

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
HASSIBA BEN BOUALI DE CHLEF



Institut des Sciences Agronomiques

THESE DE

*Doctorat En Sciences*

Spécialité : Sciences Agronomiques

THEME

Déterminisme moléculaire de l'activité  
antifongique des huiles essentielles extraites à  
partir des feuilles d'agrumes

Présentée par :

**M<sup>elle</sup> Hamdani Fatima zohra**

Soutenu le :01/12/2015

Devant l'honorable jury composé de :

<b>M<sup>r</sup>.SAADI ABDELKADER</b>	<b>Professeur</b>	<b>Président</b>	<b>Université Chlef</b>
<b>M<sup>me</sup>. ALLEM RACHIDA</b>	<b>Professeur</b>	<b>Directeur de thèse</b>	<b>Université Chlef</b>
<b>M<sup>r</sup> RIAZI ALI</b>	<b>Professeur</b>	<b>Examineur</b>	<b>Université Mostaganem</b>
<b>M<sup>r</sup> CHADLI RABAH</b>	<b>professeur</b>	<b>Examineur</b>	<b>Université Mostaganem</b>

Année universitaire 2015/2016

## **Remerciements**

La réalisation de ce travail de thèse de doctorat a été possible grâce au support du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique représenté par l'Institut des Sciences Agronomiques de l'Université Hassiba Ben Bouali de Chlef.

Cette étude ne pouvait parvenir à sa fin sans la direction de Mme **ALLEM RACHIDA**, professeur au département de biologie, faculté des sciences, Université Hassiba Ben Bouali de Chlef. Je lui dois une sincère reconnaissance pour son soutien indéfectible, sa grande disponibilité, ses précieux conseils, ses encouragements et à la totale confiance qu'elle m'a accordée

Mes travaux ne pourraient avoir de valeur sans la contribution des membres du jury qui ont accepté de juger cette thèse. Leurs remarques et suggestions contribueront à améliorer la qualité de ce document. Je tiens à exprimer mes sincères remerciements et mon profond respect à Mr **SAADI ABDELKADER**, professeur au département de biologie, faculté des sciences, Université Hassiba Ben Bouali de Chlef, qui nous a honoré par sa présence en présidant le jury.

Je suis très sensible à l'honneur que me fait Mr **RIAZI ALI**, professeur à l'université de Mostaganem pour avoir accepté d'examiner ce travail de thèse.

Je suis très reconnaissante à Mr **CHADLI RABAH**, professeur à l'université de Mostaganem pour avoir accepté de faire parti du jury de ce travail.

Je tiens particulièrement à exprimer mes profonds remerciements aux responsables de laboratoire de phytopathologie de l'institut des sciences agronomiques et le laboratoire de mycologie de la station régionale de la protection des végétaux de Chlef pour la fourniture du matériel fongique qui sans leurs aide, ce travail ne pouvait aboutir.

Je remercie, Mr **PARTRICK LAURENT**, de la Station d'Etudes Mycologiques des Hautes Vosges pour l'identification moléculaire d'*Alternaria alternata* et Melle **BOURAI MERIEM**, pour les analyses de CG/SM du laboratoire ALDAR sis à DAR AL BAIDHA

Je suis très heureuse de pouvoir exprimer ma sympathie à ma famille, mes amies proches, mes collègues de travail et mes étudiants qui n'ont jamais cessé de m'encourager, je leurs dois une grande reconnaissance.

## **PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES**

Les travaux de recherche de cette thèse ont fait l'objet de publication d'articles dans des revues scientifiques à comité de lecture et de présentations à des séminaires scientifiques internationaux et nationaux.

### **Publications Internationales**

- **Hamdani FZ., Allem R., Meziane M., Setti B., Ali arous S & Bourai M (2015) .** Chemical composition and antifungal activity of essential oils of Algerian citrus. *Africain journal of biotechnology*. 14,12 :1048-1055.
- **Hamdani FZ & Allem R (2015) .**Antifungal activity of the leaf Essential oil of Citrus against *Alternaria alternata* *in vivo*. *International Journal of Applied an Natural Sciences (IJANS)*.4, 4 :15-24
- **Hamdani FZ & Allem R (2015).** Propriétés antifongiques des Huiles Essentielles des Feuilles de citrus vis-à-vis d'*Alternaria alternata* et *Penicillium sp* *in vitro* . *Phytothérapie* Online first articles : 1- 4. DOI 10.1007/s10298-015-0978-3

### **Communications internationales et nationales**

- **Hamdani FZ., Allem R., Houari AEK., Meziane M., Setti B., Ali arous S & Bourai M (2012)** Chemical profile and antifungal activity of essential oils extracted from leaves of *Citrus aurantium* and *Citrus sinensis* (L) Osbeck of Algeria. **Conference at Dubai ISTECC**. Dubai
- **Hamdani FZ., Allem R. , Setti B., Messad kouchich M et al (2013).** Pouvoir inhibiteur *in vitro* et *in vivo* de l'huile essentielle de *Citrus limon* vis-à-vis d'*Alternaria solani* . Séminaire international « **Protection des cultures stratégiques en Algérie : Situation et Perspectives d'avenir** » Chlef.
- **Hamdani FZ., Allem R., Benhamed nourine N et Kala F (2012).** Effet antifongique des huiles essentielles extraites à partir des feuilles de *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium* vis-à-vis de cinq champignons phytopathogènes. Séminaire national « **Préservation et Valorisation des Ressources Phytogénétiques à Intérêt Aromatique et Médicinal** » Chlef.

### Résumé

L'activité antifongique des huiles essentielles de feuilles de Citrus (*Citrus aurantium*, *Citrus sinensis*, *Citrus limon* et *Citrus reticulata*) et de leurs composants volatils a été évaluée vis-à-vis du *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*, *Fusarium sp*, *Alternaria sp*, *Alternaria alternata* et *Penicillium sp*. Les rendements les plus importants ont été enregistrés avec *Citrus limon L* (1.02%) et *Citrus sinensis* (0.96 %). La caractérisation moléculaire des huiles essentielles des citruses par CG/SM a fait ressortir comme composants majoritaires en commun le D-limonène (7.18 %-36.10 %), le  $\beta$ -pinène (4.35 %-30 %) et l' $\alpha$ -pinène (2.04% - 4.36%).

Les huiles essentielles des citruses montrent un grand pouvoir inhibiteur de la croissance mycélienne, la production et la germination des spores de champignons phytopathogènes (*in vitro*). Le citral et le limonène possèdent les pouvoirs inhibiteurs les plus importants. L'effet antifongique du composant est plus efficace en phase de reproduction qu'en phase végétative du champignon.

L'huile essentielle de *Citrus limon* diminue la sévérité de maladie (IS= 0%) sur folioles de pomme de terre due à *Alternaria alternata* (*in vivo*). L'ensemble des huiles essentielles exerce un fort pouvoir inhibiteur du développement d'*Alternaria alternata* sur tubercule (IM=0%).

Les résultats obtenus de l'activité antifongique des huiles essentielles de citruses (*in vitro* et *in vivo*) ouvrent la voie à leur utilisation comme alternative aux fongicides chimiques.

**Mots clés :** Citrus, huile essentielle, composition moléculaire, CG/SM, champignons phytopathogènes, activité antifongique.

### **Abstract**

The antifungal activity of essential oils from leaves of citrus (*Citrus aurantium*, *Citrus sinensis*, *Citrus limon* and *Citrus reticulata*) and volatile components were evaluated against *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*, *Fusarium sp*, *Alternaria sp*, *Alternaria alternata* and *Penicillium sp...* The largest yields were recorded with *Citrus limon* (1.02%) and *Citrus sinensis* (0.96%). The molecular characterization of essential oils citrus with GC/SM revealed as the major components in common D-limonene (7.18% - 36.10%), the  $\beta$ -pinene (4.35% - 30%) and the  $\alpha$ -pinene (2.04% - 4.36%).

Essential oils of citrus show great power inhibitor of mycelial growth, production and spore germination of phytopathogenic fungi (*in vitro*). Citral and limonene have the largest inhibitory potencies. The antifungal effect of the component is more effective in the process of reproduction that in vegetative stage of the fungus.

The essential oil of *Citrus limon* reduces disease severity (IS = 0%) on potato folioles caused by *Alternaria alternata* (*in vivo*). All the essential oils exert an inhibitor power of development of *Alternaria alternata* on tubers (IM = 0%).

The results of the antifungal activity of essential oils of citrus (*in vitro* and *in vivo*) open the way for their use as an alternative to chemical fungicides.

**Keywords:** Citrus, essential oil, molecular composition, GC/SM, plant pathogenic fungi, antifungal activity.

ملخص

تم تقييم النشاط المضاد لنمو الفطريات لزيوت الاساسية المستخلصة من اوراق الحمضيات

( *Citrus sinensis* و *Citrus limon*, *Citrus reticulata* ;*Citrus aurantium*)

بالإضافة الى المكون الطيار ضد *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*, *Fusarium sp* ,  
*Penicillium sp* ,*Alternaria sp*, *Alternaria alternata*

اكبر عوائد تم تسجيلها مع الزيوت الاساسية *Citrus limon* (1.02%) و *Citrus sinensis* (0.96 %). اثبتت الدراسة للخصائص الجزيئية باستعمال GC/SM وجود D-limonène و

$\alpha$ -pinène (4.36 % - 2.04 %) و  $\beta$ -pinène (30 % - 4.35 %), (7.18 % - 36.10 %) كعناصر اساسية مشتركة للزيوت الحمضيات.

اظهرت الزيوت الاساسية للحمضيات تأثير مثبت كبير على نمو الفطري , انتاج ونبات الأبواغ عند الفطريات الممرضة للنبات (في المختبر). كما يسجل Citral و limonène اكبر نسب تثبيط النمو للفطر. يبدو ان تأثير المكون الطيار يكون خلال مرحلة الانتاج اكثر منه في مرحلة النمو للفطر.

الزيت الأساسي لـ *Citrus limon* يقلل من شدة المرض (IS= 0%) الذي تسببه *Alternaria alternata* على اوراق البطاطا ( *in vivo* ) و تشكل مجموع الزيوت المختبرة على درنات البطاطا مثبطات قوية لنمو الفطر (IM=0%).

النتائج المتحصل عليها تعزز امكانية استعمال الزيوت الأساسية للحمضيات كبدائل للمبيدات

الكيميائية

**الكلمات المفتاحية :** الحمضيات الزيوت الأساسية التركيب الجزيئي, CG/SM , الفطريات المسببة

للأمراض،النبات،النشاط مضاد للفطريات

## Liste des abréviations

---

**Rdt**<sub>HE</sub> : Le rendement d'huile essentielle

**d**<sup>20</sup> : Densité relative à 20°C

**n**<sup>20</sup>**D** : Indice de réfraction à 20°C

**IA** : Indice d'acide

**IE** : Indice d'ester

**GC/MS** : La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

**KI** : Indice de Kovates

**RT** : Temps de retention

**PDA** : Milieu de culture Potato Dextrose Agar

**PDB** : Milieu de culture liquide de dextrose de pomme de terre

**PIc (%)** : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne

**PIb (%)** : Pourcentage d'inhibition de la croissance (poids sec)

**PIs (%)** : Pourcentage d'inhibition de la sporulation

**PIg%** : Pourcentage d'inhibition de la germination

**CMI** : La concentration minimale inhibitrice

**NF** : La nature fongicide/fongistatique

**IS** : Indice de sévérité de la maladie

**IM** : Indice de maladie

**T** : Témoin

## Liste des Tableaux

---

	<b>Pages</b>
<b>Tableau 1</b> : Méthodes d'études de l'activité antifongique des huiles essentielles <i>in vitro</i>	<b>25</b>
<b>Tableau 2</b> : Méthodes d'études de l'activité antifongique des huiles essentielles <i>In vivo</i>	<b>31</b>
<b>Tableau 3</b> . Présentation des cinq plantes étudiées	<b>33</b>
<b>Tableau 4</b> . Caractérisation physicochimique des huiles essentielles de <i>Citrus sinensis</i> , <i>Citrus limon</i> , <i>Citrus aurantium</i> et <i>Citrus reticulata</i>	<b>37</b>
<b>Tableau 5</b> . Composition chimique des huiles essentielles de <i>Citrus sinensis</i> , <i>Citrus limon</i> , <i>Citrus aurantium</i> et <i>Citrus reticulata</i> (par CG/SM)	<b>40</b>
<b>Tableau 6</b> . Activité antifongique des huiles essentielles des citrus	<b>50</b>
<b>Tableau 7</b> . Concentration minimale inhibitrice (CMI) (mg / ml) et la nature fongicide/fongistatique (NF) des huiles essentielles des citrus	<b>52</b>



## Liste des figures

---

	<b>Pages</b>
<b>Figure 1</b> : Modèle général de biosynthèse des métabolites secondaires (Baser et Buchbauer, 2010)	<b>14</b>
<b>Figure 2</b> : Condensation des motifs isopreniques (Mann, 1987)	<b>15</b>
<b>Figure 3</b> : Schéma du montage d'hydrodistillation	<b>34</b>
<b>Figure 4</b> . Le rendement en huiles essentielles pour les quatre espèces étudiées	<b>37</b>
<b>Figure 5</b> : Chromatogramme des huiles essentielles des feuilles de citrus	<b>41</b>
<b>Figure 6</b> . Effet des huiles essentielles des <i>citrus</i> sur le poids sec du mycélium (mg) des cinq champignons phytopathogènes.	<b>53</b>
<b>Figure 7</b> . Effet des huiles essentielles des citrus sur le pourcentage d'inhibition de la sporulation des cinq champignons phytopathogènes	<b>55</b>
<b>Figure 8</b> . Effet des huiles essentielles des citrus sur le pourcentage d'inhibition de la germination des spores produites par les cinq champignons phytopathogènes.	<b>57</b>
<b>Figure 9</b> . Effet du $\beta$ - pinène, $\alpha$ – pinène, citral et limonène sur la croissance mycélienne.	<b>63</b>
<b>Figure 10</b> . Effet du $\beta$ - pinène, $\alpha$ – pinène, citral et limonène aux différentes concentrations sur la croissance mycélienne.	<b>66</b>
<b>Figure 11</b> . Effet du $\beta$ - pinène, $\alpha$ – pinène, citral et limonène sur la production des spores.	<b>68</b>
<b>Figure 12</b> . Effet du Limonène, citral, $\alpha$ – pinène et $\beta$ - pinène aux différentes concentrations sur la production des spores.	<b>69</b>
<b>Figure 13</b> . Effet du $\beta$ - pinène, $\alpha$ – pinène, citral et limonène sur la germination des spores.	<b>71</b>
<b>Figure 14</b> . Effet du limonène, citral, $\alpha$ – pinène et $\beta$ - pinène aux différentes concentrations sur l'inhibition de germination des spores.	<b>72</b>
<b>Figure 15</b> . Effet des concentrations des huiles essentielles de <i>Citrus</i> sur l'indice de sévérité de maladie (test sur foliole).	<b>79</b>
<b>Figure 16</b> . Effet du traitement des huiles essentielles de <i>Citrus</i> sur l'indice de la maladie (sur tubercule de pomme de terre).	<b>81</b>

	Page
<b>Remerciements</b>	I
<b>ملخص</b>	II
<b>Résumé</b>	III
<b>Abstract</b>	V
<b>Liste des abréviations</b>	VI
<b>Liste des tableaux</b>	VII
<b>Liste des figures</b>	VIII
<b>Table des matières</b>	IX
<b>Introduction</b>	1

## **Partie synthèse bibliographique**

<b>Chap.1: Les Agrumes</b>	5
1.1. Généralités sur les Agrumes	5
1.2. Caractéristiques et description des agrumes	6
1.3. Taxonomie des Agrumes	7
1.4. Description des espèces étudiées	7
1.4.1. <i>Citrus aurantium L amara</i>	7
1.4.2. <i>Citrus sinensis (L) Osbeck</i>	8
1.4.3. <i>Citrus reticulata Blanco</i>	8
1.4.4. <i>Citrus limon (L) Burm</i>	8
<b>Chap.2 : Les huiles essentielles</b>	9
2.1. Généralités sur les huiles essentielles	9
2.2. Composition chimique des huiles essentielles	11
2.2.1. Terpènes	11
2.2.1.1. Les monoterpènes	12
2.2.1.2. Les sesquiterpènes	12
2.2.2. Composants aromatiques.	13
2.3. Voies de biosynthèse des huiles essentielles	13
2.4. Activités biologiques des huiles essentielles	15
<b>Chap.3 : Description des espèces fongiques</b>	17
3.1. Généralités sur les champignons phytopathogènes	17
3.2. Etude des espèces fongiques sélectionnées	18

## **Table des matières**

---

3.2.1. <i>Fusarium</i>	18
3.2.1.1. <i>Fusarium oxysporum f.sp. albedinis</i>	19
3.2.2. <i>Penicillium</i>	19
3.2.3. <i>Alternaria</i>	20
3.2.3.1. <i>Alternaria alternata</i>	21
<b>Chap.4 : Méthodes d'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles</b>	<b>23</b>
4.1. Activité antifongique des huiles essentielles des citrus et de leurs composants volatiles vis-à-vis des champignons phytopathogènes	23
4.2. Mécanisme d'action des huiles essentielles sur les champignons	24
4.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles <i>in vitro</i>	24
4.3.1. Méthode des disques	24
4.3.2. Méthode des dilutions	25
4.3.3. Méthode de microdilution	27
4.3.4. Méthode de contact direct	27
4.3.5. Méthode micro atmosphère	28
4.3.6. Facteurs influençant l'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles.	28
4.3.6.1. Choix de la technique d'essai	28
4.3.6.2. Le milieu de culture	28
4.3.6.3. L'huile essentielle	29
4.3.6.4. L'agent dissolvant	29
4.4. Méthodes d'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles <i>in vivo</i>	30

## **Partie expérimentale**

<b>Chap.1 : Caractérisation physicochimique et moléculaire des huiles essentielles</b>	<b>32</b>
1.1. Matériel et méthodes	32
1.1.1. Matériel végétal	32
1.1.2. Extraction des huiles essentielles	32
1.1.3. Détermination du rendement	32

## **Table des matières**

---

1.1.4. Caractérisation physico-chimique des huiles essentielles	33
1.1.4.1. Détermination de la densité relative	33
1.1.4.2. Indice de réfraction	34
1.1.4.3. Pouvoir rotatoire	34
1.1.4.4. Indice d'acide	35
1.1.4.5. Indice d'ester	36
1.1.5. Caractérisation moléculaire des huiles essentielles	36
1.1.5.1. Analyse chromatographique par CG/SM	36
1.1.5.2. Identification moléculaire des huiles essentielles	37
1.2. Résultats et discussion	38
1.2.1. Caractérisation physicochimique des huiles essentielles	38
1.2.1.1. Rendement en huiles essentielles	38
1.2.1.2. Caractérisation physicochimique	39
1.2.2. Caractérisation moléculaire des huiles essentielles	39
1.2.2.1. Profils chimiques des huiles essentielles	39
1.3. Conclusion partielle	45
<b>Chap.2 : Activité antifongique des huiles essentielles <i>in vitro</i></b>	46
2.1. Matériel et méthodes	46
2.1.1. Purification des souches fongiques	46
2.1.2. Huiles essentielles des citrus	46
2.1.3. Activité antifongique <i>in vitro</i>	46
2.1.3.1. Effet des huiles essentielles sur la croissance mycélienne radiale	46
2.1.3.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	47
2.1.3.3. Effet des huiles essentielles des citrus sur le poids sec du mycélium	48
2.1.3.4. Activité antisporeuse des huiles essentielles des citrus	48
2.1.3.5. Activité anti germinative des huiles essentielles des citrus	49
2.1.4. Traitement statistique	49
2.2. Résultats et discussion	49
2.2.1. Activité antifongique	49

## **Table des matières**

---

2.2.1.1. Effet des huiles essentielles sur la croissance mycélienne	49
2.2.1.1. A. Effet de l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i>	49
2.2.1.1. B. Effet de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantium</i>	49
2.2.1.1. C. Effet de l'huile essentielle de <i>Citrus reticulata</i>	49
2.2.1.1. D. Effet de l'huile essentielle de <i>Citrus limon L</i>	51
2.2.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	
2.2.3. Effet des huiles essentielles des citrus sur le poids sec du mycélium des champignons	52
2.2.4. Activité antisporelante des huiles essentielles des citrus	54
2.2.5. Activité anti germinative des huiles essentielles des citrus	56
2.3. Conclusion partielle	58
<b>Chap.3 : Activité antifongique des composés moléculaires majoritaires des huiles essentielles</b>	<b>59</b>
3.1. Matériel et méthodes	59
3.1.1. Les composés majoritaires des huiles essentielles	59
3.1.2. Espèces fongiques.	59
3.1.3. Activité antifongique des composés volatils	59
3.1.3.1. Effet des composants volatils sur la croissance mycélienne radiale	59
3.1.3.2. Activité antisporelante des composants volatils	60
3.1.3.3. Activité anti germinative des composants volatils	61
3.1.4. Traitement statistique	61
3.2. Résultats et Discussion	62
3.2.1. Activité antifongique des composants volatils	62
3.2.1.1. Effet des composants volatils sur la croissance mycélienne radiale	62
3.2.1.1. Effet de la concentration des composants volatils sur la croissance mycélienne radiale	64
3.2.2. Activité antisporelante des composants volatils	67
3.2.2.1. Effet des composants volatils sur la sporulation	67
3.2.2.2 Effet de la concentration des composants volatils sur la sporulation	68

## **Table des matières**

---

3.2.3	Activité anti germinative des composants volatils	70
3.2.3.1.	Effet des composants volatils sur la germination des spores	70
3.2.3.2.	Effet de la concentration des composants volatils sur la germination des spores	71
3.3.	Conclusion partielle	74
<b>Chap.4 :</b>	<b>Activité antifongique des huiles essentielles vis-à-vis d'<i>Alternaria alternata</i></b>	<b>75</b>
	<b><i>in vivo</i></b>	
4.1.	Matériel et Méthodes	75
4.1.1.	Matériel végétal.	75
4.1.2.	Matériel fongique	75
4.1.3.	Les huiles essentielles	75
4.1.4.	Étude de l'activité antifongique des huiles essentielles <i>in vivo</i>	75
4.1.4.1.	Activité antifongique sur folioles de pomme de terre	75
4.1.4.2.	Activité antifongique sur tubercules de pomme de terre	77
4.1.5.	Traitement statistique	78
4.2.	Résultats et Discussion	78
4.2.1.	Activité antifongique sur folioles de pomme de terre	78
4.2.2.	Activité antifongique sur tubercules de pomme de terre	81
4.3.	Conclusion partielle	82
	<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>83</b>
	<b>Références bibliographique</b>	
	<b>Publications internationales</b>	
	<b>ANNEXES</b>	

### INTRODUCTION

Le succès des pratiques agricoles modernes est dû en partie à la découverte et à l'adoption des produits chimiques pour le contrôle des parasites. En effet, l'augmentation énorme des rendements de récolte liés à « The green » révolution n'aurait pas été réalisée sans la contribution de ces composés chimiques (Montesinos, 2003 ; Nunez et *al.*, 2006).

Cependant, les conséquences de l'application des pesticides sur l'environnement et les procédures sévères de leurs enregistrements constituent maintenant un obstacle dans l'homologation de nouveaux pesticides (Deguine et Ferron, 2006). De nouvelles lois ont réduit le nombre de pesticides synthétiques disponibles dans l'agriculture (Dayan et *al.*, 2009). Un des problèmes majeurs qui a conduit à l'adoption de lois strictes, est leurs portées sur la santé humaine, on leur attribue les degrés élevés de toxicité et les effets cancérogènes (Aoudou et *al.*, 2010 ; Ash, 2010).

De nouveaux pesticides sont découverts et développés (Tripathi et Dubey, 2004). L'intérêt pour les pesticides d'origines naturelles (en particulier d'origine végétale) comme alternatifs 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 pesticides (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 une place très importante 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 Sporan<sup>TM</sup> (*Rosemarinus officianalis*), Promax<sup>TM</sup> (*T. vulgaris*), Trilogy<sup>TM</sup> (*A. indica*) et E-Rase<sup>TM</sup> (*Simmondsia californica*) (Isman et *al.*, 2011).

Les huiles essentielles des citrus sont la source la mieux appréciée en parfum et arômes. Elles sont les plus utilisées en cosmétique et en industrie agroalimentaire (Sawamura, 2010).

Les huiles essentielles des citrus 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).

Des études ont été effectuées *in vitro* et sur les aliments pour évaluer l'activité antifongique des huiles essentielles des citrus et de leurs composés actifs. Elles ont rapporté leurs pouvoirs inhibiteurs vis-à-vis de certains champignons phytopathogènes tels que les *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Aspergillus* (Sharma et Tripathi 2008 ; Viuda-Martos et *al.*, 2008 ; Cosic et *al.*, 2010 ; Gumus et *al.*, 2010 ; Philips et *al.*, 2012).



La région de Chlef est une région à vocation agrumicole dont les agrumes occupent une superficie de 5760 Ha (Bellabas, 2011). La valorisation des déchets de taille (feuilles) peut constituer une source en matériel végétal très exploitable comme biofongicide par le secteur agricole.

La première partie de cette thèse est consacrée aux concepts généraux et les méthodes d'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles. Une étude a été réservée à la description des espèces de citrus et des espèces fongiques étudiées.

La deuxième partie de ce manuscrit relève de la démarche expérimentale. Elle s'articule selon quatre sections distinctes : dans un premier chapitre, la détermination des propriétés physicochimiques et moléculaires des huiles essentielles des quatre espèces de citrus (*Citrus sinensis*, *Citrus aurantium*, *Citrus limon L* et *Citrus reticulata*). Une évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles *in vitro* vis-à-vis de cinq champignons phytopathogènes sera discutée dans un second chapitre. Pour une compréhension plus approfondie des composants responsables de l'effet inhibiteur, une étude sera consacrée à l'activité antifongique des composants majoritaires de ces huiles dans le troisième chapitre. L'utilisation des huiles essentielles des citrus dans la protection de la pomme de terre, une des cultures stratégiques en Algérie fera l'objet d'un quatrième chapitre qui sera consacré à l'étude *in vivo* de l'activité antifongique des huiles essentielles vis-à-vis d'*Alternaria alternata*.

## **Synthèse bibliographique**

### 1. Les Agrumes

#### 1.1. Généralités sur les Agrumes

Les agrumes sont originaires du Sud-Est asiatique où ils sont connus depuis 4200 ans et cultivés depuis 3000 ans. Le centre d'origine se situerait plus précisément sous une ligne allant du Nord-Est de l'Inde au Nord de la Birmanie et au Sud de l'île de Haiman, le principal centre d'origine se situerait sous une ligne allant du Nord-Est de l'Inde au Nord de la Birmanie et au Sud de l'île de Hainan. À partir de cette zone, la dispersion se serait effectuée vers l'Est de l'Inde, l'archipel malais et la Chine du Sud (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 XIXe 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. La culture des agrumes est possible partout où la température moyenne de l'année est supérieure à 13°C et inférieure à 39°C. Les sols doivent être profonds, de préférence légers (sablo-argileux ou argile sableuse) et bien drainés. Les agrumes redoutent les eaux salines (au-dessus de 0,5%). L'optimum d'altitude pour un bon développement des agrumes se situe entre 1000 et 1300 m (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).

Dans le domaine de l'agroalimentaire, les agrumes représentent un secteur important. Ils offrent ainsi une grande étendue d'utilisation allant, de la consommation à l'état frais à la transformation en jus, confits ou liqueurs, mais aussi à l'extraction de leurs essence.

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 571.0 milles 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 et description des agrumes**

Les agrumes ont des troncs assez courts, leur feuillage est dense, brillant et persistant sauf pour le genre *poncirus* où il est caduc, les feuilles persistantes, les rameaux parfois épineux connaissent plusieurs vagues de croissance, la plus importante étant celle du printemps. La fleur très parfumée est en général, blanche et composée de quatre ou cinq pétales. Le fruit dont la couleur varie du vert à l'orange est très différent d'une espèce à l'autre par sa forme, sa taille et son goût. Les fruits des citrus cultivés ont presque la même structure : l'écorce, partie non comestible du fruit est peu développée chez les oranges, les mandarines et les clémentines. Elle constitue en revanche la majeure partie du fruit des cédrats ou du pamplemousse. La pulpe, partie comestible, est constituée de poils ou de vésicules enfermant le jus et qui sont regroupés en quartiers pouvant varier de 5 à 18. À la surface des fruits dans l'écorce se trouvent les glandes oléifères remplies d'huiles essentielles (Dugo et Di Giacomo, 2004).

### **1.3. Taxonomie des Agrumes**

Le terme agrumes correspond à 3 genres botaniques (*Citrus*, *Poncirus* et *Forfunella*), interfertiles (Khan,2007). Ils appartiennent, avec 8 autres genres, dont *Eremocitrus*, *Microcitrus*, *Clymenia*, *Citropsis* et *Severinia*, à la sous-tribu des Citrinae, tribu des Citreae, sous-famille des Aurantioideae, Familles des Rutaceae, Ordre des Géraniales, classe des Dicotylédones, subdivision des Angiospermes (Dugo et Di Giacomo,2004). Le genre des citrus appartient à la famille des Rutaceae qui regroupe approximativement 160 genres et 1700 espèces (Hadjiakhundi et Baligh, 2005). Ce dernier renferme la plupart des agrumes cultivés pour leurs fruits ou leurs huiles essentielles.

Deux grandes classifications existent pour le genre *Citrus*. Celle de Tanaka et qui comprend 156 espèces tandis que Swingle et Reece n'en distinguent que 16 espèces (Khan, 2007). Cette contradiction s'explique par les larges possibilités d'hybridations interspécifiques ainsi que par la polyembryonie qui fixe ces structures hybrides : en référence à cette dernière classification, les huit espèces cultivées sont : *C. sinensis* (L.) Osb (l'oranger doux), *C. aurantium* L (oranges amères ou le bigaradier) , *C. reticulata* Blanco (le mandarinier) , *C. paradisi* Macf (le pomelo) , *C. maxima* (Burn.) Merr (le pamplemoussier) , *C. limon* (L) Burm ( le citronnier), *C. aurantifolia* Christm. Swing (le limettier) et *C. medica* L (le cédratier). Ces espèces renferment un grand nombre de variétés.

### **1.4. Description des espèces étudiées**

#### **1.4.1. *Citrus aurantium* L amara**

##### **↳ 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).

### **1.4.2. *Citrus sinensis* (L) Osbeck**

#### **↳ Caractéristiques botaniques**

L'oranger est un arbre environ de 6 à 13 m de haut à feuilles persistantes, racines peu profondes et des branches principalement épineuses. Les feuilles sont lisses et ovales d'un vert foncé au dessus, brillant, avec une odeur caractéristique souvent similaire aux fruits, à pétiole articulé peu ailé. Fleur cireuse d'un blanc verdâtre, parfumée. Fruits moyen, globuleux, peau lisse, orange claire à rouge foncé (Dugo et Di Giacomo, 2004)

### **1.4.3. *Citrus reticulata* Blanco**

#### **↳ Caractéristiques botaniques**

Le mandarinier est un petit arbre de 3 à 5 m de hauteur. Les feuilles sont persistantes, lancéolées, ovales lancéolées à elliptiques lancéolées, d'un vert foncé brillant et pétiole étroitement ailé. Les fleurs sont blanches. Le fruit est aplati ou piriforme, écorce jaune, orange ou rouge orangé riche en glandes huileuses, lisses, rugueuses; croûte mince ou épaisse. Graines habituellement ovoïdes, lisses, base arrondie, apex étroit et aigu; de nombreux embryons, rarement solitaires, cotylédons verts (Lim., 2012).

### **1.4.4. *Citrus limon* (L) Burm**

#### **↳ Caractéristiques botaniques**

Le citronnier arbre rustique, à feuilles persistantes, oblongues lancéolées. Les fleurs sont plus grandes que celles de *Citrus sinensis* à pétales blancs à l'intérieur et pourpre à l'extérieur. Fruits ovoïdes de 5 à 10 cm de long, terminés par un mamelon proéminent. L'écorce extérieure est mince et teinté d'un jaune clair très pâle. Zeste amer et aromatique, le pulpe a une saveur acide et agréable (Millet, 2014).

## **2. Les huiles essentielles**

### **2.1. Généralités sur les huiles essentielles**

Les huiles essentielles sont une mixture de composés, volatils, naturels et caractérisés par une odeur forte. Elles sont synthétisées par les plantes aromatiques en tant que métabolites secondaires (Bakkali et *al.*, 2008) . Elles sont généralement obtenues par hydrodistillation et développées en moyen âge par les arabes. Elles sont connues par leurs effets antiseptique, bactéricide, virocide, antifongique et leur fragrance. Jusqu'à aujourd'hui, ces caractéristiques n'ont pas beaucoup changé sauf qu'elles sont maintenant davantage connues, en particulier au niveau antimicrobien (Bauer et *al.*, 2001) .

Dans la nature, les huiles essentielles jouent un rôle important dans la protection des plantes comme antibactériens, antivirales, antifongiques et insecticides. Elles attirent beaucoup d'insectes comme agents de dispersion du pollen et des graines (Nerio et *al.* , 2010).

Les huiles essentielles sont extraites de diverses plantes aromatiques généralement localisées dans les régions chaudes, tempérées, tropicales et pays méditerranées où elles représentent une partie importante de la pharmacopée traditionnelle. Elles sont liquides, limpides, rarement colorées et solubles dans les solvants organiques avec une densité généralement plus faible que celle de l'eau.

Elles peuvent être synthétisées par l'ensemble des organes de la plante (bourgeons, fleurs, feuilles, tiges, brindilles, graines, fruits, racines, bois ou écorces). Elles sont stockées dans les cellules sécrétrices, cavités, canaux, cellules épidermiques ou trichomes glandulaires (Ennajdaoui, 2009). Chemat in Sawamura (2010) indique que les huiles essentielles des citrus peuvent être extraites à partir de la totalité des organes de l'arbre.

Il y a plusieurs méthodes d'extraction des huiles essentielles. Celles-ci peuvent inclure l'utilisation du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) liquide ou micro-ondes et l'utilisation de l'hydrodistillation à basse ou haute pression en employant de l'eau bouillante ou de la vapeur chaude.

En raison de leurs actions bactéricides, fongicides, leurs propriétés pharmaceutiques et alimentaires, elles sont de plus en plus requises comme alternatives aux produits chimiques de synthèse pour protéger l'équilibre écologique.

Dans ce cas l'extraction par hydrodistillation est la plus préférée. Quant à celles destinées à des usages de parfumerie, l'extraction aux solvants lipophiles est la plus privilégiée. Pour les huiles essentielles des fruits d'oranger, Farhat et al.,(2011) estiment que la méthode d'extraction la plus économique et écologique est l'extraction par microonde.

Ainsi, le profil chimique des huiles essentielles se distingue, non seulement en nombre de molécules, mais également dans les types stéréochimiques des molécules extraites et ceci selon la nature et le type d'extraction (Sawamura ,2010).

Le produit d'extraction peut varier en qualité, en quantité et en composition en fonction du climat, la composition du sol, l'organe de la plante, l'âge, le stade du cycle végétatif et les conditions de stockage de l'huile essentielle (Masotti et al., 2003; Angioni et al., 2006 ; Brada et al., 2007). Sawamura et al. (2004) confirment que la composition chimique des huiles essentielles de *Citrus limon* (citronnier) change suivant les conditions de stockage. Ainsi, afin d'obtenir des huiles essentielles de composition constante, elles doivent être extraites dans les mêmes conditions à partir du même organe de la plante, sous le même climat et dans la même saison.

Smith et al. (2005) rapportent que des monographies analytiques ont été publiées par la pharmacopée européenne, ISO, l'OMS et le Conseil de l'Europe pour assurer une bonne qualité des huiles essentielles. Les huiles essentielles ont été largement employées pour leurs propriétés déjà observées dans la nature, soit pour leurs activités antibactériennes, antifongiques et insecticides.

À l'heure actuelle, environ 3000 huiles essentielles sont connues, dont 300 sont dans le commerce important, en particulier pour l'industrie pharmaceutique, agronomique, alimentaire, sanitaire, industries cosmétiques et de parfums (Bakkali et al ., 2008). Sawamura (2010) rapporte que les huiles essentielles des citrus ou de leurs composants sont utilisées dans le cosmétique, pharmaceutique et en agriculture.



Certaines huiles essentielles constituent des alternatives ou des compléments efficaces pour les composés synthétiques de l'industrie chimique, sans montrer les mêmes effets secondaires (Carson et Riley, 1995).

### **2.2. Composition chimique des huiles essentielles**

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels très complexes, caractérisées par deux ou trois majeurs composants à des concentrations assez élevées (20 -70%) par rapport aux autres composants présents sous forme de traces (Bauer et *al.*, 2001).

Les huiles essentielles des citrus contiennent 85 - 99 % de fractions volatiles et 1- 15 % de fractions non volatiles (des hydrocarbures, des stérols, des acides gras, des cires, des caroténoïdes, des coumarines, des psoralènes, et des flavonoïdes) (Tranchida et *al.*, 2012).

Les huiles essentielles peuvent être classées en plusieurs familles biochimiques (alcools, phénols, composés terpéniques...). Les constituants des huiles essentielles proviennent souvent de plusieurs principales voies de biosynthèse (Franz et Novak, 2010). En général, ces composants déterminent les propriétés biologiques des huiles essentielles et ils comprennent deux groupes d'origine biosynthétique distincte (Croteau et *al.*, 2000 ; Betts, 2001; Pichersky et *al.*, 2006). La série terpénique et la série des composés aromatiques dérivés du phénylpropane sont beaucoup moins fréquentes.

#### **2.2.1. Terpènes**

Les terpènes constituent une famille de composés largement répandus dans le règne végétal, comprenant au moins 30 000 composés (Connolly et Hill, 2005). Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique à 5 atomes de carbone (C5).

Ils sont reconnus d'être les principaux composants des huiles essentielles des citrus (Sawamura, 2010). Les Terpènes forment structurellement et fonctionnellement différentes classes. La richesse des terpènes en squelettes de carbone peut être attribuée à une classe d'enzyme connue sous le nom de terpène synthases (Degenhardt et *al.*, 2009) .

Ils sont classés selon :

- leurs fonctions: alcools (géraniol, linalol), esters (acétate de linalyle), aldéhydes (citral, citronellal), cétones (menthone, camphre, thuyone), éthers-oxydes (cinéole) ;
- leur structure: linéaire (farnésène, farnésol), monocyclique (humulène, zingiberène), bicyclique (cadinène, caryophyllène, chamazulène) ou tricyclique (cubébol, patchoulol, viridiflorol) ( Breitmaier, 2006).

Les principaux terpènes sont les monoterpènes (C<sub>10</sub>), et sesquiterpènes (C<sub>15</sub>) (Fraga, 2006), les hemiterpenes (C<sub>5</sub>), Diterpènes (C<sub>20</sub>) (Hanson, 2000), les triterpènes (C<sub>30</sub>) et tétraterpènes (C<sub>40</sub>) (Connolly et Hill, 2005).

### **2.2.1.1. Les monoterpènes**

Les monoterpènes sont formés à partir de l'accouplement de deux unités isoprène (C<sub>10</sub>). Ce sont les molécules les plus représentatives constituant 90% des huiles essentielles et autorisent une grande variété de structures (Couderc, 2001).

Sawamura (2010) rapporte que les monoterpènes sont présents en fort pourcentage chez les huiles essentielles des citrus africains dont la fraction la plus importante revient aux monoterpènes hydrocarbonés et les composants majoritaires souvent rencontrés chez les citrus sont le limonène, Myrcène,  $\alpha$  - pinène, sabinène,  $\beta$ - pinène, camphène,  $\alpha$  - phellandrene, Z( $\beta$ )-ocimene, E ( $\beta$ )-ocimene,  $\alpha$  - terpinene,  $\gamma$ - Terpinene et les autres composés moins de 0.1 %. Thormar, (2011) rapporte que les huiles essentielles extraites à partir des fruits des citrus contiennent plus de 90 % du limonène. De son côté Shaw (1979) rapporte que le limonène constitue 83-97% des huiles essentielles des fruits d'orange douce, 54-80% pour le citron et 25-32% pour la bergamote.

Les monoterpènes contiennent plus de 900 composés connus et se trouvent principalement dans 3 catégories structurales: les monoterpènes linéaires (acyclique), les monoterpènes avec un cycle unique (monocycliques) et ceux avec deux cycles (bicycliques) (Harkati, 2011). Quand la molécule est optiquement active, les deux énantiomères sont le plus souvent présents dans des plantes différentes.

### **2.2.1.2. Les sesquiterpènes**

Les sesquiterpènes contiennent 15 atomes de carbone. Ils sont moins volatils et présentent des points d'ébullition plus élevés que les monoterpènes (Baser et Buchbauer, 2010). Ce sont des dérivés hydrocarbures de formule C<sub>15</sub>. Il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes qui se divisent en plusieurs catégories structurales, acycliques, monocycliques, bicycliques, tricycliques, polycycliques. La structure et la fonction des sesquiterpènes sont semblables à ceux des monoterpènes (Bakkali et *al.*, 2008).

Ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures ou sous forme d'hydrocarbures oxygénés comme les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones dans la nature (Degenhardt et *al.*, 2009 ; El haib, 2011). Dugo et Di Giacomo (2004) mentionnent le faible pourcentage des sesquiterpènes dans les huiles essentielles des citrus méditerranéen.

### **2.2.2. Composants aromatiques.**

Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane sont beaucoup moins fréquents dans les huiles essentielles que les monoterpènes et sesquiterpènes. Citons l'acide cinnamique et l'aldéhyde cinnamique, l'eugénol, l'anéthole et l'aldéhyde anisique, ainsi que le safrole.

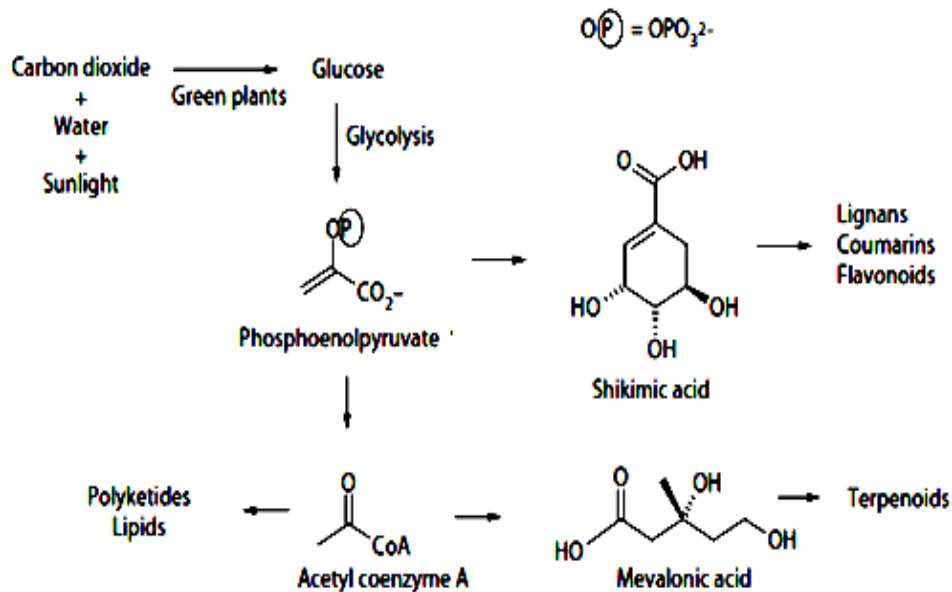
Les lactones dérivées des acides cinnamiques, comme les coumarines, sont, pour la plupart, entraînaient par la vapeur d'eau et ainsi présentes dans certaines huiles essentielles (Baser et Buchbauer, 2010 ; Couic-Marinier et Lobstein, 2013).

Les principales plantes sources pour ces composés sont : anis, cannelle, clou de girofle, fenouil, noix de muscade, persil, sassafras, anis étoilé, estragon, et quelques familles botaniques (Apiaceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Rutaceae).

## **2.3. Voies de biosynthèse des huiles essentielles**

Les produits chimiques synthétisés par la nature peuvent être classés en deux groupes. Les métabolites primaires sont ceux universels pour les plantes et les animaux. Ils constituent les blocs fonctionnels de base pour la vie (Baser et Buchbauer, 2010). Les métabolites secondaires sont ceux produits dans quelques espèces et ils sont habituellement classés dans les terpénoïdes, shikimates, polyketides, et alcaloïdes (Sauvion et *al.*, 2013).

Aujourd'hui, il est admis que la voie de l'acide mévalonique conduit à la formation des terpènes. Cet acide est obtenu à partir du métabolisme des sucres après formation de l'acétyl coenzyme A (Figure 1).



**Figure 1** : Modèle général de biosynthèse des métabolites secondaire (Baser et Buchbauer, 2010)

La conversion de l'acide mévalonique en structures hémiterpéniques débute par une double phosphorylation pour donner l'isopenténylpyrophosphate (IPP). Le pyrophosphate d'isopentényle est isomérisé en diméthylallylpyrophosphate (DMAPP).

L'addition du DMAPP sur la double liaison de l'IPP conduit au pyrophosphate de géranyle (GPP), précurseur des monoterpènes (Degenhardt et *al.*, 2009). Le processus s'accompagne de l'addition de l'IPP sur le GPP et conduit au pyrophosphate de farnésyle (FPP), précurseur des sesquiterpènes (Sallaud et *al.*, 2009); une condensation ultérieure de l'IPP sur le FPP conduira au pyrophosphate de géranylgéranyl (GGPP), précurseur des diterpènes et ainsi de suite pour former la série de pyrophosphates de prényls allyliques homologues (Figure 2).

L'allongement de la chaîne est catalysé par des prényl-transférases dont certaines sont spécifiques pour une chaîne donnée (Oswald, 2006).

- pyrophosphate de géranyle (GPP), précurseur des monoterpènes
- pyrophosphate de farnésyle (FPP), précurseur des sesquiterpènes
- pyrophosphate de géranylgéranyl (GGPP), précurseur des diterpènes

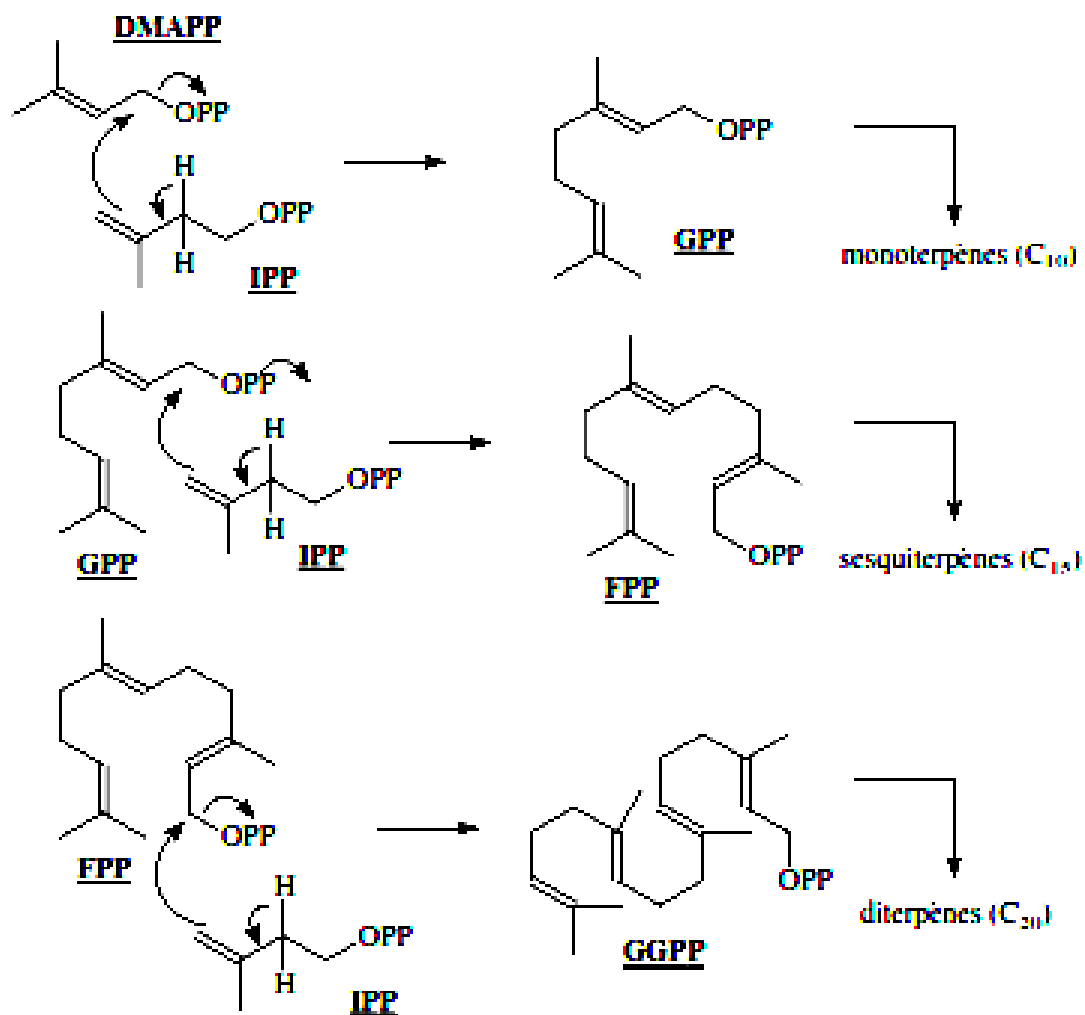


Figure 2 : Condensation des motifs isopreniques (Mann, 1987)

Ces précurseurs subissent une série de réactions de conversion, d'ionisation, d'isomérisation et de cyclisation catalysées par des enzymes spécifiques pour aboutir aux produits finaux des monoterpènes ou des sesquiterpènes.

#### 2.4. Activités biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles et leurs composants chimiques possèdent un large spectre d'activités biologiques incluant les activités antimicrobienne (Hanana et al., 2014 ; Hamrouni et al., 2014 ; Parveen et al., 2014 ), antioxydante (Arab et al., 2014), anticancéreuse (Millet, 2014), anti-inflammatoire (Kim et al., 2014) ,insecticide (Vera et al., 2014) analgésique (Hajjaj et al., 2014), sédatif, antispasmodique , anesthésiant local (Bakkali et al., 2008), antiasthmatique ( Shirole et al., 2014) et cytotoxique (Gazim et al., 2014).

## **Les huiles essentielles**

---

En raison de leurs grands nombres de constituants, les huiles essentielles ne semblent pas avoir de cibles cellulaires spécifiques (Carson et *al.* , 2002). Comme lipophiles classiques, elles passent à travers la paroi cellulaire, elles perturbent la structure de la membrane cytoplasmique et mitochondriale. Les huiles essentielles sont aussi des antioxydants tels que les terpènes et les composants phénoliques. Les antioxydants sont soupçonnés d'être directement antimutagènes (Clark, 2002) et anticancéreux en raison de leurs propriétés anti radicalaires. Il est maintenant admis que les activités prooxydantes des huiles essentielles peuvent induire l'apoptose tardive et des nécroses (Hadi et *al.* , 2000).

### **3. Description des espèces fongiques**

#### **3.1. Généralités sur les champignons phytopathogènes**

Les champignons (Fungi ou mycètes) constituent un groupe d'organismes hétérotrophes ubiquistes, riches de quelques 100.000 espèces (Meulemans, 1989). Les champignons parasites des végétaux sont des microorganismes dont les dimensions des spores se situent entre 10 -100 microns (Corbaz, 1990).

Ils sont caractérisés par un mycélium, formé de filaments nommés hyphes. Chez les moins évolués, les hyphes ne sont pas cloisonnés. Organismes, sans chlorophylle, ils tirent leurs nourritures soit de matières organiques mortes ; ce sont alors des champignons saprophytes, soit de tissus végétaux vivants, pour les parasites (Lepoivre, 2003).

Les champignons se reproduisent essentiellement par des spores unies- ou pluricellulaires. On différencie, selon leur origine, les spores sexuées et les asexuées. La forme sexuée, ou télémorphe, a pour fonction de maintenir l'espèce et apparait souvent en fin de saison alors que la forme asexuée, dite aussi forme imparfaite ou anamorphe, assure la propagation (Lanier et *al.*, 1998).

La plupart des champignons utilisent toutes les voies (asexuée, sexuée et végétatives) afin de produire un nombre très important d'unités de propagation telles que les spores ou le mycélium pour la survie et la propagation ( Prabhu et *al.*, 1992). La classification des champignons est essentiellement basée sur des caractères purement morphologiques (Meyer *et al.*, 2004). On distingue cinq groupes de champignons : Archimycètes (Champignons inférieurs), Phycomycètes, Ascomycètes, Basidiomycètes et Adéломycète ou deutéromycète (Simon,1994).

Les champignons phytopathogènes sont connus d'être à l'origine de plusieurs maladies de plantes et des pertes de rendement pour de nombreuses récoltes économiquement importantes (Fletcher et *al.*, 2006 ; AbdelKader et *al.* , 2012). En agriculture, chaque année on enregistre environ des pertes en rendement de l'ordre de 20 % dû essentiellement aux maladies fongiques (Bajwa et *al.*,2004).

Les champignons nécessitent trois facteurs pour s'exprimer: l'agent pathogène, l'hôte et l'environnement. Au cas où ces trois facteurs sont favorables, la maladie se déclare (Prabhu et *al.*, 1992). Les champignons phytopathogènes sont susceptibles d'attaquer les fruits frais et légumes dans une haute teneur en humidité et un environnement à haute température ( Boyraz et Ozcan,2006).En raison de leur puissant arsenal d'enzymes hydrolytiques, ces micro-organismes peuvent causer un degré élevé de détérioration lorsqu'ils sont présents dans / sur les aliments et peuvent être responsables de pertes économiques considérables.

En outre, ils peuvent agir comme producteur potentiel de métabolites toxiques, nommés mycotoxines, qui sont potentiellement dangereux pour la santé des consommateurs. Ils sont à l'origine de plusieurs maladies végétales dont les conséquences sont la réduction du rendement dans plusieurs pays. Les *Fusarium*, *Penicillium* et les *Alternaria*, sont la cause des maladies pour beaucoup de culture affectant les feuilles, les tiges, les fleurs, les fruits et les graines (Li et *al.*, 2008 ;Mašková et *al.*, 2012 ; Broydé et Doré, 2013).

## **3.2. Etude des espèces fongiques sélectionnées**

### **3.2.1. *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).

#### **3.2.1.1. *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis***

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. albedinis* est l'espèce la plus destructive du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) causant le Bayoud ou *Tracheomyose* du palmier. Elle menace véritablement tous les pays producteurs de dattes. L'impact de cette maladie est très sévère au Nord d'Afrique (Dihazi et al., 2012). En Algérie elle aurait décimé 3 millions d'arbres, la variété Deglet Nour est très sensible (Bounaga et Djerbi, 1990).

L'agent causal est *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*, champignon imparfait, tuberculariacé. Le champignon se reproduit exclusivement de façon végétative, en formant des spores, les microconidies, les macroconidies, et les chlamydo-spores.

Le champignon envahit le système vasculaire de la plante, jusqu'aux palmes et au bourgeon terminal, à partir des racines où se produit l'infection. Il se propage dans les vaisseaux surtout par les conidies véhiculées par la sève. Il pénètre dans la plante et migre dans les vaisseaux libéro-ligneux. Il se maintient très longtemps dans les palmiers infectés. Le dessèchement de la plante résulte donc du blocage de la circulation de sève, conséquence des différentes altérations du système vasculaire (Lepoivre, 2003).

#### **3.2.2. *Le Penicillium***

Le *Penicillium* a été décrit pour la première fois par Link en 1809 (Johnston, 2008). Le nom *Penicillium* dérive du mot latin « *penicillus* » qui signifie « petite brosse ».

On estime que le genre *Penicillium* comporte plus de 300 espèces (Samson et Pitt, 2000). *Penicillium* appartient à la classe des *Ascomycetes*, ordre des *Plectascineae*, famille *Aspergillaceae* et genre *Penicillium*. Les *Penicilliums* sont des champignons pour la plupart très communs dans l'environnement, polyphages, pouvant être responsables de nombreuses dégradations. Ils ont pour habitat naturel le sol, les denrées alimentaires, les matières organiques en décomposition, le compost, les céréales (Lepoivre, 2003).

Le thalle, formé de filaments mycéliens septé et hyalin, porte des conidiophores lisses ou granuleux, simples ou ramifiés qui se terminent par un pénicille. Les conidiophores peuvent être isolés, groupés en faisceaux lâches ou agrégés en corémies bien individualisés (Nguyen, 2007). Les conidies sont des spores unicellulaires, globuleuses, elliptiques, cylindriques ou fusiformes, lisses ou rugueuses, hyalines, grisâtres ou verdâtres (Samson et Pitt, 2000).

#### **3.2.3. *Alternaria***

La classification des champignons a longtemps été uniquement basée sur des critères morphologiques et le mode de reproduction. Selon cette nomenclature, Nees décrit pour la première fois en 1816, un champignon qu'il nomme *Alternaria tenuis*. Le genre *Alternaria* comprend les agents saprophytes et pathogènes des plantes (Thomma, 2003).

Il regroupe plus de 100 espèces ubiquitaires extrêmement répandues dans les sols, la végétation, l'air ou les aliments (Calmes, 2011). En raison de leur croissance, même à faible température, *Alternaria sp* sont des agents pathogènes après récolte bien connue, responsable de la détérioration des aliments pendant le transport réfrigéré et le stockage (Ostry, 2008). Les pertes économiques sont essentiellement liées à la réduction de la qualité due à une diminution de la valeur nutritive (Kosiak et al., 2004).

En plus des pertes dans l'alimentation et production fourragère, de nombreuses espèces d'*Alternaria* sont des productrices de mycotoxines avec des propriétés toxicologiques dont les plus importantes sont alternariol, l'éther alternariol monométhyle, altenuen, l'acide tenuazoic et altertoxines (Logrieco et al., 2009).

Cependant la majorité des espèces du genre *Alternaria* sont des champignons phytopathogènes inféodés à une famille de plantes ou à une plante spécifiquement.

Ils sont généralement présents sur les semences provoquant des manques à la levée ou des fontes de semis. Les jeunes pousses atteintes constituent une source importante d'inoculum primaire pour les plantes matures où tous les organes aériens peuvent être affectés (Lepoivre ,2003).

La gamme de plantes hôtes concernées par l'alternariose est très variée et certaines espèces peuvent provoquer d'importants dégâts sur des espèces cultivées occasionnant des pertes financières significatives.

La caractéristique clé taxonomique du genre *Alternaria* est la production de grandes conidies de couleur foncée (mélanisée) avec des cloisons longitudinales et transversales (Phaeodictyospores) , organisées en chaînette en nombre variable. Ces conidies sont plus larges à la base et se rétrécissent progressivement à un bec allongé, offrant une apparence forme de massue (Thomma, 2003). Elles mesurent entre 50-100 µm de long et 3-16 µm de large. La complexité taxonomique des *Alternaria* est liée à leur diversité et leur hétérogénéité à générer de nombreuses classifications.

L'émergence de la taxonomie moléculaire basée sur la comparaison des séquences nucléotidiques a abouti au classement du genre parmi les *Ascomycètes* au sein de la classe des *Dothideomycètes* . Ils sont phylogénétiquement proches de nombreuses espèces phytopathogènes (comme *Leptosphaeria*, *Venturia*, *Pleospora*, *Phaeosphaeria*, *Mycosphaerella*, *Cladosporium*, *Pyrenophora*, *Clochliobolus* etc.) (Calmes, 2011).

#### **3.2.3.1. *Alternaria alternata***

La pomme de terre cultivée, *Solanum tuberosum* L., est le légume le plus consommé au monde. C'est la quatrième culture vivrière du monde après le blé, le riz et le maïs (Alavni et al., 2011). Elle occupe une place importante dans les régimes alimentaires de plusieurs pays dans le monde.

L'Algérie est le deuxième pays producteur de pomme de terre dans le monde arabe et en Afrique après l'Égypte avec une production de 4.219.476.00 de tonne en 2012 (FAOSTAT, 2014). *Alternaria alternata*, est l'un des microorganismes pathogènes prévalent causant la tache brune des feuilles sur pomme de terre dans le monde (Thomma, 2003). La maladie des taches brunes sur feuilles est connue comme étant une des maladies les plus destructives et communes de la pomme de terre cultivée dans les régions à précipitations fréquentes et à

haute humidité relative. La maladie peut se produire sur un large éventail de conditions climatiques (Pitt et Hocking, 2009).

La maladie des taches brunes des feuilles dépend principalement de la fréquence de l'humidité du feuillage dû aux précipitations, du brouillard, de la rosée, ou de l'irrigation, du statut nutritionnel du feuillage et la susceptibilité du cultivar (Stevenson *et al* in Mason et Gillespie, 2013).

Les taches foliaires se développent entre les nervures depuis le bord et la pointe des feuilles. Elles sont d'abord pâles avant d'évoluer en lésions brunes claires irrégulières aux bords plus sombres et au centre plus clair où les tissus se nécrosent puis disparaissent (Thomma, 2003). Les taches sont peu à peu colonisées par un duvet noir de conidies. Sur les tubercules de pommes de terre se développent des taches brunes et des petites cavités noires.

#### **4. Méthodes d'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles**

##### **4.1. Activité antifongique des huiles essentielles des citrus et de leurs 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* ) , *Penicillium* (*P. digitatum*, *P. italicum* et *P. chrysogenum*) , *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), citron (*Citrus limon* Burm.f.) et *Citrus bigaradia* Hook.f exhibent de forts pouvoirs inhibiteurs.

De nombreux auteurs ont tenté de corrélér 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) .

Jing et al.(2014) concluent que les huiles essentielles des citrus, dont le limonène constitue le composant majoritaire (31.83 % à 96.62 % ), sont efficaces dans l'inhibition de la croissance mycélienne , la production des spores et la réduction des mycotoxines produite par les espèces *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. et A. terreus*.

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 des quelles ils ont été extraits (Ipek et *al.*, 2005).

#### **4.2. 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 (Kalembe 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).

#### **4.3. Méthodes d'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles *in vitro***

Pour la détermination du pouvoir antifongique des huiles essentielles, des méthodes conventionnelles sont habituellement appliquées *in vitro* (Tableau1).

##### **4.3.1. 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

## **Chap.4 : Méthodes d'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles**

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).

### **4.3.2. Méthode des dilutions**

Dans la méthode des dilutions, l'huile essentielle est incorporée dans le milieu semi-solide d'Agar ou bouillon liquide en différentes quantités.. L'absence de la croissance sur milieu de culture semi-gélosé ou dans les tubes à essai est déterminée à l'œil nu après incubation.

La faible miscibilité des huiles essentielles dans l'eau constitue une difficulté. L'utilisation des solvants (diméthylsulfoxyde et éthanol) ou des tensioactifs (Tween 20 et 80) dans le milieu de culture est inévitable ce qui peut influencer la concentration minimale inhibitrice (Hili et *al.*, 1997). L'expression des résultats peut être de deux manières :

- L'index d'inhibition de la croissance définie comme le pourcentage d'inhibition de la croissance du champignon par rapport au témoin incubé sur milieu de culture exempt d'huile essentielle.
- La concentration minimale inhibitrice (CMI) (analyse d'activité fongistatique) ou la concentration minimale fongicide (CMF) (ou létale)

## Chap.4 : Méthodes d'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles

**Tableau 1** : Méthodes d'études de l'activité antifongique des huiles essentielles *in vitro*

Méthodes	Organismes Fongiques	Huiles essentielles ou composés	Concentrations	Auteurs
Disques	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. verticillioides</i> , <i>F. subglutinans</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>Diaporthe helianthi</i> , <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>caulivora</i> , <i>Phomopsis longicolla</i> , <i>P. viticola</i> , <i>Helminthosporium sativum</i> , <i>Colletotrichum coccodes</i> , <i>Thanatephorus cucumeris</i>	<i>Thymus vulgaris</i> , <i>Cinnamomum zeylanicum</i> , <i>Syzygium aromaticum</i> ,	5 µl	Cosic et al.,(2010)
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Satureja macrosiphonia</i> Bornm	10 ml	Aghaei et al .,(2014)
Dilution	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> , <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Alternaria citrii</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium digitatum</i>	<i>Thymus vulgaris</i> , <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	50, 100, 200, 500, 1000, 2000 et 3000 µl/ml	Combrinck et al.,(2010)
Microdilution en plaques (microplaque)	<i>Penicillium italicum</i> Wehmer, <i>Penicillium digitatum</i> Sacc. et <i>Colletotrichum musea</i> (Berk. & M.A. Curtis)	Trente huiles essentielles	1 000 ppm.	Kouassi et al.,(2012)
	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Cladosporium</i> spp., <i>Penicillium citrinum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , et <i>Rhizopus oryzae</i>	Thymol; Carvacrol; Menthol; Eugenol	<i>Cladosporium</i> spp. (CMI) : 100 µg/mL), <i>Aspergillus</i> spp. (CMI : 100 µg/mL),	<a href="#">Abbaszadeh et al .</a> ,(2014)
Contact direct	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>P. funerea</i> , <i>Ganoderma australe</i> , <i>F. solani</i> . <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Melonis</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Calocedrus macrolepis</i> var. <i>formosana</i>	2 mg/ml	Chang et al.,(2008)
	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Cladosporium Fulvum</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Myrothecium roridum</i>	<i>Citrus sinensis</i>	25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600 et 700 ppm	Sharma et Tripathi ( 2006)
	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus niger</i> et <i>Alternaria alternata</i>	<i>Anethum graveolens</i> L	0.25, 0.5, 1.0, 1.5, et 2.0 µl/ml.	Tian et al .(2011)
	<i>Alternaria solani</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>S. minor</i> , <i>Macrophomina phaseolina</i> et <i>Pythium</i> sp.	<i>Thymus vulgaris</i> , <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	0.25 % 0.5 % et 1.0 %	AbdelKader et al ., (2012)
	<i>Fusarium avenaceum</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium. subglutinans</i> , <i>Fusarium verticillioides</i> , <i>Fusarium nygamai</i> , <i>Rhizoctonia</i> sp., <i>Microdochium nivale</i> var <i>nivale</i> , <i>Alternaria</i> sp. et <i>Bipolaris sorokiniana</i> .	<i>Pinus halepensis</i>	4 µl/ml	Hamrouni et al. (2014)
	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Citrus sinensis</i> <i>Citrus limon</i> <i>Citrus bergamia</i>	1/10 et 1/100	Messgo-Moumene et al.,(2014)
	<i>Phytophthora colocasiae</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 et 0.156 mg/ml	Sameza et al.,(2014)
Microatmosphère	<i>Alternaria alternata</i> et <i>Penicillium expansum</i> L	<i>Eucalyptus camaldulensis</i> , <i>Mentha pulegium</i> ,	2,5 ; 5 ; 10 ; 20 ; 30µl/ml	Hmiri et al.(2011)
	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Cladosporium Fulvum</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Myrothecium roridum</i>	<i>Citrus sinensis</i>	25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600 et 700 ppm	Sharma et Tripathi (2006)



La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la plus faible concentration sans croissance observable (à la loupe binoculaire). En revanche la concentration minimale fongicide (CMF) est définie par la plus faible concentration engendrant une inhibition totale de la croissance.

La méthode des dilutions a été adoptée par 71% des études destinées à évaluer le pouvoir antifongique des huiles essentielles des citrus vis-à-vis des champignons pathogènes (Baser et Buchbauer, 2010).

### **4.3.3. Méthode de microdilution**

La méthode microdilution est un modèle, reproductible et standardisé, basé sur des séries de dilutions avec des répétitions par série réparties sur microplaques. Le test nécessite relativement une faible quantité d'huile essentielle pour les essais. Cette méthode reste très limitée dans son utilisation. L'estimation de la biomasse fongique est relevée par spectrophotométrie. La croissance mycélienne est contrôlée par photométrie à 492 nm par mesure de la densité optique (DO) de chaque puit en comparaison au témoin inoculé non traité par l'huile essentielle (Wilson et al., 1997 ; Kuhajek et al., 2003). C'est une technique rapide pour le screening de l'activité antifongique d'un nombre élevé d'huiles essentielles (Kouassi et al., 2012).

### **4.3.4. Méthode de contact direct**

La technique de contact direct ou poisoned food est employée pour étudier le pouvoir inhibiteur des huiles essentielles vis-à-vis des champignons phytopathogènes (Hamrouni et al., 2014 ; Messgo-Moumene et al., 2014 ; Sameza et al., 2014)

Un disque mycélien est placé au centre d'une boîte de pétri contenant l'huile essentielle ou ces composants dans un milieu solide gélosé. Les cultures de croissances contenant les huiles essentielles sont accompagnées par les cultures témoins négatives, où les huiles sont remplacées par de l'eau ou du solvant. Biondi et al., (1993) proposent l'utilisation de cultures témoins positives contenant un fongicide standard pour évaluer la sensibilité des souches testées. Par contre Janssen et al., (1987) estiment que cette étape n'est pas nécessaire pour l'évaluation de l'activité antifongique et l'application du fongicide n'est possible que dans le cas de l'étude de la sensibilité des souches.

En outre l'activité fongicide ou fongistatique peut être vérifiée en transférant le disque mycélien ne montrant aucune croissance sur un autre milieu frais exempt d'huile essentielle ou de ces composants (Thompson ,1989).

### **4.3.5. 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 géloseensemencée 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).

### **4.3.6. 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.

#### **4.3.6.1. Choix de la technique d'essai**

Baser et Buchbauer (2010) considèrent que le choix de la technique d'évaluation de l'activité antifongique peut influencer le résultat obtenu. Ainsi 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 *Citronellae aetheroleum* était inactive vis-à-vis de neuf espèces de champignons avec la méthode de dilution, mais elle a inhibé la croissance de la totalité des espèces fongiques dans la méthode micro atmosphère.

### **4.3.6.2. Le milieu de culture**

Le milieu de culture est l'environnement direct pour l'espèce étudiée, c'est un facteur très important dans la détermination de l'activité antimicrobienne d'une substance. Les constituants du milieu peuvent réagir avec les composants de l'huile essentielle en les activant ou en les inhibant. Schuermann et Spitzner in Janssen et *al.*, (1987) ont remarqué que plus le contenu du milieu en Agar était élevé plus la solubilité et les zones d'inhibition étaient faibles et petites.

De même pour le pH qui peut influencer les résultats lorsque le test concerne les molécules neutres. L'huile essentielle d'Anis était active vis-à-vis de *Penicillium brevicompactum*, *Aspergillus fumigatus*, et *Cladosporium herbarum* au pH 4.8 plus qu'au pH 6.8 (Forstreuter-Kuenstler et Ahlert, 1984).

Kalemba et Kunicka, (2003) mentionnent aussi que les périodes d'incubation longues peuvent entraîner l'évaporation ou la décomposition de certains des composants de l'huile essentielle au cours de la période d'essai. Cependant d'autres facteurs devraient également être considérés : les conditions de culture (le type et le volume du milieu de culture).

Le milieu Potato Dextrose Agar (PDA) est largement utilisé pour les études d'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles (Cosic et *al.*, 2010 ; El Ajjouri et *al.*, 2010 ; Abdelkader et *al.*, 2012).

### **4. 3.6.3. 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)

### **4. 3.6.4. 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 EI-Galeel , 2010) . Les tensioactifs sont relativement inactifs et ils sont largement appliqués comme émulsifiants tels le Tween 20 (Griffin et al ., 2000) et le Tween 80 (Delespaul et al .,2000). Ce sont des composés ayant à la fois des groupes chimiques hydrophiles et lipophiles sur la même molécule de tensioactif. Kalemba et Kunicka, (2003) rappellent que l'addition d'un émulsifiant ou d'un solvant doit être appliquée à des concentrations n'affectant pas la croissance ou la différenciation des microorganismes testés.

## **4.5. Méthodes d'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles *in vivo***

Peu de travaux ont été consacrés à l'étude de l'efficacité antifongique des huiles essentielles *in vivo* (Tripathi et al., 2013) (Tableau 2). Les études entreprises *in vivo* rapportent que les huiles essentielles augmentent la durée de conservation des fruits et légumes en réduisant le développement des champignons fongiques. La possibilité d'utiliser les huiles essentielles par pulvérisation, contact direct avec l'huile (trempage ou mouillage), en vaporisation ou incorporées à d'autres matériaux d'emballages pour le contrôle des

#### **Chap.4 : Méthodes d'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles**

maladies après récolte a été testée sur des plantes entières, feuilles ou folioles, racines, fruits et légumes (Mahdavi et *al.*.,2013 ; Messgo-Moumene et *al.*,2014 ; Sameza et *al.*,2014).

Une grande partie des études se concentre sur les potentialités d'application des huiles essentielles comme fumigants. L'avantage qu'offrent les huiles essentielles est leurs bioactivités en vaporisation, une caractéristique qui rend leurs applications attrayantes, dans la protection des produits stockés (Chu et *al.*, 1999 ; Liu et *al.*,2002).

Fisher et Phillips, (2009) soulignent l'efficacité des huiles essentielles de *Citrus sinensis* et *Citrus bergamia*, appliqués comme fumigants, dans l'inhibition de la croissance des champignons et des bactéries.

## Chap.4 : Méthodes d'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles

Tableau 2 : Méthodes d'études de l'activité antifongique des huiles essentielles *In vivo*

Méthodes	Organismes Fongiques	Huiles essentielles	Espèce végétale	Temps d'application	Concentrations	Auteurs
<b>Contact direct (trempage ou mouillage)</b>	<i>Phytophthora colocasiae</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	Feuille de <i>Colocasiae esculenta</i> (L.)	Simultané	2.5, 3.0, 3.5, 4.0 et 4.5 mg/ml	Sameza et al. (2014)
	<i>Fusarium spp</i>	<i>Pelargonium graveolens</i> L. Her), <i>Majorana hortensis</i> , <i>Ocimum basilicum</i> var. <i>minimum</i>	Racine de <i>Cuminum cyminum</i> L	Préventive	4%	Hashem et al. ,(2010)
	<i>Phlyctema vagabunda</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> et <i>Monilinia fructigena</i> .	<i>Eugenia caryophyllata</i>	Fruit <i>Malus domestica</i>	Préventive	2 mg /ml	Amiri et al, (2008)
	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Fruits de <i>Lycopersicon esculentum</i>	Simultané	200, 300, 400, 500 et 1000 ppm	Feng et Zheng (2007)
	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Citrus sinensis</i> , <i>Citrus limon</i> <i>Citrus bergamia</i>	Foliole de <i>Solanum tuberosum</i>	Simultané	1/10 et 1/100	Messgo-Moumene et al.,(2014)
<b>Pulvérisation</b>	<i>Penicillium digitatum</i> ,	<i>Mentha spicata</i> <i>Lippia scaberrima</i>	Fruit de <i>Citrus sinensis</i>	Preventive Curative	2500 µl /l	Plooy et al.(2009)
	<i>Penicillium digitatum</i> , <i>Aspergillus flavus</i> <i>Alternaria alternata</i>	<i>Ocimum basilicum</i> , <i>Mentha pulegium</i> <i>Cassia angustifolia</i>	Fruit de <i>Citrus sinensis</i>	Préventive	200, 400 et 600 ppm	Mahdavi et al .,(2013)
	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Origanum syriacum</i> <i>Lavandula stoechas</i> <i>Rosmarinus officinalis</i>	Plants <i>Lycopersicon esculentum</i>	Preventive Curative	25, 50, 75, et 100 mg/l	Soylu et al. (2010)
<b>Vaporisation ou Fumigation</b>	<i>Penicillium expansum</i> <i>Botrytis cinerea</i>	<i>Thymus kotschyanus</i> , <i>Ocimum basilicum</i> <i>Rosmarinus officinalis</i>	Fruit <i>Pyrus communis</i>	Simultané	0, 100, 300 et 500 µl /L)	Marandi et al. (2011)
	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus niger</i> et <i>Alternaria alternata</i>	<i>Anethum graveolens</i> L	Fruits <i>Lycopersicon esculentum</i>	Simultané	100 et 120 µl/ml	Tian et al .(2011)
	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	Fruits de <i>Lycopersicon esculentum</i>	Simultané	16.7µl/l, 33.3 µl/l et 66.7 µl/l.	Feng et al ,(2011)

# Partie Expérimentale

### 1. Caractérisation physicochimique et moléculaire des huiles essentielles

#### 1.1. Matériel et méthodes

##### 1.1.1. Matériel végétal

Des feuilles fraîches d'oranger, mandarinier, bigaradier et de citronnier ont été échantillonnées à partir des vergers agrumicoles de la région de Chlef (Tableau 3) durant la période du mois de Mars (2011).

**Tableau 3.** Présentation des cinq plantes étudiées

Famille	Genre espèce	Nom vernaculaire
Rutaceae	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osb	Orange douce
	<i>Citrus aurantium</i> L ssp amara	Orange amère
	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Mandarine
	<i>Citrus limon</i> (L) Burm	Citron

##### 1.1.2. Extraction des huiles essentielles

Le montage d'hydrodistillation adopté est celui de type Clevenger applicable aux plantes choisies, 300 grammes de feuilles fraîches ont été introduits dans le ballon accompagné de 2 litres d'eau distillée, puis un chauffage a été réalisé pendant 3 heures selon la Pharmacopée européenne (Conseil de l'Europe and Pharmacopée Européenne 1, 1996) (Figure 3). L'huile essentielle obtenue dans une ampoule à décanter est séparée de l'eau par inégalité de densité. Aucun solvant organique n'est utilisé au cours de ce protocole. L'huile essentielle est au préalable séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre afin d'éliminer toute trace éventuelle d'eau, puis elle est pesée afin de calculer le rendement de l'extraction par rapport à la masse du matériel végétal frais. Les huiles essentielles sont conservées dans des flacons opaques au réfrigérateur à une température de 4°C et à l'abri de la lumière.

##### 1.1.3. Détermination du rendement

Le rendement de l'huile essentielle (Rdt<sub>HE</sub>) est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse de la matière végétale séchée .Il est exprimé en pourcentage par la relation :

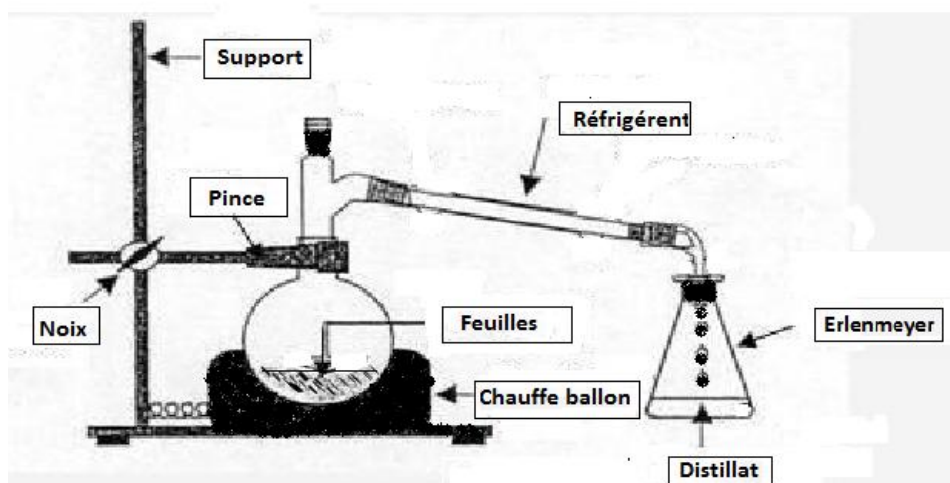
$$\text{Rdt}_{\text{HE}} (\%) = (M_{\text{HE}} / m_v) \times 100$$

Rdt<sub>HE</sub> (%) : Le rendement d'huile essentielle exprimé en pourcentage

M<sub>HE</sub>: masse en gramme de l'huile essentielle obtenue.

m<sub>v</sub>: masse en gramme de la prise d'essai de la matière végétale utilisée.





**Figure 3 : Schéma du montage d'hydrodistillation**

#### **1.1.4. Caractérisation physico-chimique des huiles essentielles**

Pour estimer la qualité et la composition des huiles extraites lors de cette étude, une caractérisation physicochimique et une identification moléculaire des huiles essentielles ont été réalisées afin de dresser leurs profils chimiques.

Les huiles essentielles des espèces étudiées obtenues par hydrodistillation ont été caractérisées par la densité, l'indice de réfraction, le pouvoir rotatoire, l'indice d'acide et l'indice d'ester. Ces propriétés physico-chimiques des huiles essentielles ont été déterminées selon les normes AFNOR respectivement NFT75-111, NFT75-112, NFT75-113, NF T75-103 et NF75-104 (AFNOR, 1982)

##### **1.1.4.1. Détermination de la densité relative**

La densité relative qu'est une grandeur relative (sans unité), a été définie comme étant le rapport de la masse de l'huile essentielle à 20°C et la masse égale du volume d'eau distillée à 20°C. La densité relative à 20°C est relevée par utilisation d'un pycnomètre de volume de 5 ml. La densité relative  $d^{20}$  est donnée par la formule suivante :

$$d = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0}$$

$M_0$  : la masse en gramme du pycnomètre vide.

$M_1$  : la masse en gramme du pycnomètre rempli d'eau distillée.

$M_2$  : la masse en gramme du pycnomètre rempli d'huile essentielle

### **1.1.4.2. Indice de réfraction**

L'indice de réfraction est défini par le rapport de la vitesse de transmission d'une radiation lumineuse (la raie D du sodium 589nm) dans le vide et dans un milieu transparent considéré. C'est un nombre sans dimension caractéristique d'un milieu donné (Taillet, 2008).

La mesure de l'indice de réfraction a lieu sur un réfractomètre NOVEX. L'huile étant maintenue dans des conditions d'isotropisme et de transparence. L'échantillon pour essai est porté à une température qui ne diffère pas de la température de référence  $\pm 0.2$  °C.

Quand la température est différente de 20°C , on effectue une correction à celle-ci par le biais de la formule

$$n^{20} D = n^t D + 0.00045(t-20)$$

$n^{20} D$  : Indice de réfraction à 20°C ;

$n^t D$  : Indice à la température ambiante ou de mesure

$t$  : Température ambiante en °C

### **1.1.4.3. Pouvoir rotatoire**

Le pouvoir rotatoire est défini comme étant l'angle exprimé en milliradians et /ou degrés d'angle, provoqué par une rotation angulaire du plan de polarisation d'une lumière polarisée linéaire de longueur d'onde de 589.3nm $\pm$ 0.3nm. Le pouvoir rotatoire est mesuré par un polarimètre de type POLAX-(2L) équipé d'une lampe à sodium. La solution introduite dans un tube de 10 cm de longueur ( $l$ ), est traversée par un rayon lumineux polarisé à la longueur d'onde de la raie D du sodium (589,3 nm). La formule utilisée est:

$$\alpha = \frac{A}{l} \times 100$$

$A$  : la valeur de l'angle de rotation (milliradians et/degres d'angle).

$l$  : longueur du tube utilisé exprimé en millimètre.

Les pouvoirs rotatoires dextrogyres (dévier la lumière à droite) sont signalés par un signe positif (+) et les pouvoirs rotatoires lévogyres (dévier la lumière à gauche) par un signe négatif (-).

### **1.1.4.4. Indice d'acide**

L'indice d'acide (IA) est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire à la neutralisation des acides libérés contenus dans 1g d'huile essentielle. Ils sont neutralisés par une solution éthanoïque d'hydroxyde de potassium titré. L'indice d'acide est exprimé par la relation :

$$IA = (56.1 \times V) / M.$$

V : volume en ml de la prise d'essai.

M : masse en gramme de la prise d'essai.

56.1: la masse molaire exprimée (en gramme/mole) de KOH.

### **1.1.4.5. Indice d'ester**

L'indice d'ester (IE) est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire à la neutralisation des acides libérés par hydrolyse des esters contenus dans 1g d'huile essentielle.

L'hydrolyse des esters est réalisée par chauffage dans des conditions définies, en présence d'une solution éthanoïque titrée d'hydroxyde de potassium et dosage de l'excès d'alcali par une solution titrée d'acide chlorhydrique.

L'indice d'ester est donné par la formule :

$$IE = (28.05/m)(V_0 - V_1) - IA$$

V<sub>0</sub> : volume en millilitres de la solution d'acide chlorhydrique pour l'essai

V<sub>1</sub> : volume en millilitres de la solution d'acide chlorhydrique pour le blanc

m : est la masse en gramme de la prise d'essai (2g ± 0.05g).

IA : la valeur de l'indice d'acide.

## **1.1.5. Caractérisation moléculaire des huiles essentielles**

### **1.1.5.1. Analyse chromatographique par CG/MS**

La détermination de la composition moléculaire des huiles essentielles a été réalisée par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG / MS). L'analyse a été effectuée au niveau du laboratoire d'analyse et de recherche ALDAR sis à Alger.

L'analyse par CG / MS des huiles essentielles a été réalisée en utilisant un Hewlett Packard 6890 Séries II Chromatographe en phase gazeuse contrôlé par ChemStation (NITS98) et équipé d'une colonne capillaire HP-5MS (5% de phényle, 95 % diméthyle polysiloxane) , de longueur de 30 m , de diamètre interne de 0.25 mm et une épaisseur du film de 0,25 µm, couplé à un spectromètre de masse (SM) Agilent de type 5973 avec un détecteur scan à impact d'électron.

Les conditions opératoires sont: le gaz vecteur est l'Hélium avec un débit de 1ml/min, la température de l'injecteur est de 250°C avec l'injection de 0.1 µl en mode Splitless pendant 0.1 min sur une colonne capillaire HP5MS (30 m x 0,25 mm, épaisseur de film 0,25 µm) .La température de la colonne est programmée de 60°C à 260 °C à raison de 5°C/min avec un temps final de maintien de 10 min.

Pour le spectromètre de masse model Agilent 5973, la température : interface (280°C), source (230°C), quadripôle (150°C) ; l'énergie d'ionisation est de 70 eV.

L'analyse CG/SM permet de faire ressortir le nombre de constituants, les concentrations de chaque composant et sa volatilité selon son ordre de sortie.

### **1.1.5.2. Identification moléculaire des huiles essentielles**

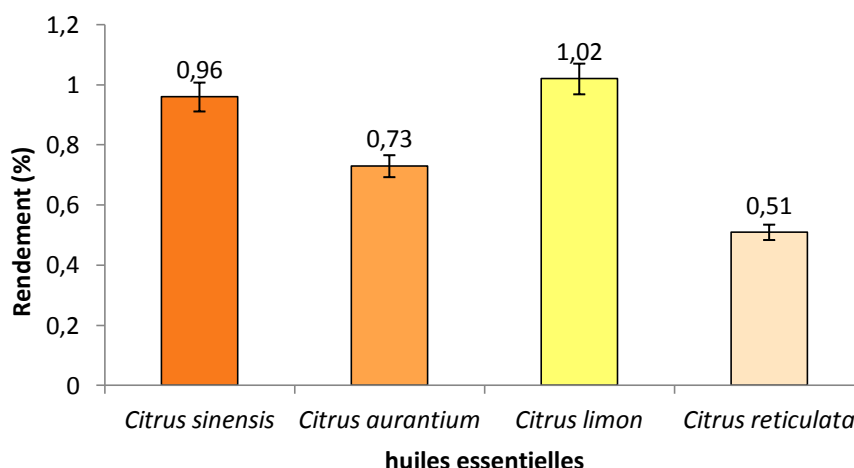
L'identification des divers constituants de l'huile essentielle a été possible par comparaison de leurs spectres de masse à ceux des composés de base de données WILLET et NIST 98. L'identification des molécules a été confirmée par la comparaison de leurs indices Kovats avec ceux connus dans la littérature (Adams, 2001). Des index Kovats des composés ont été calculés en utilisant le temps de rétention d'une série de n-alcanes.

### 1.2. Résultats et discussion

#### 1.2.1. Caractérisation physicochimique des huiles essentielles

##### 1.2.1.1. Rendement en huiles essentielles

Les huiles essentielles ont été extraites à partir de 300 g de feuilles par hydrodistillation, pour chaque espèce de citrus étudiée. Les rendements obtenus et mentionnés sur la figure 4 oscillent entre 0.51 % et 1.02 %. Les rendements les plus importants ont été enregistrés avec *Citrus sinensis* (0.96 %) et *Citrus limon L* (1.02%) .



**Figure 4.** Rendements en huiles essentielles pour les quatre espèces étudiées

L'extraction par hydrodistillation des huiles essentielles de citrus à partir des feuilles a été rapportée par plusieurs études (Fadel, 1991 ; Lota et al. , 2000 et 2001 ; Boussaada et Chemli ,2006 ; Singh et al.,2010). Pour les citrus égyptiens, Fadel, (1991) collecte des rendements nettement supérieurs à 3% pour les mandarines et 2 à 4% pour *Citrus sinensis*.

Par contre Lota et al ., (2000) et Hellal , (2011) obtiennent des rendements plus faibles en huiles essentielles des feuilles de *Citrus sinensis* et fluctuent entre 0.3 et 0.58% . Des rendements plus faibles (0.07%-0.1%) ont été obtenus aussi par Singh et al., (2010) pour *Citrus sinensis* de l'Inde.

D'autre part Boussaada et Chemli (2007) rapportent que le rendement en huile essentielle varie selon la saison et que le plus faible rendement a été trouvé à partir des échantillons des feuilles de bigaradier prélevées durant le mois de mars (0,5%)

### 1.2.1.2. Caractérisation physicochimique

La caractérisation physicochimique des huiles essentielles s'est portée sur la détermination de la densité, du pouvoir rotatoire, de l'indice de réfraction, de l'indice d'acide et de l'indice d'ester. Les résultats des indices physiques et chimiques ont été regroupés dans le tableau 4. En ce qui concerne le pouvoir rotatoire, on remarque que les huiles essentielles des citrus testées sont toutes dextrogyres. On note aussi que les résultats obtenus pour la densité (0.855 -0.863), l'indice de réfraction (1.475-1.477), l'indice d'ester (1.15 – 2.24) et l'indice d'acide (12.25-12.34) sont conformes aux normes (AFNOR, 1982). Les résultats identiques obtenus pour la densité indiquent que les propriétés physiques de ces huiles sont assez voisines. Des résultats similaires ont été obtenus par Baaliouamer, (1987) et Hellal, (2011).

**Tableau 4.** Caractérisation physicochimique des huiles essentielles de *Citrus sinensis*, *Citrus limon*, *Citrus aurantium* et *Citrus reticulata*

Huiles essentielles	Indices physiques			Indices chimiques	
	Pouvoir rotatoire	Densité	Indice de réfraction	Indice d'Acide	Indice d'Ester
<i>Citrus sinensis</i>	+ 94°	0.855	1.475	2.24	12.25
<i>Citrus aurantium</i>	+ 83.66°	0.863	1.475	1.40	12.25
<i>Citrus limon</i>	+ 62.33°	0.858	1.474	2.24	12.25
<i>Citrus reticulata</i>	+ 75°	0.855	1.477	1.15	12.34

### 1.2.2. Caractérisation moléculaire des huiles essentielles

#### 1.2.2.1. Profils chimiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont été extraites à partir des feuilles de *Citrus sinensis*, *Citrus limon*, *Citrus aurantium* et *Citrus reticulata* par hydrodistillation. L'analyse qualitative et quantitative des profils chimiques des huiles essentielles est reportée dans le tableau 5. La table inclut l'indice de Kovats, le temps de rétention et le pourcentage du total ; 49 composants sont identifiés et représentent 92.47 à 98.82% de tous les constituants ; la prédominance revient aux monoterpènes hydrocarbonés (61.41 – 73.64%) pour *Citrus sinensis*, *Citrus limon* et *Citrus reticulata*. En utilisant une colonne capillaire HP5MS, des chromatogrammes des huiles essentielles testées ont été obtenus et représentés dans la figure 5.

Le profil chromatographique de chacune de ces huiles essentielles permet d'affirmer que si des différences quantitatives existent, les huiles essentielles sont qualitativement presque identiques.

Dix composés ont été enregistrés en commun, pour les quatre huiles essentielles. Le limonène (7.18 – 36.10 %) et le  $\beta$ -pinène (4.35- 30.0%) représentent les principaux composés majoritaires.

De par leur forte teneur, ces composés étaient considérés pour contribuer principalement à l'arôme de ces huiles essentielles (Baaliouamer et Meklati ,1986). Le fort pourcentage en monoterpènes dans les huiles essentielles des citrus a été rapporté par plusieurs études (Baaliouamer ,1987 ; Viuda-Martos et *al .*, 2009 ; Espina et *al.*, 2011 ; Settanni et *al.*, 2012 ).

### ***a) Analyse de l'huile essentielle de *Citrus reticulata* par CG/SM***

L'analyse par CG/SM a permis d'identifier et de caractériser 20 composés représentant 98.82 % de la totalité de l'huile essentielle (Tableau 5). La composition chimique de l'huile essentielle est globalement composée de monoterpènes hydrocarbonés (63.75%) et oxygénés (34.98). On note aussi l'absence des sesquiterpènes hydrocarbonés. Les sesquiterpènes oxygénés sont apparus en faibles proportions (0.09 %).

Les composés majoritaires sont  $\gamma$  Terpinene (26.62 %),D- limonène (22.52 %),  $\alpha$ -pinène (4.36 %) et  $\beta$ -pinène (4.35 %) . Ils représentent 53.49 % du total de la surface du pic (Tableau 5). La composition trouvée est également similaire à celle trouvée dans la littérature pour *Citrus reticulata* en Algérie (Baaliouamer et *al .*,1992) et en Uruguay (Verzera et *al .*, 1998) .

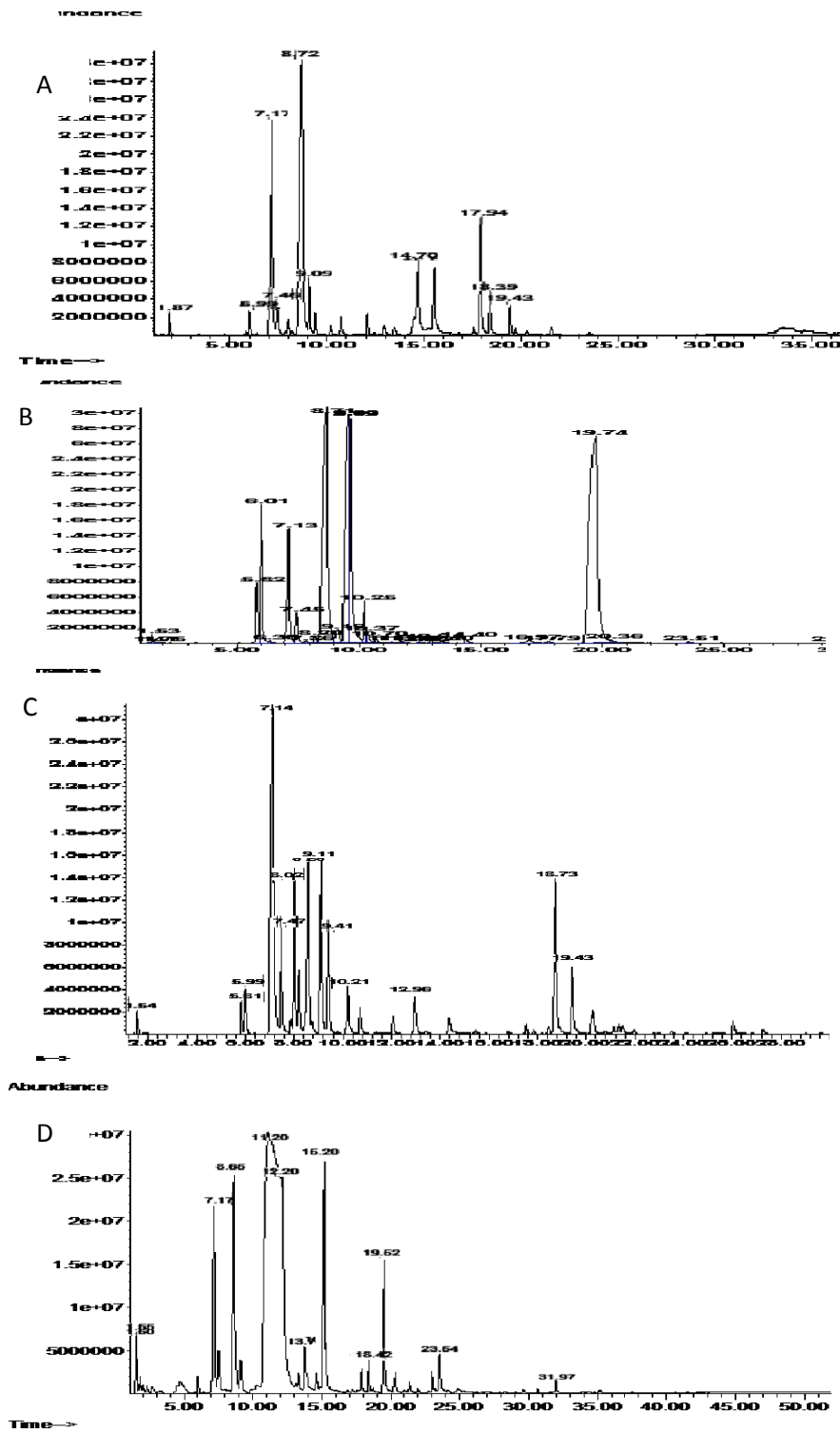
Choi, (2004) a analysé les composés volatils de l'huile essentielle provenant de Satsuma mandarin cultivé en Corée. Il mentionne l'abondance du D-limonène comme composant majoritaire (82.8 à 89.2%), suivi du  $\gamma$ -terpinène (4.2 à 5.1%) et le myrcène (1.7%). Contrairement à nos résultats Fadel, (1991), rapporte l'abondance du linalool (54.51%), du  $\beta$ -pinène (18.85 %) et  $\gamma$ -terpinène (4.5 %) pour l'huile essentielle de *Citrus reticulata* .

**Tableau 5.** Composition chimique des huiles essentielles de *Citrus sinensis*, *Citrus limon*, *Citrus aurantium* et *Citrus reticulata* (par CG/SM)

Composants	KI	RT(min)	<i>Citrus reticulata</i> (% area)	<i>Citrus limon</i> (% area)	<i>Citrus sinensis</i> (% area)	<i>Citrus aurantium</i> (% area)
3 hexen- 1-ol	866	4.71	-	-	-	0.91
$\alpha$ -Thujene	931	5.81	2.00	0.21	1.49	0.02
$\alpha$ -Pinene	939	5.99	4.36	1.28	2.04	0.38
camphene	953	6.37	0.10	0.13	-	0.03
$\beta$ - Pinene	979	7.12	4.35	14.88	30.0	5.25
$\beta$ - Myrcene	991	7.46	1.19	2.56	4.52	1.40
$\alpha$ Phellandrene	1008	7.86	0.10	0.21	0.68	-
3 Carene	1012	8.02	-	0.98	6.41	0.16
(+)-4-Carene	1035	8.20	0.38	0.34	2.77	-
D-Limonene	1036	8.71	22.52	36.10	9.37	7.18
$\beta$ Ocimene	1055	8.74	-	-	0.74	-
1,3,6-octatriene,3,7-dimethyl-	1070	9.11	0.94	3.01	8.59	1.13
$\gamma$ Terpinene	1080	9.41	26.62	1.22	4.42	-
Cis sabinene hydrate	1094	9.77	-	-	0.21	-
Terpinolene	1096	10.25	1.16	0.43	2.53	-
Linalool	1128	10.71	0.21	1.40	1.24	63.03
Z Alloocimene	1152	11.38	0.03	0.06	0.08	-
Citronellal	1159	12.06	-	1.21	0.90	-
Terpinen-4-ol	1177	12.94	0.15	0.74	2.14	0.43
$\alpha$ Terpineol	1189	13.34	0.10	0.79	0.07	1.00
Citronellol	1226	14.36	-	-	1.05	-
Citral	1254	14.70	-	6.79	-	0.46
1,6-octadien-3-ol,3,7-dimethyl	1280	14.87	0.11	1.10	-	5.79
2,6-octadienal,3,7-dimethyl	1301	15.45	-	6.79	0.22	0.15
Thymol	1360	16.97	0.30	-	-	-
$\sigma$ -Elemene	1370	17.23	-	-	-	0.05
Cis-2,6-Dimethyl-2,6octadiene	1382	17.53	-	-	0.45	-
Benzoic acid 2-amino- methyl	1392	17.79	0.09	-	-	-
2,6-octadien- 1-ol,3,7dimethyl	1394	17.84	-	10.49	0.22	0.99
Copaene	1408	18.20	-	-	-	-
(Z) $\beta$ Elemene	1393	18.45	-	-	0.44	-
(E) $\beta$ - Elemene	1398	18.71	-	-	8.97	0.08
Caryophyllene	1417	19.41	-	1.65	3.48	2.62
Methyl N-methylantranilate	1418	19.74	34.02	-	-	-
Aromadendrene	1439	19.93	-	-	-	0.05
(E) $\beta$ Famesene	1458	20.20	-	-	0.65	0.12
$\alpha$ -humulene	1474	20.29	-	0.41	1.33	0.39
$\beta$ -Selinene	1485	21.13	-	-	0.47	-
$\gamma$ Elemene	1498	21.35	-	0.10	-	0.26
$\alpha$ -Farnesene	1509	21.49	-	-	0.61	-
$\gamma$ -cadinene	1513	21.80	-	-	0.56	0.01
$\delta$ -Cadinene	1514	21.95	-	-	0.22	0.08
Nerolidol	1534	22.95	-	-	-	0.37
Caryophyllene oxide	1606	23.50	0.09	0.19	0.23	0.04
$\alpha$ Cadinol	1654	25.26	-	-	-	0.04
$\beta$ Sinensal	1706	26.04	-	-	0.72	-
$\alpha$ Sinensal	1750	27.27	-	-	0.30	-
$\beta$ Farnesol	2150	33.89	-	0.34	-	-
Phytol	2178	34.36	-	-	-	0.05
Monoterpènes hydrocarbonés (%)			63.75	61.41	73.64	15.55
monoterpènes oxygénés (%)			34.98	28.65	6,05	71.85
Sesquiterpène hydrocarboné (%)			-	02.16	15.95	3.66
Sesquiterpènes oxygénés (%)			0.09	0.53	1.25	0.45
autres (%)			-	-	-	0.96
Total identifié (%)			98.82	92.75	96.89	92.47



# Chap.1 : Caractérisation physicochimique et moléculaire des huiles essentielles



**Figure 5 :** Chromatogramme des huiles essentielles des feuilles de citrus  
À : *Citrus limon*; B : *Citrus reticulata* ; C : *Citrus sinensis* ; D : *Citrus aurantium*

Le contenu de l'un des composants d'une huile essentielle peut varier en fonction de la méthode d'extraction utilisée et la partie de la plante à partir de laquelle il a été extrait (Viuda-Martos et *al.*, 2009).

### ***b) Analyse de l'huile essentielle de Citrus limon L par CG/SM***

Vingt-six composés ont été identifiés pour L'huile essentielle de *Citrus limon*, représentant 92.75 % de l'ensemble de l'huile ; la domination revient aux monoterpènes hydrocarbonés (61.41%) et monoterpènes oxygénés (28.65%) .Les principaux constituants retrouvés sont le D- limonène (36.10 %) et le  $\beta$ -pinène (14.88 %) (Tableau 5).

Des résultats rapportés par Baaliouamer, (1987) annoncent la forte teneur en limonène (25.90 -73 %) et du  $\beta$ -pinène (17.11 %) dans les huiles essentielles des variétés algériennes du citronnier.Fadel, (1991) indique l'abondance du limonène (23.88 %) et du  $\beta$ -pinène (20.06 %) dans les huiles essentielles des citronniers égyptiens.

On note aussi la présence du citral à des concentrations appréciables (6.76 %), un composant considéré comme le principal contributeur à l'arôme de l'huile et un paramètre d'évaluation commercial pour les huiles essentielles de citronnier (Staroscik et Wilson, 1982).

### ***c) Analyse de l'huile essentielle de Citrus sinensis par CG/SM***

Pour l'huile essentielle de *Citrus sinensis* , l'analyse par CG/SM dévoile la présence de 34 composés dont la prépondérance revient en monoterpènes hydrocarbonés (73.64 %) avec des concentrations élevées en  $\beta$ -pinène (30 %), en D- limonène (9.37 %), la présence de deux isomères sesquiterpènes (Z) et (E)  $\beta$  - Elemene avec une supériorité de l'isomère (E)  $\beta$  - Elemene (8.97%) (Tableau 5).

Fadel (1991), mentionne la présence de 35 composés dont la prédominance revient au linalool (46.63 %) et  $\beta$ -pinène (15.40 %). D'autres auteurs (Baaliouamer, 1987 ; Trozzi et *al.*, 1999 ; Viuda-Martos et *al.*, 2009) ont nommé le limonène comme composé majoritaire de l'huile essentielle d'oranger.

La variation de la composition chimique de l'huile essentielle peut être attribuée à plusieurs facteurs agroenvironnementaux. Khorshidi et *al.*, (2009) remarquent que la densité de plantation influence la composition chimique de l'huile essentielle de fenouil. Alizadeh et *al.*, (2010) affirment que la quantité de certains composants tels que le carvacrol,  $\gamma$ -terpinène et  $\alpha$ -terpinène a été modifiée par l'utilisation des engrais.

### ***d) Analyse de l'huile essentielle de Citrus aurantium par CG/SM***

Pour l'huile essentielle obtenue à partir de *Citrus aurantium*, on a identifié 29 composés, représentant 92.47 % de la totalité de l'huile (tableau 5). Parmi ceux-ci, le linalool (63.03 %), le D- limonène (7.18 %) et le  $\beta$ -pinène (5.25 %) étaient les plus abondants. Nous avons trouvé à l'état de traces inférieur à 0,06% : l' $\alpha$ -Thujène, l' $\sigma$ -Elemène, l'aromadendrene,  $\delta$ -Cadinène, Caryophylène oxide,  $\alpha$  Cadinol et phytol.

Plusieurs compositions chimiques des huiles essentielles extraites à partir des feuilles du bigaradier ont été décrites, le linalool (12.66% - 66.1 %) constitue le composant majoritaire (Lota et *al.*, 2001 ; Boussaada et Chemli ,2006 ; Boussaada et Chemli ,2007 ).

Cependant, la composition chimique des huiles essentielles peut être affectée par certains facteurs environnementaux, tels que le climat, la saison, les conditions du sol et les conditions de la plante elle-même, tels que l'âge des feuilles ou le développement des fruits (Baaliouamer et Meklati, 1988 ; Benini, 2014).

### 1.3. Conclusion partielle

Les rendements obtenus en huiles essentielles oscillent entre 0.51 % et 1.02 %. Les rendements les plus importants ont été enregistrés avec *Citrus sinensis* (0.96 %) et *Citrus limon* (1.02%) .

Les huiles essentielles analysées présentent une densité allant de 0.855 à 0.863, un indice de réfraction de 1.475 à 1.477, un indice d'ester de 1.15 à 2.24 et un indice d'acide de 12.25 à 12.34. Pour le pouvoir rotatoire, on remarque que les huiles essentielles des citruses testées sont toutes dextrogyres.

La composition moléculaire des huiles essentielles de citruses analysées par CG/SM montre de forts pourcentages en monoterpènes hydrocarbonés (61.41 – 73.64 %) à l'exception de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* qui a un fort pourcentage en monoterpènes oxygénés (71.85 %).

Le D-limonène constitue le composant majoritaire commun pour les quatre huiles essentielles. On le retrouve respectivement avec 36.10 %, 22.52 %, 9.37 % et 7.18 % pour *Citrus limon*, *Citrus reticulata*, *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium*.

Le  $\beta$ -pinène est présent respectivement avec 30 %, 14.88 %, 5.25 % et 4.35 % pour *Citrus sinensis*, *Citrus limon*, *Citrus aurantium* et *Citrus reticulata*. L' $\alpha$ -pinène lui aussi contribue respectivement avec des pourcentages de l'ordre de 4.36 %, 2.04 % et 1.26 % pour *Citrus reticulata*, *Citrus sinensis* et *Citrus limon*.

On enregistre de hauts pourcentages de linalool (63.03 %) dans l'huile essentielle du bigaradier, d' $\gamma$  Terpinène (26.62%) dans le mandarinier, et de citral (6.79 %) dans le citronnier.

## **2. Activité antifongique des huiles essentielles *in vitro***

### **2.1. Matériel et méthodes**

#### **2.1.1. Purification des souches fongiques**

Les espèces de *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* et *Alternaria alternata* ont été fournies par le laboratoire de pathologie des plantes, Institut des sciences agronomiques, Université de Chlef. Les trois autres espèces fongiques, *Alternaria sp*, *Fusarium sp* et *Penicillium sp* proviennent du laboratoire de mycologie de la station régionale de la protection des végétaux de Chlef. Toutes les souches ont été purifiées et maintenues sur milieu Agar dextrose de pomme de terre (PDA) à 22°C ± 2 °C.

#### **2.1.2. Huiles essentielles des citrus**

Des échantillons d'huiles essentielles extraites par hydrodistillation à partir des feuilles de *Citrus sinensis*, *Citrus aurantium*, *Citrus limon* et *Citrus reticulata* (protocole déjà décrit) ont été utilisés pour l'étude de l'activité antifongique.

#### **2.1.3. Activité antifongique *in vitro***

##### **2.1.3.1. Effet des huiles essentielles sur la croissance mycélienne radiale**

Le pouvoir inhibiteur des huiles essentielles de *Citrus sinensis*, *Citrus aurantium*, *Citrus limon* et *Citrus reticulata* a été examiné vis à vis du *Fusarium oxysporum f.sp, albedinis*, *Penicillium sp*, *Alternaria alternata*, *Alternaria sp* et *Fusarium sp* par la technique de contact direct (Grover et Moore, 1962) utilisant l'Agar Dextrose de Pomme de terre (PDA) comme milieu de culture. Du fait de la non-miscibilité des huiles essentielles à l'eau et donc au milieu de culture, la mise en émulsion a été réalisée grâce à la dissolution dans 0.5 ml de 5% (v/v) de Tween-80 afin de favoriser le contact germe/composé.

Des dilutions sont préparées pour avoir des concentrations finales de 0.001,0.01,0.05, 0.1,0.2,0.4,0.6,0.8 et 1 mg/ml , elles ont été ajoutées aseptiquement aux différentes boîtes de Pétri (9 cm de diamètre) contenant 15 ml du milieu PDA et stérilisées à l'autoclave (20 minutes à 121 °C).

Les témoins (sans huile essentielle) ont été inoculés en suivant le même procédé. Un disque mycélien fongique (diamètre de 6 mm) des champignons pathogènes, prélevé de la périphérie de la culture âgée de sept jours, a été inoculé aseptiquement au centre des boîtes de Pétri.

Les boîtes de Pétri ont été incubées à  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant sept jours. Pour chaque traitement, trois répétitions ont été effectuées. Le diamètre des colonies fongiques a été mesuré quotidiennement pendant 7 jours. Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne radiale a été calculé par la valeur moyenne des diamètres de colonies selon la formule (Pandey et al, 1982).

$$\text{Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne } P_{Ic} (\%) = \left( \frac{dt-dT}{dt} \right) \times 100$$

dt : diamètre moyen des colonies fongiques dans le témoin

dT : diamètre moyen des colonies fongiques traitées.

### **2.1.3.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

La concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles essentielles pour l'inhibition de la croissance mycélienne des champignons a été déterminée selon la méthode citée par Mishra et Dubey (1994).

Différentes concentrations de l'huile ont été préparées de 0.001 à 1 mg / ml, dissoutes dans 0.5 ml de Tween-80 (5% v/v) et incorporées au milieu de culture PDA. Des témoins (sans huiles essentielles) ont été préparés simultanément aux traitements.

Les boîtes de Pétri inoculées ont été incubées pendant sept jours à  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . Les plus faibles concentrations sans croissance observables (à la loupe binoculaire) ont été définies comme la concentration minimale inhibitrice (CMI). Pour chaque concentration, trois essais ont été effectués.

La nature de la toxicité de l'huile vis-à-vis des champignons a été déterminée par un transfert de disques mycéliens dont la croissance a été inhibée au préalable, sur un autre milieu PDA exempt d'huile essentielle. L'effet de l'huile est considéré fongistatique s'il y a reprise de la croissance mycélienne et fongicide dans le cas contraire (Thompson ,1989).

### **2.1.3.3. Effet des huiles essentielles des citrus sur le poids sec du mycélium**

Pour déterminer l'effet de l'huile essentielle en milieu liquide, les spores des souches testées ( $10^7$  spores / ml) sont cultivées dans un milieu liquide de dextrose de pomme de terre (PDB) avec et sans huiles essentielles dans des tubes à essai (15 ml). Seules les concentrations minimales inhibitrices ont été testées. Après une durée d'incubation de 15 jours à  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , le mycélium est filtré sur un papier-filtre wattman n°1, lavé à l'eau distillée et séché à  $60^\circ\text{C}$  pendant 6h et à  $40^\circ\text{C}$  pendant toute une nuit. Le papier-filtre contenant le mycélium sec est pesé. Les essais sont répétés trois fois. Le pourcentage d'inhibition de la croissance est calculé à partir du poids sec des mycéliums selon la formule (Sharma et Tripathi, 2008).

$$\text{Pourcentage d'inhibition de la croissance (poids sec) PIb(\%)} = \left( \frac{Pt-PT}{Pt} \right) \times 100$$

Pt : Poids sec du mycelium des colonies fongiques dans le témoin

PT : Poids sec du mycelium des colonies fongiques traitées

### **2.1. 3.4. Activité antisporelante des huiles essentielles des citrus**

L'activité antisporelante des huiles essentielles de *Citrus sinensis*, *Citrus aurantium*, *Citrus limon* et *Citrus reticulata* a été étudiée sur des colonies fongiques ( *Fusarium oxysporum f.sp albedinis*, *Alternaria alternata*, *Penicillium sp*, *Alternaria sp* et de *Fusarium sp*) âgées de 11 à 15 jours ( après production de conidies) exposées aux huiles essentielles.

Les colonies ont servi pour la préparation de l'inoculum. Les conidies produites ont été rassemblées en ajoutant 5 ml d'une solution contenant du Tween-80 et l'eau distillée stérile (0.1 ml /100 ml) dans chaque boîte de Pétri. La suspension sporale a été filtrée à travers une gaze stérile. Une cellule Malassez a été employée pour compter le nombre de spores. Le pourcentage d'inhibition de la production de spore (PIs %) a été calculé relativement aux témoins.

Le pourcentage d'inhibition de la sporulation PIs par rapport au témoin est calculé selon (Hmouni et al, 1996).

$$\text{Le pourcentage d'inhibition de la sporulation PIs (\%)} = (1 - N_C / N_0) \times 100$$

$N_0$  : nombre moyen des spores par litre chez le témoin

$N_c$  : nombre moyen des spores par litre en présence de l'huile essentielle

### **2.1.3. 5. Activité anti germinative des huiles essentielles des citrus**

Quatre gouttes (1.5µl ) de la suspension sporale sont placées sur des lames de verre préalablement recouvertes de 4ml d'eau gélosée (8g/l) .Les lames sont déposées dans des boîtes de Pétri et elles sont incubées à 28±2°C pendant 48 h (Barbosa cavalcante ,2009).

Pour chaque traitement, 200 spores ont été examinées. La germination des spores a été évaluée en recherchant l'apparition des tubes germés ( Grbic et *al.* (2011). La spore dont le tube germinatif atteint 50% de sa taille est considérée germée. Le pourcentage d'inhibition de la germination (PIg%) a été calculé relativement aux témoins.

L'évaluation de l'inhibition de la germination PIg se fait selon la formule :

$$\text{Le pourcentage d'inhibition de la germination PIg (\%)} = (1 - N_c / N_0) \times 100$$

N<sub>0</sub> : Nombre des spores germées dans le témoin

N<sub>c</sub> : Nombre des spores germées sur le milieu de culture en présence de l'huile essentielle.

### **2.1.4. Traitement statistique**

Chaque expérience a été réalisée en triple et des valeurs moyennes ont été calculées. L'analyse statistique a été effectuée en utilisant l'analyse de la variance (ANOVA) et les différences entre les valeurs des moyennes ont été déterminées avec le test LSD de Fisher (P < 0,05). En cas de différences significatives, les moyennes ont été comparées avec le logiciel Statistica 6.0.

## **2.2. Résultats et discussion**

### **2.2.1 Activité antifongique**

#### **2.2.1.1 Effet des huiles essentielles sur la croissance mycélienne**

L'activité antifongique des huiles essentielles des citrus (*Citrus sinensis*, *Citrus aurantium*, *Citrus limon* et *Citrus reticulata*) a été évaluée *in vitro* vis-à-vis de cinq champignons phytopathogènes (*Fusarium oxysporum f.sp albedinis*, *Alternaria alternata*, *Penicillium sp*, *Alternaria sp* et de *Fusarium sp*); elle est exprimée par le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne radiale (PIc %).



Les résultats indiqués dans le tableau 6 annoncent un pouvoir inhibiteur significatif ( $P \leq 0,05$ ) sur la croissance mycélienne radiale différentielle et remarquable par la totalité des huiles essentielles testées.

Plusieurs publications citées dans la littérature rapportent le pouvoir antifongique qu'expriment les huiles essentielles des citrus (Sharma et Tripathi 2008 ; Viuda-Martos et al., 2008 ; Cosic et al., 2010 ; Gumus et al., 2010 ; Philips et al., 2012).

#### **2.2.1.1.A. Effet de l'huile essentielle de *Citrus sinensis***

La susceptibilité fongique aux huiles essentielles montre des pourcentages d'inhibition élevés (inhibition 100% de la croissance mycélienne) ; pour l'huile essentielle de *Citrus sinensis*, le pouvoir inhibiteur de la croissance mycélienne est plus important avec les concentrations allant de 0.4 à 1 mg/ml et ceci avec les deux espèces représentatives du genre *Alternaria* (*Alternaria alternata* et *Alternaria sp*) et du genre *Fusarium* (*Fusarium oxysporum f.sp albedinis* et *Fusarium sp*). En revanche l'espèce *Penicillium sp* est résistante avec un pourcentage d'inhibition de la croissance fluctuant entre 13.02 et 63.92 % (Tableau 6).

Philips et al., (2012) observent une sensibilité du *Penicillium chrysogenum* et *Alternaria alternata* aux huiles essentielles de *Citrus sinensis*. Ils obtiennent une réduction de la croissance mycélienne de 30 % pour *Alternaria alternata* et de 45 % pour *Penicillium chrysogenum*.

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).

#### **2.2.1.1. B. Effet de l'huile essentielle de *Citrus aurantium***

D'autre part l'ensemble des espèces fongiques phytopathogènes testées révèlent une sensibilité très remarquable vis-à-vis de l'huile essentielle de *Citrus aurantium*. On enregistre un PIc de 100 % pour les concentrations allant de 0.05 à 1 mg/ml et fluctuant entre 13.16 et 34.11 % pour les concentrations allant de 0.001 et 0.01 mg/ml (Tableau 6).

## Chap .2 : Activité antifongique des huiles essentielles *in vitro*

L'activité antifongique des huiles essentielles de *Citrus aurantium* a été rapportée par plusieurs auteurs (Wilson et al., 1997; Caccioni et al., 1998 ; Zabka et al., 2009 ).

**Tableau 6. Activité antifongique des huiles essentielles des citrus.**

Huiles essentielles Dose(mg/ml)	Pourcentage d'inhibition ( Plc %) <sup>a</sup> ( moy ± SE,n=3)					
	<i>Fusarium sp</i>	<i>Fusarium oxysporum fsp albedinis</i>	<i>Alternaria sp</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Penicillium sp</i>	
<i>Citrus sinensis</i>	1	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	63.92±0.3 <sup>AB</sup>
	0.8	100±00.0 <sup>A</sup>	76.84±7.8 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	60.62±4 <sup>AB</sup>
	0.6	100±00.0 <sup>A</sup>	76.59±3.5 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	56.91±10.0 <sup>AB</sup>
	0.4	100±00.0 <sup>A</sup>	65.90±6.3 <sup>AB</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	60.34±16.0 <sup>AB</sup>	13.02±5.6 <sup>C</sup>
	0.2	88.43±0.7 <sup>A</sup>	50.33±8.3 <sup>B</sup>	73.07±4.3 <sup>A</sup>	58.04±5.85 <sup>AB</sup>	N.A.
	0.1	12.35±3.3 <sup>C</sup>	19.40±5.5 <sup>C</sup>	23.33±2.6 <sup>BC</sup>	46.66±1.52 <sup>B</sup>	N.A.
	0.05	3.92±0.8 <sup>D</sup>	9.53±0.7 <sup>CD</sup>	8.46±8.6 <sup>CD</sup>	44.5±1.50 <sup>B</sup>	N.A.
	0.01	N.A.	2.86±0.5 <sup>D</sup>	5.12±1.7 <sup>CD</sup>	32.83±2.75 <sup>BC</sup>	N.A.
	0.001	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
<i>Citrus aurantium</i>	1	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>
	0.8	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>
	0.6	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>
	0.4	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>
	0.2	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>
	0.1	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>
	0.05	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	64.92±19.3 <sup>AB</sup>
	0.01	N.A.	34.11±3.0 <sup>BC</sup>	22.25± 2.5 <sup>BC</sup>	24,93± 8.08 <sup>BC</sup>	18.0±5.6 <sup>C</sup>
	0.001	N.A.	21.5±1.02 <sup>BC</sup>	13.16± 3.5 <sup>C</sup>	21.16± 3.81 <sup>BC</sup>	N.A.
<i>Citrus reticulata</i>	1	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>
	0.8	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	83.92±0.47 <sup>A</sup>
	0.6	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	84.51±0.21 <sup>A</sup>
	0.4	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	80.20±0.63 <sup>A</sup>
	0.2	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	74.51±0.62 <sup>A</sup>
	0.1	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	N.A.
	0.05	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	71.87±0.13 <sup>AB</sup>	71,87±0.05 <sup>AB</sup>	N.A.
	0.01	73.45±0.05 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	N.A.	70,25±0.43 <sup>AB</sup>	N.A.
	0.001	N.A.	37.9±0.27 <sup>BC</sup>	N.A.	65±0.78 <sup>AB</sup>	N.A.
<i>Citrus limon L</i>	1	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>
	0.8	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	83.14±0.20 <sup>A</sup>
	0.6	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	72,16±0.16 <sup>AB</sup>
	0.4	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	71.18±0.49 <sup>AB</sup>
	0.2	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	65.29±0.43 <sup>AB</sup>
	0.1	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	N.A.
	0.05	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	N.A.
	0.01	N.A.	30.6±0.17 <sup>BC</sup>	100±00.0 <sup>A</sup>	14.85± 8.53 <sup>C</sup>	N.A.
	0.001	N.A.	35.2±0.10 <sup>BC</sup>	45.42±0.11 <sup>B</sup>	14.00± 7.94 <sup>C</sup>	N.A.

Les valeurs des zones d'inhibition de la croissance mycélienne radiale (Plc%) sont présentées sous forme de moyenne ± écart-type. Les valeurs suivies d'une même lettre alphabétique ne sont pas significativement différentes selon ANOVA et test LSD de Fisher ( $P \leq 0,05$ ).

**2.2.1.1. C. Effet de l'huile essentielle de *Citrus reticulata***

Les résultats montrent qu'avec les huiles essentielles de *Citrus reticulata*, l'inhibition de la croissance mycélienne a été complète (PIc de 100%) avec les concentrations allant de 0.1 à 1 mg/ml pour les deux espèces testées du genre *Fusarium* et *Alternaria* . L'inhibition du *Penicillium* est importante avec les concentrations allant de 0.2 à 1 mg/ml et ayant pour PIc compris entre 74.51 à 100 % (Tableau 6).

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 PIc de 50.9 % vis-à-vis de *Fusarium proliferatum* et 39.3 % vis-à-vis de *Penicillium expansum*. Chutia et al .,(2009) enregistrent des PIc de 84 % pour *Alternaria alternata* et 42 % pour *Fusarium oxysporum*.

**2.2.1.1. D. Effet de l'huile essentielle de *Citrus limon L***

Les résultats obtenus *in vitro* montrent une forte inhibition de la croissance radiale (PIc 100 %) avec l'huile essentielle de *Citrus limon L* aux concentrations allant de 0.05 à 1mg/ml vis-à-vis du *Fusarium oxysporum f.sp albedinis*, *Fusarium sp*, *Alternaria alternata* et *Alternaria sp*. On remarque que l'inhibition de la croissance mycélienne radiale du *Penicillium* accroît avec l'augmentation de la concentration (Tableau 6).

Viuda-Martos et al., (2008) ont noté que le PIc de la croissance mycélienne de *Penicillium chrysogenum* et *Penicillium verrucosum*, augmente avec l'élévation de la concentration. La même notation a été faite par Abdelkader et al, (2012) sur *Fusarium oxysporum* et *Alternaria solani*

**2.2.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

Des données plus précises sur les propriétés antifongiques des huiles essentielles des citrus ont été obtenues en déterminant les concentrations inhibitrices minimales (CMI mg/ml) ainsi que la nature de la fongitoxicité .Les huiles essentielles de *Citrus limon* et *Citrus reticulata* ont respectivement la plus faible CMI (0.01 mg/ml) vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis* et *Alternaria sp*. Alors que l'huile essentielle de *Citrus sinensis* affiche des CMI nettement élevées (> 0.4 mg/ml) avec la totalité des espèces fongiques testées (Tableau 7). .

## Chap .2 : Activité antifongique des huiles essentielles *in vitro*

La concentration de 0.05 mg/ml est jugée être fongicide pour *Fusarium sp* avec *Citrus aurantium*, *Citrus limon* et *Citrus reticulata* ; pour *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis* avec *Citrus aurantium* et *Citrus limon* ; pour *Alternaria sp* avec *Citrus aurantium*. L'huile essentielle de *Citrus sinensis* présente une nature fongistatique vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f.sp. albedinis*, *Alternaria alternata* et *Penicillium sp* (Tableau 7).

Singh et al. (1980), Pandey et al. (1982), Souza et al. (2005) et Zabka et al. (2009) rapportent des CMI plus élevées aux CMI obtenues. La différence dans les valeurs de CMI est étroitement dépendante de la méthode utilisée (Delespaul et al. 2000).

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.

**Tableau 7.** Concentration minimale inhibitrice (CMI) (mg / ml) et la nature fongicide/fongistatique (NF) des huiles essentielles des citrus

Huiles essentielles	Souches fongiques									
	<i>Fusarium sp</i>		<i>Fusarium oxysporum fsp albedinis</i>		<i>Alternaria sp</i>		<i>Penicillium sp</i>		<i>Alternaria alternata</i>	
	CMI (mg/m)	NF	CMI (mg/ml)	NF	CMI (mg/ml)	NF	CMI (mg/ml)	NF	CMI (mg/ml)	NF
<i>Citrus sinensis</i>	0,4	-	1,0	+	0,4	-	>1,0	+	0,6	+
<i>Citrus aurantium</i>	0,05	-	0,05	-	0,05	-	0,1	-	0,05	-
<i>Citrus limon</i>	0,05	-	0,01	-	0,1	-	1	-	0,05	-
<i>Citrus reticulata</i>	0,05	-	0,05	-	0,01	-	1	+	0,1	+
Blanco										

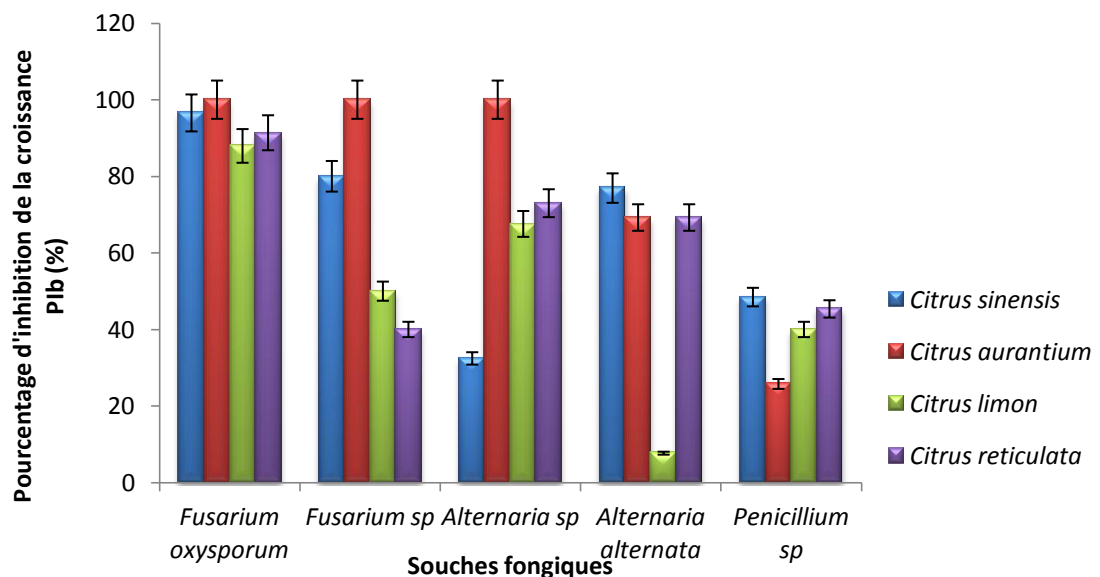
- : fongicide  
+ : fongistatique

### 2.2.3. Effet des huiles essentielles des citrus sur le poids sec du mycélium

L'effet significatif ( $P \leq 0.05$ ) des huiles essentielles sur la biomasse a été déterminé sur milieu liquide de dextrose de pomme de terre (PDB) (Figure 6). Les résultats obtenus montrent le grand pouvoir inhibiteur des huiles essentielles de *Citrus aurantium* (100%), *Citrus sinensis* (96.55%), *Citrus reticulata* (91.37%) et *Citrus limon* (87.93%) sur la croissance mycelienne en milieu liquide.

L'huile essentielle de *Citrus aurantium* a provoqué une réduction de la biomasse (100 %) des espèces de *Fusarium oxysporum f.sp albedinis*, *Alternaria sp* et *Fusarium sp*.

Les huiles essentielles de *Citrus sinensis*, *Citrus limon* et *Citrus reticulata* ont induit une diminution de la biomasse de *Fusarium oxysporum fsp albedinis*, de *Fusarium sp*, d'*Alternaria sp* et d'*Alternaria alternata*. Sharma et Tripathi, (2008) obtiennent une réduction de la biomasse d'*Aspergillus spp* traitée par l'huile essentielle de *Citrus sinensis*.



**Figure 6.** Effet des huiles essentielles des *citrus* sur le pourcentage d'inhibition de la croissance (PIb%). Les données sont des moyennes  $\pm$  écarts-types (barres d'erreur).

Les huiles essentielles enregistrent un fort pourcentage en monoterpènes ; pour *Citrus sinensis*, *Citrus limon* et *Citrus reticulata*, la présence des monoterpènes hydrocarbonés varie de 61.41 à 73.64% et pour *Citrus aurantium*, la prédominance était à la faveur des monoterpènes oxygénés (71.85 %) (Tableau 5).

Plusieurs chercheurs relient le pouvoir antifongique des huiles essentielles des citruses 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.

Caccioni et *al.*(1998 ) ont déduit une corrélation positive entre l'activité antifongique et la teneur en monoterpènes . Singh et *al.*(1980) rapportent que ces derniers sont reconnus comme de bons composés fongitoxiques .

Cependant, comme agents lipophiles, ils exécutent leur action au niveau de la membrane et sur les enzymes incorporés à la membrane (Uribe et *al.* , 1985 ; Sikkema et *al.* , 1994).

Il a été rapporté aussi que l'activité antifongique de ces composés est due à une modification de la composition en acides gras de la membrane cellulaire (Prashar et *al.* ,2003).

Plusieurs auteurs ont accordé l'activité antifongique des huiles essentielles aux composés majoritaires tel le D-limonene, linalool ,  $\beta$ -pinène ou citral (Rasooli et *al.*, 2002 ; Alma et *al.*, 2004; Bezic et *al.*, 2005; Sonboli et *al.*, 2006; Tepe et *al.*, 2006., Aoudou et *al.*, 2010).

Ils se diffusent dans les structures membranaires fongiques et les endommagent en augmentant leur perméabilité. Ils interfèrent avec les enzymes de la paroi cellulaire tels que la chitine synthétase / chitinase et avec les  $\alpha$ -et  $\beta$ -glucanases. Ils inhibent les enzymes intercellulaires et extracellulaires. Ils agissent comme un régulateur du métabolisme cellulaire et ils affectent la synthèse enzymatique dans le noyau ou le ribosome.

Ils interagissent avec l'absorption de nutriments provenant de l'environnement ce qui affecte la croissance mycélienne des champignons (Adams et *al.*, 1996 ; Chalchat et *al.*, 1997 ; Matasyoh et *al.*, 2007 ; Grbic et *al.*, 2011 ). Ils opèrent sur les hyphes mycéliens, la perte de rigidité et l'intégrité de la paroi cellulaire des hyphes, entraînant ainsi la mort du mycélium (Sharma et Tripathi, 2008).

### **2.2.4. Activité antisporelante des huiles essentielles des citrus**

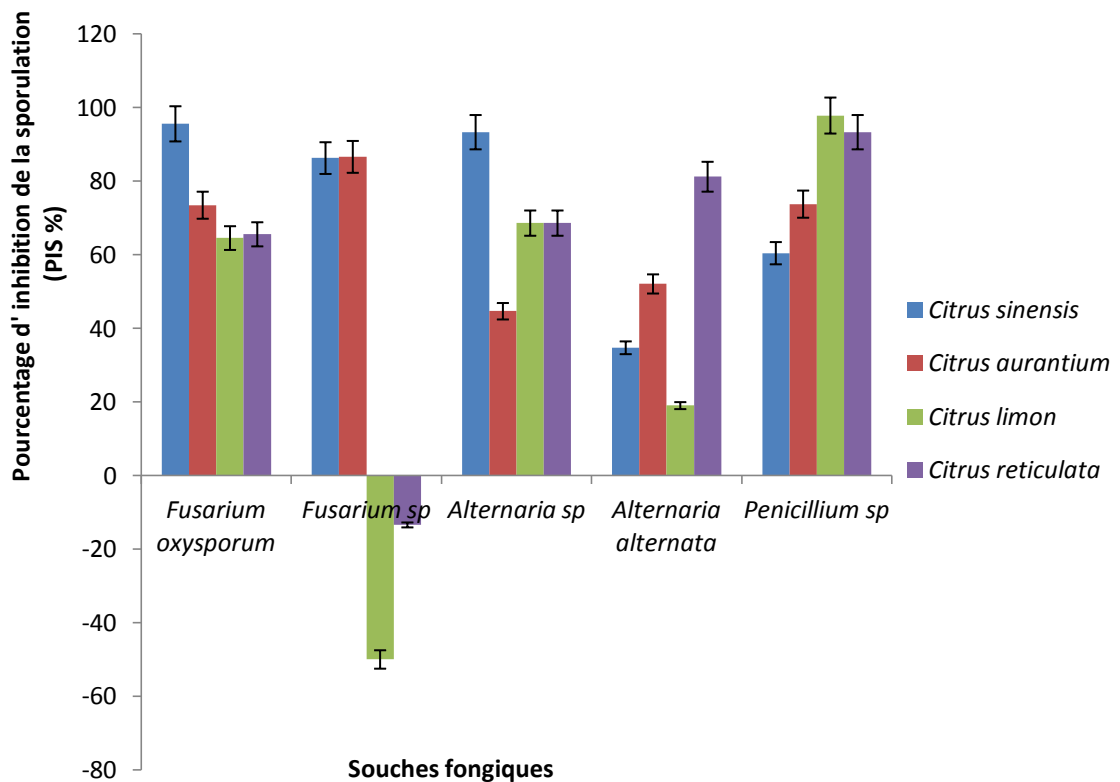
Les résultats de l'inhibition de la sporulation par les huiles essentielles sont représentés dans la figure 7. Comparés aux témoins, ils sont exprimés par le pourcentage d'inhibition de la sporulation (PIs %).

La sporulation sur PDA a été significativement ( $P < 0.05$ ) inhibée par les huiles essentielles de citrus.

Le pouvoir inhibiteur des huiles essentielles des citrus sur la sporulation a été rapporté par plusieurs auteurs (Sharma et Tripathi, 2006, 2008 ; Mahanta et *al.*, 2007 ; Chutia et *al.*, 2009 ; Grbic et *al.*, 2011 ; Philips, et *al.*, 2012).

Les pourcentages d'inhibition les plus importants ont été enregistrés pour *Citrus limon* avec *Penicillium sp* (97.85%) ; pour *Citrus sinensis* avec *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* (95,6 %), *Alternaria sp* (93.33 %) et *Fusarium sp* (86.29%) ; pour *Citrus reticulata*, avec *Penicillium sp* (93.33 %) et *Alternaria alternata* (81.22 %) et pour *Citrus aurantium* avec *Fusarium sp* (86.62 %) (Figure 7). Chutia et *al.*, (2009) obtiennent des PIs de 74 % et 83 % respectivement pour *Alternaria alternata* et *Fusarium oxysporum*.

La sporulation chez *Fusarium sp* a été stimulée de 46.11 % pour *Citrus limon* et de 13.43% pour *Citrus reticulata* (Figure 7).



**Figure 7.** Effet des huiles essentielles sur le pourcentage d'inhibition de la sporulation Les données sont des moyennes  $\pm$  écarts-types (barres d'erreur).

Ouraini et al ., (2005) remarquent que les huiles essentielles de *Thymus saturejoïdes L.*, *Menthe pulegium L.* et *Rosmarinus officinalis L* ont un effet favorisant sur la production des spores de *M. gypseum* , *M. nanum* et *M. canis*.

Le pouvoir inhibiteur des huiles essentielles des citrus sur la sporulation peut être relaté à leur composition chimique. Plusieurs composants peuvent agir comme régulateur pour des métabolismes intermédiaires ou substituer les facteurs limitant de ces derniers (Fries, 1973).

### **2.2.5. Activité anti germinative des huiles essentielles des citrus.**

Les huiles essentielles de *Citrus aurantium*, *Citrus sinensis*, *Citrus limon* et *Citrus reticulata* ont montré des pourcentages d'inhibitions différents et très significatifs ( $P < 0.01$ ) de la germination de spores.

Des pourcentages d'inhibition de la germination de spores de 100 % ont été obtenus pour *Citrus aurantium* avec *Fusarium sp* et pour *Citrus sinensis* avec *Fusarium oxysporum f.sp albedinis*. Les huiles essentielles de *Citrus sinensis* enregistrent de forts pourcentages d'inhibition de la germination des spores (58.66 à 100 %) avec la totalité des espèces fongiques (Figure 8).

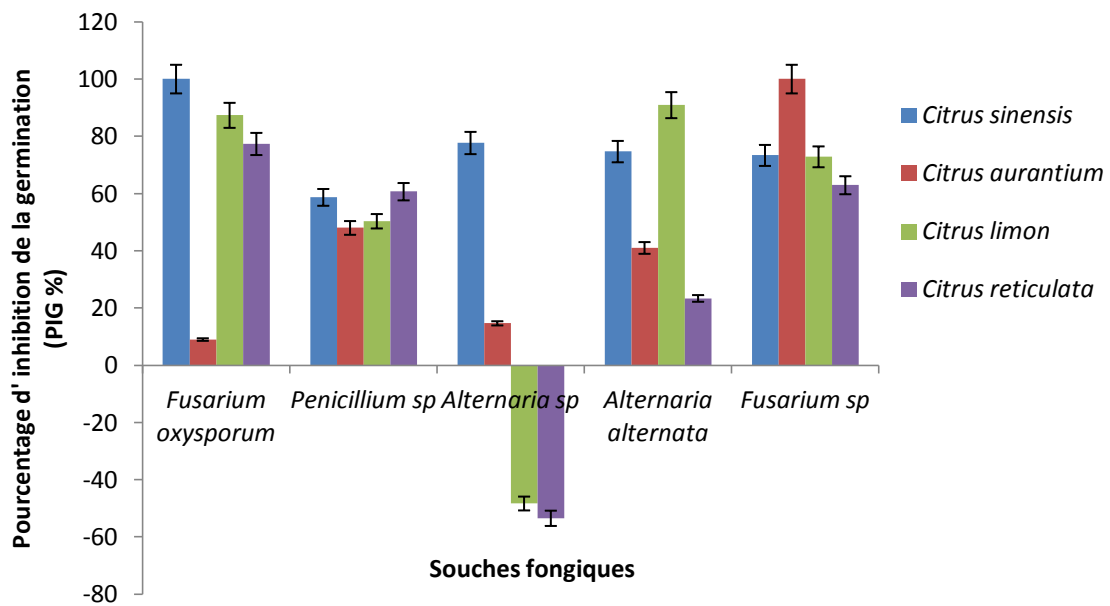
Les résultats montrent aussi des pourcentages d'inhibition avec les huiles essentielles de *Citrus reticulata* vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* (77.33 %), *Fusarium sp* (62.13%) et *Penicillium sp* (60.66 %) (Figure 8).

Nos résultats sont en accord avec ceux de la littérature, ils suggèrent que les huiles essentielles peuvent inhiber la germination des spores fongiques (Chutia et al., 2009., Grbic et al., 2011 ).

Les huiles essentielles de *Citrus limon* et *Citrus reticulata* stimulent la germination des spores respectivement de 48 % et 53 % chez *Alternaria sp* (Figure 8).

Eckert et Ratnayake , (1994) ont remarqué que les huiles essentielles de *Citrus sinensis* ont stimulé la germination des spores de 10 souches et inhibé la germination des spores de 8 autres souches de *Penicillium digitatum* . Filtenborg et al, (1996) expliquent que ceci pourrait être dû au mécanisme que développent certains pathogènes fongiques en utilisant les métabolites secondaires comme un signal pour déclencher la germination.





**Figure 8.** Effet des huiles essentielles sur le % d'inhibition de la germination des spores  
Les données sont des moyennes  $\pm$  écarts-types (barres d'erreur).

Les composants de l'huile peuvent agir de manière synergique et l'association de plusieurs composés peut avoir une action stimulante sur la germination des spores fongiques (French, 1985).

Les métabolismes actifs qui se produisent au cours de la germination des spores sont la respiration, la synthèse des ARN et des protéines (Chitarra, 2003). Ces mécanismes vitaux peuvent être inhibés sous l'effet des huiles essentielles (Grbic et al., 2011). Elles ont la capacité de pénétrer, de perturber la paroi cellulaire fongique et les membranes cytoplasmiques, d'endommager et de perméabiliser les membranes mitochondriales (Akthar et al., 2014).

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

### **2.3. Conclusion partielle**

L'activité antifongique des huiles essentielles de *Citrus sinensis*, *Citrus aurantium*, *Citrus limon* et *Citrus reticulata* a été évaluée *in vitro* vis-à-vis de cinq champignons phytopathogènes à savoir *Fusarium oxysporum f.sp albedinis*, *Alternaria alternata*, *Penicillium sp*, *Alternaria sp* et de *Fusarium sp*.

Les résultats obtenus mentionnent le grand pouvoir inhibiteur (100 %) des huiles essentielles de *Citrus aurantium*, *Citrus limon* et *Citrus reticulata* sur la croissance mycelienne en milieu solide et en milieu liquide.

Les huiles essentielles de *Citrus limon* et *Citrus reticulata* ont respectivement la plus faible CMI (0.01 mg/ml) vis-à-vis de *Fusarium oxysporum f.sp, albedinis* et *Alternaria sp*.

Quant à l'inhibition de la sporulation, les pourcentages d'inhibition les plus importants ont été enregistrés avec l'huile essentielle de *Citrus limon* pour *Penicillium sp* (97.85%) et avec l'huile essentielle de *Citrus sinensis* pour *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* (95,6 %), *Fusarium sp* (86.29 %) et *Alternaria sp* (93.33 %).

Les huiles essentielles de *Citrus sinensis* et *Citrus limon* enregistrent un fort pourcentage d'inhibition de la germination de spores (PIg : 58.66 -100 %) avec la totalité des espèces phytopathogènes.

### **3. Activité antifongique des composés moléculaires majoritaires des huiles essentielles**

#### **3.1. Matériel et méthodes**

##### **3.1.1. Composés majoritaires des huiles essentielles**

En se basant sur les profils chimiques établis des huiles essentielles de *Citrus sinensis*, *Citrus aurantium*, *Citrus reticulata* et de *Citrus limon*, quatre composés majoritaires monoterpéniques ont été testés, il s'agit du limonène (97 %) fourni par Alfa Aesar, du citral (97 %), de  $\alpha$  – pinène (97 %) et de  $\beta$ - pinène (97 %) fourni par Merck.

##### **3.1.2. Espèces fongiques.**

Les espèces *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* et *Alternaria alternata* ont été fournies par le laboratoire de pathologie des plantes, Institut des sciences agronomiques, Université de Chlef. Les trois autres espèces fongiques : *Alternaria sp*, *Fusarium sp* et *Penicillium sp* proviennent du laboratoire de mycologie de la station régionale de la protection des végétaux de Chlef. Toutes les souches ont été purifiées et maintenues sur milieu agar dextrose de pomme de terre (PDA) à 22 °C  $\pm$  2 °C.

##### **3.1.3. Activité antifongique des composés volatils**

###### **3.1.3.1. Effet des composants volatils sur la croissance mycélienne radiale**

L'effet du limonène, citral,  $\alpha$  – pinène et  $\beta$ - pinène a été testé sur la croissance du mycélium de *Fusarium oxysporum f.sp albedinis*, *Alternaria alternata*, *Alternaria sp*, *Fusarium sp* et *Penicillium sp* par la méthode de contact direct *in vitro* (Yahyazadeh et al., 2008). 15 ml du milieu PDA ont été versés dans des boîtes de Pétri stériles (diamètre 90 mm), additionnés de 0,05 % (v/v) de Tween-80 ; des quantités de limonène, citral,  $\alpha$  – pinène et de  $\beta$ - pinène ont été ajoutées individuellement au milieu de culture pour obtenir les concentrations désirées de 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 0,25 et 0,5  $\mu$ l / ml.

Un disque mycélien de 6 mm de diamètre a été prélevé à partir de la périphérie d'une culture en croissance âgée de 7 jours, puis a été placé au centre de chaque nouvelle boîte de Pétri. Des témoins adjacents (sans composants majoritaires) ont été préparés. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 28  $\pm$  2 °C pendant 7 jours. Chaque traitement a été réalisé en triple.

### Chap.3 : Activité antifongique des composés moléculaires majoritaires des huiles essentielles

Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne (PIc %) a été calculé selon la formule:

$$PIc (\%) = [(dc - dt)/dc] \times 100$$

PIc (%) : Pourcentage d'inhibition de la croissance du mycélium

dc : diamètre de la colonie fongique témoin

dt : diamètre de la colonie fongique traitée aux composants majoritaires volatils

L'activité fongicide /fongistatique des composants volatils a été déterminée en utilisant la technique de Thompson (1989) ; les disques mycéliens ont été transférés à partir des boîtes de Pétri où aucune croissance n'a été observée (totale inhibition) sur un milieu PDA frais sans composants volatils. Après 7 jours d'incubation et une croissance nulle, l'effet est considéré fongicide. Les expériences ont été répétées trois fois.

#### **3.1.3.2. Activité antisporulante des composants volatils**

Des spores issues des colonies âgées de 7 à 11 jours de *Fusarium oxysporum f.sp albedinis*, *Alternaria alternata* *Alternaria sp*, *Fusarium sp* et *Penicillium sp*, préalablement exposées au limonène, citral,  $\alpha$  – pinène et  $\beta$ - pinène ont été assemblées par addition de 10 ml d'eau distillée stérile à chaque boîte de Pétri dont on racle la surface avec un scalpel stérile . Les expériences ont été répétées trois fois.

La suspension obtenue est mise dans des tubes à essai qui ont été agités par séquence de 3 secondes pendant 15 secondes afin de détacher les spores des conidiospores puis filtrées à travers la gaze.

Le comptage du nombre de spores a été effectué à l'aide d'une cellule de Malassez à raison de dix comptages par suspension sous microscope optique (Tzortzakis et Economakis, 2007). Le pourcentage d'inhibition de la sporulation (PIs %) est calculé par rapport au Témoin.

$$PIs (\%) = (1 - Nc/No) \times 100$$

Nc : nombre moyen de spores en présence du composant.

No : nombre moyen de spores chez le témoin.

**3.1.3.3 Activité anti germinative des composants volatils**

L'effet fongicide ou fongistatique a été examiné sur la germination des spores après traitement aux composants volatils. Les spores provenant des cultures âgées de 7 à 11 jours, de *Fusarium oxysporum f.sp albedinis*, *Alternaria alternata*, *Alternaria sp*, *Fusarium sp* et de *Penicillium sp* précédemment exposées aux composants volatils, ont été assemblées comme si décrit antérieurement. La suspension sporale est ajustée à  $10^4$  conidies / ml. On prélève 1.5 µl de celle-ci, dont quatre gouttes sont déposées sur des lames en verre préalablement préparées en les recouvrant de 4 ml d'eau gélosée (8 g/l). Des lames témoins ont été préparées. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque espèce. Les lames sont placées ensuite dans des boîtes de Pétri et incubées à  $28 \pm 2$  °C pendant 48 h (Barbosa cavalcante, 2009).

Pour chaque traitement, 200 spores ont été examinées ; la germination de la spore a été évaluée en recherchant l'apparition des tubes germés (Grbic et al. 2011). La spore dont le tube germinatif atteint 50% de sa taille est considérée germée. Le pourcentage d'inhibition de la germination (PIg %) est calculé par rapport au témoin.

**3.1.4. Traitement statistique**

Chaque expérience a été réalisée en triple et des valeurs moyennes ont été calculées. L'analyse statistique a été effectuée en utilisant l'analyse de la variance (ANOVA) et les différences entre les valeurs des moyennes ont été déterminées avec le test LSD de Fisher ( $P < 0,05$ ). En cas de différences significatives, les moyennes ont été comparées avec le logiciel Statistica 6.0.

Ce test a permis de comparer les valeurs moyennes de l'effet de chaque composant volatil sur le stade de la croissance mycélienne, la production et de la germination des spores de *Fusarium oxysporum f.sp albedinis*, *Alternaria alternata*, *Alternaria sp*, *Fusarium sp* et de *Penicillium* sp.

### **3.2. Résultats et Discussion**

L'activité antifongique des quatre composants des huiles essentielles des *Citrus* à savoir le limonène, le citral, l' $\alpha$ -pinène et le  $\beta$ -pinène a été testée vis à vis de cinq champignons phytopathogènes (*Fusarium oxysporum f.sp albedinis*, *Alternaria alternata*, *Alternaria sp*, *Fusarium sp* et *Penicillium sp*). Les paramètres d'évaluation de l'effet se sont portés sur les stades de vie du champignon : la croissance mycélienne (phase végétative), la production et la germination des spores (phase de reproduction), exprimées en pourcentage d'inhibition calculé par rapport au témoin.

#### **3.2.1. Activité antifongique des composants volatils**

##### **3.2.1.1. Effet des composants volatils sur la croissance mycélienne radiale**

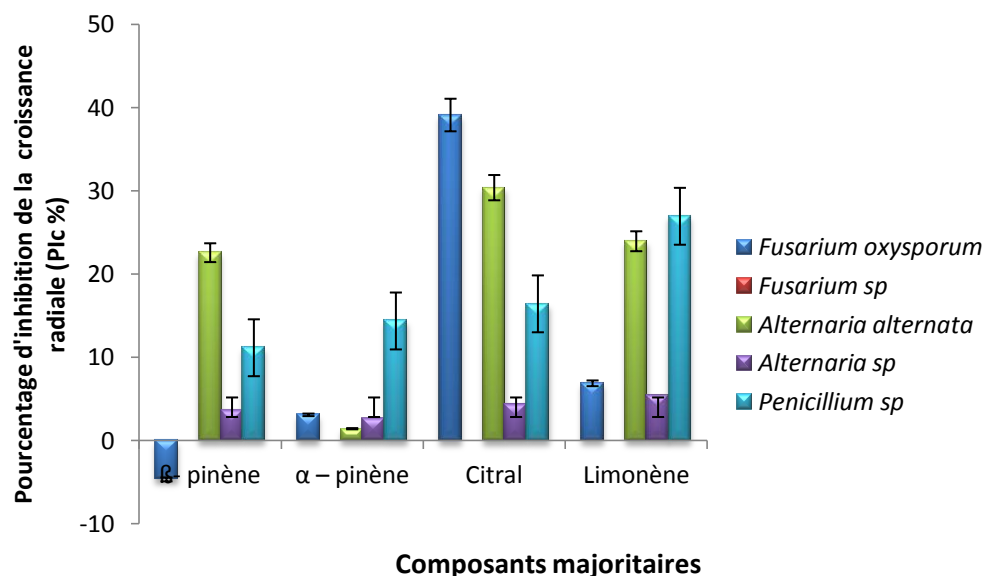
Le citral, le limonène, l' $\alpha$ -pinène et le  $\beta$ -pinène sont des constituants communs pour beaucoup d'huiles essentielles de citrus et peuvent avoir des actions antimicrobiennes (Wuryatmo et al., 2003 ; Belletti et al., 2004; Friedman et al., 2004;; Fisher & Phillips, 2008).

Les résultats obtenus (Figure 9) représentent l'effet du limonène, du citral, de l' $\alpha$ -pinène et du  $\beta$ -pinène sur la croissance mycélienne des espèces fongiques testées. Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne obtenu par les quatre composés est inférieur à celui enregistré avec les huiles essentielles de *Citrus sinensis*, *Citrus limon*, *Citrus aurantium* et de *Citrus reticulata*.

Plusieurs études 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). 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.

Il en ressort d'après l'analyse de l'ANOVA qu'au seuil 5 % les composants volatils ont un effet très hautement significatif ( $P < 0.001$ ) sur la croissance mycélienne des espèces fongiques.

*Fusarium sp* est très résistant à l'effet des quatre composants monoterpéniques où on enregistre des pourcentages d'inhibition nuls. En revanche, *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* et *Alternaria alternata* sont sensibles au citral avec des pourcentages d'inhibition de la croissance radiale (PIc %) respectivement de 39.13 % et 30.40% (Figure 8).



**Figure 9.** Effet du  $\beta$ - pinène,  $\alpha$  - pinène, citral , limonène sur la croissance mycélienne. Les données sont des moyennes  $\pm$  écarts-types (barres d'erreur).

L'action antimicrobienne exercée par le citral contre les levures et les moisissures a été déjà démontrée (Wuryatmo et *al.* , 2003 ; Rivera-Carriles et *al.*, 2005 ; Belletti et *al.*, 2007 ., Belletti et *al.*, 2008 ; Tao et *al.* ,2014 ; Zheng et al.,2015).

Zhou et *al.*, (2014) mentionnent que le citral modifie la morphologie des hyphes de *Geotrichum citri-aurantii* en provoquant la perte du contenu cytoplasmique et la distorsion des mycéliums . Ils notent aussi que la perméabilité de la membrane de *Geotrichum citri-aurantii* accroît avec l'augmentation de la concentration en citral. Zheng et *al.* ,(2015) rapportent que des concentrations de 2.0 ou 4.0  $\mu$ l/ml provoquent des dommages très importants aux structures mitochondriales de *Penicillium digitatum*

Le limonène a efficacement inhibé la croissance mycélienne de *Penicillium sp* et d'*Alternaria alternata* avec des pourcentages d'inhibition de la croissance respectifs de 26.96% et 23.96% (Figure 9).

Wilson et *al.* (1997) rapportent le grand pouvoir antifongique du D limonène vis-à-vis de *Botrytis cinerea*. Le limonène intervient dans la destruction de l'intégrité cellulaire et empêche l'activité respiratoire au niveau mitochondrial (Sikkema et *al.* , 1995).

Marei et *al.*, (2012) rapportent que le limonène agit sur l'activité enzymatique de la cellulase et la Pectin methyl esterase de *Fusarium oxysporum* et *Penicillium digitatum*.

### **Chap.3 : Activité antifongique des composés moléculaires majoritaires des huiles essentielles**

Les deux isomères  $\beta$ -pinène et  $\alpha$ -pinène produisent des effets similaires sur la croissance mycélienne des espèces fongiques à l'exception d'*Alternaria alternata* qui s'est montré sensible à l'effet du  $\beta$ -pinène avec un PIc de 22,59 % et résistante au  $\alpha$ -pinène avec un PIc de 1.43 % (Figure 9).

$\beta$ -pinène est un terpène bicyclique, c'est un constituant commun avec son isomère  $\alpha$ -pinène des huiles de Lamiacées, conifères, d'agrumes et de nombreuses autres plantes (Canillac et Mourey, 2001 ; Belletti et al., 2004 ; Burt, 2004 ; Hong et al., 2004). Ils ont été identifiés comme les plus importants constituants bioactifs et antifongiques de nombreuses huiles essentielles ( Wilson et al., 1997 ; Aligiannis et al., 2001 et Couladis et al., 2003 ). D'autre part, certains auteurs ont remarqué peu ou pas d'activité antimicrobienne pour le  $\beta$ -pinène ( Filipowicz et al., 2003 et Pichette et al., 2006 ).

L'effet antifongique du  $\beta$ -pinène a été étudié par Uribe et al. (1985) et on lui attribue les altérations produites au niveau des membranes. Ils spécifient que dans la plage des concentrations faibles, le  $\beta$ -pinène peut produire plusieurs altérations de la fonction mitochondriale. Il peut modifier les fonctions de la membrane plasmique à des concentrations plus élevées.

#### **3.2.1.2. Effet de la concentration des composants volatils sur la croissance mycélienne radiale**

La figure 10 montre les résultats de l'effet des concentrations du limonène, du citral, de l' $\alpha$ -pinène et de  $\beta$ -pinène sur le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne. Effectivement l'effet de concentration se manifeste de manière très hautement significatif ( $P < 0.001$ ) avec les espèces fongiques testées. Karatzas et al. (2000) et Vázquez et al. (2001) remarquent que l'action des constituants individuels des huiles essentielles étant en fonction de leurs concentrations.

Pour le genre *Alternaria*, les deux espèces se comportent différemment. La concentration de 0.5  $\mu$ l / ml se révèle la plus inhibitrice avec tous les composants.

En ce qui concerne *Alternaria alternata*, à faible concentration le  $\beta$ -pinène semble posséder un pouvoir inhibiteur contrairement à son isomère  $\alpha$ -pinène qui a légèrement (4%) favorisé la croissance mycélienne à la concentration de 0.01  $\mu$ l / ml (Figure 10 : À).



### Chap.3 : Activité antifongique des composés moléculaires majoritaires des huiles essentielles

Hammer et *al.*(2003) mentionnent qu'il n'y a pas de consensus clair définissant lequel des deux isomères pinène est plus activement inhibiteur vis-à-vis des champignons.

*Alternaria sp* présente une résistance vis à vis des quatre composants volatils (Figure 10 :B) avec un pourcentage d'inhibition de la croissance qui n'excède pas 13.5 %. Les faibles concentrations de 0.01 et 0.025 µl / ml avec le citral, le limonène, le β- pinène et le α – pinène ne déclenchent aucune inhibition de la croissance (PIc = 0%). Le citral et le limonène induisent l'inhibition la plus importante à partir de la concentration de 0.05 µl / ml .

Cox et *al.*(2000) rapportent que les faibles concentrations des monoterpènes entraînent des modifications dans les processus respiratoires et des changements dans la perméabilité membranaire. Stevens et *al* . (1971) obtiennent une inhibition totale de la croissance mycélienne d'*Alternaria* à la concentration de 0.125 µl / ml avec le citral.

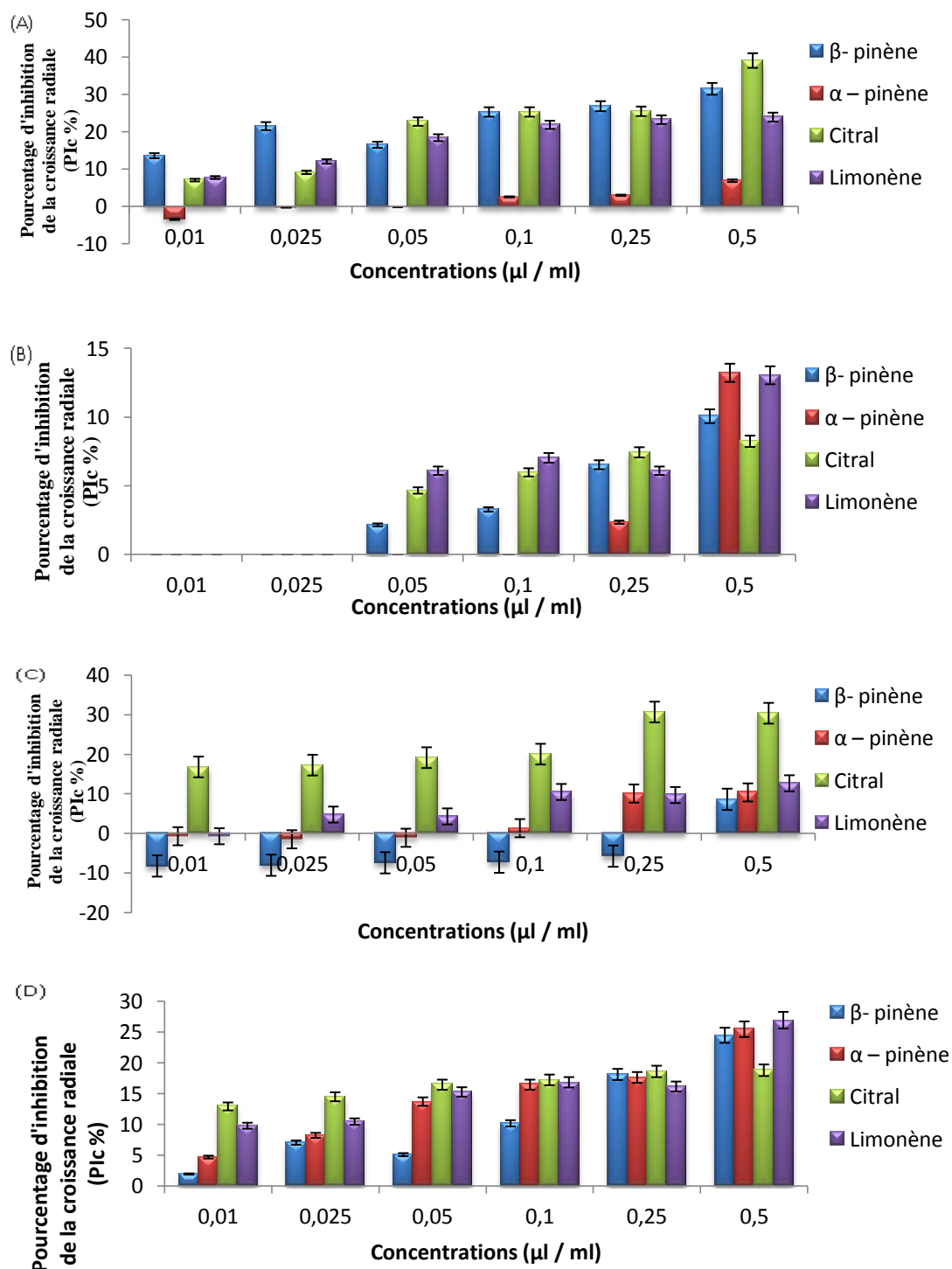
Pour le genre *Fusarium*, l'espèce *Fusarium sp* montre une résistance très importante (PIc = 0%) aux quatre composés testés. *Fusarium oxysporum fsp albedinis* est plus sensible à l'effet du citral. Moleyar et Narasimham, (1986) attribuent l'efficacité du citral vis à vis du *Fusarium oxysporum* en présence du groupement -CHO. Ils rapportent que les molécules présentant ce genre de groupe sont fortement électronégatives, indiquant que cette augmentation en électro-négativité accroît l'activité antifongique.

D'autre part, les faibles concentrations (0.01 à 0.25 µl / ml) d'α – pinène favorisent légèrement le développement mycélien de *Fusarium oxysporum fsp albedinis*. Par contre la concentration de 0.5 µl / ml inhibe la croissance mycélienne (Figure 10 : C).

Moleyar et Narasimham , (1986) notent que la stimulation ou l'inhibition de la croissance mycélienne dépendent de la concentration en composés volatils utilisés dans le milieu.

Quant à l'espèce de *Penicillium sp*, le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne le plus important (PIc = 27 %) a été enregistré avec le limonène à la concentration de 0.5 µl /ml (Figure 10: D).

### Chap.3 : Activité antifongique des composés moléculaires majoritaires des huiles essentielles



**Figure 10.** Effet du  $\beta$ - pinène,  $\alpha$  – pinène, citral et limonène aux différentes concentrations sur la croissance mycélienne.

Les données sont des moyennes  $\pm$  écarts-types (barres d'erreur). A: *Alternaria alternata* B: *Alternaria sp* C: *Fusarium oxysporum fsp albedinis* et D : *Penicillium sp*

### Chap.3 : Activité antifongique des composés moléculaires majoritaires des huiles essentielles

La sensibilité de *Penicillium sp* vis-à-vis du limonène, citral,  $\alpha$  – pinène et du  $\beta$ - pinène accroît avec l'augmentation de la concentration. Zheng et al, (2015) rapportent que des concentrations de 2.0 ou 4.0  $\mu$ l/ml en citral provoquent des dommages très importants aux structures mitochondriales de *Penicillium digitatum*. Zhou et al ., (2014) rapportent que l'effet inhibiteur du citral est positivement corrélé avec la concentration.

#### **3.2.2. Activité antisporulante des composants volatils**

##### **3.2.2.1 Effet des composants volatils sur la sporulation**

L'effet du  $\beta$ - pinène,  $\alpha$ - pinène, citral et du limonène a été étudié sur la sporulation d'*Alternaria alternata* , *Alternaria sp* , *Fusarium oxysporum fsp albedinis*, *Fusarium sp* et *Penicillium sp*. Le pourcentage d'inhibition de la sporulation (PIs %) a été calculé par la comparaison des spores produites par les colonies précédemment exposées aux composants volatils avec celles produites par le témoin (Figure 11).

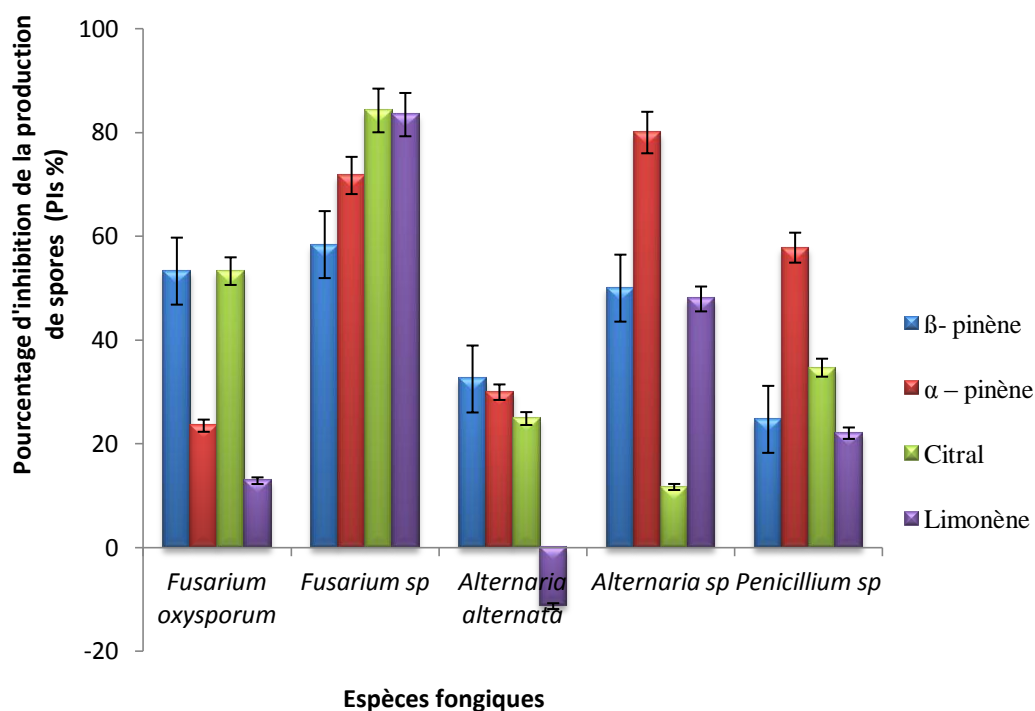
L'effet des composants volatils s'est significativement ( $P < 0.05$ ) prononcé sur l'inhibition de la production des spores des cinq espèces plus particulièrement *Fusarium sp*. L'inhibition de la sporulation des cinq espèces en présence de  $\beta$ - pinène,  $\alpha$  – pinène, citral et du limonène a été fortement enregistrée.

L' $\alpha$ -pinène engendre une forte inhibition de la production de spores chez *Alternaria sp*, *Fusarium sp* et *Penicillium sp* avec des PIs respectifs 80 % ; 71.72 % et 57.80 % (Figure 10). Garcia et al., (2008) évoquent le pouvoir inhibiteur d'  $\alpha$  -pinène sur *Fusarium subglutinans f.sp. ananas*.

Les résultats trouvés montrent les pourcentages d'inhibition de sporulation importants de *Fusarium sp* et de *Fusarium oxysporum fsp albedinis* respectivement de 58.39 et 53.28 % par le  $\beta$ - pinène et de 84.25 et 53.29 % par le citral (Figure 11).

L'activité antifongique du citral a été expliquée par le fait qu'il est un membre de l' $\alpha$ ,  $\beta$  aldéhydes insaturés pouvant jouer le rôle d'agent d'alkylation sur des groupes nucléophiles (Wuryatmo et al., 2003 ; Belletti et al ., 2010).

Le limonène provoque une forte inhibition de la production de spores chez *Fusarium sp* (83.45%), *Alternaria sp* (48 %) et aucun effet chez *Alternaria alternata* (Figure 11). Hamilton-kemp et al ., (1992) remarquent que le limonène n'a aucun effet inhibiteur sur la sporulation d'*Alternaria alternata* et de *Botrytis cinerea* .



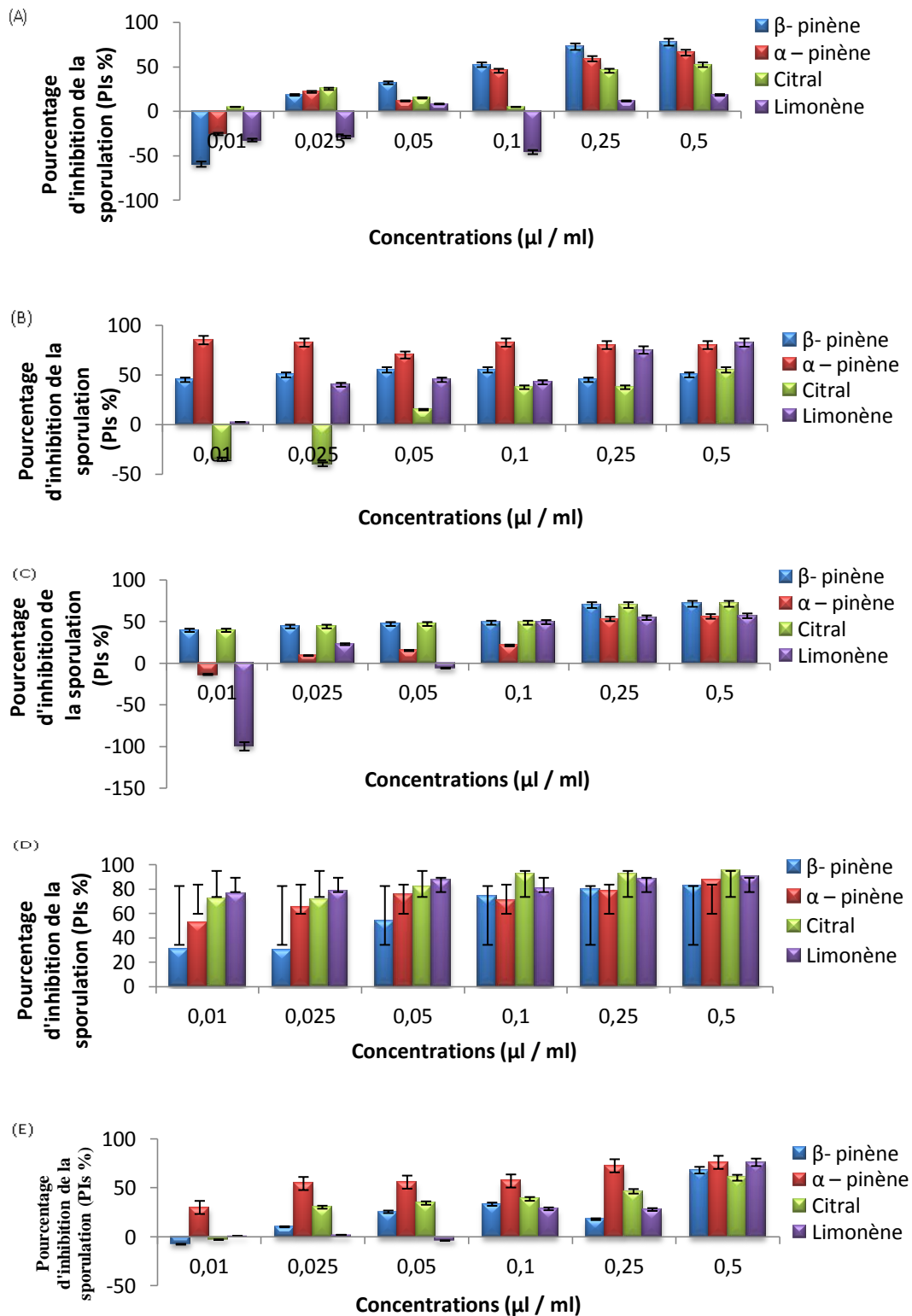
**Figure 11.** Effet du  $\beta$ - pinène,  $\alpha$  – pinène, citral, limonène sur la production des spores. Les données sont des moyennes  $\pm$  écarts-types (barres d'erreur).

### 3.2.2.2 Effet de la concentration des composants volatils sur la sporulation

L'effet des composants volatils sur la sporulation a été reporté sur la figure 12 pour les deux espèces d'*Alternaria*. Elle a été très influencée par les concentrations employées. Cependant la sporulation d'*Alternaria alternata* a été stimulée à la concentration de 0.01  $\mu\text{l} / \text{ml}$  en présence d' $\alpha$  – pinène,  $\beta$ - pinène et de limonène. La stimulation persiste avec le limonène (PIs = 45 %) jusqu'à la concentration de 0.1  $\mu\text{l} / \text{ml}$  (Figure 12: A).

Les fortes inhibitions ont été enregistrées à partir de la concentration de 0.25  $\mu\text{l} / \text{ml}$  avec les quatre composants volatils (Figure 12 : A). En revanche pour *Alternaria sp* les faibles concentrations en  $\alpha$  – pinène et de  $\beta$ - pinène inhibent fortement la production des spores.

### Chap.3 : Activité antifongique des composés moléculaires majoritaires des huiles essentielles



**Figure 12.** Effet du Limonène, Citral, α – pinène et β- pinène aux différentes concentrations sur la production des spores.

Les données sont des moyennes ± écarts-types (barres d'erreur). A: *Alternaria alternata* B: *Alternaria sp* C: *Fusarium oxysporum fsp albedinis*, D : *Fusarium sp* et E: *Penicillium sp*.

### **Chap.3 : Activité antifongique des composés moléculaires majoritaires des huiles essentielles**

Les concentrations de 0.01 et 0.025 µl / ml de citral stimulent la sporulation, par contre la concentration de 0.5 µl / ml inhibe la production de spores de 55 % (Figure 12 : B).

Pour *Fusarium oxysporum fsp albedinis*, la concentration de 0.01 µl / ml en limonène favorise la sporulation de 100 %. A fortes concentrations, l'inhibition devient de plus en plus importante (Figure 12 : C).

L'inhibition de la sporulation du *Fusarium sp* a été observée avec les quatre composés volatils et le pourcentage d'inhibition de la sporulation augmente avec l'accroissement de la concentration (Figure 12 : D).

L'inhibition de la sporulation du *Penicillium sp* accroît avec l'augmentation de la concentration pour les quatre composés (Figure 12 : E).

Hammer et al.(2003) affirment que les monoterpènes, à hautes concentrations, entraînent une perte totale de l'homéostasie, de grands dommages membranaires et une forte probabilité de la mort .

Le pourcentage d'inhibition de la sporulation le plus important a été obtenu avec le citral (PIs = 95 %) à la concentration de 0.5 µl / ml. Garcia et al ., (2008) rapportent le pouvoir inhibiteur du citral sur la sporulation de *Fusarium subglutinans f.sp ananas* apporté à la concentration de 0.5 %.

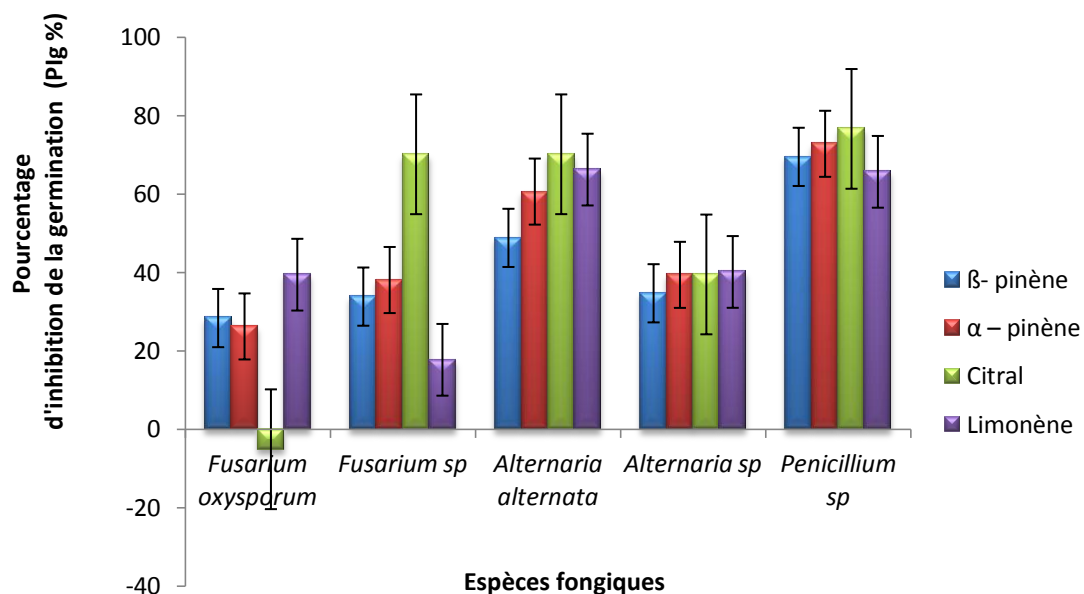
#### **3.2.3. Activité anti germinative des composants volatils**

##### **3.2.3.1. Effet des composants volatils sur la germination des spores**

Les résultats des pourcentages d'inhibitions de la germination des spores d'*Alternaria alternata* , *Alternaria sp* , *Fusarium oxysporum fsp albedinis*, *Fusarium sp* et de *Penicillium sp* collectés à partir de cultures précédemment exposées au limonène, citral, α – pinène et β- pinène sont reportés sur la figure 13 .

Les quatre composants affichent tous un effet inhibiteur très significatif ( $P < 0.01$ ) sur la germination de spores par rapport à celui enregistré avec les huiles essentielles de *Citrus sinensis*, *Citrus limon*, *Citrus aurantium* et de *Citrus reticulata*.

Les pourcentages d'inhibition fluctuent entre 18 et 76.66 %, le plus important a été enregistré avec le citral vis-à-vis du *Penicillium sp* (76.66 %).



**Figure13.** Effet du  $\beta$ - pinène,  $\alpha$  – pinène, citral, limonène sur la germination des spores. Les données sont des moyennes  $\pm$  écarts-types (barres d'erreur).

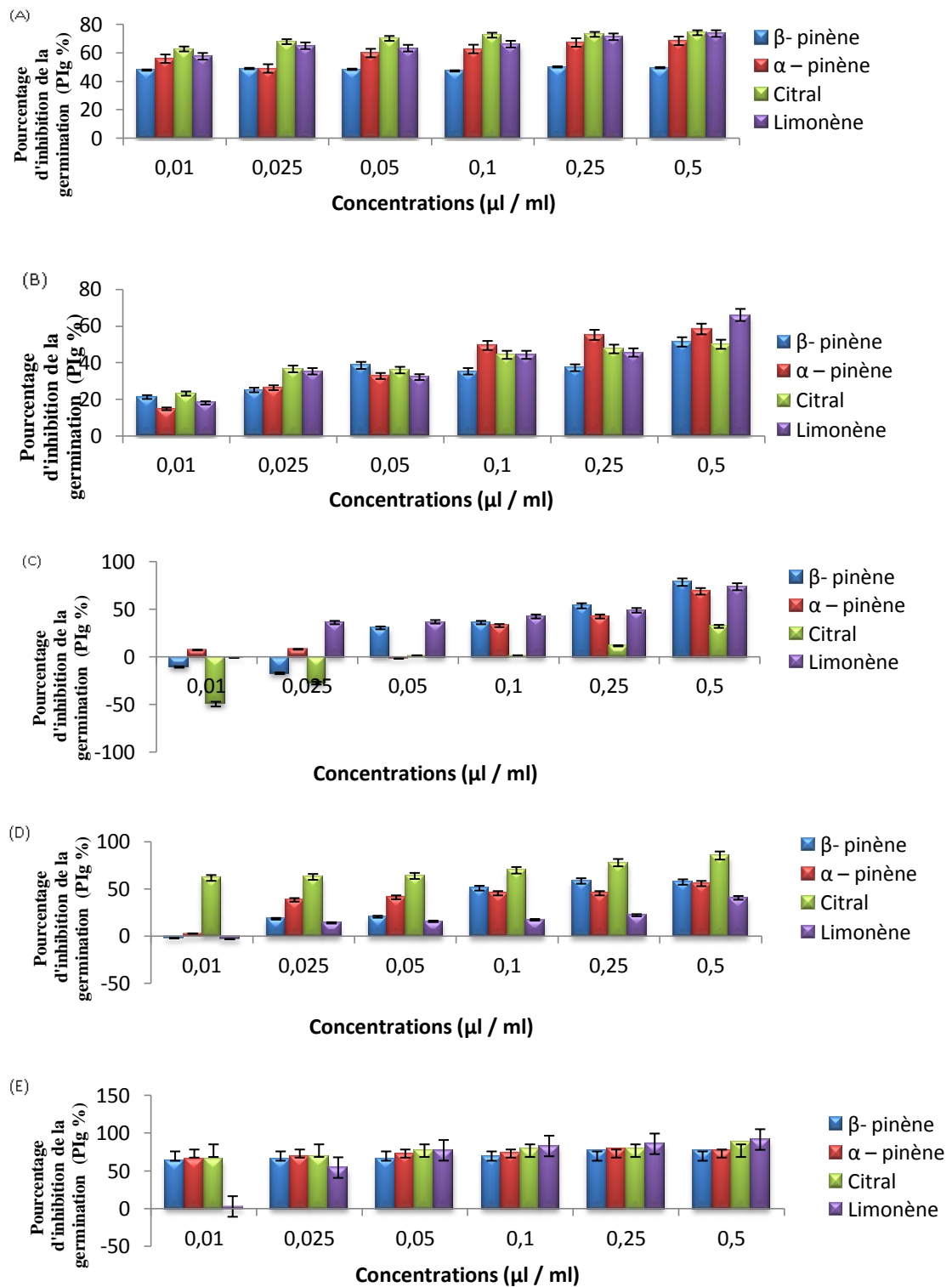
L'effet inhibiteur des monoterpènes sur la germination des spores a été rapporté par plusieurs auteurs (Wilson et al., 1987 ; Garcia et al., 2008.).

### 3.2.3.2. Effet de la concentration des composants volatils sur la germination des spores

Les résultats montrent que le  $\beta$ - pinène,  $\alpha$  – pinène, citral et le limonène à différentes concentrations ont réduit la germination des spores des cinq espèces fongiques en comparaison aux témoins (Figure 14).

L'augmentation de la concentration des composants volatils diminue le taux de la germination des spores. On enregistre de forts pourcentages d'inhibition (48 à 75 %) d'*Alternaria alternata* par les quatre composants (Figure 14 : A). Il est remarquable de noter que les autres espèces fongiques montrent une sensibilité de même ampleur à l'effet de concentration des quatre composants.

### Chap.3 : Activité antifongique des composés moléculaires majoritaires des huiles essentielles



**Figure 14 .** Effet du limonène, citral,  $\alpha$  – pinène et  $\beta$ - pinène aux différentes concentrations sur l’inhibition de germination des spores.

Les données sont des moyennes  $\pm$  écarts-types (barres d'erreur). A: *Alternaria alternata* B: *Alternaria sp* C: *Fusarium oxysporum fsp albedinis* , D : *Fusarium sp* et E: *Penicillium sp*



### Chap.3 : Activité antifongique des composés moléculaires majoritaires des huiles essentielles

*Alternaria sp* réagit à l'effet de dose par augmentation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration ; le limonène annonce une efficacité dans l'inhibition de la germination des spores en progressant d'un PIg de 17 % à la concentration de 0.01  $\mu\text{l} / \text{ml}$  et de 66 % à la concentration de 0.5  $\mu\text{l} / \text{ml}$  (Figure 14 : B).

Quant au *Fusarium oxysporum fsp albedinis*, l'effet dose semble jouer un rôle très important dans la germination des spores pour le citral et le  $\beta$ - pinène.

En effet les concentrations de 0.01 et 0.025  $\mu\text{l} / \text{ml}$  ont augmenté le taux de germination des spores respectivement de 50 % et 28 % par le citral, de 11 % et 17 % par le  $\beta$ - pinène.

En revanche à la concentration de 0.5  $\mu\text{l} / \text{ml}$ , on assiste à une inhibition de 32 % par le citral et de 78.4 % par le  $\beta$ - pinène (Figure 14 : C).

Moleyar et Narasimham, (1986) ont obtenu des pourcentages d'inhibition de la germination des spores par le citral de 100 % avec *Fusarium oxysporum*.

Mercier et al ., (2009) signalent que le mécanisme par lequel les  $\alpha$ -et les  $\beta$ -pinènes sont actifs contre les champignons réside principalement dans leur capacité à induire des effets toxiques sur la structure et les fonctions de la membrane.

En revanche la germination des spores de *Fusarium sp* semble ne pas être dépendante de la dose pour le citral et l' $\alpha$ -pinène aux concentrations allant de 0.025 à 0.25  $\mu\text{l} / \text{ml}$ . Le pourcentage d'inhibition le plus élevé (85,40 %) a été obtenu par le citral à la concentration de 0.5  $\mu\text{l} / \text{ml}$  (Figure 14 : D).

Le limonène signalé par plusieurs auteurs comme un composant antifongique s'est avéré être aussi un composant stimulateur de la germination des spores. Wilson et al ., (1987), indiquent que le limonène a favorisé la germination des spores de *Botrytis cinerea*.

Pour le *Penicillium sp*, les pourcentages d'inhibition de la germination des spores fluctuent entre 3 % et 91,45 %. Le pourcentage le plus important (91.45 %) a été enregistré avec le limonène à la concentration de 0.5  $\mu\text{l} / \text{ml}$  (Figure 14 : E)

Eckert et Ratnayake, (1994) remarquent que le taux de germination des conidies de *Penicillium digitatum* diminue avec l'accroissement de la concentration du limonène et  $\alpha$  – pinène dans le milieu de culture.

### **3.3. Conclusion partielle**

Les composants volatils testés à savoir le limonène, citral,  $\alpha$  – pinène et le  $\beta$ - pinène ont présenté un pouvoir inhibiteur important, mais de moindre effet par rapport à celui exprimé par les huiles essentielles. Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne obtenu pour les quatre composés n'excède pas 50 %. Il est inférieur à celui enregistré avec les huiles essentielles de *Citrus sinensis*, *Citrus limon*, *Citrus aurantium* et *Citrus reticulata*. Le citral et le limonène enregistrent les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne les plus importants.

Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne augmente avec l'accroissement de la concentration du limonène, citral,  $\alpha$ - pinène et de  $\beta$ - pinène.

*Alternaria alternata* et *Penicillium sp* sont les plus sensibles à l'effet inhibiteur des quatre composants volatils. Le pourcentage d'inhibition de la sporulation (PIs = 95 %) le plus important a été obtenu avec le citral à la concentration de 0.5  $\mu$ l / ml.

Le  $\beta$ - pinène,  $\alpha$  – pinène, citral et le limonène ont réduit la germination des spores de même effet que celui exprimé par les huiles essentielles. L'augmentation de la concentration des composants volatils diminue le taux de la germination des spores à l'exception d'*Alternaria alternata* dont on note l'absence de la dépendance de l'inhibition à la dose.

Les composants volatils testés ont exprimé un fort pouvoir inhibiteur de la germination des spores vis-à-vis d'*Alternaria sp* et de *Fusarium sp*. Nous constatons que l'effet inhibiteur du composant est plus efficace en phase de reproduction qu'en phase végétative du champignon.

## **4. Activité antifongique des huiles essentielles vis-à-vis d'*Alternaria alternata* in-vivo**

### **4.1. Matériel et Méthodes**

#### **4.1.1. Matériel végétal**

Des tubercules de pomme de terre (*Solanum tuberosum*) de la variété Spunta ont été plantés, un tubercule par pot, sous serre dans des pots contenant 1/3 de terreau et 2/3 de la terre d'argile. Les pots ont été remplis au taux de 5 kg / pot. L'arrosage est réalisé à l'aide d'une solution nutritive de Knop réduite au 1/4. Des folioles de pomme de terre sont prélevées 30 à 40 jours après la levée pour être utilisées dans l'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles.

#### **4.1.2. Matériel fongique**

L'espèce *Alternaria alternata* précédemment utilisée dans les tests d'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles *in vitro* et maintenue sur milieu PDA à  $22 \pm 2$  °C ; elle a été utilisée pour l'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles *in vivo*.

#### **4.1.3. Les huiles essentielles**

Des échantillons d'huiles essentielles extraites par hydrodistillation à partir des feuilles de *Citrus sinensis*, *Citrus aurantium*, *Citrus limon* et *Citrus reticulata* (protocole déjà décrit en chapitre I) ont été utilisées pour l'activité antifongique *in vivo*.

#### **4.1.4. Étude de l'activité antifongique des huiles essentielles *in vivo***

##### **4.1.4.1. Activité antifongique sur foliole de pomme de terre en survie**

L'effet inhibiteur de l'huile essentielle est testé vis-à-vis d'*Alternaria alternata* agent responsable de l'alternariose de pomme de terre. Les paramètres d'évaluation pris en considération sont la notation de l'apparition des taches sur folioles de pomme de terre en survie. L'expression des résultats se fait par le calcul de l'indice de sévérité de la maladie (IS).

L'évaluation du potentiel antifongique de l'huile essentielle *in vivo* a été déterminée par contact direct et a été testée en utilisant trois traitements d'application à savoir préventif, en simultané et curatif.

Après une désinfection superficielle suivie de plusieurs rinçages à l'eau distillée, les folioles sont placées dans des boîtes de Pétri sur l'eau gélose (4%) afin d'assurer une humidité saturante tout au long de l'essai. L'inoculation des folioles a été faite à l'aide de 20 µl d'une suspension sporale ( $10^5$  spores/ml) répartie en six points. Selon Benabderrahmane et *al.* (2009), la dilution de l'huile essentielle a été faite dans l'éthanol (10 µl /ml éthanol) pour préparer des solutions aux différentes concentrations (1, 0,5, 0.25, 0.125 et 0.0625 mg/ml).

Pour les tests préventifs, l'huile essentielle est utilisée 24 h avant l'inoculation des folioles par la suspension sporale ; pour le test en simultané, l'huile essentielle est apportée 5 min après l'inoculation par la suspension sporale et pour les tests curatifs, elle est utilisée 24 h après l'inoculation ;

L'huile essentielle est ajoutée directement (contact directe) au milieu de culture afin de permettre une bonne adhérence de l'huile avec la totalité de la surface foliaire et réduire le risque d'évaporation (Feng et *al.*, 2011) .

Des témoins sans huiles essentielles (temoin négative et positive) pour chaque essai ont été préparés de la même manière que les traitements. Ces folioles sont incubées à l'obscurité pendant 48 heures et ensuite placées à la lumière dans les conditions ambiantes du laboratoire (El abdellaoui et *al.*, 2005). Chaque essai est répété trois fois. La notation de sévérité de la maladie est calculée en se référant à la surface foliaire et estimée d'après l'échelle de notation de Notteghem et *al.* (1980). Cet indice de sévérité est calculé selon la formule :

$$IS = (\sum X_i n_i / 9Nt) * 100$$

IS: indice de sévérité de la maladie.

$X_i$ : sévérité de la maladie.

$n_i$ : nombre de folioles présentant la sévérité de la maladie.

Nt: nombre total des folioles

9 : note-la plus élevée de l'échelle

#### **4.1.4.2. Activité antifongique sur tubercules de pomme de terre**

Des tubercules de pomme de terre (*Solanum tuberosum*) de la variété Spunta ont été lavés, désinfectés par une solution d'hypochlorite de sodium (0.1 %) pendant deux minutes, rincés trois fois à l'eau distillée stérile et séchés entre deux papiers buvards stériles. Des blessures de 1 à 2 mm de profondeur et en nombre de douze par tubercule ont été faites artificiellement par un scalpel stérile à la surface du tubercule. L'inoculation des tubercules est faite par un trempage dans un bain d'inoculum (Entsar & Badawy, 2012).

L'inoculum est obtenu par raclage de la surface d'une culture d'*Alternaria alternata* âgée de dix jours à l'aide d'un scalpel stérile. Le mycélium est ensuite mis en suspension dans l'eau distillée stérile, puis une agitation est réalisée pendant une minute au vortex, la suspension résultante est filtrée à travers de la gaze pour séparer les conidies des fragments mycéliens. Après 24h de ressuyage, les tubercules sont stockés à  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  dans l'étuve.

Pour étudier la persistance du pouvoir inhibiteur de l'huile essentielle, deux traitements d'application ont été adoptés. Dans le premier traitement (test en simultané), on trempe les tubercules blessés dans la solution de l'huile essentielle de concentration de 1mg/ml diluée dans l'éthanol pendant cinq minutes suivi d'un autre trempage dans l'inoculum pendant 3 minutes. Pour le deuxième traitement (test préventif), les tubercules blessés ont subi un trempage préalable dans la solution de l'huile essentielle pendant cinq minutes, 24 heures avant leur trempage dans l'inoculum, pendant 3 minutes (Plooy et al., 2009).

Des témoins sans huiles essentielles pour chaque essai ont été préparés de la même manière que les traitements. Les tubercules inoculés sont incubés dans l'étuve à  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . Après quinze jours d'incubation, on les fait ressortir pour être conservés dans les conditions ambiantes du laboratoire pendant deux mois (Entsar & Badawy, 2012). Les essais conduits ont été répétés trois fois.

L'expression des résultats est faite par le calcul de l'indice de maladie calculé selon la formule :

$$\text{IM} = (\text{N}/12) * 100$$

IM : indice de maladie

N : nombre des blessures infectées

12 : nombre total des blessures d'un tubercule

#### **4.1.5. Traitement statistique**

Chaque expérience a été réalisée en triple et des valeurs moyennes ont été calculées. L'analyse statistique a été effectuée en utilisant ANOVA et les différences entre les valeurs des moyennes ont été déterminées selon le test LSD de Fisher ( $P < 0,05$ ).

### **4.2. Résultats et Discussion**

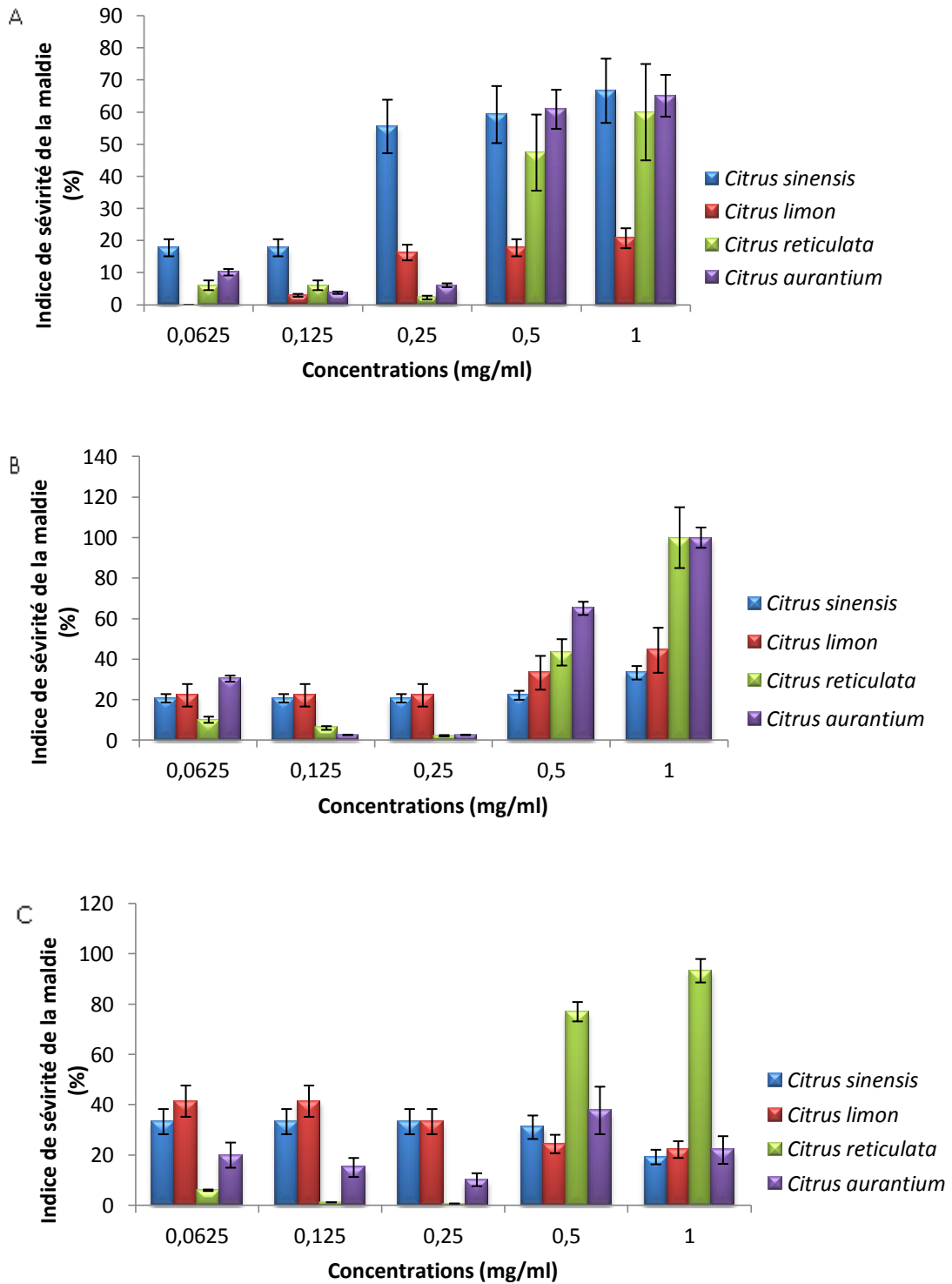
#### **4.2.1. Activité antifongique sur foliole de pomme de terre en survie**

La virulence d'*Alternaria alternata* a été confirmée par la présence de taches typiques sur les folioles du témoin. La figure 15 montre les résultats de l'effet des différentes concentrations des huiles essentielles de *Citrus sinensis*, *Citrus aurantium*, *Citrus limon* et *Citrus reticulata* sur l'indice de sévérité de la maladie (IS). Trois traitements sont réalisés à savoir préventif, en simultané et curatif. L'évolution de l'indice de sévérité de la maladie est similaire dans les trois traitements soit le préventif (Figure 15 : A), en simultané (Figure 15 : B) et curatif (Figure 15 :C).

Néanmoins les indices de sévérité de la maladie les plus faibles ont été enregistrés avec le traitement préventif pour l'huile essentielle de *Citrus limon* (IS = 0 %). Mohammadi et al, (2015) rapportent l'effet des huiles essentielles sur la diminution de l'indice de sévérité de maladie. Messego –Moumene et al,(2015) signalent l'effet des huiles essentielles des citruses dans la diminution de l'apparition des symptômes de mildiou (taches et les nécroses) sur folioles de pomme de terre.

La réduction de l'apparition des taches nécrotiques dans le traitement préventif peut être attribuée au temps de contact de l'huile essentielle (24 h avant l'infection) avec la foliole, ce qui favorise l'augmentation de la résistance de la plante vis-à-vis d'*Alternaria alternata* (Annexe 4)

Plusieurs études mentionnent la contribution des huiles essentielles dans l'augmentation de la résistance des plantes vis-à-vis des agressions externes et fournissent une stratégie importante de la défense des plantes, en particulier contre les insectes parasites des herbivores et les champignons phytopathogènes (Langenheim, 1994 ; Dayan et al., 2009). Elles agissent comme des signaux moléculaires et illustrent les liens évolutifs avec leurs rôles fonctionnels Theis et Lerda, 2003).



**Figure 15.** Effet des concentrations des huiles essentielles sur l'indice de sévérité de la maladie (sur foliole).

Les données sont des moyennes  $\pm$  écarts-types (barres d'erreur). À : préventif B : simultané et C : curatif. Les données sont des moyennes  $\pm$  écarts-types (barres d'erreur).

Il est à noter aussi que seule l'huile essentielle de *Citrus reticulata* qui a montré un effet de concentration significative ( $P < 0,05$ ). Les concentrations de 0.0625, 0.125 et 0.25 mg/ml engendrent des indices de sévérité de maladie les plus faibles (0.71 % à 6.08 %) pour les traitements préventif (Figure 15 : A) et curatif (Figure 15 : C). Elles présentent un effet inhibiteur significatif ( $P < 0.05$ ) sur l'apparition des symptômes de la maladie.

Messego –Moumene et al,(2015) indiquent que le taux d'infection varie selon l'huile essentielle de citrus testé et la concentration ; ils attribuent l'augmentation du développement du champignon à la diminution de la concentration des huiles essentielles .

Feng et Zheng (2007) remarquent que le développement d'*Alternaria alternata* a été inhibé par les fortes concentrations en huile essentielle de *Cinnamomum aromaticum in vivo* chez la tomate. Tian et al .,(2011) obtiennent une réduction du développement d'*Alternaria alternata* de 83.3 % sur tomates cerises traitées avec l'huile essentielle d'*Anethum graveolens L.*

Les concentrations de 0.5 et 1 mg/ml en huiles essentielles de *Citrus aurantium* et *Citrus reticulata* entraînent l'apparition des signes de phytotoxicité avec des indices de sévérité de maladie très élevés (IS = 100 %) pour les traitements simultanés (Figure 14 B) et curatif (Figure 15 : C). Les folioles présentent des surfaces foliaires translucides de couleur jaune-marron à brun foncé. Cet état accentue la croissance mycélienne d'*Alternaria alternata*. Des signes de phytotoxicité sur feuillage provoqués par l'augmentation de la concentration en huiles essentielles ont été rapportés par Hanana et al, (2014) .

Les huiles essentielles de *Citrus sinensis*, *Citrus aurantium*, *Citrus limon* et *Citrus reticulata* révèlent un pouvoir inhibiteur moindre que celui observé *in vitro*. Ceci peut être expliqué par l'influence du végétal hôte sur le comportement d'*Alternaria alternata*.

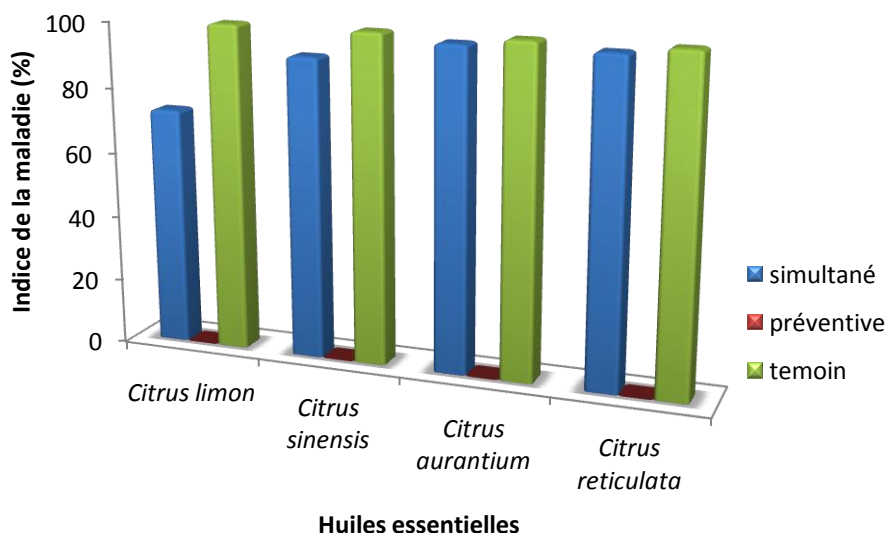
Farbood et al. (1976), attribuent cet état aux conditions nutritives et à l'humidité qui sont meilleures que celles présentes dans les milieux de culture, menant à une croissance plus facile du champignon. À cet effet Tian et al . (2011) suggèrent l'augmentation des concentrations en huiles essentielles dans les conditions *in vivo* plus que celles appliquées *in vitro*.



#### 4.2.2. Activité antifongique sur tubercules de pomme de terre

Les résultats obtenus illustrent l'effet inhibiteur des huiles essentielles dans le traitement préventif en comparaison avec le témoin ; on enregistre des indices de la maladie de l'ordre de 0 % pour les huiles essentielles de *Citrus sinensis*, *Citrus aurantium*, *Citrus limon* et *Citrus reticulata* (Figure 16).

Les tubercules de pomme de terre préservent leurs formes, leurs fermetés et aucun changement n'est observé durant les deux mois de conservation. Elshafie et *al*,(2015) notent la possibilité d'application des huiles essentielles comme agents de biocontrol dans la conservation des aliments. Jhalegar et *al*,(2015) rapportent l'influence positive des huiles essentielles sur le processus de respiration ; ce qui pourrait aider à maintenir la qualité des fruits et prolonger la durée de conservation .



**Figure 16.** Effet du traitement des huiles essentielles de *Citrus* sur l'indice de la maladie (sur tubercule de pomme de terre).

En revanche, cet effet inhibiteur disparaît quand les huiles essentielles sont employées dans le traitement en simultané (Figure 16). On enregistre des indices de la maladie supérieurs à 80%. Des changements dans la forme et la fermeté, accompagnés par l'apparition de prolifération mycélienne au niveau des zones de blessures ont été observés.

Plooy et al .,(2009) en testant deux traitements préventif et curatif , ils remarquent que l'application de l'huile essentielle de *Lippia scaberrima* de manière préventive réduit considérablement le pourcentage des fruits de citrus malades inoculés de *Penicillium digitatum* par comparaison au témoin . Kohli et al. (1998) rapportent que l'activité inhibitrice des huiles essentielles augmente avec la durée d'exposition à celles ci.

### **4.3. Conclusion partielle**

Les résultats de l'effet des huiles essentielles des citrus sur le développement d'*Alternaria alternata* sur foliole de pomme de terre inoculée révèlent que l'huile essentielle de *Citrus limon* expose un fort pouvoir inhibiteur. Les indices de sévérité de la maladie les plus faibles ont été enregistrés avec le traitement préventif. Les concentrations de 0.0625, 0.125 et 0.25 mg/ml engendrent des indices de sévérité de la maladie les plus faibles pour l'ensemble des espèces de citrus.

Pour l'effet des huiles essentielles sur le développement d'*Alternaria alternata* sur tubercule de pomme de terre inoculé, les résultats obtenus dans le traitement préventif enregistrent des indices de maladie de l'ordre de 0 % pour les huiles essentielles des *Citrus* testés.

Effectivement aujourd'hui, un intérêt considérable s'est développé pour la conservation des aliments par l'utilisation des huiles essentielles dont l'effet se prononce sur le ralentissement de la croissance et la limitation de la production des mycotoxines Smith et al.,2005 ; Omidbeygi et al.,2007)

# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Les résultats obtenus lors de cette étude consolident une investigation scientifique importante à savoir, l'utilisation des plantes comme source alternative naturelle aux produits de synthèse.

L'étude de la caractérisation nous a permis de déterminer les propriétés physiques et chimiques des huiles essentielles de *Citrus sinensis*, *Citrus aurantium*, *Citrus limon* et de *Citrus reticulata*. Il en ressort que les rendements obtenus oscillent entre 0.51 % et 1.02 %.

Les huiles essentielles analysées présentent une densité allant de 0.855 à 0.863, un indice de réfraction de 1.475 à 1.477, un indice d'ester de 1.15 à 2.24 et un indice d'acide de 12.25 à 12.34. Pour le pouvoir rotatoire, on constate que les huiles essentielles des citrus sont toutes dextrogyres.

Quant à la caractérisation moléculaire, l'étude nous a permis d'une part d'enregistrer de forts pourcentages en monoterpènes hydrocarbonés (61.41 – 73.64 %), à l'exception de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* qui a un fort pourcentage en monoterpènes oxygénés (71.85 %) et d'autre part d'identifier le D-limonène (7.18 % - 36.10 %), le  $\beta$ -pinène (4.35 % - 30 %) et l' $\alpha$ -pinène (2.04 % - 4.36 %) comme composants majoritaires des huiles essentielles testées.

Pour l'activité antifongique *in vitro* des huiles essentielles, les résultats obtenus mentionnent le grand pouvoir inhibiteur de l'huile essentielle de *Citrus limon* sur la croissance mycélienne, la production et la germination des spores de *Fusarium oxysporum f.sp albedinis*, *Fusarium sp*, *Alternaria alternata*, *Alternaria sp* et de *Penicillium sp*.

Les composants volatils testés à savoir le limonène, le citral, l' $\alpha$  – pinène et le  $\beta$ -pinène ont présenté un pouvoir inhibiteur important mais de moindre effet par rapport à celui exprimé par les huiles essentielles *in vitro*. Le citral et le limonène enregistrent les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne les plus importants.

Les espèces d'*Alternaria alternata* et de *Penicillium sp* sont les plus sensibles à l'effet inhibiteur des quatre composants volatils pour la production de spores (PIs = 95 %).

## Conclusion et perspectives

---

Le  $\beta$ - pinène, l' $\alpha$ - pinène, le citral et le limonène ont réduit la germination des spores de même effet que celui exprimé par les huiles essentielles avec les cinq espèces fongiques. Le pourcentage d'inhibition de la germination des spores (91.45 %) le plus important a été enregistré avec le limonène vis-à-vis du *Penicillium sp* à la concentration de 0.5  $\mu$ l / ml. L'effet inhibiteur du composant est plus efficace en phase de reproduction qu'en phase végétative du champignon.

Les résultats de l'effet des huiles essentielles des citrus sur le développement d'*Alternaria alternata in vivo*, en traitement préventif, sur folioles de pomme de terre, montrent que l'huile essentielle de *Citrus limon* expose un fort pouvoir inhibiteur (IS= 0%) de l'apparition des symptômes de la maladie.

L'ensemble des résultats obtenus *in vitro* montrent le grand pouvoir inhibiteur des huiles essentielles de *Citrus sinensis*, *Citrus aurantium*, *Citrus limon* et de *Citrus reticulata* vis-à-vis des cinq champignons phytopathogènes. De plus les données obtenues *in vivo* suggèrent leurs utilisations dans la conservation de la pomme de terre et des aliments.

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 :

- L'étude des facteurs influençant la composition chimique des huiles essentielles à savoir, les facteurs environnementaux (la localisation géographique, le climat, la saison de collecte, les conditions de plantation et le milieu), les facteurs propres à la plante (le génotype, l'organe de prélèvement et les stades phénologiques) et les conditions de conservation des huiles essentielles (température et durée de stockage).
- La prise en considération des conditions affectant le cycle de vie du champignon (température, pH, humidité et milieu de culture).
- L'étude de l'effet des composants mineurs et les associations entre les différents composants des huiles essentielles.
- L'étude de l'activité antifongique *in vitro* des huiles essentielles en fractions.
- Des essais sur des plantes entières en serre, dans les champs et rechercher d'autres possibilités de formulation des huiles essentielles (fumigation et pulvérisation)

## Références bibliographiques

**A**

- AbdelKader M.M., El-Mougy N.S ., El-Gamal N. G., El-Mohamdy R. S & Fatouh Y.O. (2012).** *In Vitro* assay of some plant resistance inducers, essential Oils and plant extracts on antagonistic ability of fungal bio-agents. *Journal of Applied Sciences Research*, 8: 1383- 1391.
- Abbaszadeh S., Sharifzadeh A., Shokri H.,, Khosravi A.R & Abbaszadeh A.(2014).** Antifungal efficacy of thymol, carvacrol,eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal de Mycologie Médicale* , 24 : 51-56
- Adams S., Kunz B., & Weidenbörner M. (1996).** Mycelial deformations of *Cladosporium herbarum* due to the application of eugenol and carvacrol. *Journal Essent Oil Research*, 8: 535-540.
- Adams R.P.(2001).** *Identification of Essential Oil Components by Gaz Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy*. USA: Carol Stream, IL., Allured Publishing Co .
- AFNOR . (1982).** Recueil des normes françaises des huiles essentielles, Association française de normalisation (AFNOR), Paris 180p
- Aghaei K, Hadian J, Kanani M. R, Beyranvand S & Yousefzadi M. (2014).** Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Satureja macrosiphonia Bornm.*, from Iran, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17:1, 95-103,
- Akthar M.S., Degaga B. & Azam T. (2014).** Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research*. 2,1:001-007
- Alavni K, Xin QI, Tester F. & Snape Colin E. (2011).** Physico-chemical properties of potato starches. *Food Chemistry* :125,3: 958 - 965.
- AliGiannis N., Kalpoutzakis E., Chinou I.B., Mitakou S., Gikas E.& Tsbopoulos A. (2001).**Composition and antibacterial activity of the essential oils of five taxa of *Sideritis* from Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 811–815.

- Alizadeh A., Khoshkhui M., Javidnia K., Firuzi O., Tafazoli E. & Khalighi A (2010).** Effects of fertilizer on yield, essential oil composition, total phenolic content and antioxidant activity in *Satureja hortensis* L. (Lamiaceae) cultivated in Iran. *Journal of Medicinal Plants Research* , 4,1: 033-040
- Alma M. H., Nitz S., Kollmannsberger H., Digrak M., Efe F. T. & Yilmaz N. (2004).** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from the gum of Turkish Pistachio (*Pistacia vera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 12, 3911–3914.
- Amiri A., Dugas R., Pichot A.L & Bompeix G. (2008).** *In vitro* and *in vitro* activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 126 : 13–19.
- Angioni A., Barra A., Coroneo V., Dessi S. & Cabras P. (2006).** Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 4364–4370.
- Aoudou Y., Léopold T. N., Pierre Michel J. D., Xavier F.E. & Moses M. C .(2010).** Antifungal properties of essential oils and some constituents to reduce foodborne pathogen. *Journal of Yeast and Fungal Research*, 1, 1: 001–008
- Aouni M., Pelen F.& Soulimani R. (2013).** Étude de l'activité antimicrobienne d'un mélange de 41 huiles essentielles et domaines d'application, *phytotérapie*. 11 ,4, 225 -236
- Arab K.,Bouchenak O.& Yahiaoui K .(2014).** Etude phytochimique et evaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle et des composés phenoliques du Pistachier lentisque (*Pistacia lentiscus* L.). *Journal of fundamental and Applied science*. 6 ,1 , 79 – 93
- Ash G.J (2010).** The science, art and business of successful bioherbicides , Review . *Biological Control*, 52 : 230–240



**B**

- Baaliouamer, A. & Meklati, B.Y. (1986).** Analysis of bitter orange petitgrain essential oil by combined gas chromatography-mass spectrometry. *Agricultural and biological chemistry*, 50,8: 2111-2114.
- Baaliouamer A. (1987).** Analyse qualitative et semi-quantitative d'huiles essentielles de Citrus provenant de la station expérimentale d'Arboriculture de Boufarik". Thèse de doctorat, Univ d'Alger.
- Baaliouamer A. & Meklati, B.Y. (1988).** Analysis of leaf oils from four varieties of sweet orange by combined gas chromatography-mass spectrometry. *Flavour and Fragrance Journal*, 3: 47-52.
- Baaliouamer A., Meklai B.Y., Frisse D.& Scharff C. (1992).** The chemical composition of some cold-pressed citrus oils produced in Algeria. *Journal of Essential Oil Research*. 4,3 : 251-258
- Bagamboula C.F., Uyttendaele M.& 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 Microbiol.*, 21: 33- 42.
- Bajpai V.K., Sharma, A. & 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*. 32:582-90.
- Bajwa R, Shafique S, Anjum T. & Shafique S. (2004).** Antifungal activity of allelopathic plant extracts IV: growth response of *Drechslera hawaiiensis*, *Alternaria alternata* and *Fusarium moniliforme* to aqueous extract of *Parthenium hysterophorus*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 6 :511–516.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. & Idaomar M.(2008).** Biological effects of essential oils – A. review. *Food and Chemical Toxicology* 46: 446–475.
- Barbosa cavalcante M.J. (2009).** Imagerie cellulaire de l'interaction *Musa acuminata* - *Mycosphaerella fijiensis*. Biologie Intégrative des Plantes. Thèse de doctorat. Univ Montpellier .
- Bauer K., Garbe D.,& Surburg H. (2001).** *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses*. Ed Wiley-VCH, Weinheim, 293 p.
- Baser K.H.C & Buchbauer G. (2010).** *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. Ed Taylor & Francis Group .994 p

- Bellabas A, (2011).** Rapport de mission Etude de base sur les Agrumes en Algérie. Projet GTFS/REM/070/ITA- « Programme régional de gestion intégrée des Ravageurs pour le Proche-Orient ». Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture.
- Belletti N., Ndagijimana M., Sisto C., Guerzoni M.E., Lanciotti R., Gardini F.& (2004).**Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essence on *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 6932–6938.
- Belletti N., Sado Kamdem S., Patrignani F., Lanciotti R., Covelli A. & Gardini F. (2007).**Antimicrobial activity of aroma compounds against *Saccharomyces cerevisiae* and improvement of microbiological stability of soft drinks as assessed by logistic regression. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5580–5586.
- Belletti N., Lanciotti R., Patrignani F.& Gardini F. (2008).** Antimicrobial efficacy of citron essential oil on spoilage and pathogenic microorganisms in fruit based salads. *Journal of Food Science*, 73:331–338.
- Belletti N., Kamdem S. S., Tabanelli G.,Lanciotti R. & Gardini F. ( 2010).** Modeling of Combined Effects of Citral, Linalool and  $\beta$ -Pinene Used against *Saccharomyces cerevisiae* in Citrus-Based Beverages Subjected to a Mild Heat Treatment,” *International Journal of Food Microbiology*, 136, 3: 283-289.
- Benabderrahmane M ., Benali M., Aouissat H .& Jordn Bueso M. J .(2009)** Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Pistacia atlantica* Desf. de l'Algérie *Phytothérapie* 7: 304–308
- Benini C. (2014).** Variabilité morphologique, génétique et chimique de *Cananga odorata* [Lam.] Hook.f. & Thoms. En vue de l'amélioration qualitative de la production de l'huile essentielle d'ylang-ylang dans les îles de l'Océan Indien. Thèse de doctorat. Univ de Liège. Belgique.
- Betts T.J. (2001).** Chemical characterisation of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases. *Journal of Chromatography a* ,936: 33–46.
- Bezic N., Skocibusic M. & Dunkic V. (2005).** Phytochemical composition and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. and *Satureja cuneifolia* Ten. essential oils. *Acta Botanica Croatica*. 64,2 :313–322.

- Bounaga N & Djerbi M. (1990)** . Pathologie du palmier dattier in Les systèmes agricoles oasiens Dollé V. ( Ed. ) , Toutain G. ( Ed. ) . Montpellier : *CIHEAM Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Mediterranean*. 11 : 127-132
- Boussaada O. & Chemli R. (2006)**. Chemical Composition of Essential Oils from Flowers, Leaves and Peel of *Citrus aurantium* L. var. amara from Tunisia, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 9,2: 133-139,
- Boussaada O.& 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.
- Boyras N.& Ozcan M. (2006)**. Inhibition of phytopathogenic fungi by essential oil, hydrosol, ground material and extract of summer savory (*Satureja hortensis* L.) growing wild in Turkey. *International Journal of Food Microbiology*, 107: 238 - 242.
- Biondi D., Cianci P., Geraci C., Ruberto G. & Piattelli, M. (1993)**. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from sicilian aromatic plants. *Flavour fragrance Journal*. 8: 331–337.
- Burt S. (2004)**. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review *International Journal of Food Microbiology*. 94: 223– 253.
- Brada M., Bezzina M ., Marlier M., Carlier A.& Lognay G. (2007)**. Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* du Nord de l'Algérie. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. 1 :3-7.
- Breitmaier E. (2006)**. *Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones*, Ed Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. 197p
- Broydé H & Doré T. (2013)**. Effets des pratiques agricoles sur la contamination des denrées par les mycotoxines issues de *Fusarium* et *Aspergillus spp.* *Cahier Agriculture* .22 : 182-94.

## C

- Caccioni D. R.L., Guizzardi M ., Biondi D .M., Renda A, & Ruberto, G. (1998)**. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Microbiology* ,43 :73–79.

- Calmes B, (2011).** Reponses adaptatives d'*Alternaria brassicicola* au stress oxydatif lors de l'interaction avec les brassicacees rôle du métabolisme du mannitol et des glutathion-s-transférases. Thèse de doctorat. Univ d'Angers.
- Canillac N.&Mourey A. (2001).** Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiology* 18: 261–268.
- Carson C.F., Mee B.J.& Riley T.V. (2002).** Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*.46: 1914–1920.
- Carson C.F& Riley T.V., (1995).** Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Malaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Bacteriology*.78, 3 : 264-269.
- Chalchat J.C, Garry P.R., Menut C., Lamaty G., Malhuret R., & Chopineau J.(1997).** Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African Essential Oils. *Journal of Essential Oil Research*,9: 67-75.
- Chang H.T ., Cheng , Y.H ., Wu , C.L ., Chang , S.T ., Chang , T.T .& Chang Su. Y. (2008).** Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. formosana Florin leaf against plant pathogenic fungi. *Bioresource technology*. 99, 14: 6266-6270
- Cheng Y.S.& Lee C.S (1981).** Composition of leaf essential oils from ten Citrus species. Proceedings of the *National Science Council*.5: 278- 283.
- Chitarra G.S. (2003) .** Germination inhibitors of fungal spores: identification and mode of action., PhD thesis, Univ Wageningen, The Netherlands
- Choi-Hyang S. (2004).** Volatile constituents of Satsumam growing in Korea. *Flavour fragrance Journal*. 19,5: 406-412.
- Chu C.L., Liu W.T., Zhou T. & Tsao R. (1999).** Control of post harvest gray mold rot of modified atmosphere packaged sweet cherries by fumigation with thymol and acetic acid. *Canadien. Journal. Plant Science*. 79: 685–689.
- Chutia M., Deka Bhuyan P., Pathak M.G., Sarma T.C.& Boruah P. (2009).** Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *Food Science and Technology* 42 : 777–780.
- Clark S.F. (2002).** The biochemistry of antioxidants revisited. *Nutral Clinical Practice*. 17: 5–17.

- Combrinck S. , Regnier T & Kamatou G.P.P. (2010).** *In vitro* activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. *Industrial Crops and Products*. 33,2 :344-349
- Connolly J.D.& Hill R.A. (2005).** Triterpenoids. *Natural Product Reports*. 22 :487–503.
- Conseil de l'Europe and Pharmacopée Européenne 1. (1996).** Maisonneuve S.A. Editions, Sainte Ruffine 150p
- Couderc V. L. (2001).** Toxicité des huiles essentielles. Thèse de doctorat. Univ. Toulouse.
- Couladis M., Chinou I.B., Tzakou O.& Petrakis P.V. (2003).** Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hypericum rumeliacum subsp. apollinis* (Boiss. & Heldr.). *Phytotherapy Research*. 17 : 152–154.
- Couic-Marinier F. & Lobstein A. (2013).** Composition chimique des huiles essentielles. *Actualités Pharmaceutiques*. 52, 525 : 22–25
- Corbaz R, (1990).** Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes .Ed presses polytechniques et universitaires romandes. Suisse 275 p
- Cosic J., Vrandecic K., Postic J., Jurkovic D. & Ravlic M.(2010).** *In vitro* antifungal activity of essential oils on growth of phytopathogenic fungi. *Poljoprivreda*, 16: 25-8.
- Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R. & Wyllie S.G. (2000).** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* ,88 : 170–175.
- Croteau R., Kutchan T.M.& Lewis N.G. (2000).** Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Chapitre 24 :1250-1318

## D

- Dayan F.E ., Cantrell C.L. & Duke.S.O. (2009).** Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* ,17: 4022–4034.
- Deba F., Xuan T.D., Yasuda M. & Tawata S. (2007).** Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa*. *Food Control*, 19, 346–352.

- Degenhardt J., Köllner T.G. & Gershenzon, J. (2009).** Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants, *Phytochemistry* 70 : 1621–1637.
- Deguine J P .& Ferron P .( 2006).** Protection des cultures, préservation de la biodiversité, respect de l'environnement. *Cahiers Agricultures*, 15, 3 : 307-311
- Delespaul D., De Billerbeck V.G., Roques C.G., Michel G., Marquier-Vinuales, C. & 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.& Proctor R.H. (2007).** Molecular biology of Fusarium mycotoxins. Int. *Journal of Food Microbiology*, 119, 47–50.
- Desjardins A.E. (2006).** *Fusarium Mycotoxins. Chemistry, Genetics and Biology.* Ed .APS Press, St. Pau. 260p
- Dihazi A., Jaiti F., Taktak W., Kilani-Feki O., Jaouaf S., Driouichd A., Baaziz M., Daayf F., Serghini M.A. (2012).** Use of two bacteria for biological control of bayoud disease caused by *Fusarium oxysporum* in date palm (*Phoenix dactylifera* L) seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 55 : 7-15
- Dugo G .& Di Giacomo A. (2004).** *Citrus : the Genus citrus.* 2 Ed Taylor and Francis London. 642 p.
- E**
- Eckert J.W. & Ratnayake M. (1994).** Role of volatile compounds from wounded Orange in induction of germination of *Penicellium digitatum* condia. *Phytopathology*, 84 ,7: 746 -750
- Edris A.E. & Abd EI-Galeel M.A.S .( 2010).** Solubilization of some flavor and fragrance oils in surfactant/water system. *World Applied Sciences journal* 8 ,1 : 86 -91
- EL Abdellaoui F., Ouazzani Touhami A., Badoc A.& Douira A. (2005).** Culture *in vitro* de deux isolats de *Curvularia tuberculata* et pouvoir pathogène sur six cultivars de riz. *Bulltin Société de Pharmacie de Bordeaux*, 144 : 7-26
- EL Ajjouri M ., Farah A. , Aafi A., Aarab A. , Amarfi F ., Chanmi M., Ismaili R., Rahouti M. & Satrani B. (2010).** Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. Contre les champignons de pourriture du bois, *Acta Botanica Gallica: Botany Letters*, 157,2 ; 285-294,

- El haib A. (2011).** Valorisation de terpenes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques. Thèse doctorat. Univ.Toulouse. 195 p
- Elshafie H.S., Mancini E., Camele I., De Martino L & De Feo V.(2015).** *In vivo* antifungal activity of two essential oils from Mediterranean plants against postharvest brown rot disease of peach fruit. *Industrial Crops and Products*, 66 :11-15
- Ennajdaoui H. (2009).** Analyse fonctionnelle du promoteur de la cembrene-triène-diol-synthase spécifique des trichomes de *Nicotiana sylvestris*. Thèse de doctorat. Univ Grenoble I. 140p.
- Entsar I. R. & Badawy M. E.I.(2012).** Inhibitory effects on microbial growth of *Botrytis cinerea* and *Erwinia carotovora* on potato using of a biopolymer chitosan at different molecular weights, *Archives of Phytopathology and Plant Protection* , 45,16: 1939-1949
- Espina L., Somolinos M., Lorán S., Conchello P., Garcia D.,& Pagan R. ( 2011).** Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Annual Review of Phytopatology*, 23 : 173–199.
- F**
- Fadel H. (1991).**Comparative studies on leaf oils of Egyptian Citrus varieties, *Food Chemistry Journal Islamic Academy of Sciences*, 4.3 : 196-199.
- Farbood M. L., MacNeil J. H. &Ostovar K. (1976).** Effect of rosemary spice extract on growth of microorganisms in meats. *Journal of Milk and Food Technology*, 39: 675-679.
- Farhat A .,Tixier ASF., El Maataoui M , Maingonnat JF, Romdhane M. & Chemat F (2011).**Microwave steam diffusion for extraction of essential oil from orange peel:Kinetic data, extract's global yield and mechanism, *Food Chemistry*,125 ,1: 255-261.
- 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
- Feng W. & Zheng X. (2007).** Essential oils to control *Alternaria Alternata* *in vitro* and *in vivo* .*Food Control*, 18 : 1126–1130.



- Feng W., Chen J., Zheng X & Liu Q.(2011).** Thyme oil to control *Alternaria Alternata* in vitro and in vivo as fumigant and contact treatments .Food Control, 22 : 78-81
- Fletcher J., Bender C., Budowle B., Cobb W.T., Gold S.E., Ishimaru C.A., Luster D., et al (2006).** Plant pathogen forensics: capabilities, needs, and recommendations. *Microbiology. Molecule. Biology. Revue.* 70: 450–471.
- Field B., Jordan F.& Osbourn A., (2006).** First encounters – deployment of defense-related natural products by plants. *New Phytologist*, 172, 2: 193–207.
- Filtenborg O., Frisvad J. C. & Thrane U. (1996).** Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 85–102.
- Filipowicz N., Kaminski M., Kurlenda J., Asztemborska M.& Ochocka J.R., (2003).**Antibacterial and antifungal activity of juniper berry oil and its selected components. *Phytotherapy Research*, 17: 227–231.
- Fisher K. & Phillips C. (2008).** Potential antimicrobial use of essential oils in foods: is citrus the answer? *Trends in Food Science and Technology*, 19: 156–164.
- Fisher K. & Phillips C. (2009).** The mechanism of action of a citrus oil blend against *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Journal of Applied Microbiology*, 106: 1343–1349.
- Forstreuter-Kfinstler M .& Ahlert B. (1984).** Hemmung von Mikroorganismen durch Gewürzinhaltstoffe. *Lebens- mittelchem Gerichl Chem*, 38:143-145.
- Fraga B.M. (2006).** Natural sesquiterpenoids. *Natural Product Reports.* 23: 943–972.
- Fries N.,(1973)** Effects of volatile organic compounds on the growth and development of fungi, *Transactions of the British Mycological Society* 60 : 1–21
- French R.C. (1985).** The bio-regulatory action of flavor compounds on fungal spores and other propagules. *Annual Review of Phytopatology.* 23, 173–199.
- Friedman M., P.R. Henika C.E. Levin & Mandrell R. E (2004) .** Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 6042–6048.

## G

- Garcia R., Alves E. S.S., Santos M. P., Viégas Aquije G.M.F., Fernandes A. A. R., Dos Santos R. B., et al (2008).**Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. *Brazilian Journal of Microbiology.* 39 :163-168



- Gazim Z.C., Rodrigues F., Amorin A.C.L., Moraes de Rezende C., marina Sokovic M., Tesevic V., et al (2014).** New Natural diterpene-type abietane from tetradenia riparia essential oil with cytotoxic and antioxidant activities. *Molecules*, 19, 514-524
- Gumus T., Demirci A S., Sagdic O. & Arici M (2010).** Inhibition of Heat Resistant Molds: *Aspergillus fumigatus* and *Paecilomyces variotii* by Some Plant Essential Oils. *Food Science and Biotechnology*, 19, 5: 1241-1244.
- Goetz P ,(2014).** Cédrat: *Citrus medica* L. (Rutacées). *Phytothérapie*.12, 2: 122-124
- Grbic M. L., Stupar M., Vukojević J.& Grubišić D. (2011).** Inhibitory effect of essential oil from *Nepeta rtanjensis* on fungal spore germination. *Central European Journal of Biology* . 6 .4: 583-586.
- Griffin S.G., Markham J.L. & Leach D.N (2000).** An agar dilution method for the determination of the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal. Essential Oil Research*, 12 : 249-255.
- Grover R.K.& Moore J.D. (1962).** Toxicometric studies of fungicides against brown rot organisms *Sclerotinia fructicola* and *S. laxa*. *Phytopathologie*. 52 : 876–880.
- H**
- Hadjiakhoondi A & Baligh N (2005).** Practical guidance of medicinal plants. Tehran: Islamic Azad University Scientific Publication Center, pp. 73-78.
- Hadi S.M., Asad S.F., Singh S.& Ahmad A. (2000).** Putative mechanism for anticancer and apoptosis-inducing properties of plant-derived polyphenolic compounds. *IUBMB Life* 50: 167–171.
- Hajjaj G., Bounihi A., Tajani M., Cherrah Y.& Zellou A.(2014).** *In vivo* analgesic activity of essential oil and Aqueous extract of *Matricaria chamomilla* l. (ASTERACEAE). *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3, 5 : 01-13 .
- Hamilton-kemp T.R., Mccracken C.T. JR., Loughrin J.H., Andersen R.A. & Hildebran ,D.F. (1992).** Effects of some natural volatile compounds on the pathogenic fungi *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea* . *Journal of Chemical Ecology*, 18 , 7 : 1083-1091.
- Hammer K.A., Carson C.F. & Riley T.V. (2003).** Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Journal of Applied Microbiology*, 95: 853 - 860.

- Hamrouni L., Hanana M., Amri I., Romane A., Gargouri S. & Jamoussi B. (2014):** Allelopathic effects of essential oils of *Pinus halepensis* Miller: chemical composition and study of their antifungal and herbicidal activities, *Archives Of Phytopathology And Plant Protection* 48,2:1-14
- Hanana M. , Bejia A., Amri I., Gargouri S., Jamoussi B., Hamrouni L. (2014).** Activités biologiques des huiles essentielles de pins. *Journal of New Sciences* , 4, 3 :18-32.
- Hanson J.R. (2000).** Diterpenoids. *Natural Product Reports*,17 : 165–174.
- Harkati B. (2011) .** Valorisation et identification structurale des Principes actifs de la plante de la famille asteraceae: *Scorzonera undulata*. Thèse de doctorat. Univ constantine. Algérie.
- Hashem M. , Moharam A.M., Zaied A.A., Saleh F.E.M (2010)** Efficacy of essential oils in the control of cumin root rot disease caused by *Fusarium* spp. *Crop Protection* 29 : 1111-1117
- Hellal Z. (2011) .** Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydants de certaines huiles essentielles extraites des citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Thèse de Magister. Univ Constantine. Algérie.
- Hmiri S, Rahouti M, Habib Z, Satrani B, Ghanmi M et EL ajjour M. (2011)** Evaluation du potentiel antifongique des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et D'*Eucalyptus camaldulensis* dans la lutte biologique contre les champignons Responsables de la détérioration des pommes en conservation *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 80:824 - 836
- Hmouni A., Hajlaoui MR.& Mlaiki A. (1996).** Résistance de *Botrytis cinerea* aux benzimidazoles et aux dicarboximides dans les cultures de tomate en Tunisie. *OEPP/EPPO. Bull*,26: 697-705.
- Hili P., Evans C.S. & Veness R.G. (1997).** Antimicrobial action of essential oils: The effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. *Letters in Applied Microbiology*, 24: 269–275.
- Hoet S., Stevigny C., Herent M.F. & Quetin-Leclercq J. (2006).** Antitrypanosomal compounds from leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. *Planta Medica*, 72: 480–482.
- Hong E.J., Na A.J., Choi B.G., Choi C.C., Jeung E.B. (2004).** Antibacterial and antifungal effects of essential oils from coniferous trees. *Biological and Pharmacological Bulletin*, 27:863–866.

**I**

- Inouye S., Takizawa T. & Yamaguchi H. (2001).** Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47:565–573.
- Ipek E., Zeytinoglu H., Okay S., Tuylu B.A., Kurkcuoglu M. & Husnu Can Baser K. (2005).** Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum oil* and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chemistry*, 93: 551–556.
- Ishii H. (2006).** Impact of fungicide resistance in plant pathogens on crop disease control and agricultural environment. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 40 : 205–211.
- Isman M. B. (2000).** Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19 : 603-608.
- Isman M. B., Miresmailli S. & Machial C. (2011).** Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. *Phytochemistry Reviews*, 10 :197-204.

**J**

- Jacquemond C., Curk F. & Heuzet M. (2013).** *Les clémentiniers et autres petits agrumes*. Savoir faire .Ed Quae. France.367 p
- Janssen A. M., Scheffer J. C. & Baerheim Svendsen , A. (1987)** Antimicrobial Activity of Essential Oils: A 1976—1986 Literature Review. Aspects of the Test Methods. *Planta Medica*, 53: 395-398.
- Jhalegar J.M.D ., Sharma R. R. & Singh D. (2015).** In vitro and in vivo activity of essential oils against major postharvest pathogens of Kinnow (*Citrus nobilis* × *C. deliciosa*) mandarin MD. *Journal of Food Science and Technology*, 52,4 :2229–2237
- Jing L., Lei Z., Li L., Xie R., Xi W ., Guan Y., Sumner L W. & Zhou Z. (2014) .** Antifungal of citrus essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62 ,14 :3011 -3033.
- Johnston C.L . (2008).** Identification of *Penicillium* species in the South African litchi export chain. These magister scientiae (microbiology) .Univ Pretoria, South Africa .

**K**

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

- Karatzas A.K., Bennik M.H.J., Smid E.J., Kets E.P.W. (2000).** Combined action of S-carvone and mild heat treatment on *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Applied Microbiology* 89, 296–301.
- Kassi FM., Badou OJ., Tonzibo ZF., Salah Z., Lndge A. & Kone D. (2014).** Action du fongicide naturel NECO contre la cercosporiose noire (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) chez le bananier plantain (AAB) en Côte d’Ivoire. *Journal of Applied Biosciences* ,75: 6183– 6191.
- 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 :21-26.
- Khan I. (2007).** *Citrus* Genetics, Breeding and Biotechnology. Ed CABI. USA.368p
- Khorshidi J., Tabatabaei M. F., Omidbaigi. R., & Sefidkon F . (2009).** Effect of Densities of Planting on Yield and Essential Oil Components of Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill Var. *Soroksary*). *Journal of Agricultural Science* ,1, 1 :152-157.
- Kim MJ., Yang KW., Kim SS., Park SM., Park KJ., Kim KS., Choi YH., Cho KK.& Hyun CG. (2014).** Chemical composition and anti-inflammation activity of essential oils from *Citrus unshiu* flower. *Natural Product Communications* , 9,5:727-730.
- Kuhajek J.M., Jeffers S.N., Slattery M. & Wedge D.E. (2003).** A rapid microbioassay for discovery of novel fungicides for *Phytophthora* spp. *Phytopathology*, 93:46-53.
- Kohli R.K., Batish Daizy R. and Singh H.P. (1998).** Eucalypt oils for the control of Parthenium (*Parthenium hysterophorus* L.) *Crop Protection* , 17 , 2 :119-122.
- Kouassi H.S., Bajji M., Brostaux Y., Zhiri A., Samb A., Lepoivre P.& Jijakli M.H.(2012).** Development and application of a microplate method to evaluate the efficacy of essential oils against *Penicillium italicum* Wehmer, *Penicillium digitatum* Sacc.and *Colletotrichum musea* (Berk. & M.A.Curtis) Arx, three postharvest fungal pathogens of fruits *Biotechnology , Agronomy, Society and Environment*, 16:325-336.
- Kosiak B., Torp M., Skjerve E.& Andersen B. (2004).** Alternaria and Fusarium in Norwegian grains of reduced quality—a matched pair sample study. *International Journal of Food Microbiology*, 93: 51– 62.

**L**

- Langenheim J.H. (1994).** Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology*. 20 : 1223–1280
- Lanier L., Joly P., Bondoux P.& Bellemère A. (1998) .** *Mycologie et pathologie Forestière* , tome I (Mycologie forestière). Ed Masson. Hongrie 487 p
- Laplace J.P. (2006) .** Agriculture et alimentation Réflexions croisées, *Cahiers Agricultures*. 15, 4: 375 -78.
- Lepoivre P. (2003) .** *Phytopathologie: Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte*. Ed. De Boeck Supérieur. 432 p
- Lee H.S. (2007).** Fungicidal property of active component derived from *Acorus gramineus* rhizome against phytopathogenic fungi. *Bioresource Technology*. 98: 1324–1328.
- Leslie J. F.& Summerell B. A. (2006).** *The Fusarium Laboratory manual*. Ed Wiley (Blackwell Publishing: Iowa, USA).388p
- Li S., Hartman G. L., Domier L. L.& Boykin, D.(2008).** Quantification of *Fusarium solani* f. sp. glycines isolates in soybean roots by colony-forming unit assays and real-time quantitative PCR.*Theoretical and Applied Genetics*.117,3 : 343-352
- Lim T.K. (2012).** *Edible Medicinal and non-medicinal plants: volume 5, Fruits*, Ed Springer Netherlands.955p
- Liu W.T., Chu C.L .& Zhou T.(2002).** Thymol and acetic acid vapors reduce post harvest brown rot of apricot and plums. *HortScience*, 37: 151–156.
- Logrieco A., Moretti A.& Solfrizzo M. (2009).** *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. *World Mycotoxin Journal*, 2: 129-140.
- Lota M-L., De Rocca Serra D., Tomi F L. & Casanova J.(2000).** Chemical variability of peel and leaf essential oils of mandarins from *Citrus reticulata* Blanco. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28 :61-78
- Lota M-L., De Rocca Serra D., Tomi F L & Casanova J.(2001).** Chemical variability of peel and leaf essential oils of 15 species of mandarins. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29 : 77-104

**M**

- Mahanta J. J., Chutia M., Bordoloi M., Pathak M. G., Adhikary R. K., & Sarma T. C.(2007).** *Cymbopogon citratus* L. essential oil as a potential antifungal agent against key weed moulds of *Pleurotus* spp. spawns. *Flavour and Fragrance Journal*, 22: 525–530.
- Mahdavi S., Zakerin A., Sadeghi H & Niazmand A. R. (2013)** Antifungal effects of essential oils of three medicinal plants on post-harvest rot of Valencia oranges at normal and storage temperatures. *African Journal of Microbiological Research*, 7, 29:3831-3835
- Mann J. (1987).** *Secondary metabolism*, 2nd Ed., Oxford, Clarendon Press.374p
- Manner H.I. , Buker R.S., Smith.V.E., Ward .D .& 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, Hawaii150p .
- Marandi R .J., Hassani A., Ghosta Y., Abdollahi A., Pirzad A., Sefidkon F. (2011).** Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on pear with *Thymus kotschyanus*, *Ocimum basilicum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 4: 626-634.
- Marei G. I.Kh., Abdel Rasoul M .A., Abdelgaleil S. A.M. (2012) .** Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103 : 56–61.
- Maruzzella J. C. & Sicurella N. A. (1960).** Antibacterial activity of essential oil vapours. *Journal of American Pharmaceutical Association*, 49: 692-694.
- Matasyoh J .C., Kiplimo J. J., Karubiu N .M. & Hailstorcks T. P. (2007).** Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Tarchoanthus camphorates*. *Food Chemistry*, 101: 1183–1187.
- Mašková Z, Tancinová D, Barboráková Z, Felšöciová S , M Císarová, (2012)** .Comparison of occurrence and toxinogenicity of *Alternaria* spp. Isolated from samples of conventional and new crossbred Wheat of slovak origin. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* . 1: 552-62.
- Mason P.G. & Gillespie D.R. (2013).** *Biological Control Programmes in Canada 2001-2012*.Ed CAB International. London ,544p

- Masotti V., Juteau F., Bessiere J.M. & Viano J., (2003).** Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 7115–7121.
- Meulemans M., (1989).** *Champignons phytopathogènes in traité de phytopathologie* ( Semal J) . Ed Presses Agronomiques de Gembloux. Belgique 179 – 233.
- Mercier B., Prost J. & Prost M (2009).** The essential oil of turpentine and its major volatile fraction ( $\alpha$ -and  $\beta$ -pinenes): a review. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* , 22,4 :331 – 342 .
- Messgo-Moumene S , Li Y, Bachir K, Houmani Z, Bouznad Z, Chemat F (2014)** Antifungal power of citrus essential oils against potato late blight causative agent *Journal of Essential Oil Research*,27,2:169-176
- Meyer A., Deiana J. & Bernard A. (2004).** Cours de microbiologie générale. *Journal Applied of Microbiology*. 66 , 4:1523-1526.
- Millet F. (2014).** Huiles essentielles et essence de citronnier (*Citrus limon* (L.) Burm. f. *Phytothérapie* , 12,2 : 89-97
- Mishra A .K.& Dubey N. K.(1994).** Evaluation of Some Essential Oils for Their Toxicity against Fungi Causing Deterioration of Stored Food Commodities. *Applied and Environmental microbiology*, 60 ,4:1101 – 1105.
- Mohammadi A., Hashemi M & Masoud Hosseini S .(2015).** Nanoencapsulation of Zataria multiflora essential oil preparation and characterization with enhanced antifungal activity for controlling *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mould disease. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 28: 73–80
- Moleyar V. & Narasimham P. (1986).** Antifungal activity of some essential oil components. *Food Microbiol*, 3:331 – 336
- Montesinos E. (2003).** Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *International Microbiology*. 6: 245–252.
- 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: 7-13.
- Monajemi R., Oryan S., Haeri-roohani A., Ghannadi A.& Jafarian A (2005).** Cytotoxic effects of essential oils of some Iranian Citrus peels. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 3: 183-187.



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

**N**

**Nakahara K., Alzoreky N. S., Yoshihashi T., Nguyen H. T. T.& 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 de doctorat. Univ Montpellier.

**Nerio L. S., Olivero-Verbel J.,& Stashenko E.(2010).** Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology,* 101 : 372–378.

**Nguyen M.T.(2007).** Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam - étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines. Thèse de doctorat .Univ Toulouse.

**Nunez Y.O., Salabarría I.S., Collado I.G.& Hernandez-Galan R. (2006).**The antifungal activity of widdrol and its biotransformation by *Colletotrichum gloeosporioides* (penz) Penz. & Sacc. and *Botrytis cinerea* Pers. Fr. *Journal. Agriculture. Food Chemistry.* 54:7517–7521.

**Notteghem J.L., Nriatampo G.M., Chatel M.& Dechanet R.(1980).** Techniques utilisées pour la sélection de variétés de riz possédant la résistance horizontale à la pyriculariose. *Annales de. Phytopathologie,* 12 :199-266.

**O**

**O'Donnell K., Rooney A.P., Proctor R.H., Brown D.W., McCormick S.P., Ward T.J., et al. ( 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: 20–31.

**Omidbeygi M., Barzegar M., Hamidi Z .& Naghdibadi H. (2007).** Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control,* 18:1518–1523.



- Ouraini D., Agoumi A., Ismaïli-Alaoui M., Alaoui K., Cherrah Y., Amrani M., Belabbas M. A. (2005).** Étude de l'activité des huiles essentielles de plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermatophytes. *Phytothérapie*, 3, 4: 147-157
- Ostry V. (2008).** *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs, *World Mycotoxin Journal*, 1, 2: 175-188.
- Oswald M. (2006).** Déterminisme génétique de la biosynthèse des terpénols aromatiques chez la vigne. Thèse doctorat .Univ Louis Pasteur Strasbourg.
- P**
- Pandey D.K., Tripathi N.N., Tripathi R.D. & Dixit S.N. (1982).** Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *H.suaveolens*. *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 89:344–349.
- Parveen S., Wani A. H., Ganie A.A., Pala S.A. & Mir R.A. (2014).** Antifungal activity of some plant extracts on some pathogenic fungi., *Archive of Phytopathology of Plant Protection.*, 47, 279-284
- Pawar V. & Thaker V. (2006).** *In vitro* efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. *Mycoses*, 785, 49: 316-323.
- Phillips C. A., Laird K. & 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.
- Plooy W., Regnier T. & Combrinck S. (2009).** Essential oil amended coatings as alternatives to synthetic fungicides in citrus postharvest management. *Postharvest Biology and Technology*, 53: 117–122.
- Pichersky E., Noel J.P.& Dudareva N. (2006).** Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science*, 311: 808–811.
- Pichette A., Larouche P.L., Lebrun M.& Legault J. (2006).** Composition and antibacterial activity of *Abies balsamea* essential oil. *Phytotherapy Research*, 20: 371–373.
- Pitt J.I. (2000).** Toxigenic fungi and mycotoxins. *British medical bulletin*, 56 ,1: 184 - 192.
- Pitt J.I. & Hocking A.D. (2009).** *Fungi and Food spoilage*. 3 Ed Springer Verlag US, 520p

**Prabhu A V ., Khelfane k .& Bekal S . (1992).** *Compilation des maladies fongiques des plantes en Algérie* . Ed office des publication Universitaire (OPU), Algérie . 85 p

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

## R

**Rasooli I., Moosavi M. L., Rezaee M. B. & Jaimand K. (2002).** Susceptibility of microorganisms to *Myrtus communis* L. essential oil and its chemical composition. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 4: 127–133.

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

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

**Rivera-Carriles K., Argai A., Palou E.& López-Malo A. (2005).** Synergistic inhibitory effect of Citral with selected phenolics against *Zygosaccharomyces bailii*. *Journal of Food Protection* 68 ,3: 602–606.

## S

**Sallaud C., Ronstein D., Onillon S., Jabès F., Duffé Giagalone C., Thoraval S., et al (2009).** A novel pathway for sesquiterpene biosynthesis from Z,Z-farnesyl pyrophosphate in the wild tomato *Solanum habrochaites*. *Plant Cell*, 21: 301-317

**Sameza M L., Boat M. A. B ., Nguemezi S T., Mabou L. C. N., Jazet Dongmo P. M., Boyom F.F& Menut C. (2014).** Potential use of *Eucalyptus globules* essential oil against *Phytophthora colocasiae* the causal agent of taro leaf blight. *European Journal of Plant Pathology*.140, 2: 243-250

**Samson R.A. & Pitt J.I. (2000).** *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification* . Ed Harwood academic publishers. Netherlands.524p

**Sauvion N., Calatayud P.A., Theyry D .& Marion –Poll F. (2013).** *Interaction plantes-insectes*. Ed IRD. Quae. Paris,750p

- Sawamura M, (2010).** *Citrus essential oils flavor and fragrance*. Ed John Wiley. New Jersey, 398p
- Sawamura M., Son U.S., Choi H.S., Les Kim M.S., Lan Phi N.T., Fears M. & Kumagai C. (2004)** .Compositional changes in commercial lemon essential oil for aromatherapy. *International journal of aromatherapy*, 14: 27-36
- Settanni L., Palazzolo E., Guarrasi V., Aleo A., Mammina C., Moschetti G. & Germanà M. A (2012).** Inhibition of foodborne pathogenic bacteria by essential oils extracted from citrus fruits cultivated in Sicily. *Food Control* ,26: 326-330.
- Sharma N. & Tripathi A. (2006)** .Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* , 22: 587-593.
- Sharma N. & Tripathi , A. (2008)** .Effects of *Citrus sinensis* (L) Obseck epecarp essential oil one growth and morphogenesis of *Aspergillus Niger* (L) Van Tieghem . *Microbiological Research*, 163, 3: 337-344
- Shaw P. E. (1979).** Review of quantitative analyses of citrus essential oils. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 611, 27: 246-257
- Shirole R.L., Shirole N.L., Kshatriya A.A., Kulkarni R. & Saraf M.N.(2014).** Investigation into the mechanism of action of essential oil of *Pistacia integerrima* for its antiasthmatic activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 153, 3 : 541–551.
- Smith R.L., Cohen S.M., Doull J., Feron V.J., Goodman J.I., Marnett L.J., et al. (2005).** A procedure for the safety evaluation of natural flavor complexes used as ingredients in food: essential oils. *Food Chemistry Toxicology*, 43: 345–363
- Sikkema J., de Bont J.A. & Poolman B. (1994)** .Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269 : 8022–8028.
- Simon H. (1994).** *La protection des cultures*. Ed Lavoisier Tec et Doc . France .351p
- Singh A. K., Dickshit A., Sharma M. L. & Dixit S. N. (1980).** Fungitoxic activity of some essential oils. *Economic Botany*, 34:186-190.
- Singh J. & Tripathi N.N. (1999).** Inhibition of storage fungi of black gram (*Vigna mungo L.*) by some essential oils. *Flavour Fragrance Journal*, 14: 42–44.

- Singh P. , Shukla R. , Prakash B ., Kumar A., Singh S., Mishra A. K. & 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 :1734–1740
- Sonboli A., Babakhani B. & Mehrabian A. R. (2006).** Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*. *Zeitschrift fur Naturforschung Section C. Biosciences*, 61: 160–164.
- Souza E .L ., Lima E .O., Freire K .R. L. & Sousa C .P (2005).** Inhibitory Action of Some Essential Oils and Phytochemicals on the Growth of Various Moulds Isolated From Foods. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 48 ,2 : 245-250
- Soylu E. M., Kurt S & Soylu S. (2010).** *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *International Journal of Food Microbiology*, 143 ,13 : 183–189.
- Staroscik J.A, Wilson A.A .(1982).** Quantitative analysis of cold pressed lemon oil by glass capillary gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30:507-509.
- Stevens K. L ., Jurd L. ., King A. D. & Mihara K. Jr. (1971).** The antimicrobial activity of Citral. *Experientia*.15, 5, 27, 5: 600-602.
- T**
- Taillet R. (2008) .***Optique géométrique: Mémento*. Ed De Boeck Supérieur, Belgique.130p
- Tao N. , Yang Q O. , Jia L. (2014).** Citral inhibits mycelial growth of *Penicillium italicum* by a membrane damage mechanism. *Food Control*, 41 :116- 121.
- Tepe B., Akpulat H. A., Sokmen M., Daferera D., Yumrutas O., Aydin E., Polissiou M.& Sokmen A. (2006).** Screening of the antioxidative and antimicrobial properties of the essential oils of *Pimpinella anisetum* and *Pimpinella flabellifolia* from Turkey. *Food Chemistry*, 97,4: 719–724.
- Theis N .& Lerdau M. (2003).** The evolution of function in plant secondary metabolites. *International Journal of Plant Sciences*, 164 ,3 : 93–102.
- Thomma B.P.H.J. (2003).** *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*. 4 ,4: 225–236
- Thompson D. P . (1989).** Fungitoxic activity of essential oil components on food storage fungi. *Mycologia*, 81 ,1: 151–153.

- Thormar H . (2011).** *Lipids and essential oils as antimicrobial agents*. Ed John Willey et Sons Ltd. United Kingdom,336p.
- Tian J., Ban X., Zeng Hg., Huang B., He J .& WangY. (2011).** *In vitro* and *in vivo* activity of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) against fungal spoilage of cherry tomatoes. *Food Control*, 22: 1992-1999.
- Tranchida P. Q., Bonaccorsi I., Dugo P., Mondello L.& Dugo G. (2012).** Analysis of *Citrus* essential oils: state of the art and future perspectives. A review. *Flavour and Fragrance Journal* , 27: 98-123.
- Tripathi P .&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 : 235–245.
- Tripathi A, Sharma N, Sharma V, Alam A(2013) .**A review on conventional and non conventional methods to manage post-harvest diseases of perishables, *Researcher*, 5,6 : 6-19
- Trozzi A, Verzera A. & Lamonica G. (1999).**Essential Oil Composition of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Maltese. *Journal of Essential Oil Research*, 11, 4 :482-488,
- Tzortzakis N. G. & Economakis C. D. (2007).** Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8 : 253–258
- U-V**
- Uribe S., Ramírez J.& Peña A. (1985).** Effects of beta-pinene on yeast membrane functions. *Journal of Bacteriology*, 161: 1195–2000.
- Van Hung P ., Thi Lan Chi P. & 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,
- Vázquez B.I., Fente C., Franco C.M., Vázquez M.J., Cepeda A.(2001).** Inhibitory effects of eugenol and thymol on *Penicillium citrinum* strains in culture media and cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 67:157–163
- Vera S.S., Zambrano D.F., Méndez-Sánchez S.C ., Rodríguez-Sanabria F., Stashenko E.E.& Duque Luna J.E. (2014).**Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*,113 ,7 : 2647-2654

- Verzera A., Trozzi A., Mondello L., Dellacassa E., Lorenzo D. (1998).**Uruguayan Essential Oil. Part X. Composition of the oil of *Citrus clementine* Hort. *Flavour and Fragrance Journal* , 13: 189-195.
- Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernandez-Lopez J.& 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: 1130–1138
- Viuda-Martos M ., Ruiz-Navajas Y., Fernández-López J .& Pérez-Álvarez J. A. (2009)** .Chemical Composition of Mandarin (*C. reticulata* L.), Grapefruit (*C. paradisi* L.), Lemon (*C. limon* L.) and Orange (*C. sinensis* L.) Essential Oils, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 12,2: 236-243.
- Vitoratos A., Bilalis D., Karkanis A., Efthimiadou A.(2013).** Antifungal activity of plant essential oils against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici* , 41: 86-92.
- W-Z**
- Weiland J.J., 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.
- Wilson C.L., Franklin J.D. & Otto B.E .(1987)** . Fruit volatils inhibitory to *Monilinia fructicola* and *Botrytis cinerea*.*Plant Disease*, 71: 316 – 319.
- Wilson C.L., Solar J.M., EL-Ghaouth A.& Wisniewski M.E.(1997).**Rapidevaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*.,81: 204-210.
- Wuryatmo E., Klieber A.,& Scott E.S. (2003).** Inhibition of citrus postharvest pathogens by vapor of Citral and related compounds in culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 2637–2640.
- Xue A .G.,Chen Y., Voldeng H.D ., Fedak G ., Savard M .E ., Langle T ., Zhang J .& Harman G .E (2014).**Concentration and cultivar effects on efficacy of CLO-1 biofungicide in controlling *Fusarium* head blight of wheat . *Biological Control* , 73: 2-7

- Yahyazadeh M., Omidbaigi R., Zare R., & Taheri H. (2008).** Effect of some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum* Sacc. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24,8 : 1445-1450.
- Zabka M., Pavela R. & Slezakova L. (2009).** Antifungal effect of *Pimenta dioica* essential oil against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi. *Industrial Crops and Products*, 30, 2: 250–253
- Zheng S., Jing G., Wang X., Ouyang Q., Jia L & Tao N. (2015).** Citral exerts its antifungal activity against *Penicillium digitatum* by affecting the mitochondrial morphology and function. *Food Chemistry*, 178,1 :76-81
- Zhou H, Tao N, Jia L, (2014).** Antifungal activity of citral, octanal and  $\alpha$ -terpineol against *Geotrichum citri-aurantii*. *Food Control* **37** : 277– 283.

# **PUBLICATIONS**



# ***PUBLICATION 1***

Full Length Research Paper

## Chemical composition and antifungal activity of essential oils of Algerian citrus

Hamdani Fatima Zohra<sup>1\*</sup>, Allem Rachida<sup>2</sup>, Meziane Malika<sup>1</sup>, Setti Benali<sup>1</sup>, Ali Arous Samir<sup>3</sup> and Bourai Meriem<sup>4</sup>

<sup>1</sup>University Hassiba Benbouali Chlef, Agronomy Institute, Hay Salem, 19 highway, 02000 Chlef, Algérie.

<sup>2</sup>University Hassiba Benbouali Chlef, Faculty of Science, Hay Salem, 19 highway, 02000 Chlef, Algérie.

<sup>3</sup>National Institute of Plant Protection Chlef, Algeria.

<sup>4</sup>Laboratory Research, Aldar, Dar El Beida, Algeria.

Accepted 23 July, 2013

The aim of this study is to determine the chemical composition of the essential oils of Algerian citrus. They were extracted by hydrodistillation from the leaves of citrus species (orange, Bigaradier, mandarin and lemon), using gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). Their chemical composition and antifungal activity against four phytopathogenic fungi (*Fusarium oxysporum f.sp., albedinis sp, Penicelium sp, Alternaria sp* and *Fusarium sp*) were studied. The inhibiting minimal concentration (CMI) effect was also given for four oils. Ten compounds were recorded jointly among the 51 identified, of which limonene (7.18 to 36.10%),  $\beta$ -pinene (4.35 to 30.0%) and linalool (0.21 to 63.03%) represent the principal major compounds. These results indicate that essential oils can be employed as natural fungicides against phytopathogenic fungi.

**Key words:** GC/MS, essential oils, citrus, antifungal activity, phytopathogenic fungi.

### INTRODUCTION

Fungal diseases are considered as the main enemies of crops. Apart from the fact that they have the potential to cause significant yield losses and deterioration of agricultural products, many of them cause a very serious risk to consumers because they produce dangerous toxins. Control methods applied involved mainly the application of chemical fungicides. In recent years, the polemic against the use of harmful chemicals on people's health and the environment has generated a debate on being exposed to the risk of having cancer and residual toxicity (Yaouba et al., 2010).

The increasing consciousness of consumers on the relationship between mode and health revolutionizes food, to justify the search for new strategies and to explore other surer solutions for replacement and biodegradable industry (Combrinck et al., 2010). For the

elimination of pathogenic micro-organisms in the past years, researchers were interested in composing biologically active isolates, starting from plants with the objective of providing solutions to several challenges facing producers and agricultural distributors (Combrinck et al., 2010).

Essential oils are of a great interest because of their broad acceptance by consumers and the exploitation of their potential multipurpose utilities (Sawamura, 2000). Several researches evoked the antifungal activity of essential oils extracted from citrus (Mishra and Dubey, 1994; Sherma and Tripathi, 2006; Espina et al., 2011). The studies reveal that essential oils and their components have a very significant antimicrobial potential. The studies were devoted to the determination of the chemical composition of the species of Algerian

\*Corresponding author. E-mail: Hamdaniifz@yahoo.fr.

## ***PUBLICATION 2***



**International Academy of Science,  
Engineering and Technology**

Connecting Researchers; Nurturing Innovations

**International Journal of Applied and Natural Sciences (IJANS)**

in recognition of the research paper quality, originality and significance in modeling and technical flow and upon  
recommendation of the IASET Journals Best Paper Award Committee proudly present this

**BEST PAPER CERTIFICATE**  
to  
**FATIMA ZOHRA HAMDANI &  
RACHIDAALLEM**

**Paper Title : ANTIFUNGAL ACTIVITY OF THE LEAF ESSENTIAL OIL OF CITRUS  
AGAINST ALTERNARIA ALTERNATA IN VIVO**

**Edition Date : 07/31/2015**

*S. Uma*

Deputy Editor-IASET

*M. Jayasudha*

Editor- In- Chief-IASET



## ANTIFUNGAL ACTIVITY OF THE LEAF ESSENTIAL OIL OF CITRUS AGAINST ALTERNARIA ALTERNATA IN VIVO

FATIMA ZOHRA HAMDANI<sup>1</sup> & RACHIDA ALLEM<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hassiba, Benbouali University, Institute of Agricultural Sciences, Production and  
Plant Protection Laboratory in the Chlef region, Chlef, Algeria

<sup>2</sup>Hassiba, Benbouali University, Faculty of Science, Department of Biology  
Laboratory of Bioresources local, Chlef, Algeria

### ABSTRACT

The essential oils were extracted by hydro-distillation from the leaves of citrus by using hydrodistillation. The largest yields were recorded with *Citrus limon* L (1.02%) and *Citrus sinensis* (0.96%). GC/SM of the essential oil of *Citrus* revealed limonene (7.18–36.10%),  $\beta$ -pinene (4.35–30.0%) and linalool (0.21–63.03%) as the principal major compounds. Essential oils of citrus exhibit a strong inhibiting effect on the development of *Alternaria alternata* on leaves and potato. Low concentrations generate the lowest severity indexes of disease for all citrus species. According to the results, the essential oils of citrus could be used as potential antifungal agents for the control of *Alternaria alternata in vivo*.

**KEYWORDS:** Citrus, Essential Oils, *Alternaria Alternata*, Potato, *In Vivo* Antifungal Activity

### INTRODUCTION

The phytopathogenic fungi are known to cause several plant diseases and yield losses for many economically important crops (Fletcher et al., 2006; AbdelKader et al., 2012.). In agriculture, each year there are about loss of efficiency of about 20% mainly due to fungal diseases (Bajwa et al., 2004).

The genus *Alternaria* includes saprophytes and plant pathogens (Thomma, 2003). It has over 100 species ubiquitous extremely common in soils, vegetation, air or food (Calmes, 2011). Due to their growth, even at low temperature, *Alternaria* spp are pathogens postharvest familiar, responsible for food spoilage during refrigerated transport and storage (Ostry, 2008). The economic losses are mainly related to the reduction in quality due to a decrease in the nutritional value (Kosiak et al., 2004).

Algeria is the second largest potato producer in the Arab world and in Africa after Egypt with a production of 4.219.476.00 ton in 2012 (FAOSTAT 2014). *Alternaria alternata* is one of prevalent pathogens causing brown leaf spot on potato worldwide (Thomma, 2003).

The disease brown spots on leaves is known as one of the most destructive and communes of potatoes cultivated in regions with frequent precipitation and high relative humidity conditions. The disease can occur on a wide range of climatic conditions (Pitt and Hocking, 2009).

Studies were conducted *in vitro* and *in vivo* to evaluate the antifungal activity of essential oils of citrus and their active compounds. They reported their inhibitors powers against some phytopathogenic fungi such as *Alternaria*, *Fusarium*,

# ***PUBLICATION 3***

## Propriétés antifongiques des huiles essentielles des feuilles de *Citrus* vis-à-vis d'*Alternaria alternata* et *Penicillium sp* in vitro

Antifungal properties of leaf essential oils of *Citrus* against *Alternaria alternata* and *Penicillium sp* in vitro

F.Z. Hamdani · R. Allem

© Lavoisier SAS 2015

**Résumé** Les huiles essentielles ont été extraites par hydrodistillation à partir des feuilles de citrus. Les rendements les plus importants ont été enregistrés avec *Citrus limon* L. (1.02%) et *Citrus sinensis* (0.96%). Les résultats de l'activité antifongique des huiles essentielles des feuilles de citrus montrent un pouvoir inhibiteur des huiles essentielles de *Citrus aurantium*, *Citrus limon* et *Citrus reticulata* sur la croissance mycélienne radiale d'*Alternaria alternata* et *Penicillium sp*. Ils montrent également que l'activité antifongique augmente avec la concentration des huiles essentielles testées. Celles-ci peuvent être utilisées comme agents antifongiques potentiels pour lutter contre les maladies fongiques des plantes.

**Mots clés** Citrus · Huiles essentielles · *Alternaria alternata* · *Penicillium sp* · Activité antifongique

**Abstract** The essential oils were extracted by hydrodistillation from the leaves of citrus by using hydrodistillation. The largest yields were recorded with *Citrus limon* L. (1.02%) and *Citrus sinensis* (0.96%). The results of the antifungal activity of essential oils of citrus showed the great inhibitory power of *Citrus aurantium*, *Citrus limon* and *Citrus reticulata*, on the radial mycelial growth of *Alternaria alternata* and *Penicillium sp*. Data also showed that the antifungal activity was increased as the concentration increased of tested essential oils. According to the results, the essential oils of citrus could be used as potential antifungal agents for the control of fungal diseases in plants.

F.Z. Hamdani (✉)

Laboratoire Production et Protection des végétaux dans la région de Chlef, Institut des sciences agronomiques, Université Hassiba Benbouali, Chlef, Algérie  
e-mail : Hamdanifz@yahoo.fr

R. Allem

Laboratoire de Bioressources locales, Faculté des Sciences, Université Hassiba Benbouali, Chlef, Algérie

**Keywords** Citrus · Essential oils · *Alternaria alternata* · *Penicillium sp* · Antifungal activity

### Introduction

Les fongicides chimiques ont certes permis l'amélioration des rendements en agriculture, cependant leur utilisation abusive a engendré à long terme l'apparition de phénomène de résistance, en plus de la pollution de l'environnement [1]. La recherche actuelle a soulevé la possibilité d'employer de nouveaux composés extraits à partir des plantes qui peuvent agir en tant que fongicides naturels [2]. Les huiles essentielles sont très utilisées en aromathérapie, en pharmacie, en parfumerie, en cosmétique et en agroalimentaire. Leur utilisation est liée à leurs différentes activités biologiques reconnues [3]. Les huiles essentielles avec leurs larges spectres d'actions 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 [4]. Dans cette perspective, nous avons étudié les propriétés physicochimiques et le pouvoir inhibiteur des huiles essentielles extraites à partir des feuilles de citrus de la région de Chlef vis-à-vis de deux champignons phytopathogènes

### Matériels et méthodes

#### Extraction et caractérisation physicochimique des huiles essentielles des citrus

Les huiles essentielles ont été obtenues par hydrodistillation à partir de quatre espèces de citrus : *Citrus sinensis* (L.) Osb, *Citrus aurantium* L. amara, *Citrus limon* (L.) Burm et *Citrus reticulata* Blanco et qui ont été obtenues à partir des vergers agrumicole de la région de Chlef. 300 grammes de feuilles fraîches ont été soumises à l'hydrodistillation dans un

 Lavoisier

# **Annexes**



### Annexe 1 : Effet des huiles essentielles vis-à-vis de cinq espèces fongiques phytopathogènes

Analyse de la variance du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne (PIc )

	SC	ddl	MC	F	p
<b>ord. origine</b>	1176047	1	1176047	672,2289	0,000000
<b>huile essentielle</b>	19692	3	6564	3,7520	0,012214
<b>espèce fongique</b>	18839	4	4710	2,6921	0,032990
<b>huile essentielle*espèce fongique</b>	8563	12	714	0,4079	0,958962
<b>Erreur</b>	279916	160	1749		

Analyse de la variance de l'effet des huiles essentielles sur le poids sec des espèces fongiques

	SC	ddl	MC	F	p
<b>ord. origine</b>	0,511797	1	0,511797	26,34580	0,000100
<b>Huiles essentielles</b>	0,040682	4	0,010171	0,52355	0,719914
<b>Espèces fongiques</b>	0,277155	4	0,069289	3,56679	0,029094
<b>Erreur</b>	0,310818	16	0,019426		

### Annexe 2 : Effet des composants volatils vis-à-vis de cinq espèces fongiques phytopathogènes

Analyse de la variance du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne (PIc )

FACTEURS	SC	ddl	MC	F	p
<b>ord. origine</b>	8178,227	1	8178,227	57,7111	0,000000
<b>espèces</b>	4424,064	4	1106,016	34,8526	0,000000
<b>composants</b>	1243,998	3	414,666	13,0669	0,000000
<b>espèce*composant</b>	2950,081	12	245,840	7,7469	0,000000
<b>Erreur</b>	3173,409	100	31,734		

Analyse de la variance du pourcentage d'inhibition de la sporulation (PIs)

FACTEURS	SC	ddl	MC	F	p
<b>ord. origine</b>	214489,7	1	214489,7	281,3533	0,000000
<b>Espèces</b>	40861,7	4	10215,4	13,3999	0,000000
<b>composants</b>	7083,9	3	2361,3	3,0974	0,030244
<b>Espèces*composants</b>	29668,7	12	2472,4	3,2431	0,000572
<b>Erreur</b>	76235,0	100	762,4		

## ANOVA

Analyse de la variance du pourcentage d'inhibition de la germination (PIg)

	SC	ddl	MC	F	p
<b>ord. origine</b>	261474,1	1	261474,1	758,2013	0,000000
<b>Espèces</b>	36693,0	4	9173,2	26,5998	0,000000
<b>composants</b>	820,7	3	273,6	0,7933	0,500420
<b>Espèces*composants</b>	16502,1	12	1375,2	3,9876	0,000050
<b>Erreur</b>	34486,1	100	344,9		

### Effet des concentrations des composants volatils vis-à-vis de cinq espèces fongiques phytopathogènes

Analyse de la variance du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne (PIC)

facteurs	SC	ddl	MC	F	p
<b>ord. origine</b>	8178,227	1	8178,227	92,05422	0,000000
<b>composant</b>	1243,998	3	414,666	4,66748	0,004348
<b>concentration</b>	1925,952	5	385,190	4,33571	0,001336
<b>composant*concentration</b>	92,825	15	6,188	0,06966	0,999999
<b>Erreur</b>	8528,776	96	88,841		

Analyse de la variance du pourcentage d'inhibition de la sporulation (PIs)

Facteurs	SC	ddl	MC	F	p
<b>ord. origine</b>	214489,7	1	214489,7	202,4375	0,000000
<b>composant</b>	7083,9	3	2361,3	2,2286	0,089794
<b>concentration</b>	43063,7	5	8612,7	8,1288	0,000002
<b>composant*concentration</b>	1986,3	15	132,4	0,1250	0,999972
<b>Erreur</b>	101715,4	96	1059,5		

**Annexe 3 Effet des huiles essentielles sur le développement d'*Alternaria*  
*Alternata in vivo***

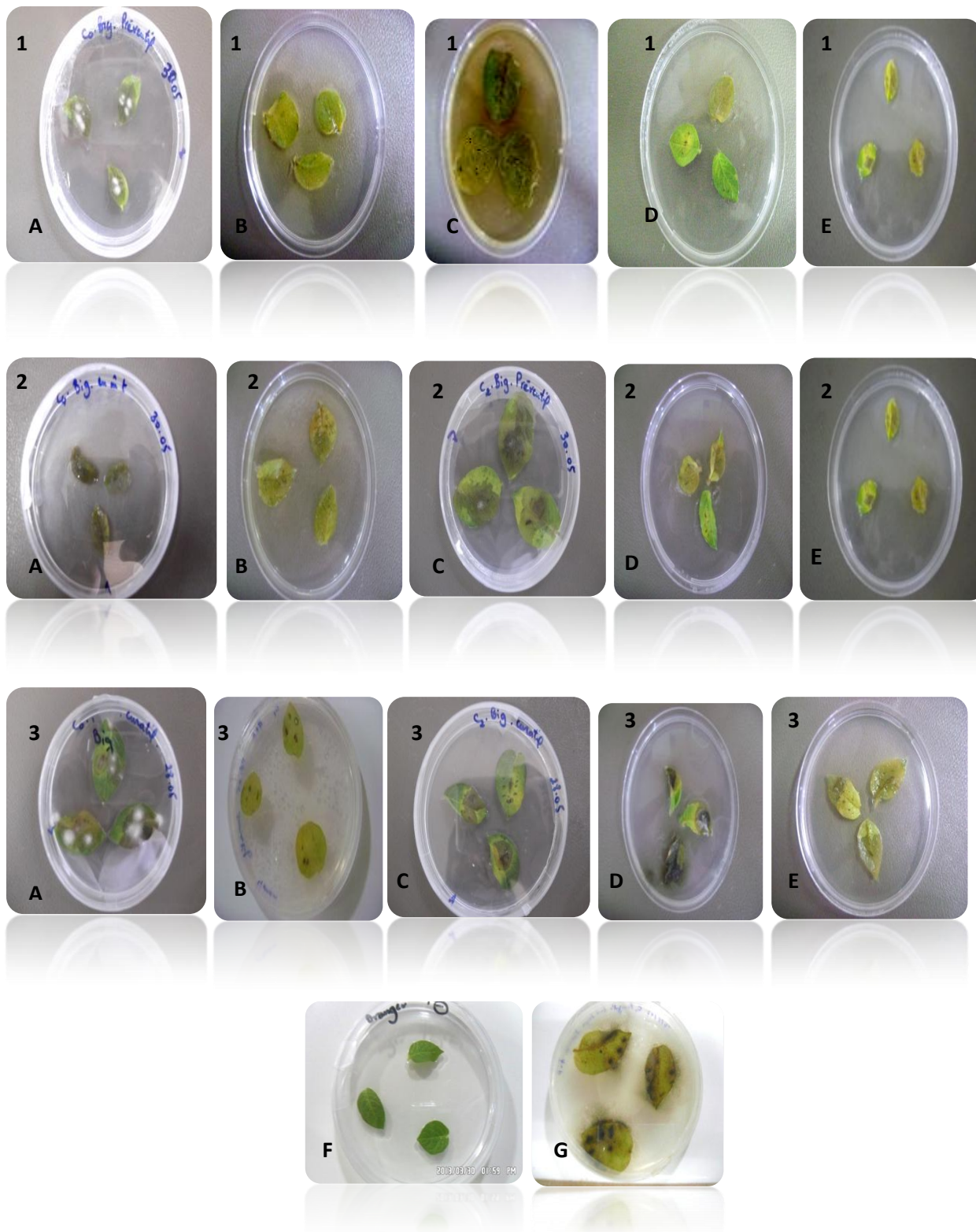
Analyse de la variance de l'effet des huiles essentielles sur la sévérité de la maladie (test sur folioles détachés)

	<b>SC</b>	<b>ddl</b>	<b>MC</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>ord. origine</b>	14720,30	1	14720,30	83,46486	0,000001
<b>Huiles essentielle</b>	2596,35	3	865,45	4,90716	0,018846
<b>concentrations</b>	7284,91	4	1821,23	10,32646	0,000735
<b>Erreur</b>	2116,38	12	176,37		

Analyse de la variance de l'effet des huiles essentielles sur l'Indice de la maladie (Test inoculation tubercule)

	<b>SC</b>	<b>ddl</b>	<b>MC</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>ord. origine</b>	48186,17	1	48186,17	1032,753	0,000000
<b>Huiles essentielle</b>	139,97	3	46,66	1,000	0,454725
<b>Concentrations</b>	24288,94	2	12144,47	260,287	0,000001
<b>Erreur</b>	279,95	6	46,66		

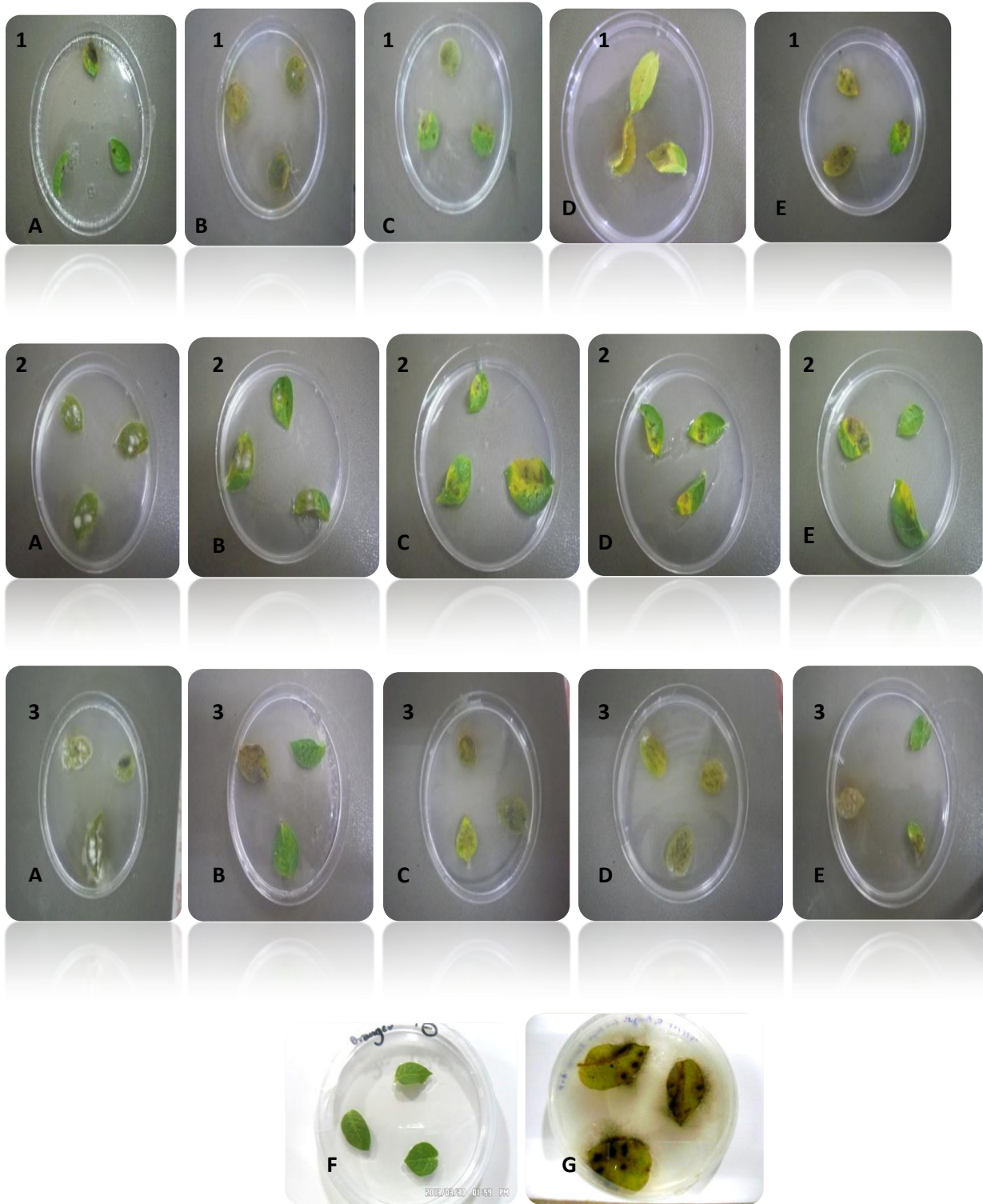
**Annexe 4: Effet des huiles essentielles de *Citrus* sur l'apparition des symptômes de la maladie**



**Planche N°1** : Effet de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* sur l'apparition des symptômes de la maladie. **1** : Simultané ; **2** : Préventive ; **3** : Curatif

**A** : 1 ; **B** : 0.5 ; **C** : 0.25 ; **D** : 0.125 ; **E** : 0.0625 mg/ml. **F** : témoin négative **G** : témoin positif

**Planches** : Activité antifongique des huiles essentielles vis-à-vis d'*Alternaria alternata* in-vivo

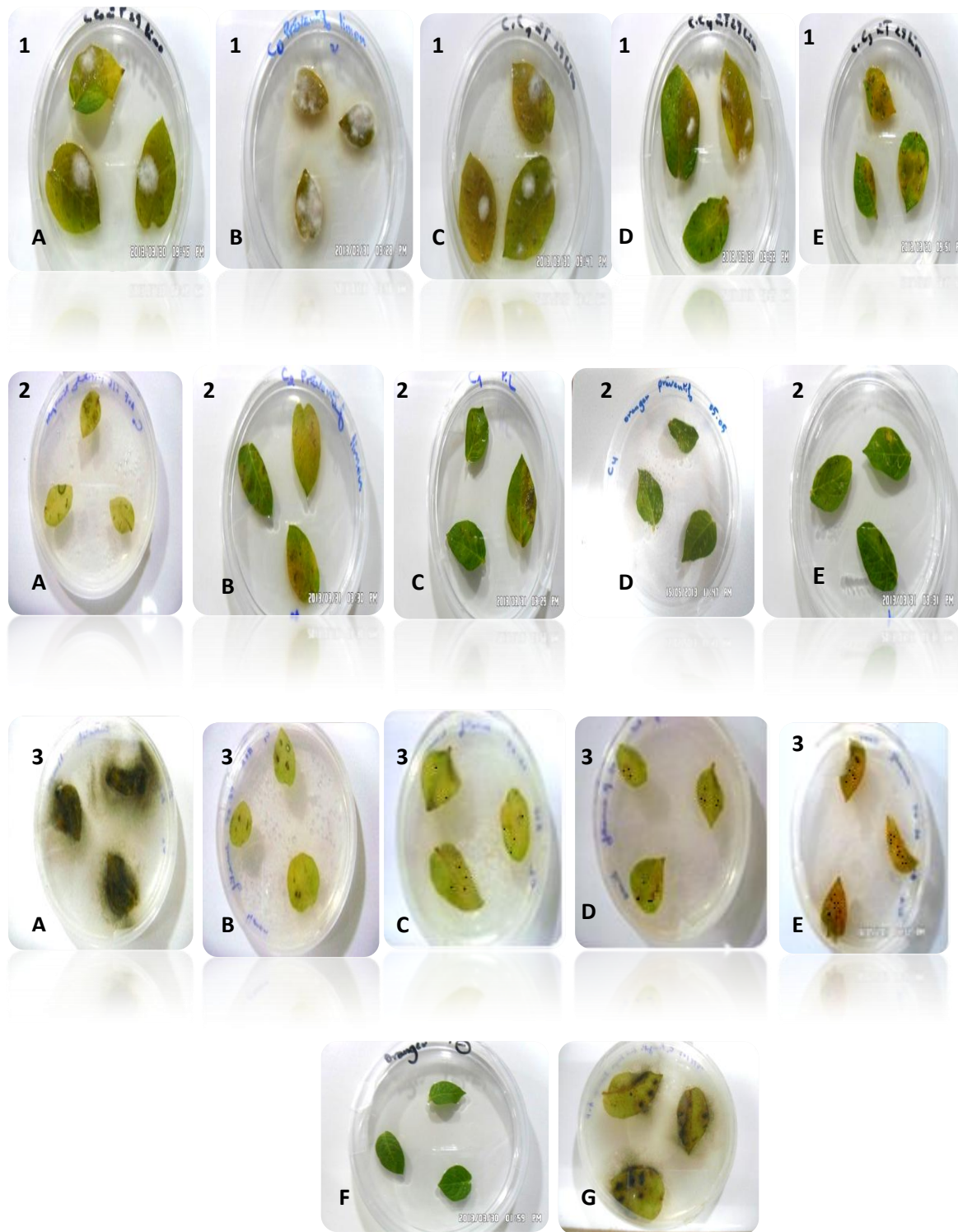


**Planche N°2** : Effet de l'huile essentielle de *Citrus reticulata* sur l'apparition des symptômes de la maladie. **1** : Simultané ; **2** : Préventive ; **3** : Curatif

**A** : 1 ; **B** : 0.5 ; **C** : 0.25 ; **D** : 0.125 ; **E** : 0.0625 mg/ml. **F** : témoin négative **G** : témoin positif.



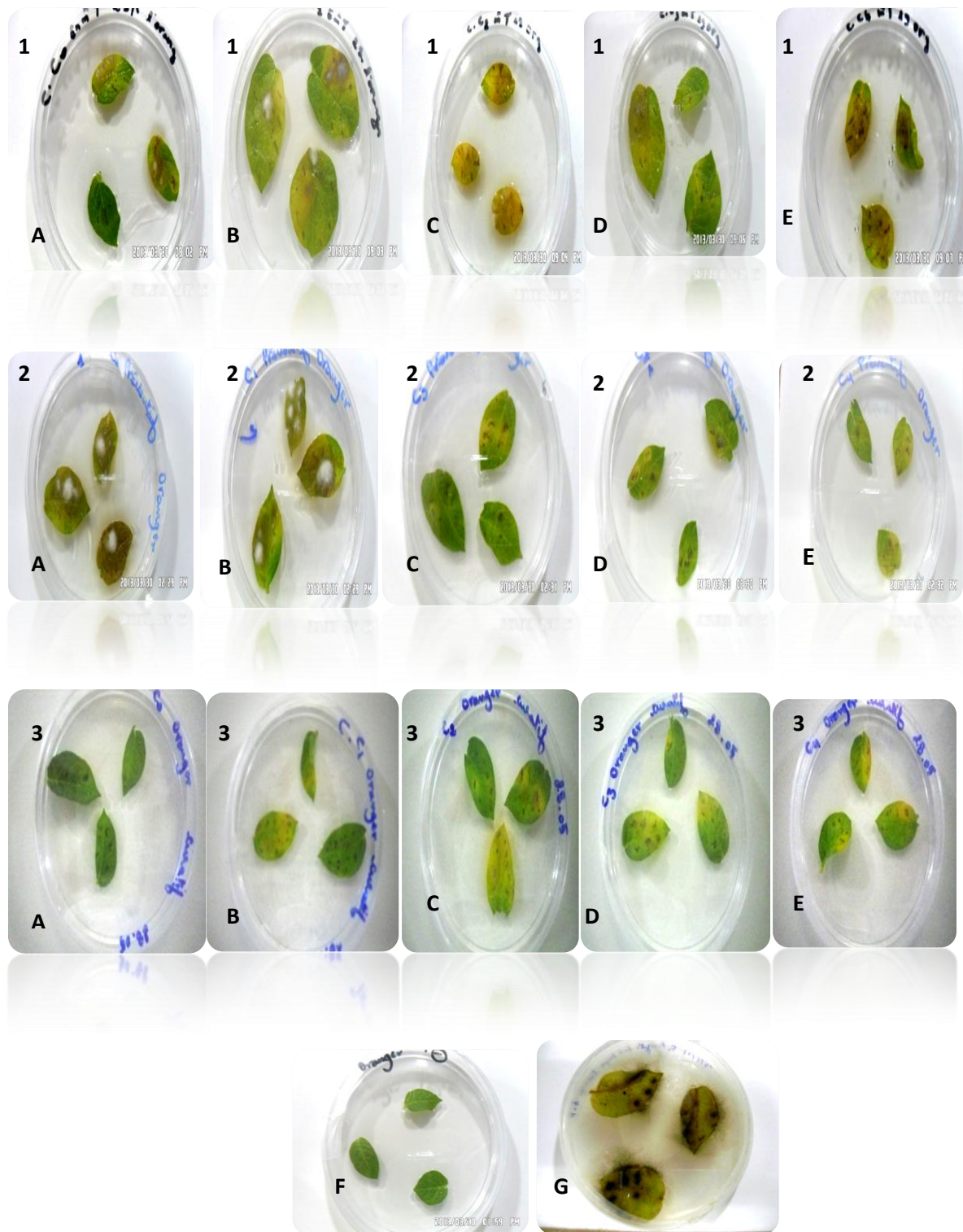
**Planches:** Activité antifongique des huiles essentielles vis-à-vis d'*Alternaria alternata* in-vivo



**Planche N°3 :** Effet de l'huile essentielle de *Citrus limon* sur l'apparition des symptômes de la maladie. **1** : Simultané ; **2** : Préventive ; **3** : Curatif

**A** : 1 ; **B** : 0.5 ; **C** : 0.25 ; **D** : 0.125 ; **E** : 0.0625 mg/ml. **F** : témoin négative **G** : témoin positif

**Planches:** Activité antifongique des huiles essentielles vis-à-vis d'*Alternaria alternata* in-vivo



**Planche N°4 :** Effet de l'huile essentielle de *Citrus sinencis* sur l'apparition des symptômes de la maladie. **1** : Simultané ; **2** : Préventive ; **3** : Curative

**A** : 1 ; **B** : 0.5 ; **C** : 0.25 ; **D** : 0.125 ; **E** : 0.0625 mg/ml. **F** : témoin négative **G** : témoin positif