

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 Aromatiques et Médicinales

Thème

Impact de la formulation sur les potentialités antimicrobiennes de l'huile essentielle de bigaradier
« *Citrus aurantium L.* »

Présenté par : **Mme OULEBSIR CHAHINEZ**

Devant les membres de jury composé de :

Mr. EL HADI D.	Professeur	U. Blida 1	Président
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 2017/2018

Remerciements

Avant toutes choses, je remercie Dieu, le tout puissant qui m' a donné la force et la patience.

*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.*

*J'adresse toute ma gratitude et mon profond respect au P^r **Elhadi D.** qui me fait l'honneur de présider le jury.*

*Mes respects et mes sincères remerciements vont à Mme **Belguendouz R** d'avoir bien voulu accepter d'être membre de jury et d'examiner ce travail*

*Un grand merci au Mr **Moussaoui K** pour son aide.*

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 , je suis reconnaissante à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce travail :

A mes très chers parents,

Je leurs dit, merci pour vos chaleureuses pensées, encouragement et surtout vos conseil et vos bénédictions.

A **ma mère**, sans toi je ne pourrais jamais être ce que je suis.

A mon très cher mari **Saleh Eddine**, je le remercie pour sa patience, sa compréhension et son soutien.

A mes petits anges **Abdelmalek, Ilyes** et **Rayane**.

A mes chers frères **Elhadi** et **Anis**.

A la mémoire de ma belle mère qui nous a quitté en ce mois de ramadhan.

A tous les membres de ma famille et ma belle famille sans aucune exception.

A tous mes collègues et mes amis de la promo.

Chahinez.

Impact de la formulation sur les potentialités de l'activité biologique de l'huile essentielle du bigaradier *Citrus aurantium L.*

Résumé

Les produits biologiques sont recherchés pour leur efficacité dans plusieurs secteurs pharmaceutiques et agricoles. La formulation permet de sécuriser, de réduire et de préserver les ressources phytogénétiques tout en protégeant le principe actif. Notre étude a porté sur l'évaluation de l'activité antifongique des quatre formulations de l'huile essentielle des feuilles de *Citrus aurantium L.* à savoir la formulation en gel, au Tween, au DMSO et à l'acétone vis à vis d'un champignon phytopathogène (*Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*) suivant deux modes d'administration, par diffusion par disque et diffusion par micro-atmosphère. Les résultats ont montré que les diverses formulations expriment un fort pouvoir inhibiteur suivant le gradient des concentrations du principe actif. La caractéristique propre aux différentes formulations se voit distincte entre diffusion par disque et diffusion par micro-atmosphère. La formulation en gel est performante suivant les concentrations de l'huile essentielle pour les deux méthodes. Tandis que les préparations au DMSO et à l'acétone sont très performantes par diffusion par disque. 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, adjuvent, *Fusarium*, diffusion par disque, diffusion par micro-atmosphère.

Impact of the formulation on the potential of biological activity essential oil of citrus aurantium L.

Abstract

Organic products are sought after for their effectiveness in several pharmaceutical and agricultural sectors. The formulation helps to secure, reduce and preserve phytochemical resources while protecting the active ingredient. Our study focused on the evaluation of the antifungal activity about four formulations of the essential oil of *Citrus aurantium L.* namely the formulation on gel, Tween, DMSO and acetone with respect to a fungus phytopathogenic (*Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*) according to two modes of administration, by diffusion by disk and diffusion by micro-atmosphere. The results showed that the various formulations express a strong inhibitory power according to the gradient of the concentrations of the active principle. The specific characteristic of the different formulations is distinct between diffusion by disk and diffusion by micro-atmosphere. The gel formulation performs well according to the concentrations of the essential oil for both methods. While the preparation from DMSO and acetone is highly efficient by disk diffusion. 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, micro-atmosphere diffusion.

تأثير الصياغة على إمكانيات النشاط البيولوجي للزيت الأساسي للبرتقال الحامض

Citrus aurantium L.

ملخص

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

ركزت دراستنا على تقييم النشاط المضاد للفطريات لأربع مستحضرات من الزيت الأساسي ل

Citrus aurantium L. من هلام, *Tween*, *DMSO* و *Acétone* ضد فطريات ممرضة للنبات

(*Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*) بطريقتين لوضع الأقراص بطريقة النشر المباشر و

الانتشار عن طريق الجو الجزئي.

تحليل النتائج يبين أن الصيغ المختلفة تعبر عن نسبة تثبيط عالية وفقا لتدرج تركيز المادة الفعالة بحيث تتغير خاصية المستحضرات باختلاف كيفية وضع الأقراص.

بينت صياغة الهلام فعالية جيدة وفقا لتركيزات الزيت العطري لكلا الطريقتين في حين أن صياغة

DMSO و *Acétone* أظهرت كفاءة عالية من خلال الوضع المباشر للأقراص .

هذا المنهج يسمح لنا بصحة استخدام الزيوت الأساسية في مختلف المجالات المتعلقة بمحاربة الفطريات و البكتريا.

الكلمات الرئيسية: أوراق البرتقال المر, *DMSO*, *CG / MS*، الفطريات الممرضة للنبات، النشاط المضاد للفطريات،

نشر القرص المباشر ، وانتشار الأقراص بالجو الجزئي.

Liste des abréviations

AFNOR : Association française de normalisation

CG/SM : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie en masse

D : diamètre

DMSO : diméthylsulfoxyde

F1 : formulation en gel

F2 : formulation au Tween 80.

F3 : formulation au DMSO

F4 : formulation à l'acétone.

HE : huile essentielle

pH : Potentiel d'hydrogène

Liste des tableaux

Tableau. 1.	Pouvoir pathogène de la souche fongique.....	18
Tableau. 2.	Composition chimique de l'HE de <i>Citrus aurantium L</i>	26
Tableau. 3.	Taux d'inhibition de la croissance mycélienne.....	35

Liste des figures

Figure. 1	Présentation des limites de la région de Boufarik.....	16
Figure. 2	Présentation de <i>Citrus aurantium L.</i>	17
Figure. 3	Montage de l'appareil Clevenger du procédé de l'hydrodistillation	19
Figure. 4	Équipement d'analyse CG-SM.....	20
Figure. 5	Dépôt des disques selon la méthode de disque.....	22
Figure. 6	Dépôt des disques selon la méthode de micro atmosphère.....	23
Figure. 7	Variation des zones d'inhibition de <i>Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici</i> sous l'effet de la formulation en gel et au Tween	28
Figure. 8	Variation des zones d'inhibition de <i>Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici</i> sous l'effet de la formulation au DMSO et à l'Acétone.....	29
Figure. 9	Effets du temps, des concentrations et des formulation sur le pouvoir antifongique de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantium L.</i> par la méthode de diffusion par disque.....	31
Figure. 10	Evolution temporelle des zones d'inhibitions selon les formulations par la méthode de diffusion par disque.....	32
Figure. 11	Effets du temps, des concentrations et des formulations sur le pouvoir antifongique de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantium L.</i> par la méthode de diffusion par micro-atmosphère.....	33
Figure. 12	Evolution temporelle des zones d'inhibitions selon les formulations par la méthode de diffusion par micro-atmosphère.....	34
Figure. 13	Variation de la vitesse de croissance de <i>Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici</i> sous l'effet des différentes formulations et des modes d'administration.....	36

Table de matière

Introduction	01
Chapitre I Synthèse Bibliographique	03
1. Les Agrumes.....	04
1.1. Généralités sur les Agrumes.....	04
1.2. Caractéristiques botaniques.....	05
1.3. Taxonomie de <i>Citrus aurantium</i> L.....	05
1.3.1. Etymologie.....	05
1.3.2. Classification botanique.....	05
1.3.3. Propriétés thérapeutiques.....	05
1.3.4. Propriétés et usage thérapeutique de l'huile essentielle du bigaradier.....	05
2. Généralités sur les huiles essentielles.....	06
2.1. Bref historique.....	06
2.2. Définition.....	07
2.3. Biosynthèse et composition chimique.....	07
2.4. Extraction des huiles essentielles.....	08
2.5. Conservation des huiles essentielles.....	08
2.6. Stabilité des huiles essentielles.....	09
2.7. Intérêt de la formulation des huiles essentielles.....	09
2.8. Les tensioactifs.....	09
2.9. Mécanisme d'action des huiles essentielles des citrus sur les champignons.....	10
2.10. Composants volatiles vis-à-vis des champignons phytopathogènes....	10
2.11. Méthodes d'évaluation les plus courants de l'activité antifongique des huiles essentielles in vitro.....	11
2.11.1. Méthode des disques.....	11
2.11.2. Méthode micro atmosphère.....	11
2.12. Facteurs influençant l'évaluation de l'activité antifongique des huiles	

essentielles <i>in vitro</i>	12
2.12.1. L'huile essentielle.....	12
2.12.2. L'agent dissolvant.....	12
3. Aperçu sur l'espèce fongique sélectionnée.....	13
3.1 <i>Fusarium</i>	13
3.2 <i>Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici</i>	13
Chapitre II: Matériel et méthodes	16
1. Lieu et période d'étude.....	16
2. Présentation de la région de collecte du matériel végétale.....	16
3. Matériel d'étude.....	17
3.1. Présentation du matériel végétal.....	17
3.2. Reconnaissance botanique.....	17
3.3. Présentation de la souche fongique.....	17
3.4. Milieu de culture.....	18
4. Méthodes d'étude.....	18
4.1. Extraction des huiles essentielles de <i>Citrus aurantium L.</i>	18
4.2. Analyse chromatographique des huiles essentielles.....	19
4.3. Calcul du rendement en huiles essentielles.....	20
4.4. Préparation des différentes formulations de l'huile essentielle.....	20
4.5. Méthodes d'évaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle...	21
4.5.1. Préparation du milieu de culture.....	21
4.5.2. Préparation des dilutions des différentes formulations.....	21
4.5.3. Préparation des disques.....	21
4.5.4 Ré-isolement de la souche fongique.....	22
4.5.5. Préparation des disques mycéliens.....	22
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		25
1.	Estimation du rendement en huiles essentielles de <i>Citrus aurantium L.</i>	26
2.	Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantium L.</i> par la CG/MS.....	26
3.	Variation temporelle des zones d'inhibition de <i>Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici</i> sous l'effet des différentes formulations de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantium L.</i>	27
4.	Etude comparée de l'activité antifongique de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantium L.</i> sous l'effet des différentes concentrations et formulations.....	30
4.1.	Méthode de diffusion par disque.....	30
4.2.	Méthode de diffusion par micro-atmosphère.....	32
5.	Etude comparée de l'indice d'inhibition des différentes formulations de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantium L.</i> à l'égard de <i>Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici</i>	35
6.	Evaluation de la vitesse de croissance de <i>Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici</i> sous l'effet des différentes formulations de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantium L.</i>	35
Discussion		38
1.	Effet des dilutions sur l'activité anti fongique de l'HE de bigaradier.....	39
2.	Evaluation de l'efficacité des formulations sur les taux d'inhibitions de la croissance mycélienne de <i>Fusarium oxysporum f.sp lycopersici</i>	40
Conclusion		44
Référence Bibliographiques		45

Introduction

L'intérêt pour les biopesticides d'origine végétale, comme alternatifs aux applications fortuites d'une pharmacopée aveugle s'est développé, en particulier ceux qui préservent un environnement sain, biodégradables, non toxiques et spécifiques dans leur action, gagnent une attention considérable (**Tripathi et Dubey., 2004**). Ils sont également nécessaires pour combattre l'évolution de la résistance aux produits de synthèses (**Isman ,2000 ; Ishii, 2006 ; Laplace, 2006**).

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 de souches fongiques résistantes aux fongicides à base d'huiles essentielles est fortement improbable à cause de la composition souvent polymoléculaire de ces huiles et de l'action synergique de leurs constituants (**Bagamboula et al., 2004**).

L'exploitation des huiles essentielles dans la protection des végétaux est encore dans ses débuts, mais ces produits ont un potentiel fongicide prémuni pour remplacer les fongicides de synthèse. Des biofongicides à base d'huile essentielle sont mis sur le marché pour les agriculteurs pratiquant de l'agriculture biologique. Il s'agit du SporanTM (*Rosemarinus officianalis*) , PromaxTM (*T. vulgaris*), TrilogyTM (*A. indica*) et E-RaseTM (*Simmondsia californica*) (Isman et al, 2011).

Les huiles essentielles de *Citrus aurantium L.* sont utilisées dans plusieurs produits comme aromatisants et additives tels que les aliments, les jus, les produits cosmétiques et médicinaux. Elles sont utilisées pour leurs propriétés antioxydantes, germicides et anticancérigènes (**Mukhopadhaya, 2000 ;Sawamura, 2010**). Les huiles essentielles de *Citrus aurantium L.* occupent un large spectre des propriétés antifongiques qui sont dévoilées par les différentes formulations en leur permettant

d'être considérées comme des agents antimicrobiens efficaces dans le traitement de certaines infections et dans la lutte contre certains organismes phytopathogènes. Le but principal de la présente étude est d'évaluer les potentialités antifongiques d'une même huile essentielle sous diverses formulations. Le recours à ce type d'étude apportera une valeur ajoutée aux secteurs pharmaceutique et agricole, compte tenu de l'importance économique de la disponibilité du matériel végétal dans la production de produits antimicrobiens naturels

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 (**Jacquemond 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 mandarines suivent 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 s'est orienté de l'huile essentielle extraite des fruits de *Citrus* à celui des feuilles. Elles sont devenues une nouvelle source en huile essentielle vu leurs développements rapides et leurs disponibilités 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).

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*. (Lucienne, 2010).

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 (**Michele, 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 (**Michele, 2010**). Obtenus 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 affections comme l'acné, les dartres, les furoncles (**Michele, 2010**).

2. Généralités sur les huiles essentielles

2.1. Bref 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, Avicenne, 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 Gattefosse 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 Labiées, 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 terpénoïdes (isopréniques, monoterpènes, les sesquiterpènes, les diterpènes et les triterpènes) (**Bruneton, 1999; Seguin, 2001; Chami, 2005; Clarke, 2008; Baser & 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 dégradatif 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 extraire les huiles essentielles sont: l'hydrodistillation « water distillation » où le matériel végétal à extraire est en contact direct avec l'eau en ébullition, la vapeur d'eau produite entraîne avec elle les essences de la plante (**Belleau,1990; Pingot, 1998; Bruneton, 1999; Baser & Buchbauer, 2010**), entraînement à la vapeur « steam distillation » à la différence de l'hydrodistillation, 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**).

La distillation est la méthode la plus ancienne et, également, la plus utilisée (**Bruneton,1999**). En revanche, une remarque s'impose dès à présent, la distillation ne permet pas d'extraire la totalité des principes actifs lourds d'un végétal mais seulement les composés volatils entraînaibles. De plus, ces procédés présentent des inconvénients dus principalement à l'action de la vapeur d'eau ou de l'eau à l'ébullition, certains organes végétaux, en particulier les fleurs, sont trop fragiles et ne supportent pas les traitements par entraînement à la vapeur d'eau et par hydrodistillation (**Garnéro, 1996**).

Des techniques plus récentes, d'un emploi très limité, pourraient résoudre tous ces problèmes, comme l'enfleurage, les fluides subcritiques ou supercritiques, les micro-ondes, les fluides sous pression, etc. (**Kaufmann & Christen, 2002; Lucchesi et al., 2004; Lucchesi, 2005 ; Piochon, 2008**). Par exemple la distillation assistée par microonde fait aujourd'hui l'objet de beaucoup d'études et ne cesse d'être améliorée parce qu'elle présente beaucoup d'avantages : technologie verte, économie d'énergie et de temps, investissement initial réduit et dégradations thermiques et hydrolytiques minimisées (**Chiasson et al., 2001; Kaufmann & Christen, 2002; Lahlou, 2004; Lucchesi et al., 2004; Olivero-Verbel et al., 2010**).

2.5. Conservation des huiles essentielles

La conservation de l'huile essentielle exige certaines précautions indispensables si l'on veut éviter leur oxydation et leur dépolymérisation. Aussi il est intéressant d'utiliser des flacons en verre colorés ou opaques, bien bouchés, pour les préserver de l'air, de la lumière et des principaux agents de leur dégradation. (**Zhiri & Boudoux, 2005**).

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 H.E lors de l'application du produit (**Chiron, 1996**).

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

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 & 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

Ces buts multiples sont atteints grâce à des composés aux fonctions diverses : tensioactifs, solvants, dispersants (**Gauvrit & 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 (émulsionnant, 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 & 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 & 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'avérerait 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 monoterpènes 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 monoterpènes 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 phytopathogènes

Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles des citrus ont été longuement reconnues (**Fisher & Phillips, 2008**). La bibliographie consultée rapporte les pouvoirs inhibiteurs des huiles essentielles des citrus et de leurs composants volatils vis-à-vis des champignons phytopathogènes des genres : *Aspergillus* (*A. Niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. et A. 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 corréler 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**).

2.11.2. Méthode micro atmosphère

Pour la méthode micro atmosphère, elle consiste à déposer un disque de papier ou un récipient contenant une quantité d'huile essentielle au centre du

couvercle d'une boîte de Pétri sans que l'huile essentielle entre en contact avec la gélose ensemencée par les micro-organismes. La boîte est hermétiquement fermée (**Baser et Buchbauer, 2010**). Après incubation une zone d'inhibition se forme ce qui correspond à l'activité antimicrobienne. Cette méthode permet de déterminer seulement la CMI en atmosphère (CMI_{air}) (**Inouye et al., 2001; Nakahara et al., 2003**).

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. (**Kalembe 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 phytopathogènes 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 f.sp.lycopersici est l'espèce la plus destructive de la tomate (*Solanum lycopersicum 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)**.

Chapitre II: Matériel et méthodes

Notre travail consiste à étudier l'activité antifongique des huiles essentielles synthétisées chez le Bigaradier *Citrus aurantium L.*, de la région de Boufarik avant la phase de floraison à l'égard d'une espèce phytopathogène. L'activité antifongique est estimée selon diverse formulation de l'huile essentielle.

1. Lieu et période d'étude

L'ensemble de ce travail a été effectué au laboratoire de phytopharmacie du département des 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 Boufarik. Ce dernier se situe à 35 km au sud-ouest d'Alger, il s'étend en écharpe sur 5094 ha. Le long des parties centrales de la chaîne de l'Atlas Tellien, comprises entre les latitudes Nord 36°34' 0", et les longitudes Est 2°55' 0". (Fig.1) (**Anonyme, 2018**).



Figure.1: Présentation des limites de la région de Boufarik

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 Février et le mois de Mars 2018. Cette période couvre la phase phénologique de feuillaison (avant floraison) (Fig.2).



Figure.2: Présentation de *Citrus aurantium* L. (Originale, 2018)

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 des feuilles de *Citrus aurantium* L. 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.1: Pouvoir pathogène de la souche fongique utilisée (Lansing et al., 2003; Moretti, 2009 ;Lepoivre, 2003).

Souche fongique	Pouvoir phytopathogène
<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.

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 L.*

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de substances organiques aromatiques liquides qu'on trouve naturellement dans diverses parties des végétaux. Elles sont très concentrées, volatiles et sensibles à la décomposition sous l'effet de la chaleur (Hellal, 2011). C'est une technique d'extraction dans laquelle le solvant est l'eau. Elle peut être utilisée pour extraire des espèces insolubles dans l'eau. Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène. Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Sachant que la température d'ébullition d'un mélange est atteinte lorsque la somme des tensions de vapeur de chacun des constituants est égale à la pression d'évaporation, elle est donc inférieure à chacun des points d'ébullition des substances pures. Ainsi le mélange azéotropique « eau + huile essentielle » distillé à une température égale 100°C à pression atmosphérique alors que les températures d'ébullition des composés aromatiques sont pour la plupart très élevées. Il est ensuite refroidi et condensé. Une fois condensées, eau et molécules aromatiques du fait de leurs différences de densité, se séparent en une phase aqueuse (présenté par l'hydrolat) et une phase organique (dénudé par l'huile essentielle).



Figure.3 : Montage de l'appareil Clevenger du procédé de l'hydrodistillation (Originale 2018).

On place la matière végétale fraîche : 150 g dans 1,6 litres d'eau distillée en utilisant un appareil de type Clevenger selon la méthode préconisée dans la Pharmacopée européenne, l'extraction est effectuée durant trois heures, durée nécessaire à l'épuisement de la matière première (environ 90%) en huile essentielle, après on récupère les vapeurs refroidies. Enfin, les huiles essentielles sont récupérées dans des flacons en verre scellés puis conservées au réfrigérateur à 4°C. Le montage de l'hydrodistillation est représenté ci-dessus (Fig.3).

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.4) : 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 50 à 300°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.4: Équipement d'analyse CG-SM.

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 (RHE) est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M). Le rendement est exprimé en pourcentage, il est exprimé par la formule suivante (Boussaada et Chemli., 2007) :

$$\text{RHE}\% = (m_h / m_v) \times 100$$

Avec :

RHE : Rendement en huile essentielle en %.

M' : Masse d'huile essentielle en gramme.

M : Masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme

4.4. Préparation des différentes formulations 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 4 formulations à partir de l'HE de bigaradier, comme suit :

-Formulation 1 : l'HE obtenue a été formulée ainsi que son témoin positif en gel selon le protocole établi par (**Moussaoui et al., 2014**).

-Formulation 2 : l'HE obtenue a été formulée ainsi que le témoin positif par une substance le Polyoxyéthylènesorbitane monooléateselon le protocole établi par (**Hamdani et Allem., 2015**).

-Formulation 3 : l'HE obtenue a été formulée ainsi que le témoin positif par un solvant polaire organique (organosulfuré) le diméthylsulfoxydeselon le protocole établi par (**Daghbouche et al., 2017**).

-Formulation 4 : l'HE obtenue a été formulée ainsi que le témoin positif par un solvant organique, l'acétone selon le protocole établi par (**Daghbouche et al., 2017**).

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 deux méthodes à savoir ; la méthode de diffusion par disques (**Aouni et al., 2013**) et la méthode par micro atmosphère (**Inouye et al., 2001; Nakahara et al., 2003**).

4.5.1. Préparation du milieu de culture

Le PDA est le milieu de culture utilisé pour l'entretien des souches fongiques et la réalisation des tests antifongiques (**Davet et Rouxel., 1997**)

-Pomme de terre	200g
-Dextrose.....	20g
-Agar.....	15g
-L'eau.....	1l
-pH.....	6.8

4.5.2. Préparation des dilutions des différentes formulations

Pour les huiles essentielles toutes les dilutions ont été faites avec les diverse formulations où les concentrations testées étaient de 3200, 1600, 800, 400 et 200 µl/ml (**Kucukbay et al., 2011**)

4.5.3. Préparation des disques

Les disques sont préparées à partir du papier wattman de 6 mm de diamètre, ensuite elles sont mises dans un tube à essai, stérilisés à l'autoclave 20 minutes à 120°C, puis stockés à une température ambiante.

4.5.4. Ré-isolement de la souche fongique.

On a prélevé quelque colonie fongique à l'aide d'une anse de platine puis disposées sur le centre d'une boîte de pétri préalablement coulée du milieu de culture spécifique pour les champignons (PDA) puis incubés a 27c pendant 5 à 6 jours.

4.5.5. Préparation des disques mycéliens

Après incubation des disques mycéliens de 8mm de diamètre issu d'une culture âgée de 7jours de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* ont été prélevé avec un emporte-pièce et inoculés au centre de chaque boîte de pétri précédemment coulé avec 15ml de PDA (1disque/boîte).

4.5.6. Application des disques

- **Pour la méthode par disque** ; on a utilisé une pince pour mettre 5 disques dans la boîte en contact du milieu de culture, à l'aide d'une micropipette on a imbibé chaque disque par 10 µl d'HE formulée (Aouni et al., 2013)(Fig.5).

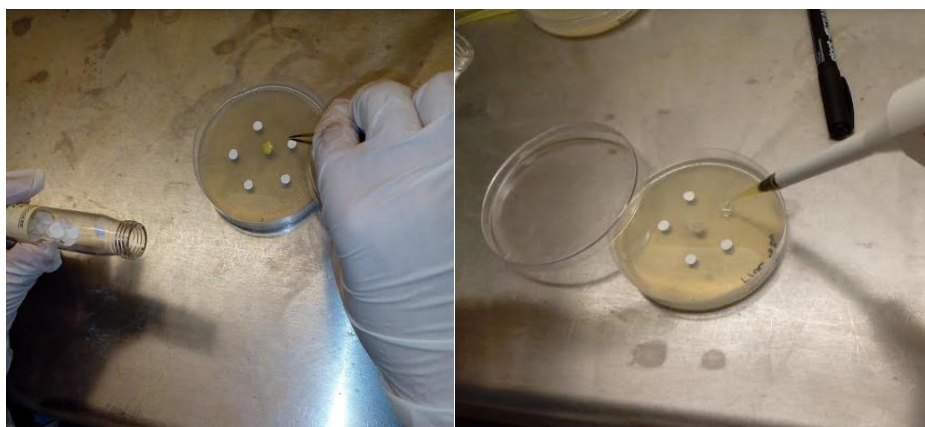


Figure.5 : Dépôt des disques selon la méthode de disque

- **Pour la méthode par micro atmosphère** ; on a déposé les disques de papier sur le couvercle de la boîte de pétri puis on les a imbibé par 10 µl sans que l'HE entre en contact avec notre milieu de culture (PDA) contenant le disque mycélien, la boîte est hermétiquement fermée (Inouye et al., 2001; Nakahara et al., 2003)(Fig.6).

Après diffusion de l'HE durant 1 heure les boîtes ont été incubées à l'obscurité à une température de 27 C°, durant 7 jours.



Figure.6 : Dépôt des disques selon la méthode de micro atmosphère

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 cinq 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 nombre de pixel.

4.6.2. Croissance mycélienne

La croissance mycélienne a été évaluée à la fin de l'expérience, à savoir au bout de 168h (7 jours) d'incubation, en mesurant la moyenne de cinq diamètres sans prendre en compte le diamètre du disque. Cette lecture est toujours réalisée en comparaison avec les cultures témoins ayant démarré le même jour et dans les mêmes conditions.

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 :

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

D: diamètre de la zone de croissance journalière (mm)

Te: temps d'incubation (jours)

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 L.* les différences ont été considérés 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

La présente étude vise à estimer l'impact de la formulation sur l'activité antifongique de l'huile essentielle des feuilles de *Citrus aurantium L.*

1. Estimation du rendement en huiles essentielles des feuilles de *Citrus aurantium L.*

L'huile essentielle des feuilles de *Citrus aurantium* a été extraite par hydrodistillation. Le rendement a été estimé à 0,57%

2. Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle de *Citrus aurantium L.* par la CG/MS

D'après le tableau. 2, on constate que les composés majoritaires de l'huile essentielle de *Citrus aurantium L.* sont le Terpeneol et le Geraniolacetate avec des taux respectifs de 21% et de 18% suivit de l'Anthranilic acid. 1,5-dimethyl-1-vinyl-4-hexeryl ester et du Caryophyllene avec des taux de 12% et 11.66%, ainsi que le Phytol qui est moins disponible par rapport aux premiers composés cités avec un taux de concentration de 4,36%.

La proportion des différents groupes de composés de l'huile essentielle de *Citrus aurantium L.* comporte une large proportion des Monoterpènes (39%). Les Sesquiterpènes viennent en seconde position avec des proportions moins élevées (23,52%). Cependant, les Alcools et les Alcaloïdes affichent des proportions ajustées respectivement à 10,76% et 12%.

Tableau.2: Composition chimique de l'HE de *Citrus aurantium L.*

Composés	Familles	Formule brute	%
1 Terpeneol	Monoterpenols	C ₁₀ H ₁₈ O	21
2 Anthranilic acid. 1,5-dimethyl-1-vinyl-4-hexeryl ester	Alcaloïde	C ₇ H ₇ NO ₂	12
3 2-Methoxy-4-vinylpheenol	Alcool	C ₉ H ₁₀ O ₂	4,3
4 Nerolacetate	Ester D Alcool	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	2,1
5 Geraniolacetate	Monoterpenes	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	18
6 Caryophyllene	Sesquiterpene	C ₁₅ H ₂₄	11,66
7 Elixene	Sesquiterpene	/	2,92
8 Nerolidol	Sesquiterpene	/	1,48
9 Germacrene D-4-ol	Sesquiterpene	C ₁₅ H ₂₆ O	3,96
10 A-cadinol	Sesquiterpenols	C ₁₅ H ₂₆ O	3,50
11 Phytol	Alcool Diterpenes	C ₂₀ H ₄₀ O	4,36
Total des substances identifiées en %			
Sesquiterpènes			23,52
Alcools			10,76
Monoterpènes			39
Alcaloïdes			12
Total			85,28

3. Variation temporelle des zones d'inhibition de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* sous l'effet des différentes formulations de l'huile essentielle de *Citrus aurantium L.*

Selon la figure. 7, l'évolution temporelle du taux d'inhibition fongique sous l'effet des huiles essentielles formulées en gel (F1), au Tween (F2) appliquées par diffusion sur gel et par micro-atmosphère montre un effet fongicide plus important selon le degré de concentration des dilutions utilisées, obéissant à un gradient positif $D1 > D2 > D3 > D4 > D5$. L'activité fongicide et/ou fongistatique s'installe dès les 4 jours de confrontation des bioproduits au champignon. Elle s'accroît au-delà du 6^{ème} jour (Fig.7).

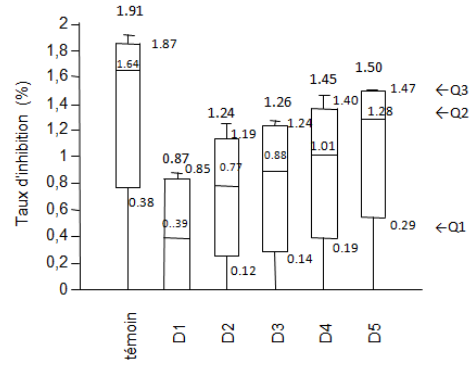
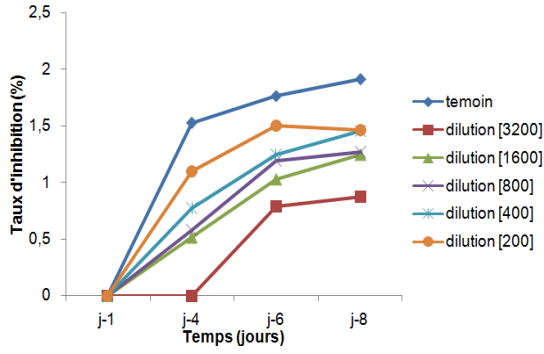
La présentation graphique en BoxPlot des données expérimentales est avancée dans le but d'apprécier la variation du taux d'inhibition selon les deux méthodes d'administration des huiles essentielles en rapport avec les formulations. La comparaison des inhibitions sous l'effet des fortes doses annonce une similarité d'effet entre la formulation en gel ($Q_1=0,29$, $Q_2=1,28$, $Q_3=1,47$) et la formulation au Tween ($Q_1=0,31$, $Q_2=1,31$, $Q_3=2,00$). Tandis que les BoxPlot de la méthode de diffusion par micro-atmosphère, montrent qu'ils sont moins efficaces en termes d'inhibition dans les premiers jours mais ils affichent une inhibition maintenue au cours du temps.

La Figure.8, représente l'évolution mycélienne de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* enregistrant des taux d'inhibition plus imposant selon le degré de concentration des dilutions utilisées, obéissant à un gradient positif $D1 > D2 > D3 > D4 > D5$ pour la formulation au DMSO, et la formulation à l'acétone. Le taux d'inhibition signalé sous l'effet de l'HE formulé au DMSO par la méthode de diffusion par disque se détache nettement du taux d'inhibition signalé sous l'effet de la même formulation par méthode de diffusion par micro-atmosphère en termes d'importance. L'efficacité des deux formulations (DMSO et acétone) apparaît dès 24h d'incubation. Sous l'effet de l'HE formulée avec l'acétone, l'activité fongicide du principe actif augmente graduellement dans le temps. Elle affiche des taux d'inhibitions importants jusqu'au 4^{ème} jour d'incubation dans les deux méthodes.

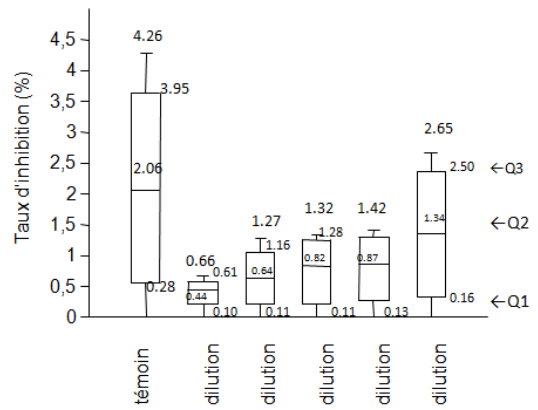
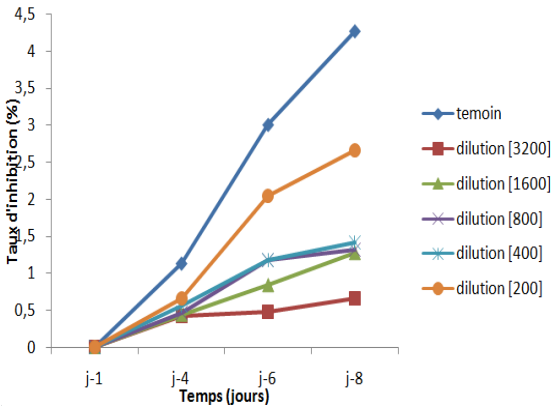
Les boîtes graphiques en BoxPlot montrent que les taux d'inhibition se détachent clairement sous l'effet des différentes doses de la formulation du DMSO par la première méthode ($Q_1=0$, $Q_2=0,22$, $Q_3=0,48$) et la méthode par micro-atmosphère ($Q_1=0,10$, $Q_2=0,66$, $Q_3=1,50$). En revanche, les doses de l'huile essentielle formulée à l'acétone expriment une similarité dans les taux d'inhibition entre la première méthode testée ($Q_1=0$, $Q_2=0,22$, $Q_3=0,51$) et la deuxième méthode ($Q_1=0$, $Q_2=0,17$, $Q_3=0,39$).

Formulation en gel à 10% (F1)

Méthode de diffusion par disque



Méthode de diffusion par micro-atmosphère



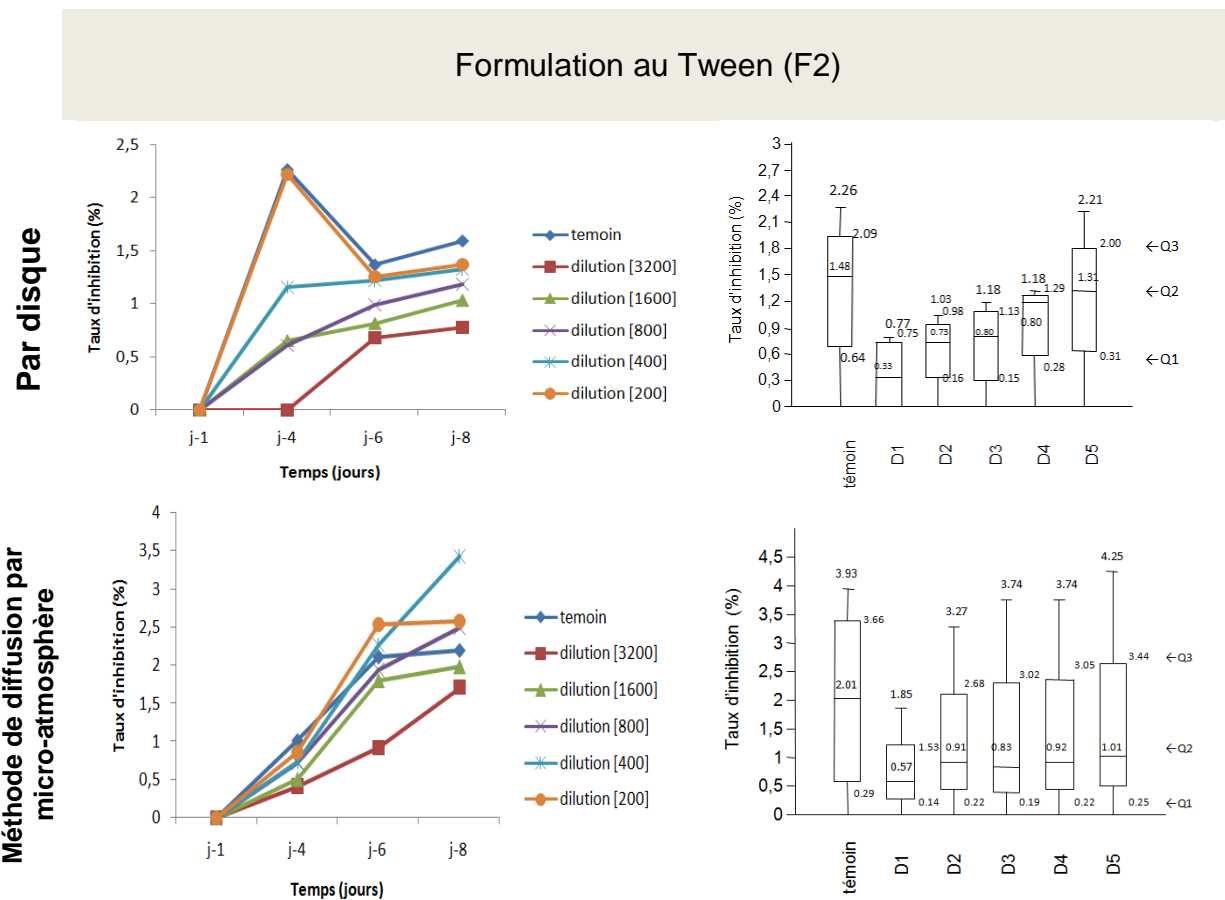


Figure.7: Variation temporelle des zones d'inhibition de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* sous l'effet de la formulation en gel et au Tween

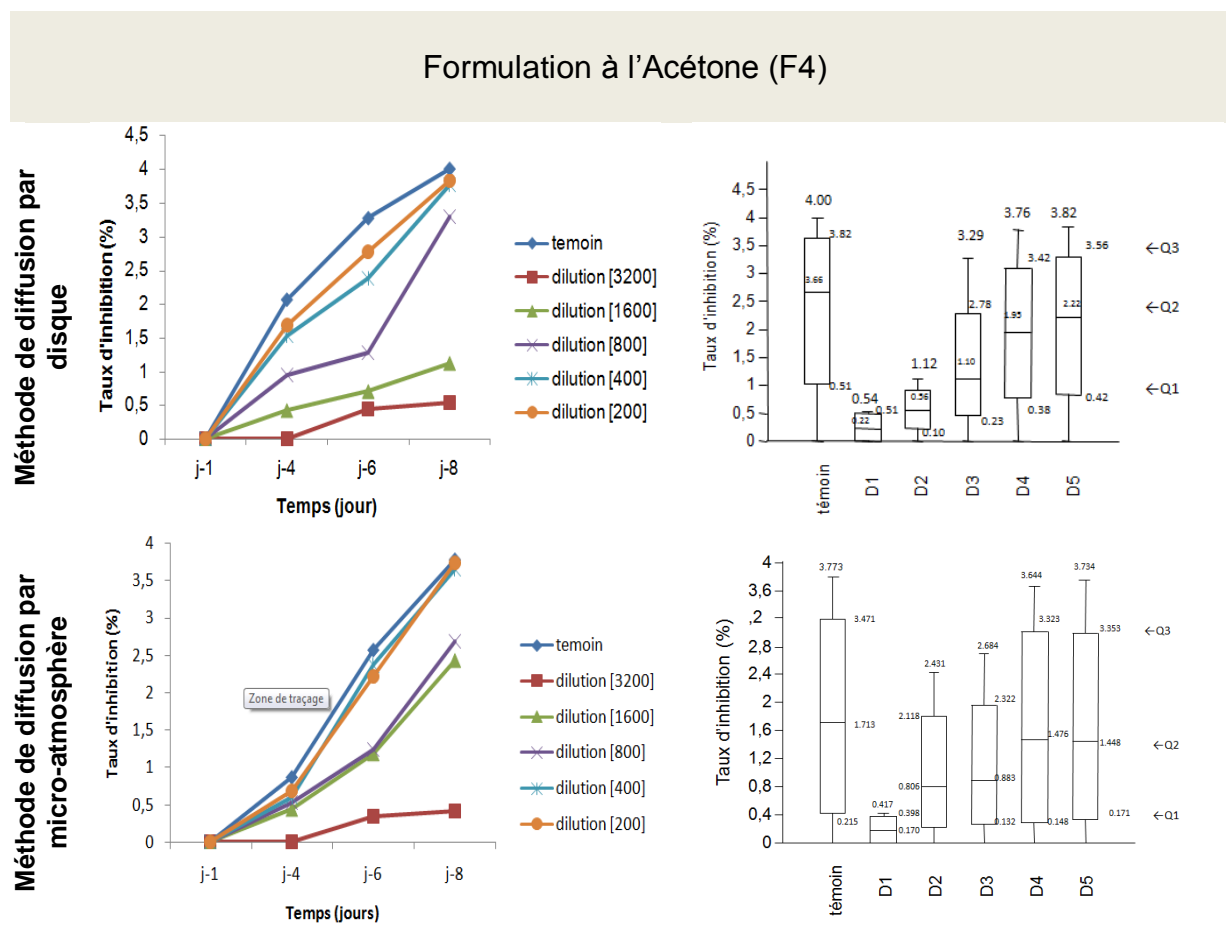


Figure.8: Variation temporelle des zones d'inhibition de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* sous l'effet de la formulation au DMSO et à l'Acétone

4. Etude comparée de l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Citrus aurantium L.* sous l'effet des différentes concentrations et formulations

4.1. Méthode de diffusion par disque

À partir des résultats obtenus, nous remarquons que le temps d'incubation enregistre un effet très significatif sur le taux d'inhibition de la souche *Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici* pour l'ensemble des traitements ($p < 0,0001$) (Fig.9). Le test de comparaison multiple Post-Hoc de Tukey, désigne pour les 4 formulations, la présence de 3 groupes homogènes relatifs aux paliers temporels d'activité fongicide. Le premier palier est signalé à T4 (4 jours) d'incubation montrant le taux d'inhibition le plus fort, affilié au groupe homogène (c). Le deuxième palier est remarquable après le T6 (6 jours) d'incubation montrant une inhibition modérée, affilié au groupe homogène (b). Enfin, le troisième palier est visible dès le T8 (8 jours) d'incubation exprimant le taux d'inhibition le plus faible, affilié au groupe homogène (a). Le même test indique la présence de 4 groupes homogènes relatifs aux formulations testées ainsi que leur témoin. Le premier palier est détecté chez le témoin montrant le taux de croissance mycélienne le plus élevé, affilié au groupe homogène (a). Le

deuxième palier est remarquable chez la formulation 4 à savoir l'HE formulée à base d'acétone relatant le taux d'inhibition le moins important, affiliée au groupe homogène (b). Alors que le troisième palier représente un taux d'inhibition très important affecté au groupe homogène (c) qui est partagé entre les formulations 1 et 2. Tandis que le quatrième palier est largement visible comportant les taux d'inhibitions les plus prononcés, affilié au groupe homogène (d). Enfin, le test de comparaison désigne pour les différentes concentrations testées la présence de 6 groupes. Le premier palier est signalé chez le témoin et chez la dernière concentration à savoir la C₅ qui montre un taux d'inhibition le plus faible, affilié au groupe homogène (a). Le deuxième palier est visible chez les concentrations C₄, C₃ et C₂ exprimant un taux d'inhibition qui se rapprochent entre les 3 concentrations, respectivement affilié au groupe hétérogène (ab, bc et cd). Le troisième palier est remarquablement visible dès chez la 1^{ère} concentration exprimant le taux d'inhibition le plus important, affilié au groupe homogène (d) (Fig.9).

La vision globale des potentialités fongicides des différents traitements montre à travers le test de Tukey que les fortes doses de l'huile essentielle des différentes formulations testées engendrent des taux d'inhibitions très similaires à l'exception de la formulation au DMSO qui se démarque des autres par sa forte inhibition au cours de l'évolution temporelle (Fig.9).

L'analyse ANOVA nous a dressé les profils temporels des taux d'inhibition selon les différentes formulations testées par la méthode de diffusion par disque. L'effet de la formulation à base du DMSO est significativement différent car il affiche une inhibition quasi constante au cours du temps d'incubation (Fig.10).

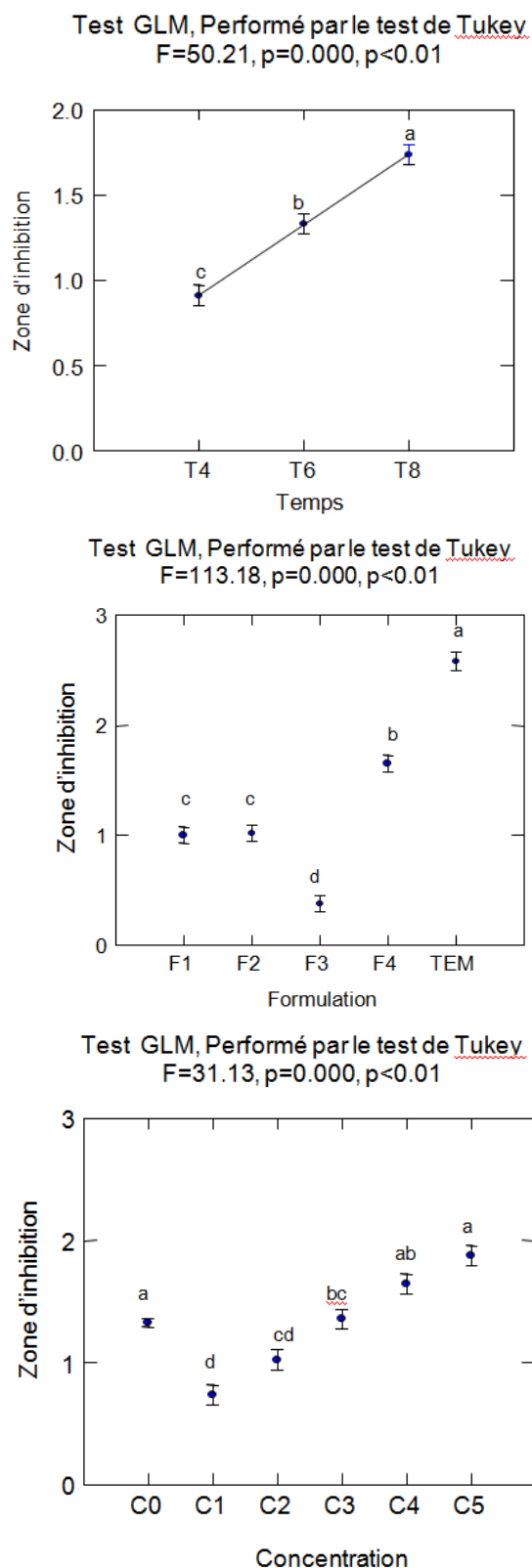


Figure.9: Effets du temps, des concentrations et des formulation sur le pouvoir antifongique de l'huile essentielle de *Citrus aurantium L.* par la méthode de diffusion par disque

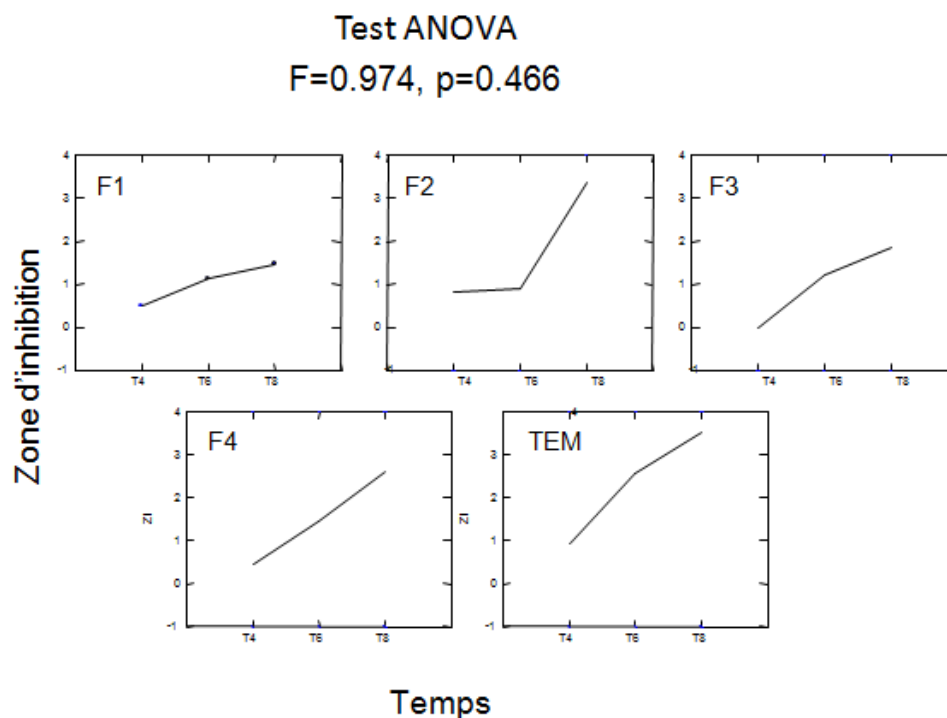


Figure.10: Evolution temporelle des zones d'inhibitions selon les formulations par la méthode de diffusion par disque

4.2. Méthode de diffusion par micro-atmosphère

Les résultats graphiques de l'analyse de la variance type GLM relatifs aux facteurs étudiés sont consignés dans la figure.11. Ils montrent que le temps d'incubation du champignon sous l'effet des huiles essentielles enregistre un effet très significatif sur le taux d'inhibition. Le test Post-Hoc de Tukey, désigne la présence de 3 groupes homogènes relatifs aux paliers temporels d'efficacité des différentes formulations par la méthode de micro-atmosphère. Le premier palier est signalé à T8 d'incubation dévoilant le taux d'inhibition le plus faible, affilié au groupe homogène (a). Le deuxième palier est remarquable pareillement chez T6 où l'incubation dévoile une inhibition plus importante, affiliée au groupe homogène (b) tandis que le troisième palier montre que T4 représente le taux d'inhibition le plus prononcé, affilié au groupe (c) (Fig.11). Concernant, le facteur formulations, le test de comparaison signale la présence de 3 groupes homogènes. Le premier palier est signalé chez le témoin qui montre le taux initial de la croissance mycélienne, affilié au groupe homogène (a). Le deuxième palier montre une inhibition similaire chez les formulations 4 et 2 à savoir (acétone et Tween), affilié au groupe homogène (b). Le troisième palier est visible chez la formulation par gel et par le DMSO exprimant le taux d'inhibition le plus important, affilié au groupe homogène (c) (Fig. 11).

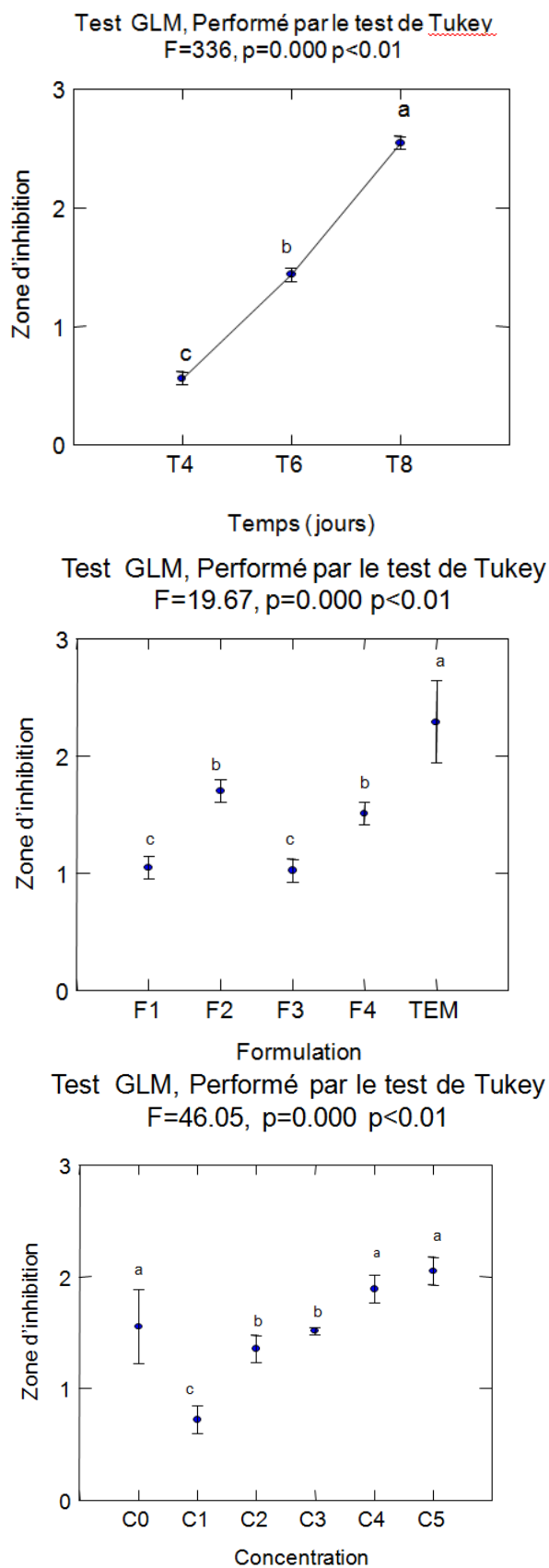


Figure.11: Effets du temps, des concentrations et des formulations sur le pouvoir antifongique de l'huile essentielle de *Citrus aurantium L.* par la méthode de diffusion par micro-atmosphère

Le taux d'inhibition est significativement différent sous l'effet du *facteur concentration* des huiles essentielles formulées. Globalement, le Test de Tukey désigne la présence de 3 groupes homogènes d'efficacité à savoir : le premier palier qui est partagé entre 3 concentrations C_0 [témoin], C_4 [400] et C_5 [200] qui affiche les taux d'inhibition les plus faibles, affilié au groupe homogène (a). Le deuxième palier annonce un taux d'inhibition modéré chez les C_3 et C_2 , affilié au groupe homogène (b). Enfin, le troisième palier exprime la plus importante inhibition constaté chez la C_1 qui représente la concentration la plus élevée, affilié au groupe homogène (c) (Fig.11).

L'analyse ANOVA nous a dressé les profils temporels des taux d'inhibition selon les différentes formulations testées par la méthode de diffusion par micro-atmosphère. L'effet de la formulation en gel est significativement différent car elle est durable dans le temps (Fig.12).

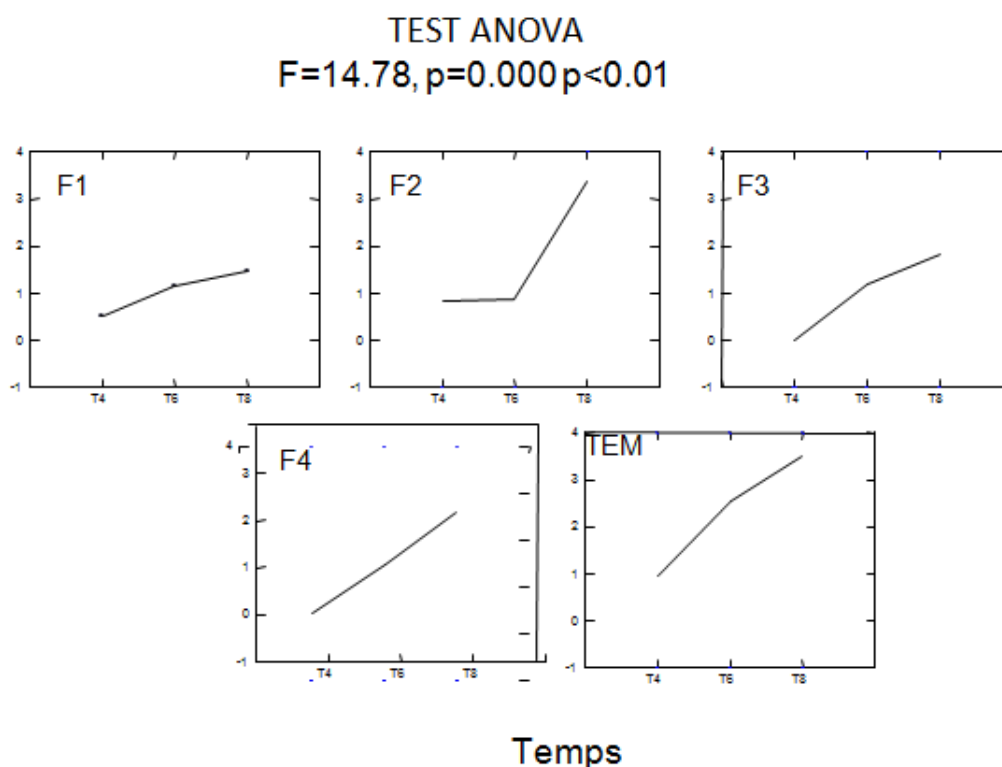


Figure.12: Evolution temporelle des zones d'inhibitions selon les formulations par la méthode de diffusion par micro-atmosphère

5. Etude comparée de l'indice d'inhibition des différentes formulations de l'huile essentielle de *Citrus aurantium L.* à l'égard de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*

Dans l'esprit de mieux visualiser l'effet fongicide/et ou fongistatique des bioproduits formulés à base d'huile essentielle de *Citrus aurantium L.*, nous avons été conduits à confronter les mêmes paliers de concentrations des différentes formulations. Cette dernière a permis d'avancer que certaines formulations affectent pareillement la croissance mycélienne. Par ailleurs, les formulations expriment des effets divergents sous mode de diffusion par disque et diffusion par micro-atmosphère (Tableau.3). La lecture individualisée des taux d'inhibitions selon la méthode de diffusion par disque, fait ressortir le facteur formulation comme élément de restriction de la croissance mycélienne. Ce constat est confirmé par le rapprochement d'effet entre F1 et F2 pour les concentrations C1 et C2. Aussi, sous l'effet des concentrations C3, C4 et C5 nous signalons le rapprochement entre F1, F2 et F4 (groupe homogène identique). En revanche, selon la méthode de diffusion par micro-atmosphère, à la forte concentration C1, F1 se rapproche de F4 tandis que F2 se rapproche de F3. Concernant les concentrations moyennement faibles et faibles, le comportement des formulations présente une multitude de rapprochement (voir les groupes homogènes) (Tableau.3).

Tableau.3: Taux d'inhibition de la croissance mycélienne

	Concentrations	F1	F2	F3	F4	Test One-way ANOVA	
						F-Ratio	<i>p</i> (value)
Méthode de diffusion par disque	C1 (3200µl/ml)	54,30± 2,03 a	51,16±3,84 a	89,3±1,14 b	88,7±1,20 b	81,38	6,64×10 ⁻¹⁰
	C2 (1600µl/ml)	34,63±2,63 a	34,86±2,33 a	88,98±0,21 c	76,6±1,80 b	203,5	5,96×10 ⁻¹³
	C3 (800µl/ml)	33,25±6,26 a	25,68±5,78 a	86,44±1,74 b	31,34±3,54 a	36,46	2,21×10 ⁻⁷
	C4 (400µl/ml)	23,74±3,92 a	16,86±3,63 a	86,32±1,64 b	21,48±2,56 a	114,8	4,95×10 ⁻¹¹
	C5 (200µl/ml)	23,40±6,95 a	13,76±2,63 a	86,26±1,55 b	20,3±3,14 a	67,62	2,63×10 ⁻⁹
Méthode de diffusion par micro-atmosphère	C1 (3200µl/ml)	84,32±1,33 b	59,22±2,66 a	59,36±1,34 a	89,38±0,84 b	90,72	2,94×10 ⁻¹⁰
	C2 (1600µl/ml)	69,92±1,51 d	28,7±3,23 a	52,88±2,26 c	38,18±1,50 b	64,64	3,67×10 ⁻⁹
	C3 (800µl/ml)	68,94±3,01 c	18,3±3,05 a	40,68±2,25 b	31,72±1,63 b	70,4	1,95×10 ⁻⁹
	C4 (400µl/ml)	66,6±2,04 c	18,16±3,04 a	42,18±3,62 b	22,66±1,01 a	5,55	8,2×10 ⁻³
	C5 (200µl/ml)	37,64±3,28 b	9,74±0,93 a	38,62±3,67 b	10,14±1,54 a	38,47	1,52×10 ⁻⁷

F1 : Formulation en gel, F2 : Formulation au Tween, F3 : Formulation au DMSO, F4 : Formulation à l'Acétone

6. Evaluation de la vitesse de croissance de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* sous l'effet des différentes formulations de l'huile essentielle de *Citrus aurantium L.*

Dans le but d'appréhender l'activité biocide des bioproduits formulés, nous avons eu recours à l'estimation de la vitesse de croissance mycélienne. Cette

dernière nous a permis à travers le rythme d'évolution mycélienne de définir un certain nombre de paramètres de toxicité d'une matière active à savoir : (i) effet Knock Down (effet choc) (ii) concentration létale ou inhibitrice figure.13,

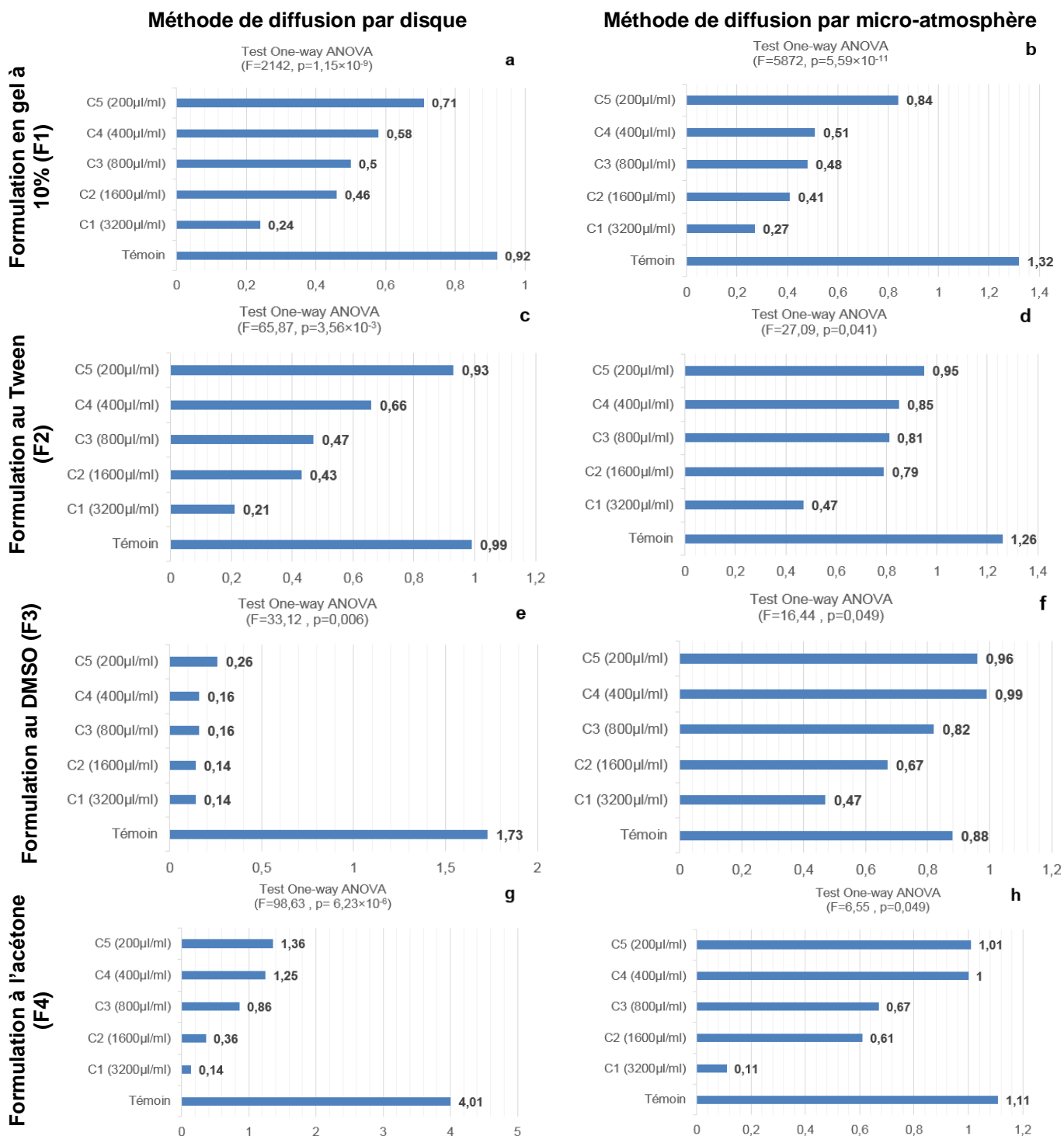


Figure.13: Variation de la vitesse de croissance de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* sous l'effet des différentes formulations et des modes d'administration

Par référence à la figure 13, et sur le plan degré de toxicité des bioproduits formulés, les résultats montrent que chaque formulation s'individualise par son effet sur la croissance mycélienne. Cette caractéristique propre aux différentes formulations se voit distincte entre diffusion par disque et diffusion par micro-atmosphère. F1 est performante suivant les concentrations de l'huile essentielle pour les deux méthodes. F3 et F4 sont très performantes par diffusion par disque.

Chapitre IV : Discussion

La formulation permet de sécuriser, de réduire et de préserver les ressources phylogénétiques tout en protégeant le principe actif. Notre présent travail à porter sur les potentialités des formulations dans l'expression des activités biologiques, les résultats de l'évaluation de l'activité antifongique nous ont permis de dégager les hypothèses suivantes :

1. Effet des dilutions sur l'activité anti fongique de l'HE de bigaradier

La susceptibilité fongique à l'huile essentielle de *Citrus aurantium* L montre des pourcentages d'inhibition élevés. Les résultats ont montré aussi que toutes les formulations ont un fort pouvoir inhibiteur sur la croissance mycélienne, dont les concentrations allant de 800 µl/ml à 3200 µl/ml s'avèrent les plus importantes envers l'espèce représentative du genre *Fusarium* (*Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*). Ce qui nous permet d'avancer l'hypothèse sur la forte présence de composés volatils regroupant les monoterpènes comme composés majoritaire dans les concentrations les plus élevées. Il a été signalé que les monoterpènes représentent une activité anti bactérienne très importante, l'hypothèse avancée, est confirmée par plusieurs études qui relient le pouvoir antifongique des huiles essentielles des 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.

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)**.

(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*.

(Cox et al., 2000), ont montrés que la présence des monoterpènes dans les huiles essentielles est capable d'affecter l'intégrité cellulaire des champignons, ce qui entraîne une inhibition de la respiration et une altération de la perméabilité.

De copieuses études ont montrés que l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle est souvent le résultat de l'activité des monoterpènes plutôt que des sesquiterpènes (Haddouchi et al., 1999). Il a été prouvé que la même activité est apparemment liée à sa teneur élevée en alcools et en esters et d'autres composés mineurs entre autres le linalool, le terpinène-4-ol, le camphre, le trans-pinocarveol, le t- Cadinol, l' α -cadinol et le β -caryophyllène oxide qui agissant de manière synergique ou additive (Muanda, 2010 et Milane, 2004).

2. Evaluation de l'efficacité des formulations sur les taux d'inhibitions de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*.

Une efficacité variable a été enregistrée vis-à-vis de l'espèce fongique testée selon les deux méthodes d'application et selon les différentes formulations, principalement due à l'action synergique et solubilisant de certains adjuvants avec l'HE comme l'acétone et le DMSO, qui ont montré une performance remarquable lors de leurs utilisation dans la méthode de diffusion par disque. Tandis que pour l'application par la méthode de diffusion par micro-atmosphère, c'est la formulation en gel qui a donné un meilleur résultat. Par conséquent, on peut avancer l'hypothèse que les formulations testées constituent une synergie potentielle avec l'HE du bigaradier et que ces dernières ne retiennent pas les composés volatils qui sont responsables de l'activité antifongique, de même le choix de la méthode d'évaluation des activités biologiques de certaines HE agissent différemment vis-à-vis des souches fongiques. On se basant sur l'hypothèse avancée, nous pouvons l'accorder avec les travaux de plusieurs chercheurs qui ont mentionné que l'activité antifongique est le résultat du synergisme ou l'antagonisme des divers composés d'huile essentielle des citrus (Sonboli et al., 2006 ; Deba et al., 2007). Ainsi que (Bajpai et al., 2013) estiment que les performances antimicrobiennes dévoilées par les huiles essentielles pourraient être le résultat d'un certain équilibre quantitatif des divers composants.

(Baser et Buchbauer., 2010), considèrent que le choix de la technique d'évaluation de l'activité antifongique peut influencer le résultat obtenu. (Sharma et Tripathi., 2006), obtiennent deux CMI différentes pour l'huile essentielle de *Citrus sinensis* avec *Alternaria alternata*, et ceci lorsqu'ils emploient deux techniques différentes pour l'étude de la fongitoxicité de l'huile essentielle. (Nakahara et al., 2003), remarquent que l'huile essentielle de *Citronellaea etheroleum* était inactive vis-à-vis de neuf espèces de champignons avec la méthode de dilution, mais elle a inhibé la croissance de la totalité des espèces fongiques dans la méthode micro atmosphère. Les huiles essentielles des *Citrus* sont un mélange complexe de composés volatils

qui présentent une activité antifongique en réduisant ou inhibant totalement la croissance fongique (**Viuda-Martos et al., 2008**).

Ces résultats semblent valider certaines utilisations des huiles essentielles de *Citrus aurantium* L. en pharmacognosie et en agriculture biologique. Les différences dans les niveaux de chémotypes et dans les activités biologiques ont montré l'importance de la formulation dans la promotion des agents antimicrobiens. Le large spectre des propriétés antifongiques des huiles essentielles de *Citrus aurantium* L. dévoilé par les différentes formulations leur permet d'être considérées comme des agents antimicrobiens efficaces dans le traitement de certaines infections et dans la lutte contre certains organismes nuisibles aux plantes. Les propriétés antifongiques dévoilées peuvent être significativement importantes pour les secteurs pharmaceutique et agricole, compte tenu de l'importance économique de la disponibilité du matériel végétal dans la production de produits antimicrobiens naturels avec des formulations combinées tout en prenant en compte des facteurs environnementaux influençant la composition et l'efficacité des huiles essentielles.

Conclusion

Au terme de cet aspect réservé à l'évaluation de l'activité antifongique des quatre formulations de l'huile essentielle de *Citrus aurantium L.* à savoir la formulation en gel, au Tween, au DMSO et à l'acétone vis à vis d'un champignon phytopathogène (*Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*), nous pouvons dégager les résultats suivants :

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

Selon les taux d'inhibitions obtenus, l'efficacité a été démontrée pour toutes les préparations. Cette caractéristique propre aux différentes formulations se voit distincte entre diffusion par disque et diffusion par micro-atmosphère. La formulation en gel est performante suivant les concentrations de l'huile essentielle pour les deux méthodes. Tandis que les préparations au DMSO et à l'acétone sont très performantes par diffusion par disque.

À la lumière des résultats obtenus, le travail ouvre la voie à d'autres perspectives. Dans le but de proposer une formulation biofongicide commerciale et d'approfondir les recherches concernant la relation entre la composition chimique 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, les facteurs environnementaux, les facteurs propres à la plante et les conditions de conservation des huiles essentielles (température et durée de stockage), (ii) L'étude de l'activité antifongique à l'égard d'une gamme plus large de champignons phytopathogènes, (iii) Des essais sur des plantes entières en serre, dans les champs et rechercher d'autres possibilités de formulation des huiles essentielles.

Références bibliographiques

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.

Anonyme., 2018. <http://fr.db-city.com/--Boufarik> consulté le 18/06/2018 a 19h20.

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, *phytotérapie*. 11(4): 225 -236.

Bagamboula C.F., Uyttendaele M., et Debevere J., 2004. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbio*. 2(1): 33- 42.

Bajpai V.K., Sharma, A., et Baek, K.H., 2013. Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens. *Food Control*. 3(2): 582-90.

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

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 hydro thermomécanique 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 rotundifoliada* Nord de l'Algérie. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. 1(1): 3-7.

Broydé H., et Doré T., 2013. Effets des pratiques agricoles sur la contamination des denrées par les mycotoxines issues de *Fusarium* et *Aspergillus spp.* *Cahier Agriculture* .2(2): 182-94.

Bruneton J., 1993. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*, 2^{ème} 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.

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 a 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.

Deba F., Xuan T.D., Yasuda M. et Tawata S., 2007. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa*. *Food Control*, 19(2) : 346–352.

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.

Devet P., et Rouxel F., 1997. Détection et isolement des champignons du sol, Paris. cedex07. 147p.

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.

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.

Haddouchi F., Lazouni H., Ahammer KA., Carson CF., et Riley TV., 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J.Appl. Microbiol.*86, pp: 985-990.

Hamdani F.Z., et Allem R., 2015. Antifungal activity of the leaf essential oil of citrus against *Alternaria alternata* in vivo. Thèse. Hassiba Ben Bouali Chlef, 60p.

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

Hellal Z., 2011. Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. : Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de magistère, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. 78p.

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.

Inouye S., Takizawa T., et Yamaguchi H., 2001. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(5): 565–573.

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.

Ishii H., 2006. Impact of fungicide resistance in plant pathogens on crop disease control and agricultural environment. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 40(2) : 205–211.

Isman M. B., 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19(6): 603-608.

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.

Kassi FM., Badou OJ., Tonzibo ZF., Salah Z., Lndge A., et Kone D., 2014. Action du fongicide naturel NECO contre la cercosporiose noire (*Mycosphaerella fijiensis*

Morelet) chez le bananier plantain (AAB) en Côte d'Ivoire. *J. Applied Biosciences*, 75(8): 6183– 6191.

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.

Laplace J.P., 2006. Agriculture et alimentation Réflexions croisées, *Cahiers Agricultures*. 15(4): 375 -78.

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.

Lepoivre P., 2003. *Phytopathologie: Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte*. Ed. De Boeck Supérieur. 432 p.

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 2^{ème} 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 *Tarhchonanthus camphorates*. *Food Chemistry*, 101(3): 1183–1187.

Michele B., 2010. L'huile essentielle de l'Oranger amer « petit grain bigarade. *Aromathérapie au service des soins esthétiques*. 235p.

Milane H., 2004 - La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques, thèse. Strasbourg.201p.

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

Moussaoui k, Ahmed H., Zitouni G et Djazouli Z., 2014. Université Blida1, faculté des sciences de la nature et de la vie, département de Biotechnologie institut technique des Elevages Route de Chebli Baba Ali. <http://dx.doi.org/10.18488/journal.58/2014.1.2/58.2.133.145>.

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.

Muanda FN., 2010 - Identification de polyphénols, Evaluation de leur Activité

Antioxydante et Etude de leurs Propriétés Biologiques. Thèse. Univ. Paul Verlaine-Metz. 239p.

Mukhopadhyay M., 2000. *Natural extracts using Supercritical Carbon Dioxide*. 1Ed, CRC Press LLC, Boca Raton, Florida. 339p.

Nakahara K., Alzoreky N. S., Yoshihashi T., Nguyen H. T. T., et Trakoontivakorn G., 2003. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cymbopogon nardus*(citronella grass). *Japan Agricultural Research Quarterly*. 37(4) : 249-252.

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.

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 one 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 Quebec, 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.

Regnault- Roger C., 2012. Trends for Commercialization of Biocontrol Agent (Biopesticide) Products. *Plant Defense Biological control*. 12(6) : 139- 60.

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.

Sawamura M., 2010. *Citrus essential oils flavor and fragrance*. Ed John Wiley. New Jersey, 398p.

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

Sonboli A., Babakhani B., et Mehrabian A. R., 2006. Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*. *Zeitschrift fur Naturforschung Section C. Biosciences*, 61(5): 160–164.

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

Tao N. , Yang Q O., et Jia L., 2014. Citral inhibits mycelial growth of *Penicillium italicum* by a membrane damage mechanism. *Food Control*, 41(17):116-121.

Tripathi P., et Dubey N., 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*. 32(9) : 235–245.

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 italicum* and *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.

Xue A .G., Chen Y., Voldeng H.D ., Fedak G ., Savard M .E ., Langle T ., Zhang J ., et Harman G .E., 2014. Concentration and cultivar effects on efficacy of CLO-1 biofungicide in controlling *Fusarium* head blight of wheat . *Biological Control*, 73(22): 2-7

Zehra 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.

Zhiri, A., et Boudoux, D., 2005. *Huiles essentielles chemotypées et leurs synergies .inspir développement*. S .A. 1.11p.

Introduction

Chapitre I :

Partie bibliographique

Chapitre II :

Matériel et méthodes

Chapitre III :

Résultats

Discussion

Conclusion

Références bibliographiques