longtemps dans les tomates infectées. Le dessèchement de la plante résulte donc du blocage de la circulation de sève, conséquence des différentes altérations du système vasculaire (Lepoivre, 2003).

3.3 *Fusarium oxysporum f.sp.Albedinis*

L'espèce la plus commune, *F. oxysporum*, provoque la maladie du flétrissement vasculaire (*Phoenix dactylifera*) dans une grande variété de palmier dattier.

Fusarium oxysporum f.sp.Albedinis provoque une maladie appelée maladie de Bayoud ou fusariose, principalement sur le palmier dattier (CMI, 1978,1992 ; EPPO/CABI, 1997)

Chapitre II :

Matériel et méthodes

Chapitre II : Matériel et méthodes

L'objectif de notre travail est d'étudier l'activité antifongique des huiles essentielles synthétisées chez le Bigaradier *Citrus aurantium* L., de la région de Cherchell avant la phase de floraison et durant la phase de floraison. L'activité antifongique est estimée selon l'indice phénologique.

1. Lieu et période d'étude

L'ensemble de ce travail a été effectué au laboratoire de phytopharmacie du département de Biotechnologies de l'Université de Saad Dahleb-Blida 1.

2. Présentation de la région de collecte du matériel végétale

Le matériel végétal de la présente étude est échantillonné de la région de Cherchell. Cherchell est une ville côtière de la mer Méditerranée, Ce dernier se situe à 100 km à l'ouest d'Alger, comprises entre les latitudes Nord $36^{\circ} 36' 31''$ et les longitudes Est $2^{\circ} 11' 50''$. (Fig. 1) (Google maps, 2019).



Figure 03 : Région de récolte de *Citrus aurant* (Google maps, 2019)

3. Matériel d'étude

3.1. Présentation du matériel végétal

Le Bigaradier a été choisi pour la présente étude d'après ses vertus ethnobotanique. Les feuilles ont été récoltées entre le mois de Janvier 2019, Cette période couvre le stade phénologique de fructification, et Le mois d'Avril 2019, cette période couvre le stade phénologique de floraison. (Fig.05).



Figure 04 : Présentation de *Citrus aurantium* dans les deux stades phénologique (Originale, 2019)

3.2. Reconnaissance botanique

L'identification de la plante choisie a été réalisée selon la nouvelle flore de l'Algérie (Quezel et Santa, 1962) par l'équipe du jardin d'essai d'EL Hamma à Alger.

3.3. Présentation de la souche fongique

L'activité antimicrobienne (activité biocide et/ou biostatique) de l'huile essentielle de *Citrus aurantium sp* a été évaluée sur une souche fongique qui provient de l'American Type Culture Collection ATCC, USA. Ses caractéristiques sont regroupées sur le tableau suivant :

Tableau 01 : Pouvoir pathogène de la souche fongique utilisée (Lansing et al. 2003 ; Joffin et Leyral, 2006 ; Assous et al. 1999).

| Souche fongique | Pouvoir phétopathogène |
|--|--|
| <i>Fusarium oxysporum f.sp lycopersici</i> | Attaque principalement la tomate au début de la floraison. la plante attaquée présente des symptômes de flétrissement et de jaunissement partiel, puis total du feuillage. |
| <i>Fusarium oxysporum f.sp Albedinis</i> | Les palmiers datée attaquée présente des symptômes de flétrissement vasculaire progresse ensuite du bas ver l'extrémité |

3.4. Milieu de culture

Pour évaluer l'activité antifongique, nous avons utilisé le milieu PDA (Potato Dextrose Agar ou pomme de terre glucosée et gélosée).

4. Méthodes d'étude

4.1. Extraction des huiles essentielles de *Citrus aurantium sp*

L'extraction des huiles essentielles de *Citrus aurantium sp*. Effectuée par hydro distillation avec un appareil de type Clevenger a été réalisée au mois de mars 2019 au niveau du laboratoire de phytopharmacie du département de la biotechnologie de l'Université de Blida 1 (Fig.06). Une quantité de 160 g de feuille de Bigaradier est

transvasée dans un ballon auquel un volume de 1,7 litre d'eau distillée est ajouté. L'extraction est effectuée durant trois heures. Les cellules du végétal éclatent et libèrent des molécules chimiques odorantes qui sont entraînées par la vapeur d'eau. Celles-ci se condensent dans un réfrigérant et le mélange eau-huile est recueilli dans une burette. La décantation se fait dans une ampoule à décanter dans laquelle le mélange se sépare en deux phases non miscibles par la différence de leur densité (phase aqueuse inférieure, hydrolat et phase huileuse supérieure).

Enfin, les huiles essentielles sont récupérées dans des flacons en verre scellés puis conservées au réfrigérateur à 4° C.



Figure 05 : Montage de l'appareil Clevenger du procédé de l'hydrodistillation (Originale 2019).

4.2. Analyse chromatographique des huiles essentielles

L'analyse chromatographique de l'huile essentielle a été effectuée à l'aide d'un chromatographe de type Thermo Electron (Fig.07) : Trace GC Ultra équipé d'une colonne capillaire HP-5 (5% diphényl- 95% diméthyl-siloxane) (30 m x 0,25 mm,

épaisseur du film : 0,25 μ m). L'appareil est équipé d'un injecteur PVT (Température de Vaporisation Programmée) de type split–splitless. Le mode d'injection est split. Le volume injecté est de 1 μ l. La programmation de température va de 50 à 300°C avec un gradient de 3°C/min. La spectrométrie de masse est réalisée avec un chromatographe en phase gazeuse de type Thermo Electron Trace MS system. La fragmentation est effectuée par impact électronique d'intensité 70eV. La colonne capillaire est de type HP-5MS (5% diphényl- 95% diméthyl-siloxane) (30 m x 0,25 mm, épaisseur du film : 0,25 μ m). La température de la colonne est programmée de 50à300°C à raison de 3°C/min. Le gaz vecteur hélium a un débit de 1,0 ml/min. L'injection est faite en mode split (rapport de fuite : 1/70, débit ml/min). L'appareil est relié à un système informatique gérant la bibliothèque de spectres de masse du National Institute of Standards and Technology (NIST 98). Les composés de l'huile essentielle sont identifiés par les spectres de masse.



Figure 06 : Équipement d'analyse CG-SM (originale 2019)

L'identification des composants individuels est fondée sur la comparaison des indices de rétention (I_r) calculés, avec ceux de composés authentiques ou des données de la littérature (National Institute of Standards and Technology, 2008), et des bibliothèques commerciales, et par l'analyse de chaque spectre de masse des composés constitutifs.

4.3. Calcul du rendement en huiles essentielles

Le rendement en huiles essentielles (R) est le rapport entre le poids de l'huile essentielle (P') et le poids de la plante traitée (P) (**Carré, 1953**) il est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

$$R\% = (P' / P) \times 100$$

Avec :

R% : Rendement en huile essentielle

P' : Poids de l'huile essentielle en gramme.

P : Poids de la plante en gramme

4.4. Préparation de la dilution de l'huile essentielle

La formulation consiste à additionner à l'huile essentielle un ou plusieurs adjuvants afin de faciliter sa conservation et d'homogénéiser son étalement et son absorption par le substrat. Nous avons préparé une formulation à partir de l'HE de bigaradier.

Dilutions : l'HE obtenue a été diluée par un solvant polaire organique (organosulfuré) le diméthylsulfoxyde qui n'a eu aucun effet sur les souches fongiques aux concentrations étudiées selon le protocole établi par **Daghbouche (2017)**.

Ce choix a été fait car le DMSO est le solvant préférable pour la majorité des auteurs, notamment (**Alavi et al., 2005**) et (**Mohammedi. 2006**) et (**Ownagh et al., 2010**) qui ont prouvé que le DMSO n'a aucun pouvoir antifongique puissant.

4.5. Méthodes d'évaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle

Pour mettre en évidence l'activité antifongique de *Citrus aurantium L.* nous avons utilisé une méthode ; la méthode de diffusion par disques (**Aouni et al., 2013**)

4.5.1. Préparation du milieu de culture

L'évaluation de l'activité antifongique a nécessité la préparation du milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (**Singh et al., 2006**). Pour cela, 200 g de pomme de terre ont été épluchés, découpés en quatre morceaux et mis dans une fiole en verre dans laquelle 600 ml d'eau distillée y ont été ajoutés, puis mises sur une plaque chauffante jusqu'à ébullition afin d'obtenir du jus de pomme de terre.

À l'aide d'une balance, 20 gr d'agar et 15 gr de glucose sous forme de poudre ont été pesés. Ce mélange (glucose-agar) a été versé dans une autre fiole en verre dans laquelle 200 ml du jus de pomme de terre et 800 ml d'eau distillée y ont été aussi ajoutés. La fiole contenant le mélange (glucose-agar-jus de PDT-eau distillée) a été mise dans un agitateur pendant quinze minutes.

La solution obtenue a été versé dans des bouteilles en verre stériles et fermées hermétiquement. Ces dernières ont été mises dans un autoclave à 180° C pendant 20 mn.

4.5.2. Préparation des dilutions

Pour les huiles essentielles toutes les dilutions ont été faites avec du diméthyle sulfoxyde (DMSO) où les concentrations testés étaient de : D1 (800 µl / mL), D2 600, D3 400 µl / mL.

Les dilutions, ont été préparées à l'aide d'une micropipette 1000µl on ajout de 1ml de (DMSO) dans chaque tube, à l'aide d'une micropipette 100µl on ajout 800µl de huile essentielles dans le tube 1 pour D1, 600µl de huile essentielles dans le tube 2 pour D2, 400µl de huile essentielles dans le tube 3 pour D3.

4.5.3. Préparation des disques

Les disques sont préparés à partir du papier wattman de 6 mm de diamètre, ensuite ils sont mis dans un tube à essai, stérilisés dans un four pasteur pendant 30 min à 180° C, puis stockés à une température ambiante.

4.5.4. Préparation de l'inoculum

Toutes les souches microbiennes ont été pré-cultivées avant leur utilisation. Dans la zone aseptique du bec bunsen, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches fongiques à tester a été mis dans des tube à essai déjà stérile, on verse 10ml d'eau physiologique stérile à 0.9% pour obtenir de suspensions des spores, en suite la densité optique lue à 625nm est justifier à 0.08 à 0.10nm, afin d'obtenir une suspension homogène. On admet que cette densité mesurée à 625nm est équivalente à 1×10^6 spor/ml **Braga et al.,(2007)**. (fig. 05)

L'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum.



Figure 07 : Préparation de l'inoculum

4.5.5. Ensemencement

- Vingt millilitres d'agar nutritif liquide stérile ont été chauffés et versés dans chaque boîte de Pétri. Après refroidissement de l'agar liquide et solidification, un écouvillon a été trempé (100 μ l) dans la suspension microbienne standardisé a été étalée sur la surface des plaques d'agar stérile.
- L'essorer en le pressant fermement(en le tournant) sur la paroi interne du tube.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas, en stries serrées (ensemencement par écouvillonnage), on répète l'opération deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.



Figure 08 : Préparation des ensemencements

4.5.6. Application des disques

On a utilisé une pince pour mettre 3 disques dans la boîte en contact du milieu de culture, à l'aide d'une micropipette on a imbibé chaque disque par 10 μ l d'HE formulée **Aouni et al. (2013)**



Figure 09 : Application des disques

L'activité a été répétée pour huile essentielle formulée de la période de la floraison. Ensuite, toutes les boîtes de pétri ont été incubées à 27 C° durant 10 jours, condition favorable au développement mycélien.

4.6. Expression des résultats

L'activité antifongique a été évaluée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition, déterminée par les différentes concentrations.

4.6.1. Cinétique de la croissance mycélienne

La Cinétique de la croissance mycélienne correspond aux variations dans le temps, du diamètre du champignon avec différentes concentrations. La cinétique de croissance mycélienne a été évaluée toutes les 48 heures en mesurant la moyenne de diamètres perpendiculaires passant par le milieu de la rondelle. Cette lecture est toujours réalisée en comparaison avec les cultures témoins dans les mêmes conditions et en utilisant le logiciel **Digimizer** avec un support pour respecter le même pixel.

4.6.2. Croissance mycélienne

La croissance mycélienne a été évaluée à la fin de l'expérience, à savoir au bout de 240h (10jours) d'incubation, en mesurant la moyenne de diamètres par disque et par champignon. Cette lecture est toujours réalisée en comparaison avec les cultures témoins ayant démarré le même jour et dans les mêmes conditions.

4.6.3. Détermination de l'indice antifongique Le pourcentage d'inhibition de croissance I(%) est exprimé par la réduction du diamètre de la colonie fongique par rapport au témoin, selon la formule suivante (**Sharma et Tripathi, 2008**).

$$I(\%) = \frac{[(D_{\text{témoin}} - D_{\text{test}})]}{D_{\text{témoin}}} \times 100$$

Dtémoin : témoin diamètre de la colonie témoin en (mm), **Dtest** : diamètre de la colonie dans le test en (mm)

4.6.4. Détermination de la vitesse de croissance mycélienne (VC)

Selon **Cahagnier et Molard (1998)**, la vitesse de la croissance mycélienne de chaque concentration est déterminée par la formule suivante :

$$VC = [D1/Te1] + [(D2-D1)/Te2] + [(D3-D2)/Te3] + \dots + [(Dn-Dn-1)/Ten]$$

D : diamètre de la zone de croissance journalière.

Te : temps d'incubation.

5. Analyse statistique des données

Les résultats sont rapportés comme valeurs de trois répétitions (moyennes \pm SE) sur la base d'un C.V. <15%. L'analyse de la variance (type GLM et type ANOVA) suivie du test de post-Hoc a été utilisée pour établir l'effet des dilutions et des formulations sur l'activité antifongique de l'huile essentielle du Bigaradier *Citrus aurantium*, les différences ont été considérées comme significatives à $p < 0,05$. Les données ont été déroulées par le logiciel XLSTAT ver. 9, et par le logiciel PAST ver. 1.37.

Chapitre III :

Résultats

Chapitre III : Résultats

Les résultats de nos travaux d'évaluation de l'influence de l'indice phénologique sur l'activité antifongique de l'huile essentielle des feuilles de *Citrus aurantium L.* de deux différents stades, floraison et fructification, extraites par hydrodistillation, sur les champignons *Fusarium oxysporum f.sp. Lycopersici* et *Fusarium f.sp. Albedinis*, menés en conditions de laboratoire sont présentés dans cette partie.

1. Estimation du rendement en huiles essentielles selon l'indice phénologique

Les rendements moyens en huiles essentielles ont été calculés en fonction de la matière végétale des feuilles de *Citrus aurantium L.* de différents stades phénologiques. Les pourcentages obtenus en rendements, pour la même quantité et la même durée d'extraction, sont faibles et ne sont pas très différents (Fig. 10)

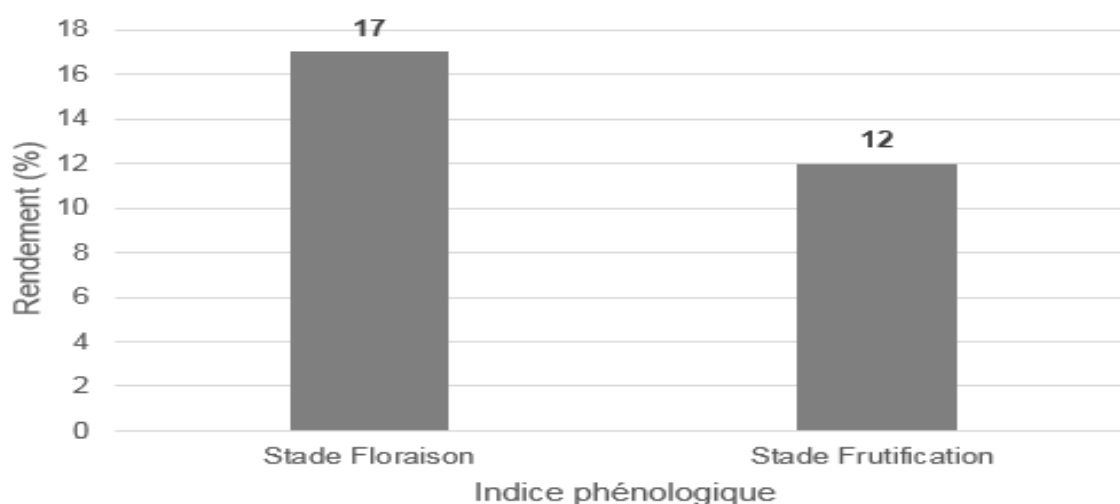


Figure 10 : Rendement en huiles essentielles selon l'indice phénologique

2. Composition chimique des huiles essentielles selon l'indice phénologique

Les résultats d'analyse de la CG/SM font ressortir une richesse en molécules pareillement au niveau des huiles essentielles des feuilles de *C. aurantium* des deux indices phénologiques (floraison et fructification) (42 molécules) (Tableau 02).

Les principaux composés chimiques qui constituent la fraction majoritaire de l'huile essentielle de *C. aurantium* issus des feuilles du stade phénologique floraison sont au nombre de 11 molécules. Nous notons la présence de Linalol (27,88%), Acétate de linalyle (23,74%), alpha-terpinéol (7,93%), Géraniol (6,63%), Bêta-pinène (4,14%), Acétate de neryle (3,95%), Trans-bêta-ocimene (3,76%), Acétate de geranyle (3,27%), Bêta-myrcene (2,82%), Nerol (1,78%) et Limonene (1,64%). Concernant l'huile essentielle de *C. aurantium* issus des feuilles du stade phénologique fructification, les fraction majoritaire sont : Linalol (23,89%), Acétate de linalyle (20,45%), alpha-terpinéol (8,11%), Géraniol (5,41%), Bêta-myrcene (4,32%), Acétate de geranyle (4,13%), Nerol (3,98%), Bêta-pinène (3,27%), Limonène (3,03%), Acétate de neryle (2,77%), Cis-bêta-ocimene (2,59%), Trans-bêta-ocimene (1,98%) et Bêta-caryophyllene (1,55%).

Tableau 02 : Composition des huiles essentielles de *Citrus aurantium* selon l'indice phénologique

| Constituants | % stade floraison | Constituants | % stade fructification |
|-------------------------------|-------------------|-------------------------|------------------------|
| Linalol | 27,88 | Linalol | 23,89 |
| Acétate de linalyle | 23,74 | Acétate de linalyle | 20,45 |
| alpha-terpinéol | 7,93 | alpha-terpinéol | 8,11 |
| Géraniol | 6,63 | Géraniol | 5,41 |
| Bêta-pinène | 4,14 | Bêta-myrcene | 4,32 |
| Acétate de neryle | 3,95 | Acétate de geranyle | 4,13 |
| Trans-bêta-ocimene | 3,76 | Nerol | 3,98 |
| Acétate de geranyle | 3,27 | Bêta-pinène | 3,27 |
| Bêta-myrcene | 2,82 | Limonène | 3,03 |
| Nerol | 1,78 | Acétate de neryle | 2,77 |
| Limonene | 1,64 | Cis-bêta-ocimene | 2,59 |
| Cis-bêta-ocimene | 0,75 | Trans-bêta-ocimene | 1,98 |
| Sabinene | 0,54 | Bêta-caryophyllene | 1,55 |
| Bêta-caryophyllene | 0,34 | Sabinene | 0,66 |
| Alpha-pinène | 0,21 | Terpinolene | 0,42 |
| Alpha-humulene | 0,21 | Citronellol | 0,33 |
| Citronellol | 0,21 | 3-hexen-1-OL | 0,26 |
| Terpinolene | 0,18 | Terpinene-4-OL | 0,22 |
| Terpinene-4-OL | 0,17 | 2-Ethyl furan | 0,21 |
| Bicyclogermacrene | 0,15 | Alpha-thuyene | 0,21 |
| 3-Hexen-1-OL | 0,13 | Delta3-carene | 0,21 |
| Delta3-carene | 0,12 | Bêta-phellandrene | 0,21 |
| Alpha-terpinene | 0,12 | Bêta-elemene | 0,21 |
| p-cymene | 0,12 | Acetate de citronellyle | 0,21 |
| 2-Hexen-1-OL | 0,12 | Alpha-humulene | 0,21 |
| Bêta-elemene | 0,12 | E-bêta-farnesene | 0,21 |
| Germacrene D | 0,12 | Alpha-muurolol | 0,19 |
| Acétate de Cis-epoxy-linalyle | 0,12 | Bicyclogermacrene | 0,18 |
| Nerolidol | 0,12 | Nerolidol | 0,18 |

| | | | |
|-------------------------|--------------|-------------------------------|--------------|
| Germacra-1,5-dien-4-OL | 0,12 | Alpha-pinene | 0,16 |
| T-Cadinol | 0,12 | p-cymene | 0,12 |
| Alpha-muurolol | 0,12 | Germacrene D | 0,12 |
| 2-Hexanal | 0,10 | Bêta-bisabolene | 0,12 |
| 2-Ethyl furan | 0,06 | Acétate de Cis-epoxy-linalyle | 0,12 |
| Bêta-phellandrene | 0,06 | Germacra-1,5-dien-4-OL | 0,12 |
| E-bêta-farnesene | 0,05 | T-CADINOL | 0,12 |
| Neral | 0,05 | 2-Hexanal | 0,09 |
| Bêta-bisabolene | 0,05 | 2-Hexen-1-OL | 0,07 |
| Alpha-cadinol | 0,05 | Alpha-terpinene | 0,06 |
| Alpha-thuyene | 0,04 | Camphene | 0,04 |
| Camphene | 0,04 | Neral | 0,04 |
| Acetate de citronellyle | 0,04 | Alpha-cadinol | 0,04 |
| TOTAL | 92,29 | TOTAL | 90,82 |

3. Estimation de la croissance mycélienne

Selon la figure (11) l'évolution temporelle de la croissance mycélienne de *Fusarium f.sp. Albedinis* et *Fusarium f.sp Lycopersici* sous l'effet de l'huile essentielle de deux stades phénologique (floraisons et fructification) montre un effet antifongique en fonction du temps (2jour, 4jour, 6jour, 8jour et 10jour) après traitements à différents doses (D1, D2, D3).

La comparaison des croissances mycéliennes fait constater que les 3 dilutions sont différentes de celle de témoin dans les deux stades et les deux champignons.

Au stade de la fructification, la dilution D1 est différente de D2 et D3 tandis que D2 et D3 sont proches par rapport à D1.

Au stade de floraison, on observe que la dilution D1 est différente de D2 et D3 alors que D1 et D2 sont proches par rapport à D3.

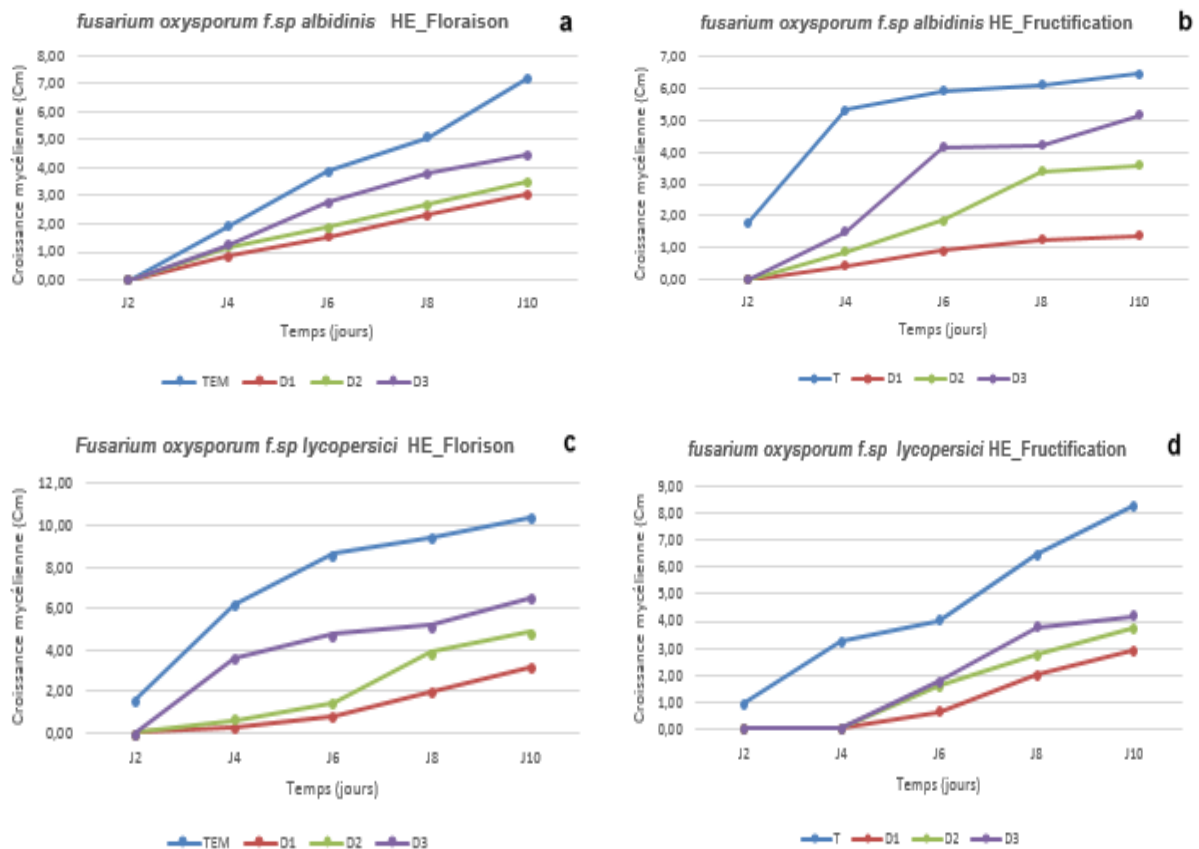


Figure 11 : Variation temporelle de la croissance mycélienne

Le test de Wilcoxon est avancé dans le but d'apprécier la variation de la croissance dans chaque point d'observation. La comparaison des mesures dans chaque boîte d'observation, montre que les croissances ne présentent aucune différence au niveau des blocs expérimentaux (Tableau 03).

Selon le test de Wilcoxon, on remarque que dans les deux blocs floraison et fructification affiche au bloc témoin une différence significative. Au bloc floraison affiche une différence significative au niveau de dilution (D1 ; D3) et (D2 ; D3), non significative au niveau de dilution (D1 ; D2). Au bloc fructification affiche une différence significative au niveau de dilution (D1 ; D2) et (D1 ; D3), non significative au niveau de dilution (D2 ; D3).

Tableau 03 : Comparaison par paire des paliers temporels de l'évolution de *Fusarium oxysporum f. sp Albedinis* sous l'effet des huiles essentielles

| HE | Floraison | TM | D1 | TM | D2 | TM | D3 | D1 | D2 | D1 | D3 | D2 | D3 |
|----|----------------|---------|------|---------|------|---------|------|----------------------|------|---------|------|----------------------|------|
| | | N | 5 | | 5 | | 5 | | 5 | | 5 | | 5 |
| | Moyenne | 3,61 | 1,55 | 3,61 | 1,84 | 3,61 | 2,45 | 1,55 | 1,84 | 1,55 | 2,45 | 1,84 | 2,45 |
| | Médiane | 3,87 | 1,55 | 3,87 | 1,87 | 3,87 | 2,76 | 1,55 | 1,87 | 1,55 | 2,76 | 1,87 | 2,76 |
| | Test Wilcoxon | 0,0493* | | 0,0370* | | 0,0135* | | 0,1239 ^{NS} | | 0,0445* | | 0,0501* | |
| HE | Fructification | TM | D1 | TM | D2 | TM | D3 | D1 | D2 | D1 | D3 | D2 | D3 |
| | | N | 5 | | 5 | | 5 | | 5 | | 5 | | 5 |
| | Moyenne | 5,12 | 0,80 | 5,12 | 1,95 | 5,12 | 2,81 | 0,80 | 1,95 | 0,80 | 2,81 | 1,95 | 2,81 |
| | Médiane | 5,93 | 0,92 | 5,93 | 1,86 | 5,93 | 3,14 | 0,92 | 1,86 | 0,92 | 3,14 | 1,86 | 3,14 |
| | Test Wilcoxon | 0,031* | | 0,0261* | | 0,0133* | | 0,0458* | | 0,0369* | | 0,0679 ^{NS} | |

NS : Non significative, * : Significative à 5%

Selon le test de Wilcoxon, on remarque que deux blocs floraison et fructification les huiles affiche au bloc témoin une différence significative. Au bloc floraison affiche une différence significative au niveau de dilution (D1 ; D3) et (D2 ; D3), non significative au niveau de dilution (D1 ; D2). Au bloc fructification affiche une différence significative au niveau de dilution (D1 ; D2) et (D1 ; D3), non significative au niveau de dilution (D2 ; D3) (Tableau 04).

Tableau 04 : Comparaison par paire des paliers temporels de l'évolution de *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* sous l'effet des huiles essentielles

| HE | Floraison | TM | D1 | TM | D2 | TM | D3 | D1 | D2 | D1 | D3 | D2 | D3 |
|----|----------------|---------|------|---------|------|---------|------|----------------------|------|---------|------|----------------------|------|
| | | N | 5 | | 5 | | 5 | | 5 | | 5 | | 5 |
| | Moyenne | 7,27 | 1,27 | 7,27 | 2,16 | 7,27 | 4,02 | 1,27 | 2,16 | 1,27 | 4,02 | 2,16 | 4,02 |
| | Médiane | 8,64 | 0,82 | 8,64 | 1,44 | 8,64 | 4,73 | 0,82 | 1,44 | 0,82 | 4,73 | 1,44 | 4,73 |
| | Test Wilcoxon | 0,0314* | | 0,0221* | | 0,0121* | | 0,0778 ^{NS} | | 0,0379* | | 0,0440* | |
| HE | Fructification | TM | D1 | TM | D2 | TM | D3 | D1 | D2 | D1 | D3 | D2 | D3 |
| | | N | 5 | | 5 | | 5 | | 5 | | 5 | | 5 |
| | Moyenne | 4,59 | 1,10 | 4,59 | 1,62 | 4,59 | 1,95 | 1,10 | 1,62 | 1,10 | 1,95 | 1,62 | 1,95 |
| | Médiane | 4,02 | 0,63 | 4,02 | 1,60 | 4,02 | 1,74 | 0,63 | 1,60 | 0,63 | 1,74 | 1,60 | 1,74 |
| | Test Wilcoxon | 0,0116* | | 0,0468* | | 0,0314* | | 0,0102* | | 0,0256* | | 0,2507 ^{NS} | |

NS : Non significative, * : Significative à 5%

4. Estimation de la vitesse de croissance fongique

Selon la figure (12) l'évolution temporelle de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum f.sp. Albedinis* et *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* sous l'effet de l'huile essentielle de deux stades phénologique (floraison et fructification) montre un effet antifongique en fonction du temps (2jour, 4jour, 6jour, 8jour et 10jour) après traitements à différents doses (D1, D2, D3).

Dont la comparaison de la vitesse de croissances mycéliennes on constate que les 3 dilutions sont différentes de celle de témoin dans les deux stades et les deux champignons.

Dans le stade de la floraison nous notons que la vitesse de croissance sous D1, D2 et D3 sont différentes entre eux, alors que le stade de fructification sont proches les uns des autres

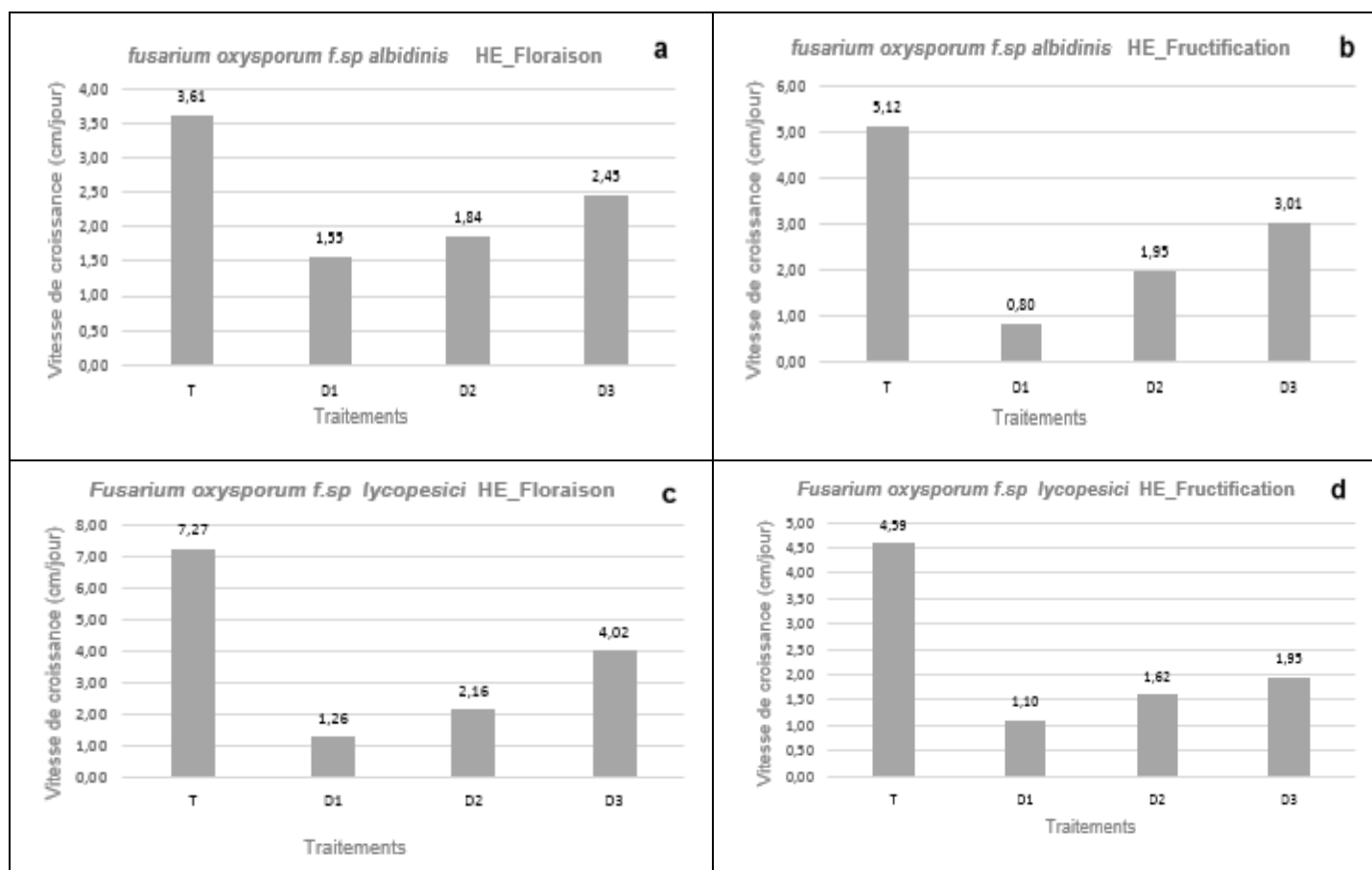


Figure 12 : Variation de la vitesse de croissance sous l'effet de l'indice phénologique et les dilutions

Une analyse type one way anova (analyse de la variance à un seul facteur) a été utilisée pour le facteur vitesse de croissance. Les résultats graphiques sont consignés dans la figure (Fig. 13).

À partir des résultats obtenus, nous remarquons que la vitesse de croissance enregistre un effet très significatif dans les dilutions.

| <i>fusarium oxysporum f.sp albidinis</i> HE_Floraison a | | | | | | <i>fusarium oxysporum f.sp albidinis</i> HE_Fructification b | | | | | |
|---|-------------|--------|-------------|--------|---------|--|-------------|----------|-------------|--------|---------|
| | Sum of sqrs | df | Mean square | F | p(same) | | Sum of sqrs | df | Mean square | F | p(same) |
| Between groups: | 12,3823 | 3 | 4,12743 | 1,157 | 0,3566 | Between groups: | 50,6112 | 3 | 16,8704 | 6,064 | 0,00586 |
| Within groups: | 57,0658 | 16 | 3,56661 | | | Within groups: | 44,5108 | 16 | 2,78192 | | |
| Total: | 69,4481 | 19 | | | | Total: | 95,122 | 19 | | | |
| | TEM | D1 | D2 | D3 | | | T | D1 | D2 | D3 | |
| TEM | | 0,3471 | 0,4743 | 0,7693 | | T | | 0,004339 | 0,03793 | 0,2282 | |
| D1 | 2,43 | | 0,9948 | 0,8753 | | D1 | 5,792 | | 0,7004 | 0,1974 | |
| D2 | 2,086 | 0,3434 | | 0,9562 | | D2 | 4,25 | 1,542 | | 0,75 | |
| D3 | 1,369 | 1,061 | 0,7175 | | | D3 | 2,831 | 2,96 | 1,418 | | |

| <i>fusarium oxysporum f.sp lycopersici</i> HE Floraison c | | | | | | <i>fusarium oxysporum f.sp lycopersici</i> HE Fructification d | | | | | |
|---|-------------|----------|-------------|--------|----------|--|-------------|---------|-------------|--------|---------|
| | Sum of sqrs | df | Mean square | F | p(same) | | Sum of sqrs | df | Mean square | F | p(same) |
| Between groups: | 105,66 | 3 | 35,2201 | 5,691 | 0,007554 | Between groups: | 36,2817 | 3 | 12,0939 | 2,901 | 0,0672 |
| Within groups: | 99,0134 | 16 | 6,18834 | | | Within groups: | 66,7118 | 16 | 4,16949 | | |
| Total: | 204,674 | 19 | | | | Total: | 102,993 | 19 | | | |
| | TEM | D1 | D2 | D3 | | | T | D1 | D2 | D3 | |
| TEM | | 0,007564 | 0,02366 | 0,2072 | | T | | 0,06822 | 0,1394 | 0,2135 | |
| D1 | 5,397 | | 0,9394 | 0,3306 | | D1 | 3,815 | | 0,9782 | 0,9128 | |
| D2 | 4,59 | 0,8072 | | 0,6463 | | D2 | 3,255 | 0,5607 | | 0,9939 | |
| D3 | 2,918 | 2,479 | 1,672 | | | D3 | 2,891 | 0,9242 | 0,3636 | | |

Figure 13 : Etude comparée de la vitesse de croissance sous l'effet de l'indice phénologique et les dilutions

(Analyse de la variance renforcée par le test de comparaison par paire de Tukey)

5. Estimation de l'indice d'inhibition

La comparaison des croissances mycéliennes de *Fusarium oxysporum f.sp. Albedinis* et *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* sous l'effet des 3 dilutions annonce une similarité d'effet entre les deux stades floraison et fructification selon l'ordre de concentration des dilutions utilisées (D1>D2>D3). En revanche, sous l'effet de l'huile essentielle, l'activité antifongique présente une croissance mycélienne plus importante

selon les fortes et les faibles concentrations obéissant toujours à un gradient positif (D1>D2>D3) (Fig.14).

La Figure (14) (a, b), représente l'évolution mycélienne de *Fusarium f.sp.albedinis* Enregistrant des taux d'inhibition de la dépendance sur le degré de concentration des dilutions utilisées avec l'engagement d'une gradation positive en deux stades floraison et fructification.

L'efficacité des dilutions est démontrée après 2 jours d'incubation aux deux stades, au 4 jour, la distance entre le disque et le champignon diminue plus rapidement dans le stade floraison que dans le stade de fructification. Et la distance entre le disque et le champignon la continue de diminuer au stade de la fructification plus qu'au stade de la floraison jusqu'au 10 jours.

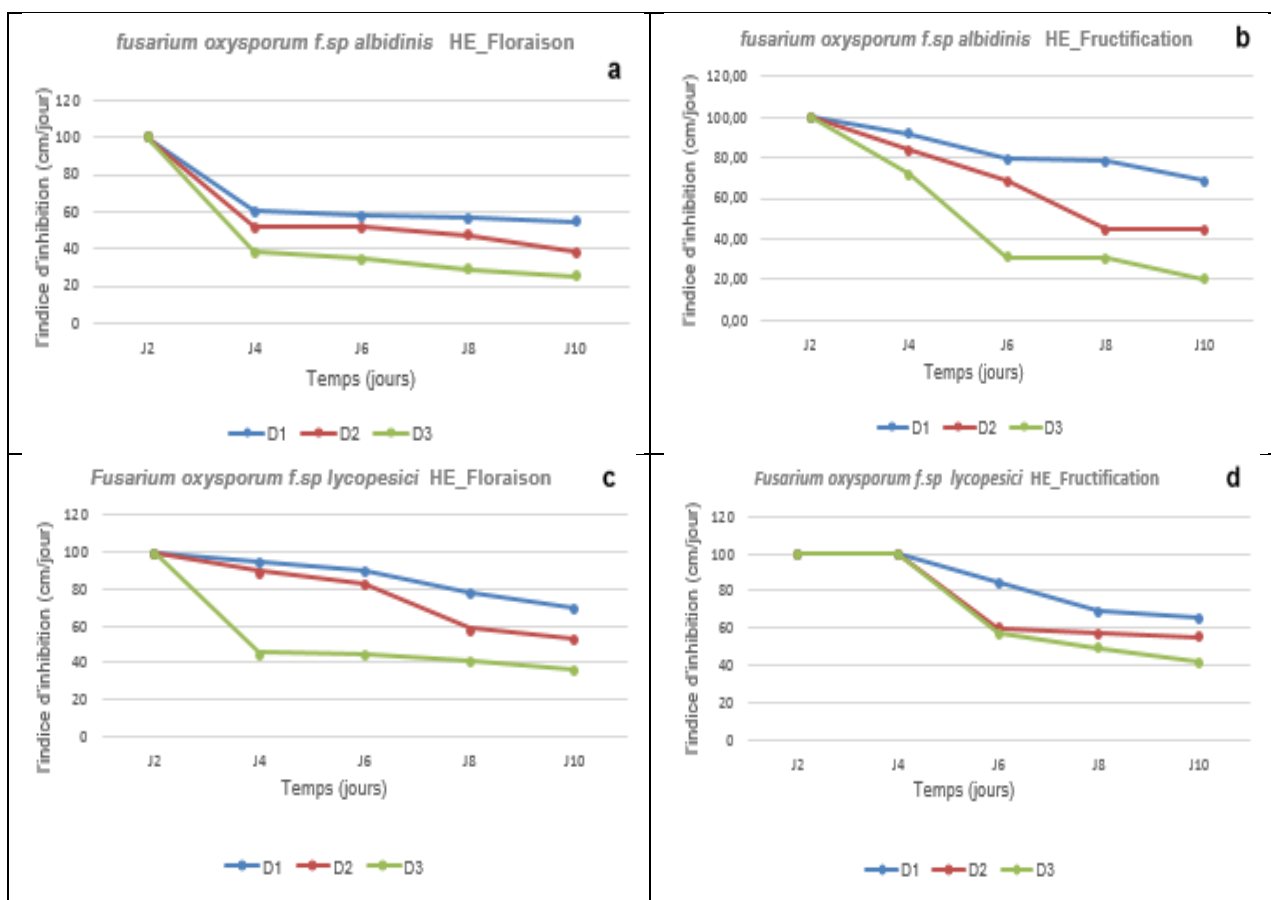


Figure 14 : Variation temporelle de l'indice d'inhibition

La Figure(14) (c, d), représente l'évolution mycélienne de *Fusarium Lycopersici* Enregistrant des taux d'inhibition de la dépendance sur le degré de concentration des dilutions utilisées avec l'engagement d'une gradation positive en deux stade floraison et fructification.

L'efficacité des dilutions est démontrée après 2jours d'incubation dans le stade floraison et se démontrée dans le stade fructification après 2 jours d'incubation pour D3 et après 4 jours d'incubation pour D1 et D2, D3 reste constant jusqu'au jour 4 dans stade floraison et que D1 et D2 dans le stade fructification la distance entre le disque et le champignon la continue de diminuer moins Par rapport au stade de floraison jusqu'au 10jours.

Le test de Wilcoxon est avancé dans le but d'apprécier la variation d'abondance dans chaque point d'échantillonnage. La comparaison des effectifs dans chaque boîte d'observation montre une les abondances ne présentent aucune différence au niveau des blocs expérimentaux (tableau 05).

Selon le teste de Wilcoxon, on remarque que dans les deux blocs floraison et fructification affiche une différence significative au niveau de tous les dilutions

Tableau 05 : Comparaison par paire des paliers temporels de l'évolution de *Fusarium f .sp. Albedinis* sous l'effet des huiles essentielles

| | | | | | | | |
|----------------------|---------------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|
| HE Floraison | | D1 | D2 | D1 | D3 | D2 | D3 |
| | N | 5 | | 5 | | 5 | |
| | Moyenne | 65,64 | 57,66 | 65,64 | 45,29 | 57,66 | 45,29 |
| | Médiane | 57,56 | 51,47 | 57,56 | 34,63 | 51,47 | 34,63 |
| | Test Wilcoxon | 0,0379* | | 0,0301* | | 0,0422* | |
| HE Fructification | | D1 | D2 | D1 | D3 | D2 | D3 |
| | N | 5 | | 5 | | 5 | |
| | Moyenne | 83,68 | 68,27 | 83,68 | 50,56 | 68,27 | 50,56 |
| | Médiane | 79,44 | 68,62 | 79,44 | 30,94 | 68,62 | 30,94 |
| | Test Wilcoxon | 0,0342* | | 0,0458* | | 0,0405* | |

* :

Significative à 5%

Selon le teste de Wilcoxon, on remarque dans les deux blocs floraison et fructification affiche une différence significative. Au bloc floraison affiche une différence significative au niveau de toutes les dilutions, par conter au bloc fructification affiche une différence non significative au niveau de toutes les dilutions (tableau 06).

Tableau 06 : Comparaison par paire des paliers temporels de l'évolution de *Fusarium f.sp lycopersici* sous l'effet des huiles essentielles

| | | | | | | | |
|----------------------|---------------|----------------------|-------|---------------------|-------|---------------------|-------|
| HE Floraison | | D1 | D2 | D1 | D3 | D2 | D3 |
| | N | 5 | | 5 | | 5 | |
| | Moyenne | 86,74 | 77,09 | 86,74 | 53,76 | 77,09 | 53,76 |
| | Médiane | 90,48 | 83,35 | 90,48 | 45,11 | 83,35 | 45,11 |
| | Test Wilcoxon | 0,0437* | | 0,0447* | | 0,0379* | |
| HE Fructification | | D1 | D2 | D1 | D3 | D2 | D3 |
| | N | 5 | | 5 | | 5 | |
| | Moyenne | 83,71 | 74,50 | 83,71 | 69,44 | 74,50 | 69,44 |
| | Médiane | 84,43 | 60,23 | 84,43 | 56,81 | 60,23 | 56,81 |
| | Test Wilcoxon | 0,1025 ^{NS} | | 0,225 ^{NS} | | 0,325 ^{NS} | |

NS : Non significative, * : Significative à 5%

Selon les histogrammes de l'indice d'inhibition suivant (fig. 15) en a remarqué que les deux champignons sont différents ente aux dans le stade de floraison (a et b) mais dans le stade de fructification le *Fusarium lycopersici* sont pas différent entre eux

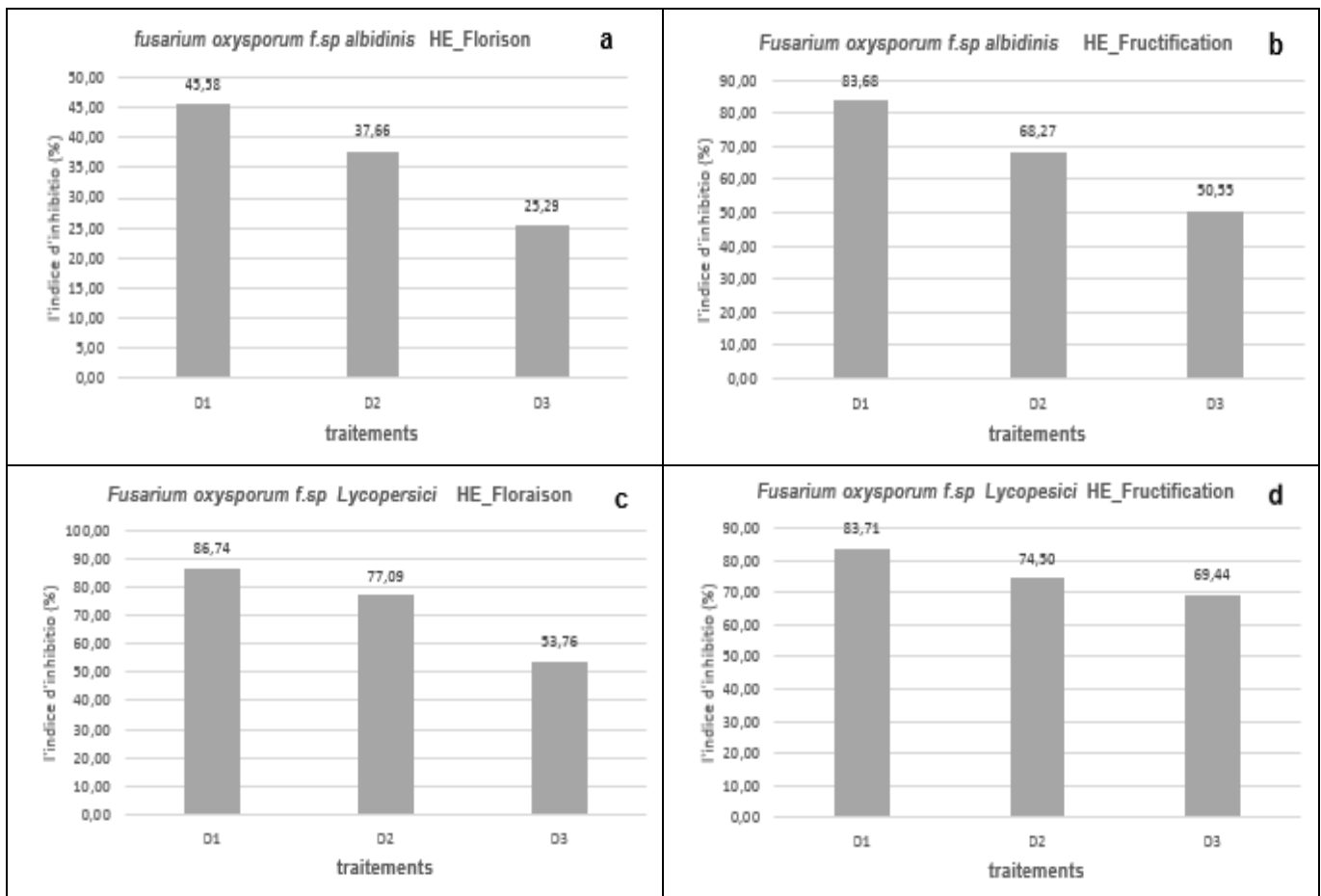


Figure 15 : Variation de l'indice d'inhibition sous l'effet de l'indice phénologique et les dilutions

L'analyse ANOVA nous a dressé les profils temporels des taux d'inhibition selon les différentes dilutions testées par la méthode de diffusion par disque. L'effet de la formulation à base du DMSO est significativement différent car il affiche une inhibition quasi constante au cours du temps d'incubation appart le champignon *Fusarium sp* dans le stade fructification c'est non significatif (fig.16)

| <i>fusarium oxysporum f.sp albidinis</i> HE Floraison a | | | | | | <i>fusarium oxysporum f.sp albidinis</i> HE_Fructification b | | | | | |
|---|-------------|----|-------------|--------|---------|--|-------------|----|-------------|------|---------|
| | Sum of sqrs | df | Mean square | F | p(same) | | Sum of sqrs | df | Mean square | F | p(same) |
| Between groups: | 1050,93 | 2 | 525,464 | 0,8193 | 0,4639 | Between groups: | 2746,07 | 2 | 1373,03 | 2,18 | 0,1558 |
| Within groups: | 7696,28 | 12 | 641,356 | | | Within groups: | 7559,12 | 12 | 629,927 | | |
| Total: | 8747,2 | 14 | | | | Total: | 10305,2 | 14 | | | |

| | D1 | D2 | D3 |
|----|--------|--------|--------|
| D1 | | 0,8738 | 0,4375 |
| D2 | 0,7041 | | 0,7264 |
| D3 | 1,796 | 1,092 | |

| | D1 | D2 | D3 |
|----|-------|--------|--------|
| D1 | | 0,6082 | 0,1346 |
| D2 | 1,373 | | 0,5233 |
| D3 | 2,95 | 1,577 | |

| <i>fusarium oxysporum f.sp lycopersici</i> HE_Floraison c | | | | | | <i>fusarium oxysporum f.sp lycopersici</i> HE_Fructification d | | | | | |
|---|-------------|----|-------------|-------|---------|--|-------------|----|-------------|--------|---------|
| | Sum of sqrs | df | Mean square | F | p(same) | | Sum of sqrs | df | Mean square | F | p(same) |
| Between groups: | 2876,19 | 2 | 1438,09 | 3,466 | 0,06485 | Between groups: | 522,962 | 2 | 261,481 | 0,4824 | 0,6288 |
| Within groups: | 4978,84 | 12 | 414,904 | | | Within groups: | 6504,71 | 12 | 542,059 | | |
| Total: | 7855,03 | 14 | | | | Total: | 7027,67 | 14 | | | |

| | D1 | D2 | D3 |
|----|-------|--------|---------|
| D1 | | 0,7399 | 0,06047 |
| D2 | 1,06 | | 0,2076 |
| D3 | 3,621 | 2,562 | |

| | D1 | D2 | D3 |
|----|-------|--------|--------|
| D1 | | 0,8095 | 0,6095 |
| D2 | 0,884 | | 0,9374 |
| D3 | 1,37 | 0,486 | |

Figure 16 : Etude comparée de l'indice d'inhibition sous l'effet de l'indice phénologique et les dilutions

(Analyse de la variance renforcée par le test de comparaison par paire de Tukey)

Discussion

Chapitre IV : Discussion

1. Le rendement d'extraction

Le rendement en pourcentage des feuilles d'huile essentielle de *Citrus aurantium L* des deux stades phénologique sont faibles et proches. Les résultats d'analyse par CG/SM, selon l'indice phénologique, montre la présence de certains composés dans le stade fructification avec différents pourcentages par rapport au stade floraison. Notamment, le limonène avec 3,03%, le nerol avec 3,98% dans le stade fructification alors que dans le stade floraison, le limonène enregistre 1,61%, et le nerol affiche 1,78%. Les résultats obtenus sont confirmés par les travaux d'**Abad et al. (2006)**], où ils ont montré l'existence d'une variation marquée pendant le stade de fructification, bien que les quantités des composés maximales aient été aperçues au cours du stade floraison.

2. Effet de l'indice phénologique sur l'activité antifongique des huiles essentielles de bigaradier *Citrus aurantium L*

Les résultats de l'activité antifongique des huiles essentielles de *Citrus aurantium L* du stade fructification, montre un effet plus importantes sur les deux champignons *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* et *Fusarium oxysporum f.sp. Albedinis*, par rapport à l'effet des huiles essentielles du stade floraison. La différence dans l'activité antifongique dans les huiles des deux stades phénologique de *Citrus aurantium L*. est liée à la présence de certains composés dans stade fructification qui sont absente dans le stade floraison, ainsi que le ratio des composés qui s'affiche à des proportions différentes. Les travaux de **McGaw et al. (2002)**, ont signalé que les extraits de la même plante recueillie à différents stades phénologique présentaient des activités biologiques différentes.

3. Effet des dilutions sur l'activité anti fongique des huiles essentielles de bigaradier *Citrus aurantium L*

La susceptibilité fongique à l'huile essentielle de *Citrus aurantium L* montre des pourcentages d'inhibition. Les résultats ont montré aussi que toutes les concentrations ont un pouvoir inhibiteur sur la croissance mycélienne par rapport au témoin, dont les concentrations allant de 600 µl/ml à 800 µl/ml s'avèrent les plus importantes envers l'espèce représentative du genre *Fusarium* (*Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*) dans le stade fructification. La reprise de la croissance mycélienne a été après 4 jours de l'incubation, par rapport à celle de la concentration 400 µl/ml où la reprise a été signalée après 2 jours de l'incubation. Ce qui nous permet d'avancer l'hypothèse sur la forte présence de composés volatils regroupant les monoterpènes comme composés majoritaires dans les concentrations les plus élevées. Il a été signalé que les monoterpènes représentent une activité anti bactérienne très importante, l'hypothèse avancée, est confirmée par plusieurs études qui relient le pouvoir antifongique des huiles essentielles des citrus à leur composition chimique (**Matasyoh et al., 2007**), annoncent que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est censée être associée à des composants phytochimiques tels que les monoterpènes.

Une réduction dans la concentration de l'huile essentielle entraîne une diminution dans le pouvoir inhibiteur de celle-ci avec toutes les espèces fongiques. Les huiles essentielles des citrus sont un mélange complexe de composés volatils qui présentent une activité antifongique en réduisant ou inhibant totalement la croissance fongique (**Viuda-Martos et al., 2008**).

(**Caccioni et al., 1998**), ont déduit une corrélation positive entre l'activité antifongique et la teneur en monoterpènes. **Singh et al. (2010)** rapportent que ces derniers sont reconnus comme de bons composés fongitoxiques.

Van Hung et al. (2013), rapportent que la croissance mycélienne diminue avec l'augmentation de la concentration en huile essentielle de *Citrus reticulata*. Ils obtiennent un Plc de 50.9 % vis-à-vis de *Fusarium proliferatum*.

Les composés chimiques tels le limonène, caryophyllène oxyde, α -pinène, β -pinène, α -terpinéol et le citral ont des activités antifongiques et antibactériennes ; composés largement présents dans la composition chimique des huiles essentielles des *Citrus* **(Matasyoh et al., 2007)**.

Les composés chimiques tels le limonène, caryophyllène oxyde, α -pinène, β -pinène, α -terpinéol et le citral ont des activités antifongiques et antibactériennes ; composés largement présents dans la composition chimique des huiles essentielles des citrus **(Matasyoh et al., 2007)**.

Mais avec le champignon *Fusarium oxysporum f.sp.Albedinis*, la reprise de la croissance mycélienne dans les trois concentrations de 400 μ l/ml, 600 μ l/ml, 800 μ l/ml dans les deux stades été le même temps après 2 jours de l'incubation avec un gradient positif (D1>D2>D3). Les résultats nous permettent d'avancer l'hypothèse que les huiles essentielles n'exercent pas le même effet sur tous les champignons, chaque huile essentielle est unique dans sa composition et chaque champignon ou bactérie diffère considérablement en structure et en fonctionnalité **(Elgayyar et al., 2001)**.

Conclusion

Conclusion

Au terme de cet aspect réservé à l'évaluation de l'activité antifongique en deux stades phénologique différents (fructification et floraison) de l'huile essentielle de *Citrus aurantium L.* à savoir les dilutions de DMSO vis à vis d'un champignon phytopathogène (*Fusarium oxysporum f.sp lycopersici* et *Fusarium oxysporum f.sp.albedinis*), nous pouvons dégager les résultats suivants :

Les résultats ont montré que dans la même plante mais dans deux stades différents les composés de l'huile essentielle varie selon le stade phénologique en suite l'activité de l'huile sur la croissance mycélienne donnant des différents effets

Toutes les dilutions ont montré un fort pouvoir inhibiteur sur la croissance mycélienne qui est proportionnel avec les concentrations et ceci avec l'espèce représentative du genre *Fusarium*. Cette démarche, nous a permis de prouver que l'action biocide est fortement liée que la forte présence en composés volatils regroupant les monoterpènes comme composés majoritaire dans l'huile essentielle de *Citrus aurantium L.* et la capacité de sa libération

Selon les taux d'inhibitions obtenues, l'efficacité a été démontrée pour toutes les préparations. Cette caractéristique propre aux différents stades phénologique se voit distincte par méthode de diffusion par disque.

À la lumière des résultats obtenus, le travail ouvre la voie à d'autres perspectives. Dans le but de recherches concernant la relation entre la composition chimique de l'huile essentielle de *Citrus aurantium L.* dans deux stades phénologique différents et l'activité antifongique des huiles essentielles. Il serait intéressant de compléter le travail plus particulièrement par : (i) L'étude des facteurs influençant la composition chimique des huiles essentielles à savoir, (ii) L'étude de l'effets des différents types de nutrition minérale et organique sur la composition des huiles essentielles et par conséquent sur ses l'activité antimicrobienne

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abad M.J., Bessa A.L., Ballarin B., Aragon O., Gonzales E., Bermejo P.,

2006 - Anti-inflammatory activity of four Bolivian Baccharis species

(Compositae). Journal of Ethnopharmacology. 103, pp: 338-344.

AFNOR, 1996. Huiles essentielles. Volume 1 : échantillonnage et méthodes d'analyse. AFNOR, Paris, 440p.

Akthar M.S., Degaga B., et Azam T., 2014. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms. Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research. 2(1): 001-007.

Alavi S-H-R., Yassa N. et Fazeli M-R.(2005). Chemical constituents and antibacterial activity of essential oil of Peucedanum ruthenicum M. Bieb. Fruits. SHR IJPS 1 (4):217-222.

Anonyme., 2019. <http://fr.db-city.com/--cherchell> consulté le 12/06/2019 à 16h40.

w

Anton R., et Lobstein A., 2005. Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed. Tec. & Doc., Paris, 522p.

Aouni M., Pelen F., et Soulimani R., 2013. Étude de l'activité antimicrobienne d'un mélange de 41 huiles essentielles et domaines d'application, phytothérapie. 11(4): 225 -236.

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., et Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology* 4(6): 446–475.

Braga, J., McNally, J. G. & Carmo-Fonseca, M. (2007) - A reaction-diffusion model to study RNA motion by quantitative fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys J*, 92, 2694-2703.

Baser K.H.C., et Buchbauer G., 2010. Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications. Ed Taylor & Francis Group. 994p.

Belleau F., 1990. Analyses des huiles essentielles du *Ledum groenlandicum*. Thèse, Uni. du Québec. Pp :13-16.

Benayad N., 2008. Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Thèse. Univ. Mohammed V – Agdal. Rabat, 63p.

Besombes C., 2008. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse. Univ. de La Rochelle, 289p.

Boussaada O., et Chemli R., 2007. Seasonal Variation of Essential Oil Composition of Citrus Aurantium L. var. amara. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 10(2): 109-120.

Boz I., Burzo I., Zamfirache M.M., Toma C., et Padurariu C., 2009. Glandular trichomes and essential oil composition of Thymus pannonicus All. (Lamiaceae). Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Biologie, pp.36-39.

Brada M., Bezzina M., Marlier M., Carlier A., et Lognay G., 2007. Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de Mentha rotundifoliadu Nord de l'Algérie. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement. 1(1): 3-7.

Bruneton J., 1993. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2ème Ed. Lavoisier. pp : 385 – 623.

Bruneton J., 1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. Tec & Doc. pp: 461 – 769.

Burt S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. International Journal of Food Microbiology .9(4): 223-253.

Caccioni D. R.L., Guizzardi M., Biondi D .M., Renda A., et Ruberto, G., 1998. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and

antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Food Microbiology* ,4(3) :73–79.

Cahagnier B., et Richard-Molard D., 1998. - Moisissures des aliments peu-hydratés, les moisissures. Collection sciences et techniques agroalimentaires. Ed. : Lavoisier. pp: 39-41.

Carette A.S., 2000. La lavande et son huile essentielle. In Besombes C., 2008. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse. Univ. de La Rochelle, 289p.

Carré P., (1953) – Précis de technologie et de chimie industrielle. Ed. Ballière JB. et fils, 238p.

Chami F., 2005. Evaluation in vitro de l'action antifongique des huiles essentielles d'origan et de girofle et de leurs composés majoritaires in vivo application dans la prophylaxie et le traitement de la Candidose Vaginale sur des modèles de rat et de souris immunodéprimés. Thèse, Univ. Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc, 266p.

Cheng Y.S., et Lee C.S., 1981. Composition of leaf essential oils from ten Citrus species. *Proceedings of the National Science Council*.5: 278- 283.

Chiron F., 1996. Synthèse d'hydro peroxyde de terpenes. Relation avec l'activité antimicrobienne et application à la synthèse de poly terpenes hydroperoxydes. Mémoire. Ing. CNAM. Paris.70p.

Chutia M., Deka Bhuyan P., Pathak M.G., Sarma T.C., et Boruah P., 2009.

Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *Food Science and Technology* 4(2): 777–780.

Clarke S., 2008. Chemistry of essential oil. 1st Ed. ELSEVIER. British, 302p.

Coret J., et Chamel A., 1994. Surfactant and citiculaire penetration of herbicides.

Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R., et Wyllie S.G., 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.*88, pp: 170–175.

Daghbouche S., Daghbouche A., Boulessnam A., Snoussi S.A., et Djazouli

Z.E., 2017. Variation phénologique du contenu phytochimique et de l'activité antibactérienne de *Cytisus triflorus* l'Her. *Agrobiologia* 7(2): 548-561.

Degryse A., Delpalala I. et Vvoïnier M., 2008. Risque et bénéfices possibles

Huiles essentielles. École des hautes études en santé publique, pp : 2-44.

Delespaul D., De Billerbeck V.G., Roques C.G., Michel G., Marquier -Vinuales, C., et Bessiere J.M., 2000. The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. *Journal of Essential Oil Research*, 12: 256–266.

Desjardins A.E., 2006. *Fusarium Mycotoxins. Chemistry, Genetics and Biology.* Ed .APS Press, St. Pau. 260p.

Desjardins A.E., et Proctor R.H., 2007. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *Int. Journal of Food Microbiology*, 11(9): 47–50.

Dugo G ., et Di Giacomo A., 2004. *Citrus : the Genus citrus.* 2 Ed Taylor and Francis London. 642 p.

Edris A.E. et Abd El-Galeel M.A.S., 2010. Solubilization of some flavor and fragrance oils in surfactant/water system. *World Applied Sciences journal* 8(1): 86 - 91.

Elgayyar M., Draughon F.A. Golden D.A et Mount J.R., 2001. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selectes pathogenic and saprophytic microorganisms. *J. Food protects*, 64 : pp 1019-1024.

F.A.O., 2012. *Agrumes, frais et transformés ; rapport statistiques annuelles*

(CCP:CI/ST/2012). Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture.46 p

FAOSTAT., 2014. Disponible sur le site FAOSTAT.fao.org

Farid B., 2011. Encyclopédie des plantes utiles. 1. Production.alger.72p.

Farhat A.,Tixier ASF., El Maataoui M , Maingonnat JF,Romdhane M., et Chemat F., 2011. Microwave steam diffusion for extraction of essential oil from orange peel, extract's global yield and mechanism Food Chemistry, 125 (1): 255-261.

Fisher K., et Phillips C., 2008. Potential antimicrobial use of essential oils in foods: is citrus the answer? Food Science and Technology.19(2): 156–164

Garnéro J., 1996. Huiles essentielles. Techniques de l'Ingénieur, traité Constantes physicochimiques; K 345-1, 39p.

Gauvrit C., et Cabanne F., 1993. Oils for weed control: uses and mode of action, Pestic. Sci. 3(7):147-153.

Gauvrit C., 1994. Oils in plant protection: herbicide case study. Phytoma.45(8): 37-38

Goetz P., 2014. Cédrat: *Citrus medica* L. (Rutacées). *Phytothérapie*.12(2): 122-124.

Griffin S.G., Markham J.L., et Leach D.N., 2000. An agar dilution method for the determination of the minimum inhibitory concentration of essential oils. *J. Essential Oil Research*, 12(3): 249-255.

Gumus T., Demirci A S., Sagdic O., et Arici M., 2010. Inhibition of Heat Resistant Molds: *Aspergillus fumigatus* and *Paecilomyces variotiiby* Some Plant Essential Oils. *Food Science and Biotechnology*, 19(5): 1241-1244.

Hazzit M., 2002. Arômes alimentaires. Thèse magister, USTHB, Alger. 96p.

Hoet S., Stevigny C., Herent M.F., et Quetin-Leclercq J., 2006. Antitrypanosomal compounds from leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. *Planta Medica*, 7(2): 480–482.

Ipek E., Zeytinoglu H., Okay S., Tuylu B.A., Kurkcuoglu M., et Husnu Can Baser K., 2005. Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum oil* and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chemistry*, 93(5): 551–556.

Jacquemond C., Curk F., et Heuzet M., 2013. Les clémentiniers et autres petits agrumes. *Savoir faire* .Ed Quae. France.367p.

Janssen A. M., Scheffer J. C., et Baerheim Svendsen , A., 1987. Antimicrobial Activity of Essential Oils. Aspects of the Test Methods. *Planta Medica*.53: 395-398.

Jing L., Lei Z., Li L., Xie R., Xi W ., Guan Y., Sumner L W., et Zhou Z., 2014. Antifungal of citrus essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62 (14) : 3011 -3033.

Kalemba D. et Kunicka A ., 2003. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(7): 813-829.

Kaufmann B., et Christen P., 2002. Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochem. Anal.* 13,pp:105-113.

Kerboua M., 2002. L'agrumiculture en Algérie in : D'Onghia A.M. (ed.), Djelouah K. (ed.), Roistacher C.N.(Ed.). *Proceedings of the Mediterranean research network on certification of citrus (MNCC): 1998-2001.* Bari : CIHEAM, Options Méditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches, 43(3) :21-26.

Kucukbay F, Yildiz B, Kuyumcu E., et Gunal S., 2011. Chemical Composition and Antimicrobial Activities of the Essential Oils of *Teucrium orientale* var. *orientale* and *Teucrium orientale* var. *puberulens*. *Chemistry of Natural Compounds*, 47(5): 833-836.

Lahlou M., 2004. Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research* 18(2) : 435-448.

Lansing, J. S., Cox, M. P., Downey, S. S., Janssen, M. A., et Schoenfelder, J.

W., 2003. A robust budding model of Balinese water temple networks. *World Archaeology*, 41(1): 112-133.

Lee H.S., 2007. Fungicidal property of active component derived from *Acorus gramineus* rhizome against phytopathogenic fungi. *Bioresource Technology*. 98(8): 1324–1328.

Lesley B., 1996. *Plantes médicinales et aromatiques*, Ed. Lavoisier. Paris. pp :58-61.

Leslie J. F., et Summerell B. A., 2006. *The Fusarium Laboratory manual*. Ed Wiley (Blackwell Publishing: Iowa, USA).388p.

Lucchesi M.E., Chemat F., et Smadja J., 2004. Solvent free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs. Comparison with conventional hydro-distillation. *J. Chromatogr. A* 104(3): 323-327.

Lucchesi M. E., 2005. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception

et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse. Univ. de La Réunion, 72p.

Lucienne M., 2010. Les Plantes Médicinales d'Algérie 2eme Ed. vol 239, P56.

Manner H.I., Buker R.S., Smith.V.E., Ward .D ., et Elevitch .C.R., 2006. Citrus species (citrus), ver.2.1.In Elevitch, C.R (Ed) . Species profiles for Pacific Island Agroforestry . Permanent Agriculture Resources (PAR), Holualoa, Hawai150p.

Marriott P.J., Shellie R., et Cornwell C., 2001. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. Journal of Chromatography A, 93(6) : 1-22.

Maruzzella J. C., et Sicurella N. A., 1960. Antibacterial activity of essential oil vapours. J. American Pharmaceutical Association, 49(4): 692-694.

Matasyoh J .C., Kiplimo J. J., Karubiu N .M., et Hailstorks T. P., 2007. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of Tarchonanthus camphorates. Food Chemistry, 101(3): 1183–1187.

McGaw L.J., Jäger A.K., Van Staden J., 2002 - Variation in antibacterial activity of Schotia species. South African Journal of Botany. 68, pp: 41–46.

Michele B., 2010. L'huile essentielle de l'Oranger amer « petit grain bigarade.

Aromathérapie au service des soins esthétiques. 235p.

Mohammedi Z. (2006). Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse magistère. Université de Tlemcen: 104P.

Mohammedi Z., 2013 - Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie. 84p.

Monajemi R., Oryan S., Haeri-roohani A., Ghannadi A., et Jafarian A .,2005.

Cytotoxic effects of essential oils of some Iranian Citrus peels. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 3(7): 183-187.

Moretti A. N., 2009. Taxonomy of Fusarium genus, a continuous fight between lumpers and splitters. Zbornik Matice srpske za prirodne nauke / Proc. Nat. Sci, Matica Srpska Novi Sad. 117(2): 7-13.

NDO E., 2011. Evaluation des facteurs de risques épidémiologiques de Phaeoramulariose des agrumes dans les zones humides du cameroun. Thèse. Univ. Montpellier.89p.

O'Donnell K., Rooney A.P., Proctor R.H., Brown D.W., McCormick S.P., et Ward

T.J., 2013. Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 strongly support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important

fusaria. *Fungal Genetics and Biology*, 52(2): 20–31.

Olivero-Verbel J., González-Cervera T., Güette-Fernandez J. Jaramillo-Colorado B., et Stashenko E., 2010. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants. *Brazilian J. Pharmacognosy* 20(4):568-574.

Ownagh A., Hasani A., Mardani K. et Ebrahimzadeh S. (2010). Antifungal effects of thyme, agastache and satureja essential oils on *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Fusarium solani*. *Veterinary Research Forum*. 2:99-105.

Pawar V., et Thaker V., 2006. In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. *Mycoses*, 785(49): 316-323.

Phillips C.A., Laird K., et Allen S.C., 2012. The uses of Citri-V™®-Year antimicrobial citrus essential oil vapor for the control of *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus Niger* and *Alternaria alternata* in vitro and on food, *Food Research International*, 47(2): 310–314.

Pingot A., 1998. Les huiles essentielles. Ed. Tec. & Doc. Paris, pp:230-236.

Piochon M., 2008. Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore aurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et héli-synthèse. Thèse. Univ. du Québec, pp:5-9.

Prashar A., Hili P., Veness R.G., et Evans, C.S., 2003. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*, *Phytochemistry*, 63(11): 569–575.

Regnier T., Combrinck S., Veldman W., et Du Plooy W., 2014. Application of essential oils as multi-target fungicides for the control of *Geotrichum citris aurantii* and other post harvest pathogens of citrus. *Industrial Crops and Products*, 61(4):151–159.

Salle J., 1991. les huiles essentielles. Ed. Frison-Roche. Paris, 166p.

Samadi M., Abidin R., Yunus D., Biak R., Yoshida H. et Lok E.H.,(2017) – Assessing the Kinetic model of hydro-distillation and chemical composition of *Aquilaria malaccensis* leaves essential oil” *Chinese Journal of Chemical Engineering*. Volume 25, Issue 2. Pages 216-222.

Sharma N., et Tripathi A., 2006.Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* post-harvest pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(8): 587-593.

Sharma N. et Tripathi , A.; 2008. Effects of *Citrus sinensis* (L) Obseck epecarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus Niger* (L) Van Tieghem . *Microbiological Research*, 163(3): 337-344

Seguin E., 2001. Le préparateur en pharmacie « Botanique - Pharmacognosie - Phytothérapie-Homéopathie ». Ed. O.P.U, Alger. 208p.

Singh B., Bhupinnder S. et Annette C., (2006) – Characterisation and evaluation of biochars for their application as a soil amendment. Australian of journal of Soil Research 8p.

Singh P. , Shukla R. , Prakash B ., Kumar A., Singh S., Mishra A. K., et Dubey N. K., 2010. Chemical profile, antifungal, antiaflatoxicogenic and antioxidant activity of Citrus maximaBurm. and Citrus sinensis(L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. Food and Chemical Toxicology, 48(12): 1734–1740.

Stolzenberg. G. E., 1989. Adjuvent and Agrochemicals. Ed. Chow P.N.P, Boca Raton Florida. USA.VOL.1; pp:17-25.

Van Hung P ., Thi Lan Chi P., et Thi Lan Phi N., 2013. Comparison of antifungal activities of Vietnamese citrus essential oils, Natural Product Research. Formerly Natural Product Letters, 27(4-5): 506-508,

Vitoratos A., Bilalis D., Karkanis A., et Efthimiadou A., 2013. Antifungal activity of plant essential oils against Botrytis cinerea, Penicillium italicumand Penicillium digitatum. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici,41(12): 86-92.

Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernandez-Lopez J., et Perez-Alvarez J., 2008. Antifungal activity of lemon (*Citrus limon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*, 19(8): 1130–1138.

Weiland J.J., et Sundsbak J.L., 2000. Differentiation and detection of sugar beet fungal pathogens using PCR amplification of actin coding sequences and the ITS region of the rRNA gene. *Plant Disease*. 84 (4): 475- 482.