

N° d'Ordre :

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DÉPARTEMENT D'AGRONOMIE.

# Mémoire

De fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la nature et de la vie (S.N.V.)

Filière : Sciences agronomiques

Spécialité : Protection des Végétaux

Intitulé du thème :

**Evaluation de l'effet antifongique de deux plantes  
médicinales « *Rosmarinus officinalis* et *Citrus  
aurantium* » sur quelques souches de champignons  
« *Fusarium oxysporium* et *Alternaria sp.* ».**

Présenté par : M<sup>elle</sup> Belkacemi Amel

M<sup>elle</sup> Slimani Kheira

Mémoire soutenu devant l'honorable jury composé de :

Président de jury : M<sup>r</sup> Zaid Redouane (MAA / UDL Sidi Bel Abbès.)  
Examineur : M<sup>me</sup> Ghomari Samia (MCA / UDL Sidi Bel Abbès.)  
Promoteur : M<sup>me</sup> Elaoufi Manal (MAA / UDL Sidi Bel Abbès.)  
Co-Promoteur : M<sup>me</sup> Madouni Narimène (Doctorante / Université de Mascara.)

Année universitaire 2020 - 2021

Session : « Juin »

## **Remerciements**

*D'abord nous remercions «Allah» de nous avoir donné le courage, la patience et la volonté pour réaliser ce modeste travail.*

*Nous exprimons notre plus grande reconnaissance à nos parents qui ont pu nous transmettre des valeurs éducatives et familiales dénuées de tous jugement, tout le mérite de notre réussite leurs revient.*

*Nous tenons donc à remercier :*

*Notre promotrice M<sup>me</sup> Elaoufi Manel « Maitre Assistante A. », d'avoir accepté de nous encadrer, nous orienter et nous avoir permis de bénéficier de ses conseils lors de la réalisation de ce travail.*

*Nous tenons également à remercier la Co-promotrice M<sup>me</sup> Madouni Narimane pour son aide, ses orientations, son soutien ainsi que les efforts qu'elle a fourni tout au long de notre travail.*

*Nous voulons remercier également Mr Zaid Redouane « Maitre Assistant A. » pour nous avoir fait l'honneur de présider notre jury.*

*Nous adressons aussi nos vifs remerciements à M<sup>me</sup> Ghomari Samia « Maitre de Conférence A. » pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner ce travail. Nos remerciements vont à l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail*

*A mes très chers parents, source de ma joie de vie et de courage*

*A mes tendres soeurs: Karima, Asmaà, Zahra*

*A mon respectueux frère : Kadirou*

*A tous mes ami(e)s : Soumia, Amina, Kheira, Souàd, Meriem, Rahima, Nor el houda je les remercie pour les moments agréables qu'on a passé ensemble que dieu vous protège et vous garde pour moi*

*A tous ceux que j'aime et je respecte.*

*Amel*

## ***Dédicaces***

*Rien n'est aussi beau à offrir que le fruit d'un labeur qu'on dédie du fond du coeur à ceux qu'on aime et qu'on remercie en exprimant la gratitude et la reconnaissance durant toute notre existence.*

*Je dédie ce modeste travail particulièrement à mes très chers parents, qui ont consacré leur existence à bâtir la mienne, pour leur soutien, patience et soucis de tendresse et d'affection pour tout ce qu'ils ont fait pour que je puisse arriver à ce stade, mes chers vous êtes ma source d'inspiration dans la vie.*

*A mes chères frère Abd-karim, Abd-el-kadar, et mes soeurs Rabha, Habiba, Sannaa ; mes frères vous êtes la source de joie et de bonheur, je vous Souhaite la réussite dans votre vie.*

*A toute ma famille.*

*A toutes mes amies de ma promotion surtout la section Protection des végétaux, particulièrement à Amel, Hassniya, Soumia*

*Et à tous ceux que j'ai connus durant mon cycle d'étude.*

*Khaira*

### Résumé

Le présent travail est consacré à l'étude de l'activité antifongique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques et médicinales en provenance de la région de Sidi Bel Abbès, *Rosmarinus officinalis* et *Citrus aurantium*, vis-à-vis de deux champignons phytopathogènes, *Fusarium oxysporum* et *Alternaria sp.* Responsables de fréquentes maladies chez la tomate.

Les résultats obtenus révèlent de bons rendements d'extraction avec des taux respectifs de 0,95 % et 0,54 % pour les huiles de *Rosmarinus officinalis* et de *Citrus aurantium*. L'étude du pouvoir antifongique a montré que les deux huiles essentielles testées possèdent des activités inhibitrices significatives sur les deux champignons pathogènes, enregistrant ainsi des taux d'inhibition de 89,84% (*Rosmarinus officinalis*) et 98,43% (*Citrus aurantium*). Cependant, l'huile essentielle de *Citrus aurantium* a montré, sur *Fusarium oxysporum*, une activité antifongique plus élevée par rapport à celle enregistrée par *Rosmarinus officinalis*. Par ailleurs, les deux huiles essentielles ont marqué le même effet inhibiteur vis-à-vis d'*Alternaria sp.* Cette forte activité antifongique est liée très probablement à l'inhibition de la croissance mycélienne notamment à de fortes concentrations des huiles essentielles.

**Mots clés :** *Rosmarinus officinalis* - *Citrus aurantium* - *Alternaria sp.* *Fusarium oxysporum* - effet antifongique - huile essentielle.

### Abstract

The current work was focused on the antifungal activity study of the essential oils of two aromatic and medicinal plants from Sidi Bel Abbas city, *Rosmarinus officinalis* and *Citrus aurantium*, screws two phytopathogenic fungi, *Fusarium oxysporium* and *Alternaria sp.*, responsible for frequent diseases in tomatoes.

The obtained results reveal good extraction yields with rates of 0.95% and 0.54% respectively for *Rosmarinus officinalis* and *Citrus aurantium* oils. The study of antifungal power showed that the two essential oils tested have significant inhibitory activities on both pathogenic fungi, thus recording inhibition rates of 89.84% (*Rosmarinus officinalis*) to 98.43% (*Citrus aurantium*). However, the essential oil of *Citrus aurantium* showed, on *Fusarium oxysporium*, a higher antifungal activity compared to that recorded by *Rosmarinus officinalis*. In addition, the two essential oils marked the same inhibitory effect screws *Alternaria sp.* This strong antifungal activity is most likely related to the inhibition of mycelia growth including high concentrations of essential oils.

**Keywords:** *Rosmarinus officinalis* - *Citrus aurantium* – *Alternaria sp.* - *Fusarium oxysporium*– antifungal effect - essential oil.

## ملخص

يتم تكريس هذا العمل لدراسة النشاط المضاد للفطريات للزيوت الأساسية من النباتات العطرية والطبية من منطقة سيدي بلعباس، *Rosmarinus officinalis* و *Citrus aurantium*، مقابل اثنين من الفطر النباتي، *Fusarium oxysporium* و *Alternaria sp.*، مسؤولة عن الأمراض المتكررة في الطماطم.

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها عوائد استخلاص جيدة بمعدلات 0.95% و 0.54% لزيوت *Rosmarinus officinalis* وزيوت *Citrus aurantium*. أظهرت دراسة القوة المضادة للفطريات أن للزيوت الأساسية المختبرة نشاط مثبط كبير على الفطرين المرضيين، وبذلك سجلت معدلات تثبيط 89.84% (*Rosmarinus officinalis*) إلى 98.43% (*Citrus aurantium*). ومع ذلك، أظهر الزيت العطري لعطر *Citrus aurantium*، على *Fusarium oxysporium*، نشاطاً مضاداً للفطريات أعلى مقارنةً بتلك التي سجلها *Rosmarinus officinalis*. علاوة على ذلك، أظهر الزيتان الأساسيان نفس التأثير المثبط ضد *Alternaria sp.* من المحتمل جداً أن يكون هذا النشاط المضاد للفطريات مرتبطاً بتثبيط نمو الفطريات، لا سيما عند التركيزات العالية من الزيوت الأساسية.

الكلمات المفتاحية: *Alternaria sp.* - *Citrus aurantium* - *Rosmarinus officinalis*

- *Fusarium oxysporium* - التأثير المضاد للفطريات - الزيت العطري.

## Liste des figures

<b>Figure 01:</b> Aspects morphologiques du Romarin	04
<b>Figure 02 :</b> Photo du bigaradier (orange amère)	07
<b>Figure 03 :</b> Distribution géographique du bigaradier	11
<b>Figure 04 :</b> Modes d'extraction des huiles essentielles	15
<b>Figure 05 :</b> Schéma de l'appareillage d'hydro-distillation	16
<b>Figure 06:</b> La méthode d'hydro diffusion	17
<b>Figure 07:</b> Caractères morphologiques des <i>Fusarium</i>	23
<b>Figure 08 :</b> Symptômes de <i>Fusarium oxysporum</i> sur les feuilles et les tiges de la tomate	25
<b>Figure 09 :</b> Cycle évolutif d' <i>Alternaria sp.</i> sur la tomate et la pomme de terre	28
<b>Figure 10:</b> Symptômes d'Alternariose sur plant de tomate (fruit, feuille et tige)	30
<b>Figure 11:</b> localisation géographique de la zone d'étude	32
<b>Figure 12 :</b> Bigaradier <i>Citrus aurantium</i>	33
<b>Figure 13:</b> Feuilles sèches du Romarin ( <i>Rosmarinus officinalis</i> )	33
<b>Figure 14:</b> Feuilles sèches du Bigaradier ( <i>Citrus aurantium</i> )	34
Figure 15 : a) <i>Fusarium oxysporium</i> après 7 jour de cultue. b) <i>Alternaria sp.</i> après 7 jours de culture	35
<b>Figure16 :</b> Dispositif de l'extraction d' hydro stillation	36
<b>Figure 17:</b> Illustration de l'aromatogramme par la méthode de contact direct	38
<b>Figure 18:</b> Croissance mycélienne de <i>Fusarium oxysporum</i> après traitement par l'HE de <i>Citrus aurantium</i>	43
<b>Figure 19:</b> Croissance mycélienne de <i>Fusarium oxysporum</i> après traitement par	44

l'HE de <i>Rosmarinus officinalis</i>	
<b>Figure 20:</b> Croissance mycélienne d' <i>Alternaria sp.</i> après traitement par l'HE de <i>Citrus aurantium</i>	45
<b>Figure 21:</b> Croissance mycélienne d' <i>Alternaria sp.</i> après traitement par l'HE de <i>Rosmarinus officinalis</i>	46
<b>Figure 22:</b> Taux d'inhibition (TI) des HEs sur <i>Fusarium oxysporum</i>	47
<b>Figure 23:</b> Taux d'inhibition (TI) des HEs sur <i>Alternaria sp.</i>	48
<b>Figure 24 :</b> Photo des témoins la croissance mécylienne de <i>Fusarium oxysporium</i> au septième jour.	62
<b>Figure 25 :</b> Photo des témoins de la croissance mécylienne d' <i>Alternaria sp.</i> au septième jour (photo originale 2021).	63
<b>Figure 26 :</b> Photo de la croissance mycélienne de <i>Fusarium oxysporium</i> au septième jour en fonction des différentes concentrations appliquées de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantium</i> .	64
<b>Figure 27 :</b> Photo de la croissance mycélienne de <i>Alternaria sp.</i> au septième jour en fonction des différentes concentrations appliquées de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> .	65
<b>Figure 28 :</b> Photo de la croissance mycélienne d' <i>Alternaria sp.</i> au septième jour en fonction des différentes concentrations appliquées de l'huile essentielle de <i>Citrus aurantium</i> .	65

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01:</b> Composition de l'huile essentielle du romarin	05
<b>Tableau 02 :</b> Position systématique du bigaradier	09
<b>Tableau 03 :</b> Composition chimique du fruit de Citrus	10
<b>Tableau 04 :</b> Les souches fongiques testées	34
<b>Tableau 05 :</b> Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles de <i>Rosmarinus Officinalis</i> et de <i>Citrus Aurantium</i>	40
<b>Tableau 06 :</b> Rendement des huiles essentielles des deux plantes	41

## Liste des abréviations

**HE** : Huile essentielle

**PDA**: Potato Dextrose Agar

**Rd** : rendement

**%** : Pourcentage.

**AFNOR** : association française de Normalisation.

**C°** : degrés Celsius

**F** : fusarium

**FORL** : fusarium oxysporium f.sp. Radicis-lycopersici

**pH** : potentiel hydrogène

**ml**: Millilitre

**Rdt** : le rendement en huile essentielle

**M** : Masse d'huile essentielle récupéré(g)

**M0** : Masse de matière végétale à traiter (g)

**Mm**: Millimètre

**L** : croissance mycélienne

**D** : diamètre de la colonie

**d**: diamètre de l'explant

**I'%** : taux d'inhibition exprimé en pourcentage

**dC** : Diamètre de colonies dans les boites «témoins positifs »

**dE** : Diamètre de colonie dans les boites contenant l'extrait de plante

**HEs** : huiles essentielles.

**TI**: taux d'inhibition.

Les plantes sont continuellement soumises à un ensemble de bioagresseurs provoquant des maladies et des dégâts qui ont un fort impact sur la production agricole. Pour augmenter le rendement et éviter les pertes post-récolte, les producteurs agricoles ont de plus en plus recours aux pesticides chimiques, et donc automatiquement à une pollution de plus en plus accrue sur l'environnement. En effet, dans le cadre d'une agriculture largement intensive, l'usage de produits phytosanitaires est devenu quasiment systématique car en contrôlant ces bioagresseurs, il permet de maintenir un haut niveau de productivité (**Spiga, 2016**).

Afin de surmonter les problèmes liés à l'utilisation des concentrations élevées des produits engendrant un risque de haut niveau de résidus toxiques de ces produits qui ne sont pas bénéfiques pour l'homme et l'environnement, les chercheurs se sont intéressés à la recherche de substances à partir d'extraits des plantes pour le contrôle de ces maladies dans l'agriculture et qui ne sont pas nocifs pour la santé humaine et l'environnement (**Duru et al., 2003**).

Pour remédier à toutes ces contraintes, des solutions alternatives à la lutte chimique doivent être envisagées. En effet, dans le cadre d'élaboration de nouvelles méthodes alternatives, de nombreux travaux de recherche ont été entrepris, dans le but de minimiser les dégâts causés par les agents pathogènes, attaquant les cultures en post-récoltes. Ces derniers ont porté essentiellement, sur l'utilisation de nombreux produits (**Youssef et al., 2012**).

Il semble que l'utilisation des essences végétales de certaines plantes aromatiques et médicinales est l'une des stratégies efficaces de lutte contre les maladies des végétaux en post-récolte, et ceci en raison de leurs propriétés antimicrobiennes, antioxydantes et antifongiques (**Talibi et al., 2012**).

Cependant, l'utilisation des huiles essentielles dans la lutte contre les maladies fongiques reste limitée, d'où l'intérêt de la présente étude, portant sur l'évaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* et du bigaradier (Orange amère) sur deux champignons *Fusarium oxysporum* et *Alternaria sp.* par contact.

Ce modeste mémoire est subdivisé en deux grandes parties : bibliographique et expérimentale. Dans un premier temps, notre travail englobe une synthèse bibliographique portant sur trois chapitres :

- chapitre I : les plantes médicinales : ce chapitre porte sur les deux plantes utilisées dans le présent travail ; le Romarin et le Bigaradier.

- chapitre II : les huiles essentielles : généralités, propriétés, rôles, différentes méthodes d'extractions des huiles essentielles...etc
- chapitre III : les souches de champignons. Ce chapitre est consacré à l'étude de deux souches de champignons phytopathogènes : *Fusarium oxysporum* et *Alternarien sp.*

La partie expérimentale est subdivisée en deux chapitres :

- chapitre III : matériels et méthodes, dans lequel nous développons les différents matériels et méthodes utilisés pour la réalisation de ce travail.
- chapitre IV : résultats et discussion, consacré aux analyses, commentaires et discussion des résultats obtenus.

Signalons enfin que l'étude expérimentale de ce mémoire a été réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie du département d'Agronomie, faculté des sciences de la nature et de la vie, université Djilali Liabes de Sidi Bel Abbès, Algérie.

## *Partie bibliographique*

**CHAPITRE I :**  
*Les plantes médicinales*

### I. Généralités sur les plantes médicinales

Les plantes médicinales sont riches en métabolites secondaires importantes pour la recherche pharmaceutique et l'élaboration des médicaments, utilisés directement comme agents thérapeutiques (**Decaux, 2002**), et quoi qu'ils n'entrent pas dans le fonctionnement vital de la plante, ils présentent un intérêt substantiel dans les relations de la plante avec son environnement et entrent dans les mécanismes de défense contre les attaques extérieures, considérés comme une réponse aux stress biotiques et abiotiques (**Hartmann, 2007**).

#### I.1. *Rosmarinus officinalis* L.

##### I.1.1. Description botanique

Le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) est un arbrisseau de la famille des Labiées, répandu sur toutes les rives de la méditerranée (**Gildemeister et Hoffmann, 1912**). Il est dominant dans les communautés arbustives post-feu, principalement dans les sols calcaires. Il s'agit d'un germe à semences obligatoire et à floraison abondante. Son caractère ensoleillé et son effort de reproduction élevé lui permettent de coloniser les paysages découverts (**Sardans et al., 2005**). C'est un arbrisseau toujours vert de 0,5 à 2 m. la tige ligneuse est couverte d'une écorce grisâtre et se divise en de nombreux rameaux opposés. Les feuilles sont sessiles, opposées et coriaces; enroulées sur les bords. Les fleurs bleu violacées, visible de janvier à mai. Sont groupées en grappe à l'extrémité des rameaux le fruit à une forme ovoïde, entouré par un calice brun et persistant. L'inflorescence et le calice ont une pilosité très courte; l'inflorescence est en épis très courts et les bractées mesurent 1 à 2 mm.

La reproduction peut se faire par voies sexuée (graine) et asexuée (bouture et éclat de touffes). Les modes de dissémination qui lui sont propres sont : la gravité, le vent, l'eau, les animaux (mammifères, oiseaux, insectes) l'homme (**Chfai et al., 2014**).



**Figure 01:** Aspects morphologiques du Romarin (Frouhat et Lahcini, 2013).

### I.1.2. Systématique botanique de la plante:

La systématique botanique est pour un chercheur la carte d'identification de la plante et sans cette dernière, il est très difficile d'entamer un travail de recherche (Zoubeidi, 2004).

La connaissance de l'origine botanique de la plante destinée à l'obtention de son huile essentielle est nécessaire aussi pour les applications futures, en parfumerie, en cosmétique, en pharmacie et même en agroalimentaire. L'identité de la matière initiale (plante ou partie de plante) est indispensable pour la traçabilité et pour éviter les éventuelles fraudes.

L'identification est effectuée par le fournisseur qui doit présenter un certificat d'analyse, l'acheteur, quant à lui, devrait aussi faire les tests de confirmation (Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2013).

Le romarin tien son nom du latin, ros, rosée, et marinus, de mer : allusion à son parfum et à son habitat sur les coteaux maritimes. Sa taxonomie botanique a été mentionnée par Quezel et Santa (1963) est comme suit : (tableau : de classification)

<b>Règne :</b> Plantae.
<b>Embranchement:</b> Spermaphytes.

<b>S/Emb</b> : Angiospermes.
<b>Classe</b> : Dicotylédones.
<b>S/Classe</b> : Gamopétales.
<b>Ordre</b> : Lamiales.
<b>Famille</b> : Lamiaceae.
<b>Genre</b> : <i>Rosmarinus</i> .
<b>Espèce</b> : <i>Rosmarinus officinalis</i> .

### **I.1.3. Composition chimique de *Rosmarinus officinalis* :**

La composition chimique de la plante dépend du lieu et du moment de la récolte ou l'idéal est de la récoltée lorsque le végétal à le maximum d'essence. La plante entière contient des acides organiques (acide rosmarinique), des flavonoïdes et une huile essentielle (**Cronquist, 1981**).

En plus de l'huile essentielle on trouve dans le romarin : des dérivés triterpéniques, des acides phénoliques et des acides gras organiques (**Lanfranchi et al., 2010**).

#### **I.1.3.1. Les huiles essentielles :**

L'huile essentielle est constituée de plusieurs molécules chimiques de synthèse naturelle. Ces molécules sont différentes selon la nature de la plante et le sol dans lequel la plante va croître, le temps de récolte, la partie de la plante, la préparation de l'échantillon, ainsi que la méthode d'extraction. Les molécules sont formées à partir de divers atomes puisés par la plante via le sol et via sa synthèse organique. L'ensemble constitue des réactions chimiques donnant naissance aux molécules aromatiques, constituant l'huile essentielle (**Bousbia, 2011**).

La composition chimique des extraits dépend largement de l'influence des conditions du mode d'extraction sur l'essence contenue dans la plante. Les extraits ainsi que de nombreux dérivés porteurs de fonctions diverses sont constitués principalement de composés terpéniques. Les terpènes sont très répandus dans la nature et surtout dans les plantes comme constituants des huiles essentielles. Ils sont issus d'une voie métabolique secondaire de l'acide mévalonique (**tableau 01**) (**Zermane, 2010**).

**Tableau 01:** Composition de l'huile essentielle du romarin (Zermane, 2010).

<b>Monoterpènes</b>	<b>Acycliques</b>	myrcène linalol
	<b>Monocycliques</b>	terpinéol-4 $\alpha$ -terpinéol cinéole limonène
	<b>Aromatiques</b>	P-cymène
	<b>Bicycliques</b>	$\alpha$ -pinène camphène verbénone camphre bornéole acétate de bornyle
<b>Sesquiterpènes</b>		caryophyllène humulène

### I.1.4. Distribution géographique

*Rosmarinus officinalis* est une plante originaire du bassin méditerranéen qui se développe spontanément en plusieurs endroits privilégiant un sol calcaire, de faible altitude, ensoleillé et sec (Gravot, 2008). Le romarin se trouve dans toutes les contrées mondiales, et en Europe, plus particulièrement sur le pourtour méditerranéen (Iserin, 2001).

### I.1.5. Intérêt de *Rosmarinus officinalis* L.:

#### I.1.5.1. Intérêt écologique :

Le romarin peut être retrouvé à l'état sauvage, comme peut être cultivé. C'est la plante la plus populaire dans le bassin méditerranéen ; en Algérie, nous la trouvons dans les jardins, les parcs en bordure odorante des sociétés, des écoles... Les fleurs s'épanouissent tout au long de l'année ce qui attire de nombreux insectes (Boulezzen, 2017).

#### I.1.5.2. Intérêt médicinal :

Le romarin a des usages multiples et est cultivé à des fins commerciales. Si l'on souffre d'hypotension, de dépression, de fatigue chronique, il est conseillé de mâcher des feuilles de romarin. Il peut être efficace aussi en cas de trouble de mémoire. En règle générale, il doit

néanmoins être utilisé avec précaution, car en cas de surdosage il peut provoquer un empoisonnement (**Kunkele et Lobmeyer, 2007**).

### I.1.6. Activité antifongique :

Le romarin (*Rosmarinus officinalis L*) présente des activités inhibitrices sur la germination des spores ou des arthrospores de tous les dermatophytes testés à des concentrations allant de 0,001 à 4%. Cette action a été plus forte sur les souches fongiques anthropophiles et avec de moindres concentrations (**Ouraini et al., 2005**). La biosynthèse de l'aflatoxine a été inhibée totalement par l'huile essentielle du Romarin à une concentration de 450 ppm. (**Rasooli et al., 2008**). En évaluant l'activité biologique de 11 huiles essentielles y compris celle du *Rosmarinus*, en utilisant la technique standard de diffusion sur gélose, les résultats ont montré que ces huiles ont une activité inhibitrice modérée sur les levures examinées (**Sacchetti et al., 2005**).

### I.2. Le bigaradier :

#### I.2.1. Présentation de la famille des Rutacées :

Appartenant à l'ordre des sapindales, la famille des Rutaceae compte environ 900 espèces réparties en 150 genres. Les espèces sont distribuées et répandues sur presque tous les continents excepté l'Antarctique (**Shwart, 2011**). Selon **Scora (1988)**, le nord de l'Inde, les régions proches de la Birmanie et de la Chine, auraient abrité l'existence et l'apparition de *Citrus limon*, *Citrus aurantium* et *Citrus sinensis*. Le Vietnam, le sud de la Chine et le Japon seraient la zone de diversification de *Citrus reticulata* (**Bedrane, 2020**). La diffusion des Rutaceae en particulier les Agrumes à travers le monde s'est fait très lentement. Le bigaradier, le citronnier et l'oranger ont été introduites dans le bassin méditerranéen vers la moitié du XIIe siècle, et le mandarinier au XIXe siècle. Leur introduction en Afrique a été faite par les arabes et hindous vers le XIVe siècle. (**Spiegel- Roylet Goldschmidt, 1996**).

#### I.2.2. Généralité sur le bigaradier :

L'oranger amère appartient à la famille des Rutaceae, genre *Citrus*. Il est aussi appelé oranger de Séville ou bigaradier, il pousse sous un climat subtropical (**Deterre, 2012**).

Il est connue pour son goût extrêmement amer et aigre (**Bocco et al., 1998**). En raison de ce goût, les oranges amères ne sont pas employées comme fruits comestibles, elles sont plutôt

utilisées pour la fabrication de jus et des marmelades (confitures d'orange) (Ersus *et al.*, 2007).



**Figure 02 :** Photo du bigaradier (orange amère) (Ghédira and Goetz, 2015)

### I.2.3. Description botanique :

L'oranger amère est un grand arbre atteignant de 5 à 8 m de haut, avec des feuilles vertes toujours vert et brillant, les fleurs blancs très purs, d'odeur agréable possèdent 5 à 8 pétale (Ghédira et Goetz, 2015) . Le fruit fait environ 7 cm de diamètre avec une écorce dure et une pulpe très acide. Il est très résistant au froid, à l'excès d'eau et à quelques maladies (Deterre, 2012).

Le bigaradier est utilisé comme porte greffe pour ses nombreuses qualités :

- La résistance à la gommose (Phytophthora qui provoque le dépérissement rapide des racines).
- La compatibilité satisfaisante avec les autres grandes variétés (*Citrus sinensis* et le citronnier).
- La production abondante de fruits de bonne qualité (Medjdoub, 1996).

### I.2.4. Classification botanique :

Le tableau ci-dessous montre la position systématique du bigaradier.

**Tableau 02:** Position systématique du bigaradier (Manner Harley *et al.*, 2006).

<b>Règne</b>	Végétal
<b>Division</b>	Embroyophyta
<b>Sous-division</b>	Angiospermes
<b>Classe</b>	Dicotyledoneae
<b>Sous-classe</b>	Archychalmydeae
<b>Ordre</b>	Géraniale
<b>Sous-ordre</b>	Géraniineae
<b>Famille</b>	Rutaceae
<b>Sous-famille</b>	Aurantiodeae
<b>Tribus</b>	Citreae
<b>Sous-tribus</b>	Citrinae
<b>Genre</b>	Citrus
<b>Espèce</b>	<i>Citrus aurantium</i>

### I.2.5. Composition chimique :

Le tableau (03) présente la composition chimique du bigaradier ou l'orange amère.

**Tableau 03** : composition chimique du fruit de *Citrus aurantium* (Sidana et al., 2013)

<b>Humidité (g)</b>	87,6
<b>Protéines (g)</b>	0,7
<b>Matière grasse v</b>	0,2
<b>Fibres (g)</b>	0,3
<b>Carbohydrates (g)</b>	10,9
<b>Minéraux (g)</b>	0,3
<b>Calcium (mg)</b>	26
<b>Phosphore (mg)</b>	20
<b>Vitamine C (mg)</b>	30
<b>Carotène (mg)</b>	1004
<b>Energie (k.cl)</b>	48

### I.2.6. Répartition géographique :

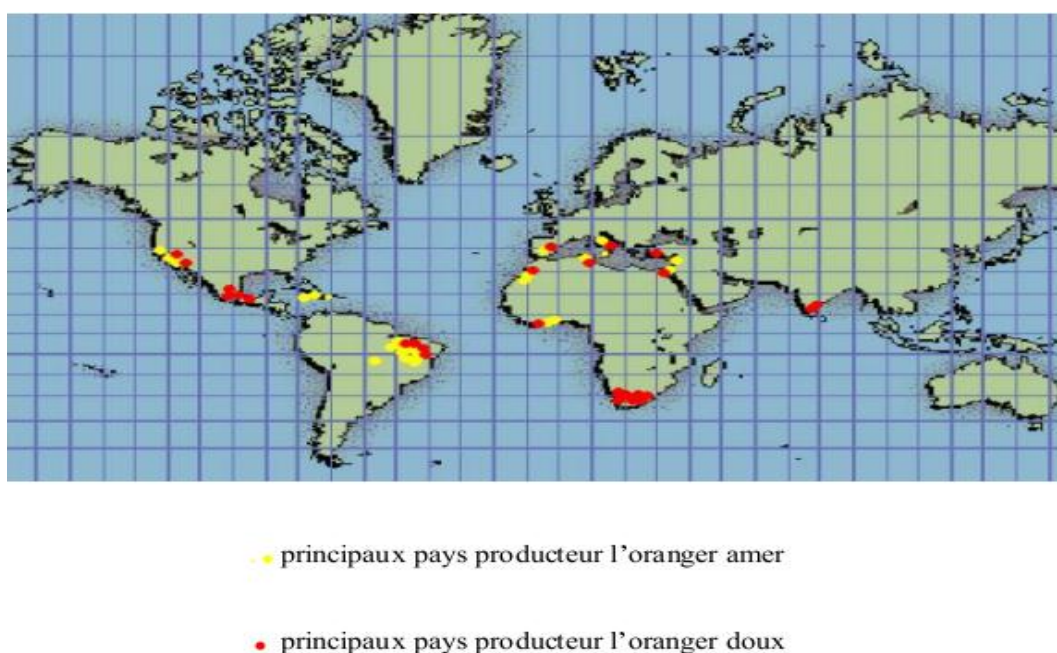
Le bigaradier est passé de la Chine vers l'Inde, l'Arabie et enfin l'Egypte. Il est introduit en Europe grâce aux arabes qui l'introduisirent en Sicile au XIème siècle. Il est cultivé en Amérique centrale et en Amérique du sud ainsi que dans le bassin méditerranéen (Ferhat et al., 2010).

C'est le plus résistant des citrus, il sert donc de porte greffe à tous les autres. Les principaux pays producteurs sont :

- ✓ Italie (en Calabre dans la province de Reggio) ;
- ✓ Sicile (provinces de Palerme, Messine, Syracuse) ;
- ✓ Espagne (plus particulièrement en Andalousie) ;
- ✓ Afrique du Nord (le Maroc, la Tunisie, la cote d'ivoire) ;
- ✓ Proche orient (en Israël, au Liban)

- ✓ La Californie aux États-Unis ;
- ✓ Brésil ;
- ✓ Les grandes Antilles (la Jamaïque, porte Rico et Haïti) ;
- ✓ Paraguay.
- ✓ Les principaux pays exportateurs sont : l'Espagne, le Portugal, l'Israël, la Grèce(Crète) l'ouest de l'inde. (Teuscheret *et al.*, 2005) Il se reproduit toujours par semis.

Ainsi, l'oranger amer se cultive en terrasses dans un climat tempéré aux températures douces l'hiver (minimum de -30C) et chaudes l'été. En effet, il demande un apport relativement faible en eau (2 à 3 arrosages par mois) car son principal facteur de croissance est le soleil. Malgré les conditions de température et d'ensoleillement, le bigaradier n'exige pas un sol particulier, seulement qu'il ne soit pas trop siliceux (Giraudn, 1993).



**Figure 03 :** Distribution géographique du bigaradier (Encyclopedie Encarta, 2006).

### I.2.7. Activités biologiques du Bigaradier:

Plusieurs activités biologiques de *Citrus aurantium* ont été rapportées dans des études antécédentes. L'orange amère est utilisée comme sédatif léger et hypnotique pour ses vertus apaisante, calmante et motrice. Il est également utilisé pour traiter l'insomnie. L'odeur d'orange amère diminue les symptômes d'anxiété, améliore l'humeur et crée un sentiment de bien-être (Dosoky et Setzer, 2018). L'huile essentielle est connue pour ses propriétés anti-

infectieuses, analgésiques, anesthésiantes, cicatrisantes, bactéricides et antiseptiques **(Ghédira et Goetz, 2015)**.

L'huile essentielle de l'orange amère a montré une bonne activité de piégeage des radicaux libres, due en grande partie à la teneur élevée en limonène, efficace pour réduire le stress oxydatif. L'activité antibactérienne de l'orange amère a été rapportée contre plusieurs espèces pathogènes telle que, *Listeria innocua*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, et *Aeromonas hydrophila* **(Dosoky et Setzer, 2018)**.

# ***CHAPITRE II :***

*Les huiles essentielles*

### II.1. Généralités sur les huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont des substances huileuses, volatiles et odorantes qui sont sécrétées par les plantes aromatiques que l'on extrait par divers procédés dont l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation (Iserin *et al.* , 2007), par pressage ou incision des végétaux qui les contiennent.

Elles sont très utilisées dans l'industrie des produits cosmétiques, pharmaceutiques et agro-alimentaire (Kaloustian *et al.* , 2008 ). Les huiles essentielles se retrouvent dans des glandes minuscules situées dans différentes parties de la plante aromatique : les feuilles, les fleurs, les fruits, les graines, l'écorce et pour certaines plantes dans les racines.

Les huiles essentielles des plantes ont trouvé leur place en aromathérapie, en pharmacie, en parfumerie, en cosmétique et dans la conservation des aliments. Leur utilisation est liée à leurs larges spectres d'activités biologiques reconnues (Amarti , 2009).

### II.2. Propriétés des huiles essentielles :

D'après Bruneton (1999), les huiles essentielles forment un groupe très homogène caractérisé par les propriétés physiques suivantes :

- Les huiles essentielles sont des substances liquides à température ambiante, elles sont incolores ou jaunes.
- Leur densité est inférieure à celle de l'eau.
- Elles sont très altérables, sensibles à l'oxydation.
- Elles sont solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques, mais peu solubles dans l'eau.
- Le point d'ébullition se situe entre 60° C et 240° C.
- Elles perdent rapidement leurs propriétés quand elles sont exposées à la chaleur ou même à la lumière.

### II.3. Caractéristiques organoleptiques :

Chaque extrait est caractérisé par ces propriétés organoleptiques telles que l'odeur, l'aspect et la couleur (Yaacoub et Tlidjane, 2018).

- a) **L'odeur** : L'odorat est un sens chimique très sensible et l'habileté des parfumeurs à classer et caractériser des substances chimiques parviennent à

doser les produits naturels et leur perception peut aller jusqu'au dix millionnièmes de grammes par litre d'air.

- b) **La couleur** : La coloration d'une huile essentielle dépend des produits qui la constituent. Certains solvants ont le pouvoir d'extraire beaucoup de pigments, ce qui intensifie la couleur d'une huile donnée.
- c) **L'aspect** : L'aspect d'un extrait dépend des produits qui la constituent, qui peuvent nous apparaître sous forme solide, liquide ou bien solide- liquide.

### II.4. Localisation des huiles essentielle

Les huiles essentielles sont produites dans le protoplasme cellulaire des plantes aromatiques et représentent les produits du métabolisme secondaire (**Dorosso Sonate, 2002**).

La synthèse et l'accumulation de ces métabolites dans les organes sont associées à la présence de structures histologique spécialisées : cellules sécrétrices. Les cellules sécrétrices sont rarement isolées, mais le plus souvent regroupées dans des poches (Myrtaceae, Rutaceae) dans des canaux sécréteurs (Apiaceae, Composeae) ou dans des poils sécréteurs(Lamiacées). Ces cellules sont le plus souvent à la périphérie des organes extérieurs de la plante.

(**Kaloustian et Hadji-Minaglo, 2012**).

La partie de la plante utilisée pour obtenir l'huile essentielle doit être précisée, soit pour des questions de rendement (par exemple : la fleur de lavande contient beaucoup plus d'huile essentielle que la tige), soit parce que la composition chimique de la partie considérée conduira a une application spécifique très intéressante ; c'est le cas d'oranger amer « *Citrus aurantium*, Rutaceae »: l'épicarpe frais du fruit fournit l'essence de Curaçao utilisée pour confectionner des cocktails, les fleurs fournissent l'huile de Neroli (eau de fleur d'oranger amer), les feuilles et les petits rameaux fournissent l'essence de petit grain de bigaradier.

### II.5. La composition chimique des huiles essentielles

Selon **Bachelot et al. (2006)**, la composition biochimique des huiles essentielles est souvent complexe qui leur confère toutes leurs propriétés, elles peuvent être composées d'une centaine de molécules. Les huiles essentielles pures et naturelles sont les seules à posséder la bonne concentration de composés chimiques, et donc les propriétés adéquates.

De même, la composition des huiles essentielles d'une même espèce varie selon la localisation géographique, les conditions climatiques, la période de récolte...Par conséquent, leurs

propriétés varient également. Il est donc important de sélectionner une huile essentielle standardisée dont les composants actifs sont clairement identifiés et quantifiés (**Caillet, 2008**).

D'après **Couderc (2001) et Desmares et al. (2008)**, les constituants des huiles essentielles appartenant de façon quasi-exclusive à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes: le groupe des terpenoïdes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane beaucoup moins fréquent d'autre part. Le poids moléculaire des composés est assez faible, généralement compris entre 150 et 200.

### **II.6. Rôle des huiles essentielles :**

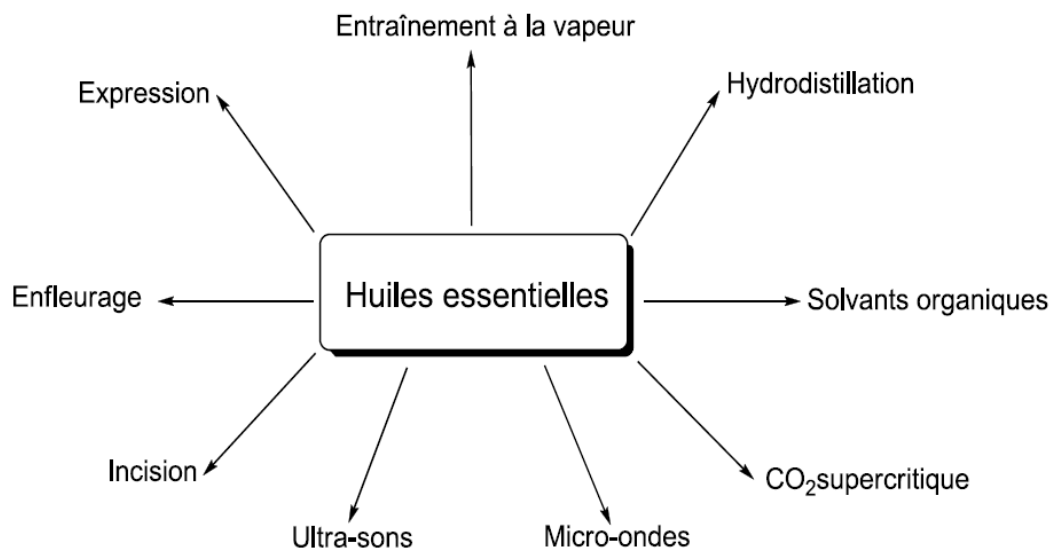
Les huiles essentielles sont des messagers chimiques utilisés par les plantes aromatiques pour interagir avec leur environnement. Les huiles essentielles permettent d'éloigner les maladies, les parasites, mais aussi jouent un rôle protecteur face aux rayonnements du soleil. Les huiles essentielles jouent un rôle important dans la reproduction et la dispersion des espèces végétales puisqu'elles permettent d'attirer les insectes pollinisateurs.

### **II.7. Les techniques d'extraction des huiles essentielles :**

Plusieurs méthodes sont connues pour extraire les essences aromatiques des végétaux. Les principales méthodes d'extraction sont basées sur l'entraînement à la vapeur d'eau, l'expression, la solubilité et la volatilité. Chacune d'elles donne une image différente de la composition de l'huile essentielle du produit.

La méthode choisie pour l'extraction des huiles essentielles doit être la plus efficace et qui donnerait une huile essentielle de très bonne qualité, un rendement élevé avec un coût économique faible. L'huile essentielle obtenue doit être limpide, concentrée, d'odeur fine caractéristique de la partie de la plante utilisée et ne doit contenir aucune trace de solvant (**Hernandez, 2005**).

Parmi les méthodes d'extraction nous citons :



**Figure 04 :** Modes d'extraction des huiles essentielles (Bruneton, 2016)

### II.7.1. Hydro distillation :

L'extraction des huiles essentielle par hydro distillation est réaliser par un appareil de type Clevenger. Il comprend un ballon de capacité de deux litres contenant de l'eau bouillonnante en contact direct avec la matière végétale. Ce ballon est connecté à un réfrigérant qui sert à condenser la vapeur d'eau contenant l'huile essentielle extraite, le distillat est récupéré dans un ballon ou un bécher (Boutekedjiret, 1999).

L'eau et les molécules aromatiques sont hétérogènes du fait de leurs différences de densité et se séparent après décantation en une phase aqueuse et une phase organique (l'huile essentielle) (Festy, 2011). D'après Garnero (1991), la durée de la distillation influe non seulement sur le rendement mais également sur la composition de l'extrait.

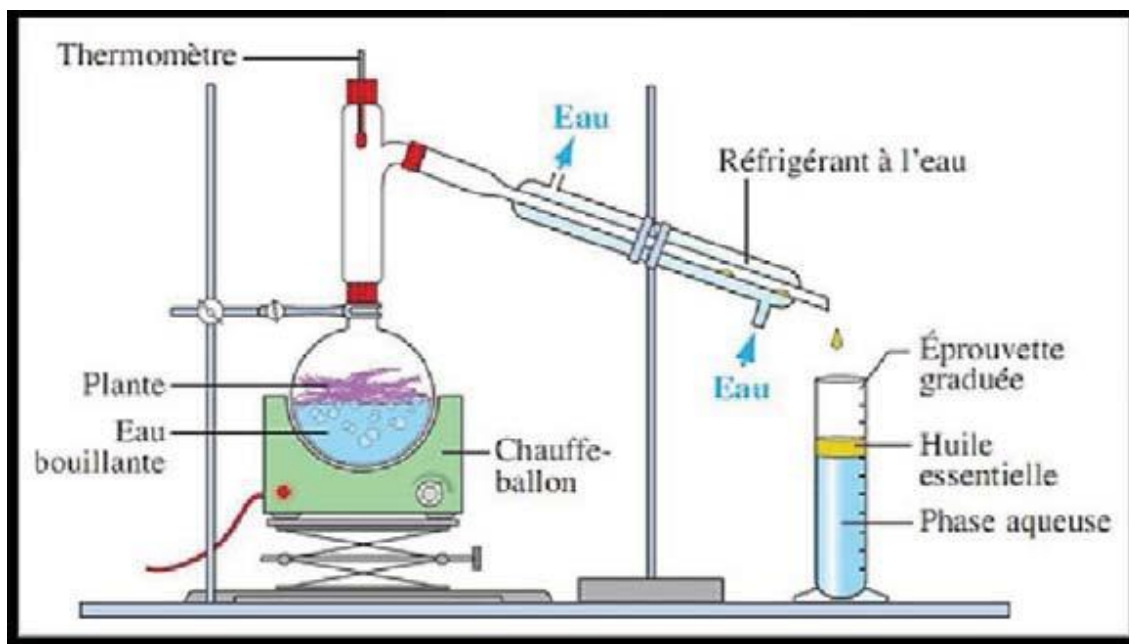


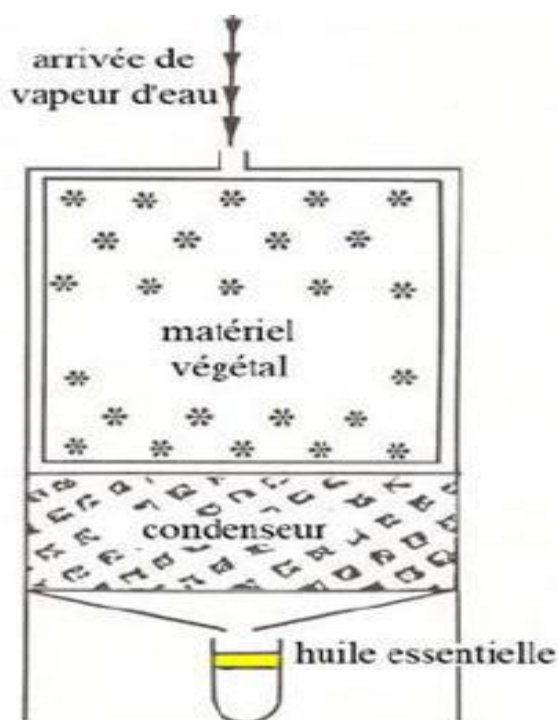
Figure 05 : Schéma de l'appareillage d'hydro-distillation (Hernandez, 2005)

### II.7.2. Extraction par expression à froid :

Cette méthode est utilisée pour extraire les huiles essentielles des agrumes qui ne supportent pas les préparations à chaud. Ce procédé consiste soit à presser les péricarpes sous un courant d'eau, soit à écraser les agrumes entiers entre des cylindres mécaniques, puis séparer l'huile de l'eau en utilisant un décanteur ou une centrifugeuse (Khalfi et Habbes, 2007).

### II.7.3. Hydro diffusion :

L'hydro diffusion consiste à pulser de la vapeur d'eau à très faible pression à travers la masse végétale, du haut vers le bas (Fekih, 2015). La condensation du mélange de vapeur contenant l'huile se produit sous la grille retenant la matière végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils. De plus, l'hydro diffusion permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur. (Elhaib, 2011).



**Figure 06:** La méthode d'hydro diffusion (Elhaib A2011).

### II.7.4. Extraction par les solvants organiques :

La technique d'extraction par solvant organique, consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique. Les solvants les plus utilisés sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol, le méthanol, le dichlorométhane et l'acétone. Le solvant choisi, en plus d'être autorisé devra posséder une certaine stabilité face à la lumière, la chaleur ou l'oxygène, sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait. L'extraction est réalisée avec un appareil de Soxhlet (Brian, 1995).

### II.7.5. Extraction au gaz CO<sub>2</sub> supercritique :

La technique est fondée sur la solubilité des constituants dans le dioxyde de carbone à l'état supercritique. Grâce à cette propriété, le dioxyde de carbone permet l'extraction dans le domaine liquide (supercritique) et la séparation dans le domaine gazeux. Le dioxyde de carbone est liquéfié par refroidissement et comprimé à la pression d'extraction choisie. Il est ensuite injecté dans l'extracteur contenant le matériel végétal, puis le liquide se détend pour se convertir à l'état gazeux pour être conduit vers un séparateur où il sera séparé en extrait et en solvant (Dastmalchi et Keyvan, 2008).

Le CO<sub>2</sub> est inerte, non toxique et accessible à un prix raisonnable pour un degré de pureté élevé.

De plus, il est gazeux à température ambiante, ce qui facilite la récupération de l'extrait final en ne laissant aucun résidu toxique (Muther, 2015).

### II.7.6. Extraction par enfleurage :

L'enfleurage est une technique assez difficile. Elle date de l'antiquité égyptienne et est basée sur la forte affinité des molécules odorantes pour les graisses. Elle est réservée principalement aux organes fragiles que sont les fleurs (violette, tubéreuse, jasmin...). Celles-ci sont étalées délicatement sur des plaques de verre enduites de graisse qui va absorber les substances volatiles. Ces graisses sont ensuite épuisées à l'alcool. Ce procédé a tendance à disparaître car il nécessite beaucoup de main-d'œuvre (Sallé, 1991).

### II.8. Activités biologiques des huiles essentielles :

#### II.8.2. Activité antioxydant :

Les antioxydants sont des substances capables de protéger l'organisme contre les effets du stress oxydatif (Beirao et Bernardro-Gil, 2006).

On distingue trois types d'antioxydants enzymatiques, les enzymes de réparation, et les antioxydants non enzymatiques, les substances naturelles dont les huiles essentielles sont classées tant qu'antioxydants non enzymatiques. L'activité antioxydante peut être primaire ou préventive (indirecte), cette dernière est capable de retarder l'oxydation par des mécanismes indirects tels que la réduction d'oxygène (Madhavi *et al.*, 1996).

Par contre les antioxydants à réaction directe sont capables de donner des électrons d'oxygène radicalaire afin qu'ils puissent le piéger, empêchant ainsi la destruction des structures biologiques. Ils peuvent agir comme agents réducteurs capable de passer leurs électrons aux ROS et les éliminer (Kohen et Nyska, 2002).

Quelques travaux ont rapporté que certaines huiles essentielles sont plus efficaces que les antioxydants synthétiques (Hussain *et al.*, 2010). Les effets antioxydants d'huiles essentielles et d'extraits des plantes sont dus principalement à la présence des groupes d'hydroxyle dans leur structure chimique (Hussain *et al.*, 2009).

#### II.8.2. Activité antibactérienne :

L'une des premières mises en évidence in vitro de l'activité antibactérienne des huiles essentielles date de la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, lorsque Buchholtz a étudié la croissance des propriétés inhibitrices de l'huile des graines de carvi et de thym en 1875. Toutefois, il aura fallu attendre le début du XX<sup>ème</sup> siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser (**Cox et al., 2000**). Des lors, plusieurs recherches ont démontré le pouvoir antimicrobien de certaines essences sur une large palette de micro-organismes, y compris sur des bactéries résistantes aux antibiotiques.

Néanmoins, le mécanisme d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes et fongiques reste difficile à cerner, compte tenu de la composition complexe des huiles volatiles (**Burt., 2004**). La variabilité des constituants des huiles suggèrent qu'elles agissent sur plusieurs sites d'action dans les micro-organismes, étant donné que chaque composé possède son propre mode d'action (**Guinoiseau, 2010**).

### II.8.3. Activité antifongique :

Dans le domaine phytosanitaire et agro alimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant la denrée alimentaire (**Lis-Balchin, 2002**). Ils agissent sur un large spectre de moisissure et de levure en inhibant la croissance des levures et la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures.

Plusieurs auteurs ont démontré que la formation d'un complexe entre le donneur d'électrons et l'aldéhyde induit un changement de l'état ionique de la membrane se traduisant par un déséquilibre d'échange avec le milieu extérieur. Ce déséquilibre entraîne la mort cellulaire (**Baser et Buchbauer., 2010**).

### II.9. Toxicité des huiles essentielles :

Alors que de nombreux ouvrages font référence à la toxicité de nombreux produits sur le marché, la toxicité des huiles essentielles est moins investiguée. La plupart du temps, sous le terme de toxicité sont décrites des données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi. Les interactions de ces produits avec les médicaments sont aussi peu mentionnées (**Pibiri, 2006**).

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisées sans risque. Certaines huiles essentielles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau : en raison de leur pouvoir irritant (les huiles riches en thymol, ou en carvacrol), allergène (huiles

riches en cinnamaldéhyde) ou photo-toxique (huiles de citrus contenant des furacoumarines), d'autres huiles essentielles ont un effet neurotoxique (les cétones comme l' $\alpha$ -thujone sont toxiques pour les tissus nerveux). La toxicité des huiles essentielles est assez mal connue. Il manque de données sur leurs éventuelles propriétés mutagènes et cancérigènes. La plupart du temps, sous le terme de toxicité sont décrites des données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi. Il existe quelques huiles essentielles dont certains composés sont capables d'induire la formation de cancer (**Guba, 2001**).

### **II.10. Application des huiles essentielles dans les produits alimentaires :**

En raison des préoccupations quant à l'innocuité des composés synthétiques, d'importants travaux sont effectués pendant ces dernières décennies pour trouver de composés d'origine organique provenant de sources naturelles comme solution de rechange à ces substances chimiques. En conséquence il y a une forte tendance à isoler ces composés organiques naturels pour la protection de la qualité des produits alimentaires et la santé des consommateurs.

Actuellement, les huiles essentielles et leurs composants, représentent un outil très intéressant pour augmenter la durée de conservation des produits alimentaires. Ces substances naturelles sont riches en composés antimicrobiens et antioxydants. Elles pourraient donc servir d'agents de conservation alimentaires, et ce d'autant plus qu'ils sont pour la plupart classés « généralement reconnus comme GRAS » ou approuvés comme additifs alimentaires par l'administration Américaine des aliments et des médicaments, FDA (Food Drug Administration). Ils n'ont pas par conséquent pas besoin d'autorisation d'emploi dans les aliments, mais des études préalables sont nécessaires afin de mieux cerner leur activité sans pour autant être toxique pour l'homme (**Caillet et Lacroix, 2007**).

Pour choisir les huiles essentielles comme conservateurs alimentaires, il convient de connaître le seuil d'efficacité (la concentration la plus faible en huile essentielle capable d'inhiber toute croissance microbienne), car selon l'effet recherché et les bactéries ciblées, la concentration ne sera pas la même. Chaque huile essentielle possède une activité spécifique variable selon les microorganismes, les conditions de stockage de l'aliment (le pH, la température, pression d'oxygène etc.) ou la nature des aliments peuvent avoir une influence sur l'action des huiles essentielles.

Ainsi, la généralisation de l'utilisation des huiles essentielles n'est pas facilement envisageable à tous les aliments (**Cutter, 2000**). Mais le recours aux huiles essentielles

s'avère être un choix pertinent à la nécessité de réduire ou de remplacer les agents de conservation chimiques ou synthétiques.

Dans le but d'augmenter la durée de conservation des différents types d'aliments, par exemple l'usage simultané de plusieurs facteurs de conservation sous forme de systèmes combinés pourrait être très utile pour potentialiser l'efficacité de chaque facteur individuel. La notion de synergie entre les systèmes antioxydants et antimicrobiens est aussi une alternative intéressante. Voire même un procédé incontournable pour mieux sécuriser les produits vis-à-vis des germes pathogènes et, contre les phénomènes d'oxydation lipidique (**Azeredo et al., 2004**).

De nombreux auteurs (**Lin et al., 2004 ; Fisher et Phillips, 2006 ; Oussalah, 2006 ; Caillet et Lacroix, 2007**), ont rapporté que les huiles essentielles peuvent être ajoutées pratiquement à tous les aliments. Les huiles essentielles d'origan, de thym, de cannelle, ou de coriandre sont efficaces pour les viandes, les volailles, et la charcuterie, l'huile essentielle de menthe pour les produits frais, les huiles essentielles à base de carvacrol ou le citral pour les poissons. L'incorporation d'huile essentielle dans la viande hachée a contribué au maintien de la qualité microbiologique et à la réduction de l'oxydation lipidique au-delà de sa durée normale d'entreposage.

## *CHAPITRE III :*

*Les souches de champignons «Fusarium  
et Alternaria »*

### **III.1. *Fusarium oxysporum*:**

#### **III.1.1. Généralités :**

Le genre *Fusarium* est bien connu pour son rôle important en phytopathologie, ce dernier regroupe un grand nombre d'espèces (Messiaen et Cassini, 1968), présentant une spécificité parasitaire pour une large gamme de plantes hôtes (Ozenda, 1990) et responsables des maladies connues sous le terme de fusarioses telles que le flétrissement vasculaire ou la pourriture racinaire et du collet (Lepoivre, 2003).

Le genre *Fusarium* comprend un groupe large et hétérogène de champignons importants pour l'industrie alimentaire et pharmaceutique, la médecine et l'agriculture. Les espèces de *Fusarium oxysporum* se caractérisent par une large gamme de plantes hôtes et la plupart des souches pathogènes de *Fusarium oxysporum* envahissent le système vasculaire de ces plantes et présentent une spécificité parasitaire, c'est-à-dire que l'espèce ne peut attaquer qu'un hôte déterminé (Ozenda, 1990).

#### **III.1.2. Classification de *Fusarium* :**

*Fusarium oxysporum* est considéré comme Ascomycète proche du groupe téléomorphique Gibberella que Nectria (Di Pietro *et al.*, 2003 ; Michielse et Rep, 2009) et ayant plus de 120 formes spéciales. ( tableau : de classification de fusarium)

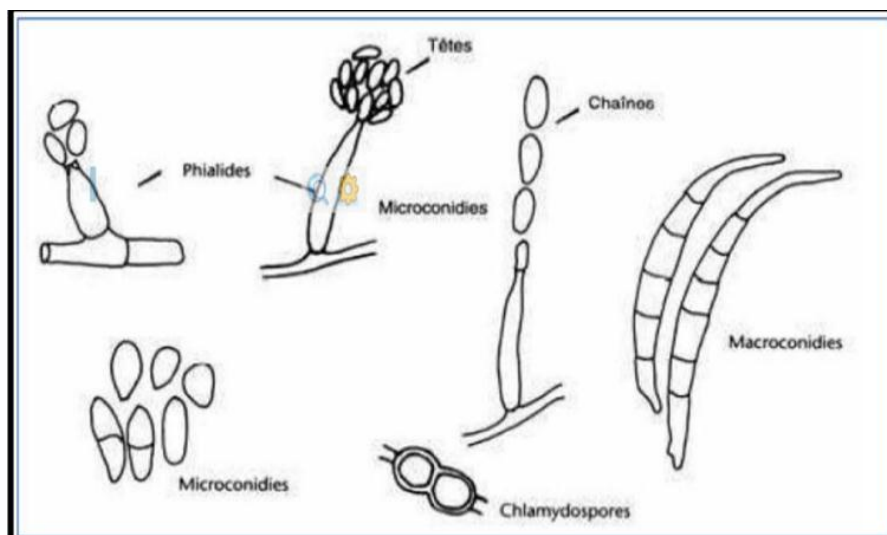
<b>Règne :</b> Fungi
<b>Division :</b> Ascomycota
<b>Classe :</b> Sordariomycetes
<b>Sous-classe :</b> Hypocreomycetidae
<b>Ordre :</b> Hypocreales
<b>Famille :</b> Nectriaceae
<b>Genre :</b> <i>Fusarium</i>
<b>Espèce :</b> <i>F. oxysporum</i> (FOL) ou (FORL)

#### **III.1.3. Caractères morphologiques :**

### Chapitre III : Les souches de champignons « *Fusarium* et *Alternaria* »

La principale caractéristique morphologique des *Fusarium* est la présence de macroconidies en forme fusiformes, cloisonnées (**figure 07**) (**Tabuc, 2007**). Le thalle des *Fusarium* est à croissance, habituellement, rapide et de couleur variée (**Jeunot, 2005**), les conidiophores parfois très ramifiés formant sur le thalle des coussinets (sporodochies) et portent des masses de spores d'aspects graisseux, les phialides sont plus ou moins allongées et peuvent produire deux types de conidies: des macroconidies fusiformes, avec une cellule basale pédicellée, portant une sorte de talon et/ou des microconidies petites, généralement septées, piriformes, fusiformes ou ovoïdes .

Les chlamydo-spores peuvent être présentes comme absentes, se différenciées soit par le mycélium ou par les conidies (**Jeunot, 2005**). Au niveau de physiologie cellulaire, les *Fusarium* ont une croissance optimale à une température comprise entre 22 et 37 °C. La majorité des moisissures se développent bien dans un milieu humide ( $A_w = 0,85$ ), les *Fusarium* se développent dans un milieu très humide ( $A_w > 0,9$ ), ce qui explique leur présence dans les champs et sur les plantes vivantes (**Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002**). Ces moisissures sont aérobies ; l'oxygène leur permet d'effectuer une croissance normale. Cependant, la plupart peuvent se développer même si l'oxygène est limité. Ils se développent normalement à un pH compris entre 3 et 8. Généralement, une croissance fongique est optimale à un pH compris entre 5 et 6 (**Tabuc, 2007**).



**Figure 07** : Caractères morphologiques des *Fusarium* (**Tabuc, 2007**).

#### III.1.4. Physiopathologie du *Fusarium oxysporum* :

Beaucoup d'espèces saprophytes sont capables de se développer en tant que pathogènes secondaires sur des tissus végétaux sénescents. Les espèces du genre *Fusarium* peuvent ainsi attaquer les céréales (maïs, blé, orge, avoine), des légumes, les plantes ornementales et beaucoup d'arbres fruitiers. La majorité des espèces de *Fusarium* sont susceptibles de produire des mycotoxines et sont ainsi impliquées dans des intoxications chez les animaux d'élevage (Tabuc, 2007).

Les principales espèces de *Fusarium*, compte tenu de leur fréquence dans les différents substrats, notamment les céréales, de leur potentiel toxigène et de leur pouvoir pathogène, sont : *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* et *F. verticilloides* (*F. moniliforme*) (Tabuc, 2007). *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum* sont les agents pathogènes de la maladie des pourritures racinaires qui se manifeste aussi bien sur blé dur et tendre que sur l'orge. Cette maladie apparaît particulièrement dans les zones semi-arides et durant les années à faible pluviométrie. (Ezzahiri, 2001). Chez le pois ce type de maladie peut aussi être occasionné par *F. oxysporum* f.sp. *solani*. (Haglund et Kraft, 2001). Le flétrissement vasculaire est la maladie qui provoque les plus grandes pertes pour de nombreuses plantes cultivées, telles que les légumes, et des cultures tropicales elle est aussi provoquée par *F. oxysporum* (Agrios, 2005).

#### **III.1.4.1. Symptomatologie :**

Plusieurs genres de champignons telluriques sont capables d'infecter les racines de plantes sauvages et cultivées et de causer des dégâts importants (Agrios, 2005). Le *Fusarium* est parmi les champignons telluriques les plus agressifs, causant des flétrissements et des pourritures de nombreuses espèces végétales cultivées. Qu'il entraîne des pertes économiques, le contrôle de ce pathogène reste toujours limité à des mesures prophylactiques, la désinfection du sol n'est jamais complète en raison d'une part, de la difficulté de sa réalisation (Benhamou *et al.*, 1997). Concernant la fusariose, cette maladie est causée par certains champignons du genre *Fusarium*. Les champignons de ce genre sont considérés comme étant les champignons telluriques les plus agressifs. Ils sont largement distribués dans le sol représentant 40% de la mycoflore au niveau de la rhizosphère (Mhiri, 2003).

- La flétrissure fusarienne ou fusariose vasculaire : *Fusarium Oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (FOL)

### Chapitre III : Les souches de champignons « *Fusarium et Alternaria* »

---

Les symptômes de FOL se manifestent en une décoloration de la tige commençant par un léger jaunissement longitudinal sur une portion de celle-ci et évoluant en une bande jaune plus marquée puis en une nécrose beige à marron clair. Les vaisseaux à l'intérieur de la tige brunissent. Il cause également un jaunissement du rachis, d'une foliole et éventuellement de la feuille entière (Arino *et al.*, 2007).

- La pourriture de la racine et du collet : « *Fusarium Oxysporum* f.sp. *Radicis Lycopersici* (FORL) »

Les symptômes de FORL se manifestent en un brunissement des racines, de leur cylindre central et des vaisseaux situés au niveau du pivot et du collet. On le reconnaît aussi par l'apparition d'un chancre brun, légèrement déprimé se développant sur un seul côté du collet et de la tige, en forme de flamme (Adejumo *et al.*, 2007). Le système racinaire devient brun et pourri, les vaisseaux, les tissus corticaux et le collet brunissent. On peut remarquer également un flétrissement juste avant que les premiers fruits soient prêts à cueillir. Les feuilles hautes fanent avant les feuilles basses, il y a décoloration jaune ou doré (Fandohan *et al.*, 2005).



**Figure 08** : Symptômes de *Fusarium oxysporum* sur les feuilles et les tiges de la tomate (Spiga, 2016).

### III.2. *Alternaria sp.* :

#### III.2.1. Présentation du pathogène :

*Alternaria sp.* est un champignon phytopathogène, présent dans les régions tempérées et tropicales de l'Ancien et du Nouveau monde, provoquant chez les plantes de la famille des *Solanaceae* , une maladie appelée « alternariose » ou « brûlure alternarienne ».

Les *Alternaria* sont des champignons fréquents dans notre environnement. Ils appartiennent aux moisissures atmosphériques. Ils peuvent être isolés des végétaux très divers. *Alternaria* comprend près de 275 espèces (Simmons, 2007) avec des modes de vie saprophytes et phytopathogènes qui peuvent affecter des cultures sur champ ou les produits végétaux pendant la récolte ou post-récolte (Logrecio *et al.*, 2009). Ce sont des champignons mésophiles, leur activités prédominantes disparaissent lorsque la température s'élève (Botton *et al.*, 1990).

Les *Alternaria* sont des champignons très communs et cosmopolites. Ils peuvent se retrouver sur des substrats très variés : plantes, sols, textiles, grains (Linas *et al.*, 1990). L'air joue un rôle très important dans la dispersion des spores. Les spores *Alternaria* sont allergènes. Les spores sont également infectieuses déterminant le plus souvent des formes cliniques cutanéodermiques favorisées par certains facteurs : diabète mal équilibré, corticothérapie (Badillet, 1991). Les spores fongiques produisent aussi des protéines allergènes qui peuvent causer des maladies immunotoxiques, tels que l'asthme (Bush et Portnoy, 2001). Les chercheurs rapportent un nombre croissant de patients présentant une allergie respiratoire, en particulier les enfants (Emeryk *et al.*, 2004).

#### III.2.2 Caractéristiques morphologiques :

*Alternaria sp.* qui se distingue par son niveau de virulence est identifiable par la forme caractéristique de ses spores. Le montage et l'examen microscopique des conidies dans une goutte d'eau permettent d'identifier les spores (Idnurm et Heitman, 2005).

- Aspect macroscopique d'*Alternaria sp.* :

Les colonies d'*Alternaria* ont une croissance rapide et aspect cotonneux. La surface des colonies est souvent hétérogène, présentant des zones blanches constituées exclusivement

### Chapitre III : Les souches de champignons « *Fusarium* et *Alternaria* »

d'hyphes aériennes et des zones sombres rasantes renfermant les spores asexuées mélanisées (Criquet *et al.*, 2008).

- **Aspect microscopique d'*Alternaria* sp. :**

Les hyphes sont septées. Les conidiophores sont bruns, septes et ont souvent l'aspect de «zigzags». Ils portent des conidies simples ou ramifiées. Les conidies présentent des cloisonnements transversaux et longitudinaux et sont caractéristiques du genre *Alternaria*. Des tubes germinateurs peuvent également être observés à la surface des conidies Principaux champignons allergisants (Criquet *et al.*, 2008).

#### III.2.3 Classification taxonomique selon (Hawksworth, 1994) :(tableau de taxonomie )

<b>Règne</b>	Champignons
<b>Division</b>	Ascomycota
<b>Classe</b>	Euascmycetes
<b>Ordre</b>	Pleosporales
<b>Famille</b>	Pleosporaceae
<b>Genre</b>	<i>Alternaria</i>
<b>Espèce</b>	<i>Alternaria</i> sp.

#### III.2.4. Biologie d'*Alternaria* sp. :

*Alternaria* sp. est une espèce saprophyte et tonophile facultatif (Requiert des conditions moyennes d'humidité)  $A_w = 0,85$  à  $0,88$ . Croissance optimale obtenue à la température de  $25^\circ\text{C}$  et à pH 4 à 5,4. Mais ce champignon peut se développer dans une gamme de pH assez large allant de 2,7 à 8 et pour température maximal entre  $30-32^\circ\text{C}$ . Contenu en eau des spores : 86% ; sous des conditions très sèches, elles restent viables pendant plusieurs années (Subramanian, 1983). *Alternaria* sp. est une espèce cellulolytique ; elle utilise les éléments suivants comme source de carbone : D-galactose ; maltose ; raffinose ; saccharose. Et comme source d'azote : acétamine ; acétate et oxalate d'ammonium ; acide Laspartique ; acide L-glutamique ;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  ; Glycine ; peptone ; urée. (Inoue ,1994).

## Chapitre III : Les souches de champignons « *Fusarium* et *Alternaria* »

Dès que les températures sont comprises entre 18 et 25 °C, des pluies légères suffisent à déclencher la contamination des plantes. La propagation de la maladie est ensuite rapide, dépendante des faibles précipitations ou de la répétition des rosées matinales. Ce champignon produit ses organes de dissémination (spores) à des températures qui varient entre 8 et 28 °C, lorsque l'humidité est élevée. Les spores présentes sur les premières taches disséminent ensuite la maladie sur les fruits ou les plantes, transportées par le vent, la pluie, les insectes ou les oiseaux. La rosée ou la pluie sont essentielles à leur germination et à leur pénétration dans la plante.

La maladie se transmet également par les semences, notamment lorsque l'on récolte soi-même les graines sur une culture contaminée (Vieira, 2004).

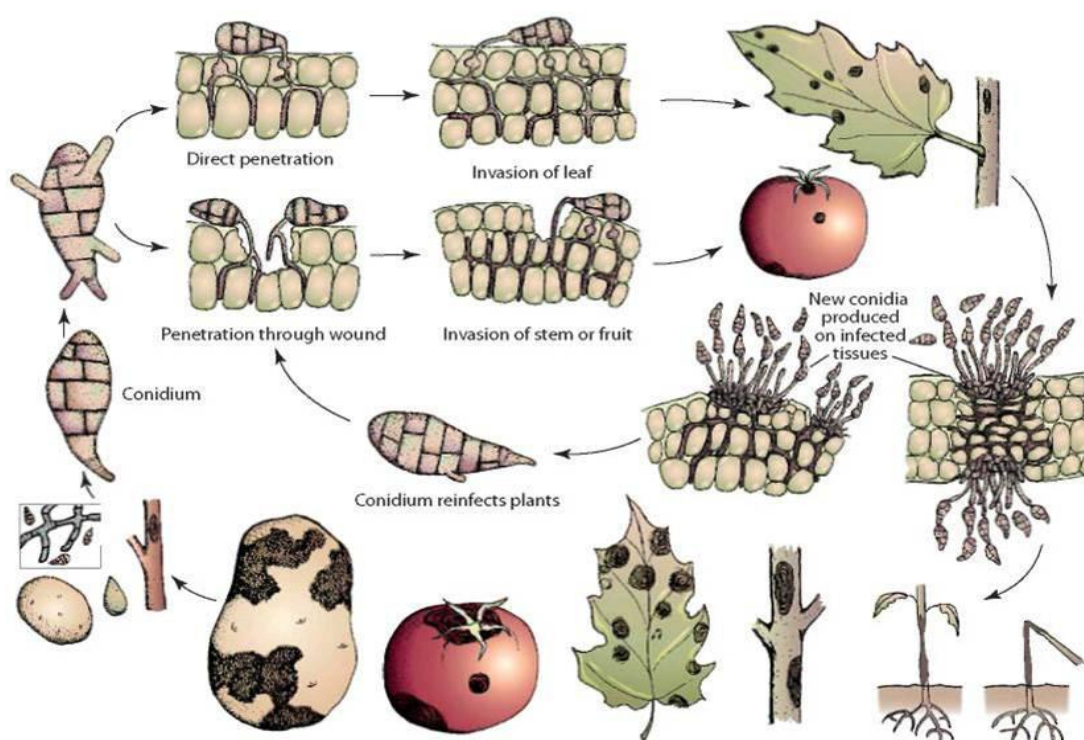


Figure 09 : Cycle évolutif d'*Alternaria* sp. sur la tomate et la pomme de terre (Spiga, 2016).

### III.2.5. Maladies provoqué par *Alternaria* sp. :

#### III.2.5.1. Tâches alternariennes :

Domages : Les taches brunes tirant vers le brun jaunâtre, circulaires, de petites à grandes, dispersées sur la feuille peuvent être causées par des champignons des genres *Alternaria*. Ce sont généralement des agents pathogènes faibles, qui peuvent également vivre en saprophytes

sur les tissus morts. Les taches foliaires causent rarement d'importants dégâts dans les cultures (**Halonen et al., 1997**).

#### **III.2.5.2. L'alternariose :**

Elle est favorisée par la sénescence des plantes et des conditions climatiques bien précises:

- Température élevée (20-25°C) et rosée pendant la nuit pour permettre l'infection,
- Alternance de périodes humides et ensoleillées pour la formation des conidies et la sporulation,
- La dispersion des spores est assurée par le vent et les éclaboussures de pluie (**Kwon-Chung et Bennett, 1992**).

L'alternariose est une maladie très répandue chez la tomate de plein champ et parfois chez la tomate de serre élevée dans du sol et en substrats artificiels. *Alternaria sp.* infecte aussi la pomme de terre, l'aubergine et des adventices de la famille des solanacées (**Vieira, 2004**).

Chez la tomate de serre, cette maladie atteint les feuilles plus âgées, mais elle se trouve aussi sur les tiges et les fruits qui mûrissent. Les taches foliaires sont rondes, brun foncé à noires, mesurent environ 1 cm de diamètre et se reconnaissent facilement par les anneaux concentriques ou zones (tâches zonées) qu'elles forment. Les anneaux peuvent ne pas apparaître sur les lésions situées en bordure de la feuille. Sur les tiges, les rameaux et les pédoncules, les lésions sont noires, s'élargissent, s'allongent par la suite et parfois les encerclent. Sur le fruit, les lésions apparaissent d'abord autour d'un pédoncule, d'une blessure ou d'une fissure, s'agrandissent rapidement et forment des plages noires, déprimées et coriaces. Si la défoliation est importante, les fruits sans protection peuvent subir des insulations (**Shankar, 2006**).



**Figure 10:** Symptômes d'Alternariose sur plant de tomate (fruit, feuille et tige)  
(Spiga, 2016).

## *Partie expérimentale*

# *CHAPITRE IV :*

*Matériels et méthodes*

### IV.1. Objectif :

L'objectif de cette étude est de tester le pouvoir antifongique des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et *Citrus aurantium* sur deux souches de champignons phytopathogènes de la tomate, afin de pouvoir développer de nouveaux usages des sous-produits d'origines végétales et produire des fongicides naturels qui peuvent remplacer les formes synthétiques.

### IV.2. Situation géographique des régions de collecte :

La plante aromatique et médicinale *Rosmarinus officinalis* a été collecté dans la commune de Merine « latitude 34°46'51'' nord et longitude 0°27'04'' ouest », elle est située à 52 Km au sud de Sidi bel Abbes (**Figure 11**).



**Figure 11:** Localisation géographique de la zone Merine willaya de Sidi Bel Abess

La plante *Citrus aurantium* (**Figure 12**) a été collectée dans la commune de Sidi Bel Abbes, Chef-lieu de Wilaya, et de coordonnées géographiques latitude 35°12'44,8'' nord et longitude 0°37'56,4'' est. Elle est située à environ 500 mètres d'altitude et à 80 Km au sud d'Oran (**Figure 12**). Elle est délimitée, au nord-ouest, par la commune de Ain Thrid ; au nord est par la commune de Sidi Brahim ; au Sud par la commune de Amarnas, à l'est par la

commune de Tilmouni et à l'ouest par la commune de Sidi Lahcene (Benaidja mourad, 2020).

**Figure 12** : Bigaradier *Citrus aurantium* (Benaidja mourad, 2020).

### IV.3. Matériels d'étude :

#### IV.3.1. Matériel végétal :

Les feuilles de *Rosmarinus officinalis* ont été récoltées durant le mois de Mars 2021 dans la région de Merine wilaya de Sidi Bel Abbas.



**Figure 13**: Feuilles sèches du Romarin (*Rosmarinus officinalis*).

Photo prise par Belkacemi et Slimani (2021).

Pour le *Citrus aurantium*, l'huile essentielle a été récupérée à partir du laboratoire d'agronomie afin de la valoriser et d'étudier son pouvoir fongicide.



**Figure 14**: Feuilles sèches du Bigaradier (*Citrus aurantium*) ( Benaidja Morad)..

#### IV.3.1.1. Préparation de la poudre végétale :

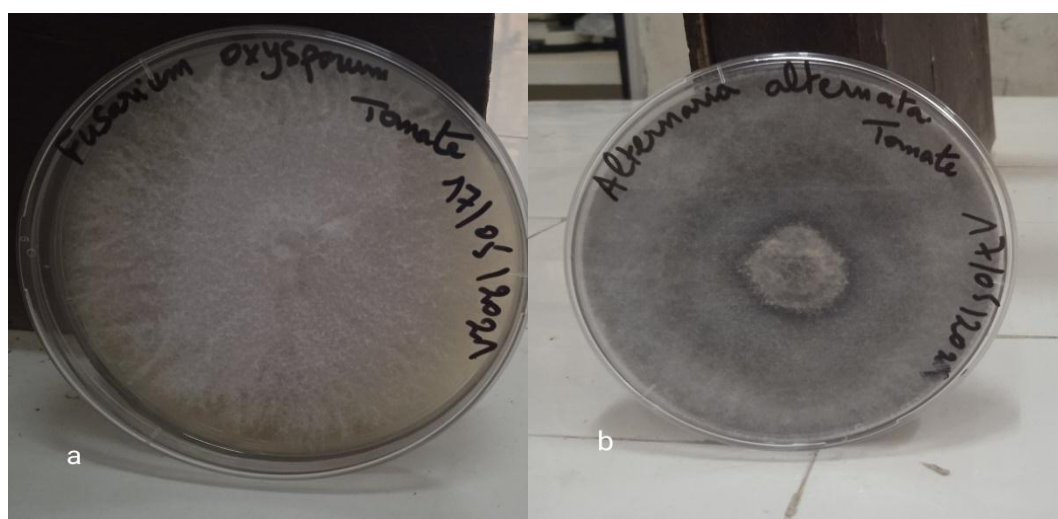
Les feuilles sont lavées puis séchées à l'abri de l'humidité et de la lumière et à température ambiante afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules, puis elles sont broyées dans un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre très fine, la poudre résultante a été conservée au réfrigérateur à 4°C dans un récipient hermétiquement fermés. La poudre sera ultérieurement utilisée pour l'extraction des huiles essentielles.

### IV.3.2. Matériel fongique :

Les souches fongiques testées dans la présente étude sont : *Alternaria sp.* et *Fusarium oxysporum* qui attaquent les cultures de la tomate et sont représentées dans le tableau 04.

**Tableau 04** : Les souches fongiques testées.

Souches fongiques (champignons)	Origine
<i>Fusarium oxysporum</i>	Laboratoire de microbiologie (Université Mascara).
<i>Alternaria sp.</i>	Isolés de feuilles de tomate contaminés (Laboratoire d'agronomie UDL SBA).



**Figure 15** : a) *Fusarium oxysporum* après 7 jours de culture. b) *Alternaria sp.* après 7 jours de culture. Photo prise par Belkacemi et Slimani (2021).

### IV.3.3. Milieu de culture :

Suivant le protocole employé et selon les souches, nous avons utilisé le milieu PDA).

#### Définition :

**Témoin+** : produit chimique de synthèse

**Témoin-** : 19 ml pdA + 0.2% Agar

### IV.4. Méthodes d'étude :

#### IV.4.1. Extraction des huiles essentielles :

Le matériel végétal séché est soumis à une hydro-distillation au moyen d'un dispositif d'extraction type Clevenger (**figure15**). Cette technique se base sur le pouvoir que possède la vapeur d'eau à transporter les huiles essentielles. L'opération consiste à introduire 50g de poudre végétale dans un grand ballon, on y ajoute 500 ml d'eau distillée. Le mélange est porté à ébullition à l'aide d'un chauffe ballon. Les vapeurs chargées d'huile essentielle passent à travers le tube vertical puis dans le serpentín de refroidissement où aura lieu la condensation. Les gouttelettes ainsi produites s'accumulent dans le tube rempli auparavant d'eau distillée. L'HE de faible densité par rapport à l'eau, surnage à la surface de cette dernière. Après 2h30 d'extraction l'HE est récupéré dans des flacons opaques bien scellés à température basse (0, - 4°C) afin d'éviter toute dégradation.



**Figure 16 :** Dispositif de l'extraction de hydro stillation Photo prise par Belkacemi et Slimani (2021).

### IV.4.2. Caractéristiques organoleptiques :

La caractérisation des huiles essentielles se fait à fin d'évaluer la qualité de nos extraits, nous avons réalisé une étude analytique en déterminant les caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur), se sont des indications qui permettent d'évaluer initialement la qualité d'une huile essentielle.

### IV.4.3. Détermination des rendements en huiles essentielles :

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenu et la masse du matériel végétale à traiter. Le rendement est calculé par la formule suivante :

$$\text{Rdt}\% = \text{M}/\text{M0} \times 100$$

**Rdt%** : Le rendement en huile essentielle

**M** : Masse d'huile essentielle récupéré (g)

**M0** : Masse de matière végétale à traiter (g)

### IV.4.4. Etude du pouvoir antifongique des huiles essentielles :

L'activité antifongique des deux huiles essentielles a été réalisée sur deux souches *Fusarium oxysporum* et *Alternaria sp.*, ils ont été testée *in vitro* par la méthode du contact direct sur milieu gélosé « PDA » pour déterminer les taux d'inhibition, en comparant leur action à diverses concentrations sur la croissance mycélienne (Hussin *et al.*, 2009).

### IV.4.5. Méthode du contact direct :

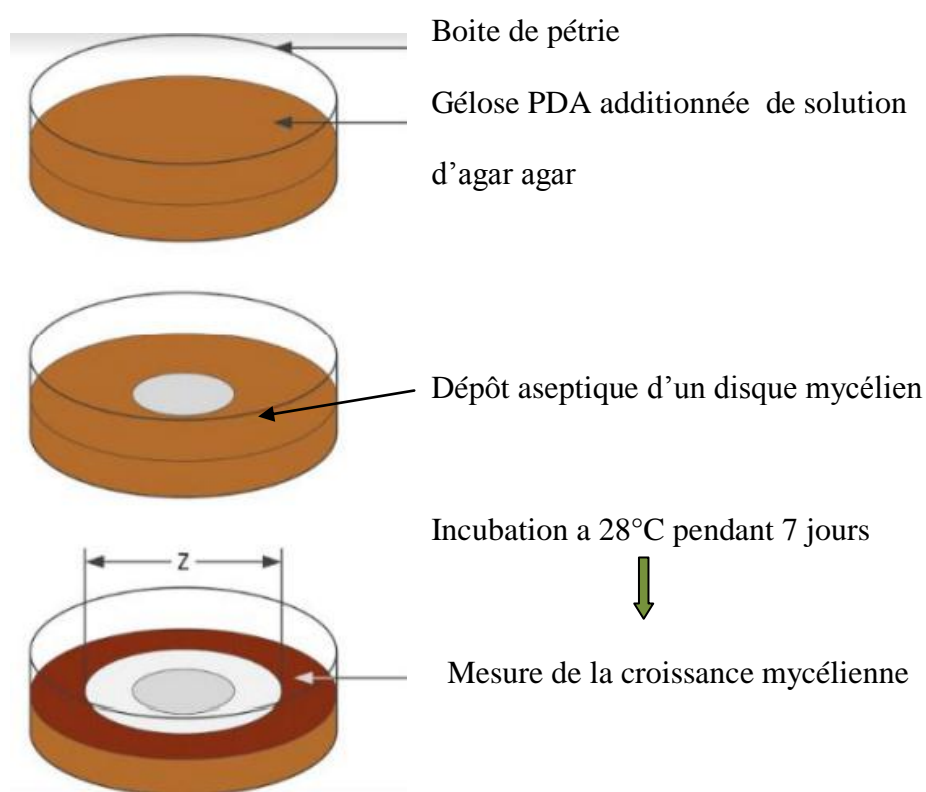
#### A. Préparation des dilutions :

Les huiles essentielles ont été utilisées sous forme d'émulsions pour pouvoir être manipulées comme des solutions. Du fait de la non miscibilité des huiles essentielles à l'eau et donc au milieu de culture, une mise en émulsion a été réalisée grâce à une solution d'agar à 0,2 %. Elle permet d'obtenir, dans le milieu une répartition homogène des huiles essentielles et d'augmenter au maximum le contact germe/composé. L'agar-agar à 0,2 % a été choisi comme agent émulsionnant à la place du Tween 80 du fait qu'il est dépourvu de toute influence sur l'activité de l'huile essentielle (Remmal *et al.*, 1993). Les concentrations testées sont 5µl/ml,

0,5 $\mu$ l/ml, 1  $\mu$ l/ml et 2  $\mu$ l/ml. L'étude comparative a été effectuée avec des boîtes ensemencées traitées avec un produit phytosanitaire de synthèse contre la Fusariose et l'Alternariose.

### B. Ensemencement :

1ml de chaque huile essentielle, pour chaque concentration, est ajouté dans des tubes contenant 19 ml du milieu PDA stérile encore liquide. Le mélange est homogénéisé à l'aide d'un mixeur Vortex afin de bien disperser l'huile essentielle dans le milieu de culture (**Subrahmanyam et al., 2001**). Ensuite, il est immédiatement coulé dans des boîtes de pétri de 90 mm (20 ml/boîte) (**Satish et al., 2010**). Après solidification de la gélose, les boîtes de pétri sont ensemencées par un disque mycélien, de 6 mm de diamètre pris de la culture jeune du mycète. les boîtes de pétries ensemencées sont scellé par du parafilm afin d'éviter l'évaporation des huiles essentielle au cours de l'incubation. Les tubes contenant le milieu PDA additionné de la solution d'agar agar ont servi de témoin pour chaque souche (**Mishra et Dubey, 1994; Khallil, 2001**).



**Figure 17:** illustration de l'aromatogramme par la méthode de contact direct.

### C. Incubation :

Toutes les boîtes de pétriensemencées sont incubées à la température de 28°C pendant 7 jours (Mohammedi, 2006).

### D. Estimation de la croissance mycélienne :

La technique consiste à mesurer la croissance mycélienne des colonies durant sept jours, en utilisant la formule suivante (Brewer, 1960 ; Leach, 1962) :

$$L=D-d/2$$

**L** : croissance mycélienne

**D** : diamètre de la colonie

**d** : diamètre de l'explant

### E. Evaluation du taux d'inhibition de la croissance mycélienne :

Les résultats obtenus à partir de l'estimation de la croissance mycélienne sont aussi exprimés en pourcentage (%) par rapport à la croissance mycélienne du témoin.

$$I'(\%) = 100 \times (dC - dE) / dC$$

**I' (%)** = Taux d'inhibition exprimé en pourcentage

**dC** = Diamètre de colonies dans les boîtes « témoins positifs »

**dE** = Diamètre de colonies dans les boîtes contenant l'extrait de plante (Kordali et al., 2003).

# *CHAPITRE V :*

*Résultats et discussion*

### V.1. Caractéristiques organoleptiques :

Les caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles du Romarin et du Bigaradier (l'orange amère) sont résumées dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 05 :** Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles de *RosmarinusOfficinalis* et de *Citrus Aurantium* :

Paramètre	Bigaradier ( <i>Citrus Aurantium</i> )		Romarin ( <i>RosmarinusOfficinalis</i> )	
	Huile essentielle	AFNOR	Huile essentielle	AFNOR
Aspect	Liquide	Liquide	Liquide mobile	Liquide mobile, Limpide
couleur	jaune pâle à jaune ambré	Jaune pâle à vert brunâtre	Jaune clair	Presque incolore à jaune pâle
Odeur	Son odeur rappelle celle des fleurs du bigaradier.	Caractéristique d'autre partie de zeste d'orange amer	Camphrée	Caractéristique Fraiche, plus au moins camphrée selon l'origine

## Chapitre V : Résultats et discussions

Les huiles essentielles du Romarin et du Bigaradier ont été extraites par hydrodistillation, une technique très reconnue pour l'obtention des huiles essentielles (Mari Elisabeth, 2005).

D'après le tableau ci-dessus, on remarque que l'HE du Romarin a un aspect liquide mobile alors que celui du Bigaradier est liquide, la couleur de l'HE du Romarin est jaune clair par contre celle du Bigaradier varie du jaune pâle au jaune ambré et enfin une odeur camphrée est remarqué pour l'HE du Romarin et celle Bigaradier rappelle l'odeur des fleurs de cette plante.

Les résultats obtenus indiquent une différence entre les caractéristiques organoleptiques des deux huiles. Ces paramètres diffèrent selon les espèces étudiées.

Les valeurs obtenues témoignent l'influence des conditions édaphiques et climatiques ainsi que les conditions de cultures des plantes, il est logique que leurs valeurs diffèrent d'un endroit à l'autre.

Les paramètres organoleptiques de nos huiles essentielles sont en accord avec ceux répertoriés dans les normes (AFNOR, 1999).

### V.2. Le Rendement :

Les valeurs des rendements des huiles essentielles du *Rosmarinus officinalis* et de *Citrus aurantium* sont enregistrées dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 06 :** Rendement des huiles essentielles des deux plantes :

Plante	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Citrus aurantium</i>
Rendement en %	0,95%	0,54%

Selon Les résultats enregistrés dans le tableau (06) ont a remarque que le rendement de l'HE de *Rosmarinus officinalis* qui est de 0,95% et supérieur à celui de *Citrus aurantium* qui

est de 0,54% (résultat de **Benaidja Mourad,2020** . Ces deux résultats sont en accord avec les normes AFNOR (0 ,5-2).

Le rendement de l'HE de *Rosmarinusofficinalis* de notre étude est légèrement supérieur à ceux trouvés dans la littérature ; 0,6% pour le romarin de Tennira(**Bouzidi, 2019**), 0 ,62% pour celui de Mostaganem (**Bousaàdi, 2019**) 0,36% pour le Romarin d'Annaba (**Ouibrahim, 2014**) et 0.54%, 0.6% pour le Romarin du Maroc obtenus respectivement par (**Derwich et al., 2011**) et (**AtikBekkara et al., 2007**).

Par contre, **Djeddiet al..(2007)** ont rapporté dans une étude réalisée sur le Romarin du Maroc que le rendement de ce dernier est de0.82 %. De même, (**Athmaniet al., (2018)** ont montré que le rendement du romarin de guelma est de 1,2%. Ainsi, (**AthmaniIneset al., 2018**) ont révélé une valeur de1, 2% pour celui de 0,94. Ces résultats sont supérieurs à celui trouvés dans la présente étude.

Le rendement en huile essentielle de *Citrus aurantium*est proche de celui obtenu de (**Djenane, 2015**) à TiziOuzou (0,58%) et de (**Bendali et al., 2019**)a Blida (0,57%).

Il est légèrement supérieur à celui enregistré par (**Hamdani, 2017**) à Tlemcen (0,27%) et il est considéré comme inférieur par rapport à celui trouvé par (**Ouguelmaneet al., 2020**) àGhardaia (0,70%) et de (**Zakaria et al., 2017**) en Syrie (1,87%).

La différence de rendement varie en fonction de plusieurs paramètres notamment le climat, l'origine géographique de la plante, la variété, l'organe, le cycle végétatif, la période de récolte et la méthode d'extraction (**Abad et al., 2012 ;Djouahriet al., 2015**).

### V.3. Activité anti fongique :

Les huiles essentielles sont des composés apolaires doués d'un grand pouvoir pénétrant (Mishra et Dubey 1994). Ils se diffusent dans les structures membranaires fongiques et les endommagent en augmentant leur perméabilité. Ils inhibent les enzymes intercellulaires et extracellulaires. Ils affectent la synthèse enzymatique dans le noyau ou le ribosome et interagissent avec l'absorption de nutriments provenant de l'environnement ce qui affecte la croissance mycélienne des champignons (Sikkema, 1994) (Fisher et Phillips, 2008).

L'activité antifongique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* et *Citrus aurantium* a été testée vis-à-vis de deux souches phytopathogènes : *Fusarium oxysporum* et *Alternaria* sp.

#### V.3.1. Evaluation de la croissance mycélienne :

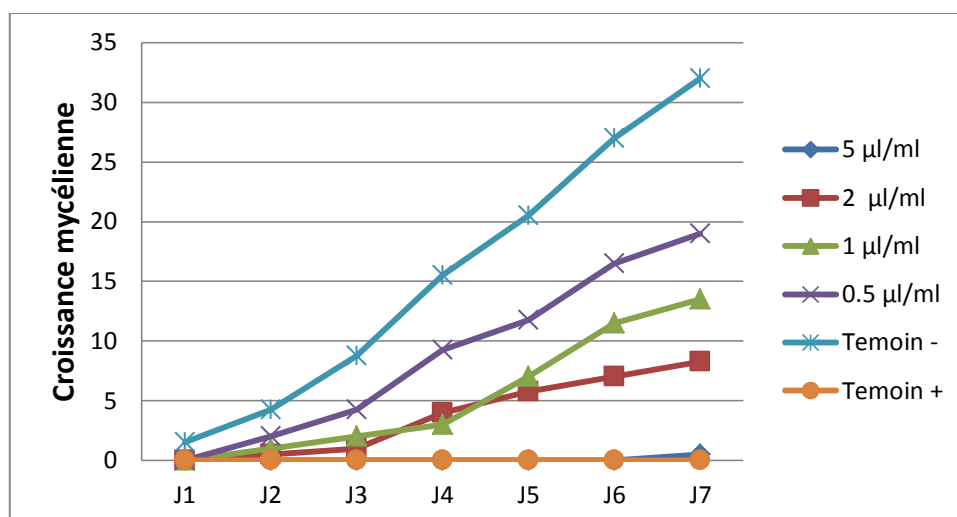
L'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles est définie par l'absence ou la présence de la croissance mycélienne. Dans un premier temps, la croissance mycélienne du témoin est très normale, contrairement aux boîtes traitées par les huiles essentielles de *Citrus aurantium* et *Rosmarinus officinalis* étudiées ; la croissance varie en fonction des concentrations et de la durée d'incubation. La croissance mycélienne a débuté le premier jour dans les boîtes témoin sans traitement.

#### V.3.2. Effet anti fongique des huiles essentielles sur *Fusarium oxysporum* :

##### V.3.2.1. Effet anti fongique de *Citrus aurantium* sur *Fusarium oxysporum* :

Selon les résultats obtenus et présentés dans la Figure 18, une croissance mycélienne du *Fusarium oxysporum* de longueur de 2 mm et 1 mm a été observée au J2 pour les concentrations 0.5 µl/ml et 1 µl/ml respectivement de l'huile essentielle de *Citrus aurantium*.

Pour la concentration 2 µl/ml la croissance a été notée à partir du J3 alors qu'une absence totale de croissance mycélienne à la concentration de 5 µl/ml et pour les témoins a été remarquée.

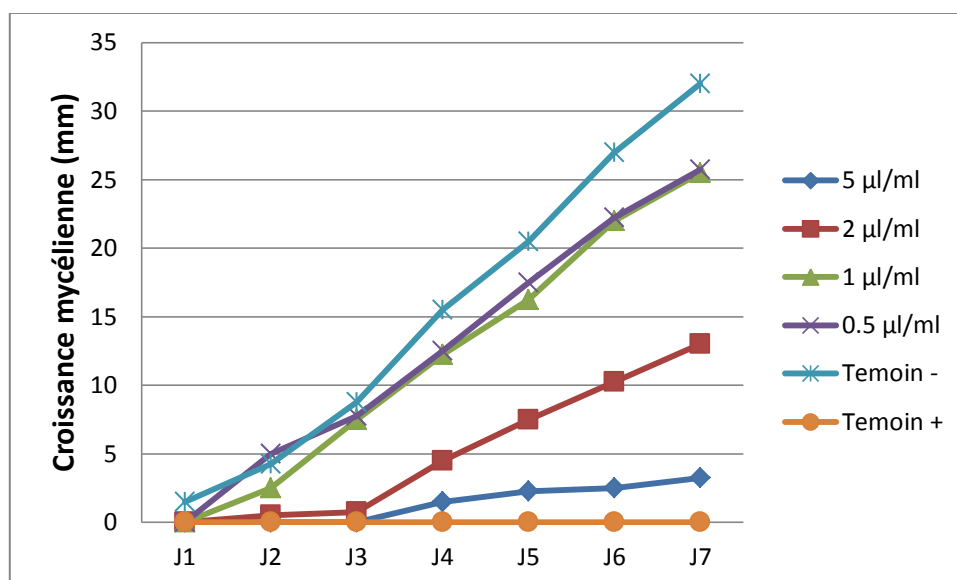


**Figure 18:** Croissance mycélienne de *Fusariumoxysporum* après traitement par l'HE de *Citrus aurantium*

Les résultats obtenus de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* après traitement par l'huile essentielle de *Citrus aurantium* montrent un grand pouvoir inhibiteur de la croissance mycélienne. Ce résultat enregistré a été aussi prouvé dans les travaux de (Hamdani, 2015). A la concentration de 5 µl/ml notre huile essentielle a montré un effet inhibiteur similaire au fongicide synthétisé (Témoin +) avec absence de sporulation de *Fusarium oxysporum*. Ce résultat est en accord avec (Estabraq et Hayfa, 2015) qui a trouvé une activité anti fongique de HEC importante contre la sporulation de *Fusarium oxysporum*.

#### V.3.2.2. Effet anti fongique de *rosmarinus officinalis* sur *Fusarium oxysporum* :

La croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* sous l'effet de l'huile essentielle de *Rosmarinusofficinalis*(figure 19) a débuté le J2 pour les concentrations 0,5µl /ml, 1µl /ml et a atteint les 25 mm de croissance. Cependant pour la concentration 2µl/ml et 5µl/ml la croissance a démarrée le J3 avec une longueur de 13mm et 3,25 mm après 7 jour d'incubation.



**Figure 19:** Croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* après traitement par l'HE de *Rosmarinusofficinalis*

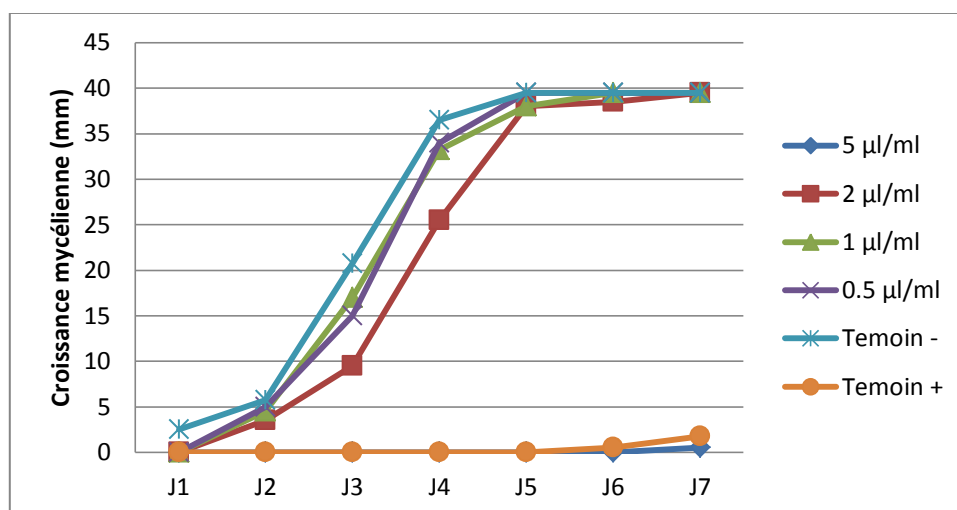
Les résultats de la croissance mycélienne du *Fusarium oxysporum* après traitement avec l'HE de romarin de la présente étude est en accord avec celle de (Bouzidi, 2019) qui a démontré que la croissance mycélienne a commencé le deuxième jour dans la concentration de 2%. Par ailleurs (Bendjdou et al., 2016) a mentionné qu' à différentes concentrations (0,5% et 1%) la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* a été inhibée (100%). Cependant notre résultat est inférieur aux travaux cités auparavant où la croissance mycélienne a été inhibée les trois premiers jours puis a démarré le J3 pour atteindre 13mm et 3.25 mm pour les concentrations de 2 ul/ml et 5ul/ml.

D'après ces résultats on a observé une différence dans la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* en présence des deux huiles essentielles testées. Le *Citrus aurantium* a eu un effet plus répressif sur la vitesse de croissance du champignon spécialement à la concentration de 5ul/ml par rapport à l'huile essentielle de *Rosmarinusofficinalis* où une croissance mycélienne a été enregistrée.

### V.3.3. Effet anti fongique des huiles essentielles sur *Alternariasp.*:

#### V.3.3.1. Effet anti fongique de *Citrus aurantium* sur *Alternariasp.* :

Les résultats de l'effet antifongique de l'HE du Bigaradier sur la croissance mycélienne d'*Alternaria sp.* sont reportés dans la figure 20.



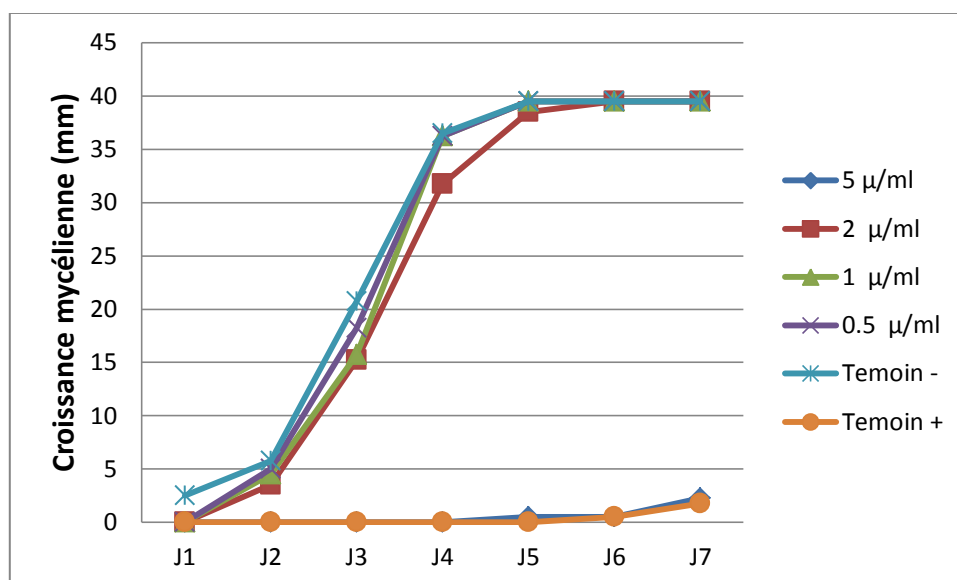
**Figure 20:** Croissance mycélienne d'*Alternariaalternata* après traitement par l'HE de *Citrus aurantium*

La croissance mycélienne d'*Alternariaalternata* a débuté dès J2 avec des longueurs mycéliennes de 4.25 mm, 2 mm et 1 mm respectivement pour les concentrations 0,5 µl/ml, 1 µl/ml et 2 µl/ml de l'HE de *Citrus aurantium*. Une absence de croissance mycélienne à la concentration 5µl/ ml et dans les boites témoins + est observée (**Figure 19**).

La croissance mycélienne d'*Alternariaalternata* diminue avec l'augmentation des concentration de l'HE de *Citrus aurantium*, ces résultats se concordent avec ceux de (**Hamdani, 2015 et Van Hung et al., 2013**).

### V.3.3.1. Effet anti fongique de *Rosmarinusofficinalis L* sur*Alternariasp.*

Les résultats de l'effet antifongique de l'HE du Romarin sur la croissance mycélienne d'*Alternariasp.* sont reportés dans la figure 21.



**Figure 21:** Croissance mycélienne d'*Alternaria sp.* après traitement par l'HE de

*Rosmarinus officinalis*.

La longueur des mycéliums observés après le traitement par l'HE de *Rosmarinus officinalis* a atteint les 40 mm au J7 pour les concentrations de 0,5 µl /ml, 1 µl /ml et 2 µl /ml tandis qu'à la concentration de 5 µl /ml, la croissance mycélienne s'est stabilisée à 1.75 mm (**figure 21**).

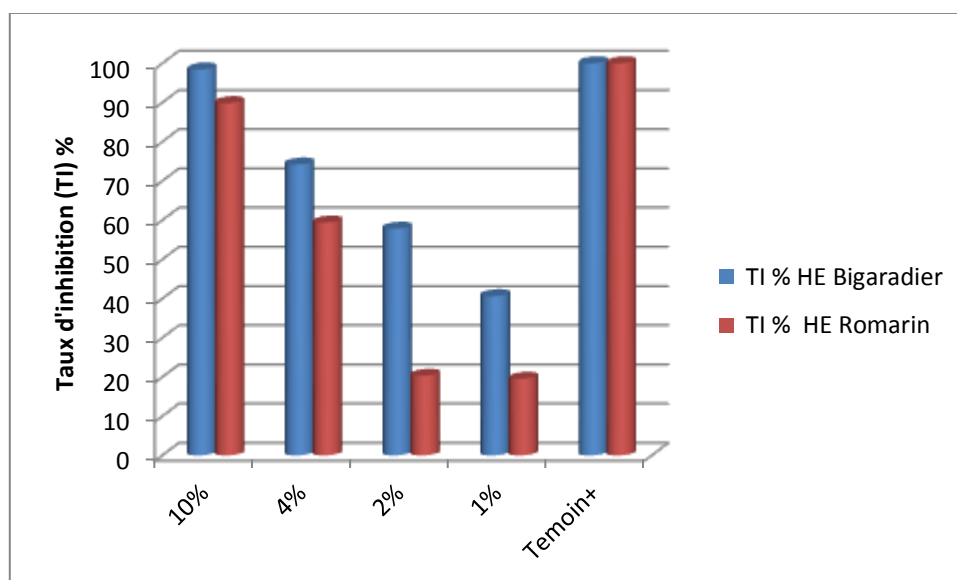
Les résultats de la croissance mycélienne d'*Alternaria sp.* à la concentration de 1 µl/ml sont identiques à ceux de **Shaban (2014)** où il a démontré que la croissance a démarré au j2 et a atteint 39,5 mm.

#### V.4. Taux d'inhibitions :

Les huiles essentielles ont eu des activités variables sur les deux souches fongiques testées. Les taux d'inhibitions (TI) ont été calculés le J7 d'incubation.

##### V.4.1. Effet inhibiteur des HEs sur *Fusarium oxysporum* :

(**La figure 22**) montre que le taux d'inhibition de l'HE du romarin est inférieur (89,84%) à celui du bigaradier qui est (98,43 %) à la concentration de 5 µl/ml. Ceci implique que le *Fusarium oxysporum* est plus sensible aux différentes concentrations de l'HE de *Citrus aurantium* (effet plus répressif) par rapport à celles du romarin.



**Figure 22:** Taux d'inhibition (TI) des HEs sur *Fusarium oxysporum*

Concernant *Fusarium oxysporum*, l'huile essentielle du bigaradier (*Citrus aurantium*) a donnée des taux d'inhibition supérieurs à 50% pour les concentrations de 2 $\mu$ l/ml et 1 $\mu$ l/ml avec une inhibition totale (98.43%) pour la concentration de 5  $\mu$ l/ml. Ces résultat sont supérieurs a ceux trouvés dans les travaux de (Zakaria *et al.*, 2017) qui ont obtenus des pourcentages d'inhibition de 100% à la concentration de 20  $\mu$ l/ml.

Concernant l'inhibition de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* par l'huile essentielle de romarin , les résultats obtenus montrent un effet inhibiteur supérieur (89.84 %) par rapport à (Bouzidi 2019) qui a obtenu un taux d'inhibition de 60% à la concentration de 2% et de (Ozcan et Chalchat , 2008 ) qui ont mentionnés un taux d'inhibition partielle (5%) à la concentration de 40 ppm .

#### V.4.2. Effet inhibiteur des HEs sur *Alternariasp.* :

*Alternariasp.* se révèle particulier ; les essais ont donné des taux d'inhibition presque identiques pour les huiles essentielles du bigaradier et du romarin.

Pour les concentrations 0,5 $\mu$ l/ml, 1 $\mu$ l/ml et 2 $\mu$ l/ml au jour J7 les deux souches fongiques se sont développées même en présence des huiles essentielles avec absence d'inhibition. Cependant à la concentration de 5 $\mu$ l/ml les taux d'inhibition (TI) ont été identiques au produit chimique de synthèse (témoin+) et même supérieur pour l'HE du bigaradier (Figure 23).

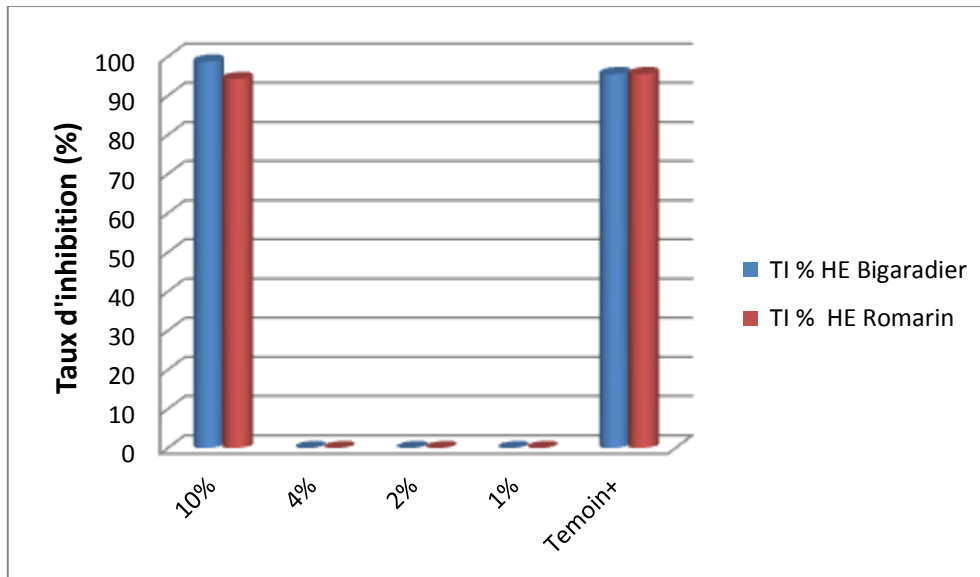


Figure 23: Taux d'inhibition (TI) des HEs sur *Alternaria* sp.

Les résultats des travaux de ( Zakaria *et al.*, 2017) ont montrés un effet inhibiteur de l'HE du bigaradier inférieur à ceux de notre étude où à la concentration de 1500 ppm une inhibition de 100% a été enregistrée.

Concernant l'effet inhibiteur de l'HE du romarin sur *Alternaria alternata*, nos résultats sont supérieurs à ceux trouvés par (Saglamet *al.*, 2009) qui ont trouvés un taux d'inhibition de 12,92% à la concentration de 100 µl/ml.

### Conclusion

Les dégâts enregistrés sur la santé humaine et sur l'environnement dus à l'utilisation des pesticides conventionnels sont fréquents. C'est dans ce contexte et dans le but de chercher une solution alternative et de proposer des produits de substitution moins toxiques et moins onéreux que s'inscrit le présent travail dont l'objectif principal est de tester le potentiel antifongique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques et médicinales en provenance de la région de Sidi bel abbés : le Romarin (*Rosmarinus officinalis*) et le bigaradier (*Citrus aurantium*) vis-à-vis de deux souches pathogènes : *Fusarium oxysporium* et l'*Alternaria sp.*

Les travaux menés dans la présente étude ont permis de mettre en évidence l'activité antifongique des deux huiles essentielles par la technique de contact direct sur milieu gélosé «PDA».

Les résultats ont été assez probants puisqu'ils ont révélé un bon rendement des deux huiles essentielles avec des taux respectifs de 0,95 % et 0,54 % pour *Rosmarinus officinalis* et *Citrus aurantium* et une bonne activité inhibitrice vis-à-vis des deux champignons utilisés tout en enregistrant des taux d'inhibition de 89,84% (*Rosmarinus officinalis*) et de 98,43% (*Citrus aurantium*) sur *Fusarium oxysporium*. Cependant, l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Citrus aurantium*, sur *Fusarium oxysporium*, est plus élevée par rapport à celle de *Rosmarinus officinalis*. D'autre part, les deux huiles essentielles ont marqué le même effet inhibiteur vis-à-vis d'*Alternaria sp.* Par ailleurs, cette activité varie d'une souche à une autre et diffère selon les concentrations d'HE des plantes étudiées.

La détermination de l'effet inhibiteur de la croissance mycélienne a montré que nos huiles essentielles sont dotées d'une activité intéressante et pourrait donc être utilisées comme alternatives aux traitements antifongiques ce qui va permettre une réduction de l'utilisation de traitements de synthèse et avoir recours à des solutions alternatives sous forme de produits naturels à base d'huiles essentielles.

Ce travail est loin d'être exhaustif. En terme de perspectives et dans le but de compléter ce modeste travail d'autres recherches doivent être menées dans ce sens afin d'étudier le pouvoir et le mécanisme d'inhibition de la croissance mycélienne par les composés purifiés de *Rosmarinus officinalis* et de *Citrus aurantium*.

## *Références bibliographiques*

1. **Abad M.J., Bedoya L. M., Apaza L., Bermejo P., 2012.** The *Artemisia L.* genus: a review of bioactive essential oils. *Molecules*, 17(3), 2542-2566.
2. **Adejumo, T.O., Hettwer, U., and Karlovsky, P., 2007.** Occurrence of *Fusarium* species and trichothecenes in Nigerian maize. *International Journal of Food Microbiology* 116: 350- 357.
3. **AFNOR.1999.** Recueil de norme : les huiles essentielles .Tome1.Echantillonnage et méthode d'analyse .AFNOR. Paris .440p .
4. **Agrios, G.N., 2005.** Plant Pathology. 5<sup>th</sup> ed. Elsevier Academic Press, USA UK.
5. **Amarti, F., 2009.** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. Et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*14(1), 141-148.
6. **Arino, A., Juan, T., Estopanan, G., and Gonzalez-Cabo, J.F., 2007.** Natural occurrence of *Fusarium* species, fumonisin production by toxigenic strains and concentration of fumonisins B1, and B2 in conventional and organic maize grown in Spain. *Journal of Food Protection* 70: 151-156.
7. **Athmania I., Djaiabet CH ., Zaghdoudi GH., 2018.** Etude de l'activité Antifongique des huiles essentiellesde *Rosmarinus Officinalis L.* et du *Thymus Capitatus L.* sur des agents d'otomycose : Cas d'*Aspergillus niger.*, Mémoire de Master ., Université 8 Mai 1945 Guelma., Faculté des sciences de nature et de la vie., Filière sciences biologique.
8. **Atik Bekkara F., Bousmaha L., Taleb Bendiab SA., Boti JB., Casanova J., 2007.** Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis L* poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. *Biologie & Santé.* 7: 6-11.
9. **Azeredo H.M.C., Faria J.A.F.et Dasilva M.A.P., 2004.** Minimization of peroxyde formation rate in soybean oil by antioxydant combonations. *Food Researh International*, 4, 141-158.
10. **Bachelot C., Blaise A., Corbel T. Et Le Guernic A., 2006.** Les huiles essentielles : extraction et comparaison. U.C.O Bretagne. Pp: 1-18.
11. **Badillet, G., 1991.** Les alternarioses cutanées. *Revue générale. J. Mycol. Méd.* 118: 59-71.
12. **Baser K.H.C. et Buchbauer G., 2010.** Handbook of Essential oils : Science, Technology And Applications. CRC Press. UK.
13. **Bedrane M.A., « les Agrumes ». 15 janvier 2020,** <https://agronomie.info/fr/les-agrumes/>.

14. **Beirão A.R.B. et Bernardo-Gil M.G., 2006.** Antioxidants from *Lavandula luisieri*. 2<sup>nd</sup> Mercosur Congress on Chemical Engineering. Portugal. 8p.
15. **Bendali A., Oulebsir C., El-Hadi D. et Djazouli Z.E., 2019.** Impact of the formulation on the potential anti fungal activity essential oil of *Citrus aurantium L.* *AgroBiologia*, 9(2), 1677-1693.
16. **Benhamou, N., Chet, I., 1997.** Parasitism of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopathology* (86), p. 405–416.
17. **Bocco, Alessandra, et al., 1998.** Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of agricultural and food chemistry* 46.6; P: 2123-2129.
18. **Botton, B. Bretton, A. Fevre, M. Gauthier, S. Guy, Ph. Larpent, Jp. Reymond, P. Sanglier, J.J. Vayssier, Y. Veau, P., 1990.** Moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle. 2eme édition. Paris. 512: 309.
19. **Boubekeur B., Eddine M.S., 2016.** Contribution à l'étude de l'impact de procédé d'extraction des huiles essentielles sur l'activité antifongique, antibactérienne et antioxydante de la plante médicinale *Rosmarinus officinalis L.* (Doctoral dissertation).
20. **Bousbia N. 2011.** Extraction des huiles essentielles riches en antioxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires ; thèse de doctorat ; université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique.
21. **Boutekdjiret C., Bentahar F., Belabbes R. & Bessiere J.M., 1999.** Study of *Rosmarinus officinalis L.* essential oil yield and composition as a function of the plant life cycle. *J. Essent. Oil Res*, 11 (2): 238-240.
22. **Bouzidi L., 2019.** Étude de l'activité antifongique de *rosmarinus officinales* vis-à-vis *fusarium oxysporium.f. sp lycopersici* et *Alternaria solani*.lp., Université Djilali liabes de sidi Bel Abbes., Faculté des sciences de la nature et de la vie ., département des sciences de l'agronomie.
23. **Brewer D., 1960.** Studies in *Asochyta pisi*. *Canadian journal de la végétale philosophie Mathématique*. Classique hachette.
24. **Bruneton J., 1987.** *Déments de phytochimie et de pharmacognosie*. Paris, Lavoisier, 585p.
25. **Bruneton J., 1999.** *Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – Techniques et documentations*, 3ème Edition, Lavoisier, (1999), 1120 pages.

26. **Bruneton J., 2016.** Pharmacognosie : 5ème édition. Éditions Lavoisier, 1487p.
27. **Burt.S., 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 223-253.
28. **Bush, R.K. Portnoy, JM., 2001.** The role and abundance of fungal allergens in allergic diseases. *J. Allerg Clin. Immunol.* 107: 430-440.
29. **Caillet S. et Lacroix M., 2007.** Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. INRS -Institut Armand-Frappier, (RESALA). P: 1-8.
30. **Castegnaro M., Pfohl-Leszkowicz A., 2002.** Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans la sécurité alimentaire du consommateur, Lavoisier, Tec&Doc.
31. **Couderc V., 2001.** Toxicité des huiles essentielles. Thèse d'exercice, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 65 p.
32. **Cox S., D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R. And 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.
33. **Criquet S. and Calvert V., 2008.** IMEP UMR CNRS 6116. Planche Tp mycologie publié sur internet le 03/03/2008.
34. **Cronquist. A., 1981.** An integrated system of classification of flowering plants. New York: Columbia University Press.
35. **Croteau R., 1986.** Biochemistry of monoterpenes and sesquiterpenes of essential oils. *Herbs, spices, and medicinal plants: recent advances in botany, horticulture, and pharmacology.* Vol. 1, Oryx Press, Phoenix, 81-133.
36. **Cutter C.N., 2000.** Antimicrobial effect of herb extracts against *E. coli* O157: H7. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* associated with beef. *Journal of Food Protection*, 63(5), 601-607.
37. **Decaux. I., 2002.** Phytothérapie : Mode d'emploi. Edition : Le bien public, p.p. 6.
38. **Derwich E.H., Benziane Z., Chabir R., Taouil R., 2011.** In vitro antibacterial activity and GC/MS analysis of the essential oil extract of leaves of *Rosmarinus Officinalis* grown in Morocco. *Int J Pharm Pharm Sci.* 3(3) : 89- 95.
39. **Desmares C., Laurent A. et Delerme C., 2008.** Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. AFSSAPS. Anatole, France, 18p.

40. **Deterre, S., 2012.** Influence des étapes de production du parfum issu des écorces d'orange amère (*Citrus aurantium* L. ssp *amara*) sur la qualité aromatique. L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement AgroParisTech, p. 211.
41. **Di Pietro, A. Madrid, MP. Caracuel, Z. Delgado-Jarana, J, Roncero, MIG., 2003.** *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus *Molecular Plant Pathology*(4): 315-325.
42. **Djeddi S., Bouchenah N., Settar I., Skaltsa HD., 2007.** Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Algeria. *Chem. Natural Comp.* 43(4) : 487- 490.
43. **Djenane D., 2015.** Chemical profile, antibacterial and antioxidant activity of Algerian citrus essential oils and their application in *Sardina pilchardus*. *Foods*, 4(2), 208-228.
44. **Djouahri A., Boualem S., Boudarene L. et Baaliouamer A., 2015.** Geographic's variation impact on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils from wood and leaves of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Industrial crops and Products*, 63, 138-146.
45. **Dorosso Sonate J., 2002.** Composition chimique des huiles essentielles extraites de plantes aromatiques de la zone soudanienne du Burkina Faso : valorisation. Université Ouagadougou.
46. **Dosoky N. et Setzer W., 2018.** Biological Activities and Safety of Citrus spp. essential Oils. *International Journal of Molecular Sciences*. 19. 10.3390/ijms19071966.
47. **Duru M.E., Cakir A., Kordali S., Zengin H., Harmandar M., Izumi S et Hirata T., 2003.** Antifungal activities of the leaves of three pistacia species grown in Turkey. *Fitoterapia*.74 (1-2):170-176.
48. **Emeryk A., Chojna A., Bartkowiec K., Emeryk M., Postepski, J., 2004.** Prevalence of asthma and some respiratory symptoms in the years 1995 and 2001 in schoolchildren from rural regions of Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 11: 63-66.
49. **Encyclopedie Encarta, (2006).**
50. **Ersus, S., et Cam M., 2007.** "Determination of organic acids, total phenolic content, and antioxidant capacity of sour *Citrus aurantium* fruits." *Chemistry of Natural Compounds* 43.5: 607-609.
51. **Ezzahiri,B., 2001.** Les maladies du Blé Identification, facteurs de développement et méthodes de lutte (Bulletin Mensuel d'information et de liaison du PNTTA) N°77.

52. **Fandohan, P., Gnonionfin, B., Hell, K., Marasas, W.F., and Wingfield, M.J., 2005.** Natural occurrence of *Fusarium* and subsequent fumonisin contamination in preharvest and stored maize in Benin. *International Journal of Food Microbiology* 99: 173-183.
53. **Ferhat, M.A., Meklati, B.Y., Chemat, F., 2010.** Citrus D'Algérie les huiles essentielles et leurs procédés d'extractions Office des publications universitaires ed.
54. Festy D., 2011. Les huiles essentielles ça marche. A propos de l'aromathérapie. Editions: Leduc.s.Paris. 9 p.
55. **Fisher K. et Phillips C., 2006.**The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *E.coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*, in vitro and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*, 101 (6), 1232-1240.
56. **Fisher K., Phillips C., 2008.** Potential antimicrobial use of essential oils in foods: is citrus the answer? *Trends Food Sci Tech* 19: 156–64.
57. **Frouhat Z. et Lahcini.B., 2013.** Lutte biologique par l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* ; mémoire de master académique ; université de Kasdi Merbah de Ourgla.
58. **Garnéro J., 1991.** Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation. Ed. Encyclopédie des médecines naturelles, Paris, France, pp. 2-20.
59. **Ghédira, K, Goetz,P, 2015.***Citrus aurantium*L var. *amara* Link. *Phytothérapie* 13: 320-327.
60. **Giraudn, clermont- ferrand., 1993.** l'oranger doux, l'oranger amer, thèse de docteur en pharmacie p 77.
61. **Guba R., 2001.** Toxicity myths-essential oils and their carcinogenic potential. *International Journal of Aromatherapy*, 11, 76-83.
62. **Guinoiseau.E., 2010.** Molécules, antibactérienne issues d'huiles essentielles : séparation, identification et mode d'action. Thèse de Doctorat de l'Université de Corse, option : Biochimie- Biologie moléculaire, France. 50p.
63. **Haglund, W.A ., Kraft, J .M., 2001.***Fusarium wilt*. In" *Compendium of Pea Diseases Pests*", (Eds. Kraft, J.M., Pflieger, F.L.) American Phytopathological Society Press, St. Paul, USA, 13.

64. **Halonen M., Stern D.A. And Wright A.L., 1997.** Alternaria as a major allergen for asthma in children raised in a desert environment. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155:1356-1361.
65. **Hartmann. T., 2007.** From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism, Review. *Phytochemistry*, 68, p.p. 2831–2846.
66. **Hawksworth, D.L., 1994.** Ascomycete systematics: problems and perspectives in the nineties. Plenum Press, New York.
67. **Hernandez T., Canales M., Avila J. G., Garcia A. M., Martinez A., Caballero J., 2005.** Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lantana achyranthifolia* Desf. (Verbenaceae). *Journal of Ethnopharmacol.* 96:551–554.
68. **Hussain A.I., 2009.** Characterization and biological activities of essential oils of some species of lamiaceae. Thèse de Doctorat. Pakistan. 257p.
69. **Hussin N.M., Muse R., Ahmad S., Ramli J., Mahmood M., Sulaiman M.R, Shukor M.A-Y., Rahman M.F.A. et Aziz K.N.K., 2009.** Antifungal activity of extracts and phenolic compounds from *Barringtonia racemosa* L. (*Lecythidaceae*). *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 (12): 2835-2842.
70. **Idnurm A. et Heitman J., 2005.** Light controls growth and development via a conserved pathway in the fungal Kingdom. *PLoS Biol* 3:615-626.
71. **Inoue M., 1994.** Fungal contamination of paint film and plastic wall covering. Ed. Garg KL, Garg N & Mukerji KG, Recent advances in biodeterioration and biodegradation. Vol 2. Biodeterioration and biodegradation of natural and synthetic products. Calcutta : Naya PROKASH, 71-80.
72. **Iserin P., Moulard F., Rachel R., Biaujeaud M., Ringuet J., Bloch J., Ybert E., Vican P., Masson M., Moulard F., Restellini J.P. et Botrel A., 2001.** La rousse : encyclopédie des plantes médicinales ; identification, préparation, soins. 2 éd, Paris, pp.155-291.
73. **Iserin P., Masson M. et Restellini J.P., 2007.** Larousse des plantes médicinales. Identification, préparation, Soins .Ed Larousse, pp14.
74. **Jeunot B., 2005.** Les fusariotoxines sur céréales: détection, risque et nouvelle réglementation. Thèse d'exercice. Université de Nancy I. UFR Sciences pharmaceutiques et biologiques.

75. **Kaloustian J., Chevalier J., Mikail C., Martino M., Abou L., Vergnes M.F., 2008.** Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne. Springer DOI 10.1007/s10298-008-0307-1.
76. **Kaloustian J, Hadji-Minaglo F., 2012.** La connaissance des huiles essentielles : qualilogie et aromathérapie. Paris. Edition Springer.
77. **Kaloustian J. et Hadji-Minaglou.F., 2013.** La connaissance des huiles essentielles : qualilogie et aromathérapie: Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée. Edition Springer Science & Business; pp11.
78. **Khalil A.R.M., 2001.** Phytofungitoxic properties in the aqueous extracts of some plants. Pakistan Journal of biological Science, 4(4):392\_394.
79. **Kohen R., Nyska A., 2002.** Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. Toxicologic Pathology. 30: 620-650.
80. **Kordali S., Cakir A., Zengin H., Durun M.E., 2003.** Antifungal activities of the leaves of three pistacia Species grown in turkey. fitoterapia. 74p: 164-167.
81. **Kunkle U. et Lobmeyer T.R., 2007.** Plantes médicinales. Identification, récolte, propriétés et emplois. Ed.Parragon Books Ltd 87-99p.
82. **Kwon-Chung K.J. et Bennett J.E., 1992.** Medical Mycology. Lea & Febiger, Philadelphia and London.
83. **Lepoivre P., 2003.** Phytopathologie: bases moléculaires de biologiques des pathosystèmes et fondement des stratégies de lutte. De Boeck & Presses Agronomiques de Gembloux. Ed.: Brussels, Belgium, 149-167
84. **Lin Y.T., Labbe R.G. & Shetty K., 2004.** Inhibition of *Listeria monocytogenes* in fish and meat systems using Oregano and Cranberry synergies. Applied and Environmental Microbiology, 70, 5672-5678.
85. **Linas M.D., Morassin P. Recco., 1999.** Actualités sur *Alternaria*: écologie, revue Française d'allergologie. 349-355.
86. **Lis-Balchin M., 2002.** Lavender: the genus *Lavandula*. Taylor and Francis, London.p: 37, 40, 50, 155-200.
87. **Logrecio A. Moretti A. Solfrizzo M., 2009.** Alternariatoxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. World Mycotoxin Journal. 2(2): 129-140.
88. **Lucchesi M.E., 2005.** extraction sans solvant assistée par micro- onde conception et Application à l'extraction des huiles essentielles :p17 ;23, 52.

89. **Madhavi D.L., Deshpande S.S. et Salunkhe D.K., 1996.** Food Antioxidants. Technological, Toxicological, and Health Perspectives. Marcel Dekker, Inc. New York. 65p.
90. **Masson T.L. et Wasserman B.P., 1987.** Inactivation of red beet beta-glucan synthesis by native and oxidized phenolic compounds. *Phytochemistry*. 26: 2197-2202.
91. **Medjedoub F., 1996.** Biologie de l'aleurode floconneux, *Aleurothrixus floccosus* Maskell (Homoptera, Aleurodidae) dans un verger d'agrumes de la région de Draâ Ben Khedda (Tizi-Ouzou). Magistère en Biologie & Ecologie des Populations. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, 73.
92. **Messini C.M. et Cassini R., 1981.** Recherches sur les Fusarioses. IV-La systématique des *Fusarium*. *Ann.Epiph.*, 19 : 387-454.
93. **Mhiri W., 2003.** Maladies cryptogamiques des graminées à gaeon et biologie des *Fusarium* spp et *Rhizoctonia* spp. Mémoire de diplôme d'études approfondies en protection des plantes et environnement de l'Ecole Supérieure d'horticulture et d'Elevage Chott Mariem, Sousse, Tunisie : 107p.
94. **Michielse C.B. Rep M.? 2009.** Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 10 (3): 311-324.
95. Mishra A.K. et Dubey N.K., 1994. Evaluation of Some Essential Oils for Their Toxicity against Fungi Causing Deterioration of Stored Food Commodities. *Applied and Microbiology*. 60 (4): 1101-1105.
96. **Mohammedi Z., 2006.** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. *Mémoire de magistère*. Université de Tlemcen: 104 P.
97. **Ouguelmane A., Houichiti R., 2020.** Etude des activités biologiques d'une plante aromatique médicinale locale "Citrus aurantium"., Mémoire la fin d'étude vue de l'obtention du diplôme de Master ., *Université de Ghardaïa .*, Faculté des Sciences et Technologies ., Département des Génie des Procédés.
98. **Ouibrahim A., 2014.** Evaluation de l'effet antimicrobien et antioxydant de trois plantes aromatiques (*Laurus nobilis* L., *Ocimum basilicum* L. et *Rosmarinus officinalis* L.) de l'Est Algérien. *Thèse*, Université Badji Mokhtar - Annaba, 32p.
99. **Ouraini. D., Agoumi. A., Ismaïli-Alaoui. M., Alaoui. K., Cherrah. Y., Amrani. M. et Belabbas. M. A., 2005.** Etude de l'activité des huiles essentielles de plantes

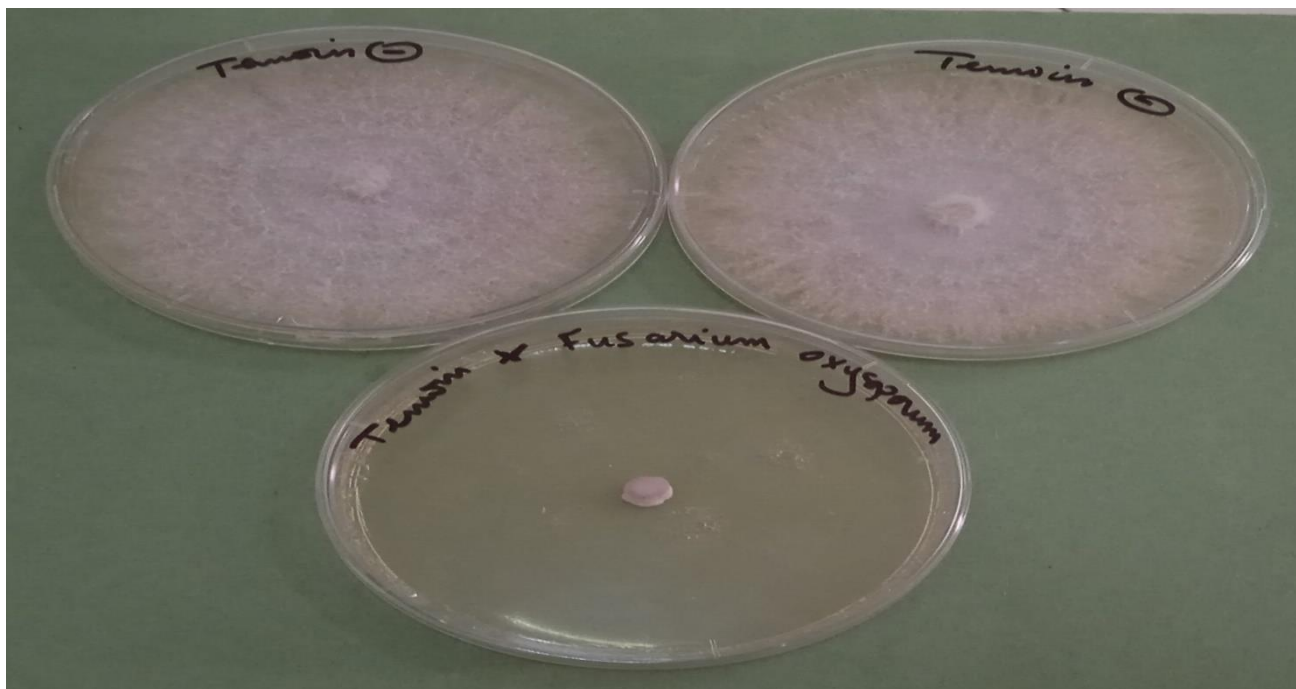
- aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermatophytes. *Phytothérapie*, 3, 4, p.p. 147-157.
100. **Ousaadi Y. et Moukdad. N., 2019.** Evaluation in vitro de l'effet insecticide du romarin (*Rosmarinus officinalis*) et de la sauge (*Salvia officinalis*) vis-à-vis du puceron vert des agrumes (*Aphis spiraecola*)... mmoire Pour l'obtention du diplôme de Master II en Agronomie. Université Abdelhamid Ibn Badis De Mostaganem. Faculté des sciences de la nature et de la vie Département d'agronomie.
101. **Oussalah M., Caillet S., Saucier L. & Lacroix M., 2006.** Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli*O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 69 (5), 1046-1055.
102. **Özcan M.M. et Chalchat J.C., 2008.** Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey. *International journal of food sciences and nutrition*, 59(7-8), 691-698.
103. **Ozenda P., 1990.** Les organismes végétaux, tome I : végétaux inférieurs, Masson , P. 220.
104. **Pibiri M.C., 2006.** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. thèse de Doctorat, Lausanne, Canada, p : 177.
105. **Quezel. P., Santa. S., 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, 36, p.p. 84-679.
106. **Rasooli. I., Abyaneh. M.R., 2004.** Inhibitory effects of thyme oils on growth and aflatoxin production by *aspergillus parasiticus*. *food control* 15.
107. **Sacchetti. et Collaborateurs., 2005.** Growing in Argentina. *Bioresource Technology*.• (In press).
108. **Saglam C., Özcan M. M. et Boyraz. 2009.** Fungal inhibition by some spice essential oils. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 12(6), 742-750.
109. **Sallé J.L., 1991.** Les huiles essentielles: Synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie. Editions : Frison-Roche. Paris, 21.
110. **Satish S., Raghavendra M-P., Mohana D-C. et Raveesha K-A. (2010).** *In vitro* evaluation of the antifungal potentiality of *Polyalthialongifolia* against some sorghum grain moulds. *Journal of Agricultural Technology*. Vol.6 (1): 135-150.

111. **Shaban W., 2014.** Evaluation of some fungicide alternatives against *Alternaria* fruit rot on tomato. *Egyptian Journal of Phytopathology*, 42(2), 91-104.
112. **Shankar, J., 2006.** Recombinant glutathione-S-transferase a major allergen from *Alternaria alternata* for clinical use in allergy patients. *Molecular Immunology*. 43 (12): 1927-1932.
113. **Shwart Z.T., 2011.** A phylogeny of the putaceae and a biogeographic study of it's subfamily aurantioideae. Degree project for master of science in systematics and biodiversity, biology, department and environmental science, university of gothemburg ", 37p.
114. **Sidana J., Saini V., Dahiya S., Nain P., Bala S., 2013.** A review on citrus 'the boon of nature. *Intern. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 18: 20–27.
115. **Sikkema J., de Bont J.A., Poolman B., 1994.** Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J Biol Chem* 269 : 8022–8
116. **Simmons, E.G., 2007.** *Alternaria. An Identification manuel.* : CBC Biodiversity Series No. 6. CBC Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands. 775 pp.
117. **Spiegel- Roylet Goldschmidt E.E -" biologie of citrus".** University Press. Cambridge U.K (101), (1996): 23-25p.
118. **Spiga N., 2016.** Effet in vitro de l'extrait méthanolique des feuilles et des tiges de *Ruta chalepensis*, *Ruta angustifolia* et *Aplophyllum tuberculatum* vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radici lycopersici*, *Alternaria solani*, *botrytis cinerea* et *pectobacterium cacarotovororum*. Mémoire de master en sciences agronomiques; université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem.
119. **Subramanian C.V., 1983.** *Hyphomycetes : Taxonomy and Biology.* Academic Press Inc., 300, 357, 399.
120. **Tabuc C., 2007.** Flore fongique de différents substrats et condition optimales de production des mycotoxines. Thèse de Doctorat. Institut polytechnique de Toulouse.
121. **Talibi I., Askarne L., Boubaker H., Boudyach E.H., Msanda F., Saadi B., Ait Ben Aoumar A., 2012.** Antifungal activity of Moroccan medicinal plants against citrus sour rot agent *Geotrichum candidum*. *Letters in Applied Microbiology* 55(2): 155-61.

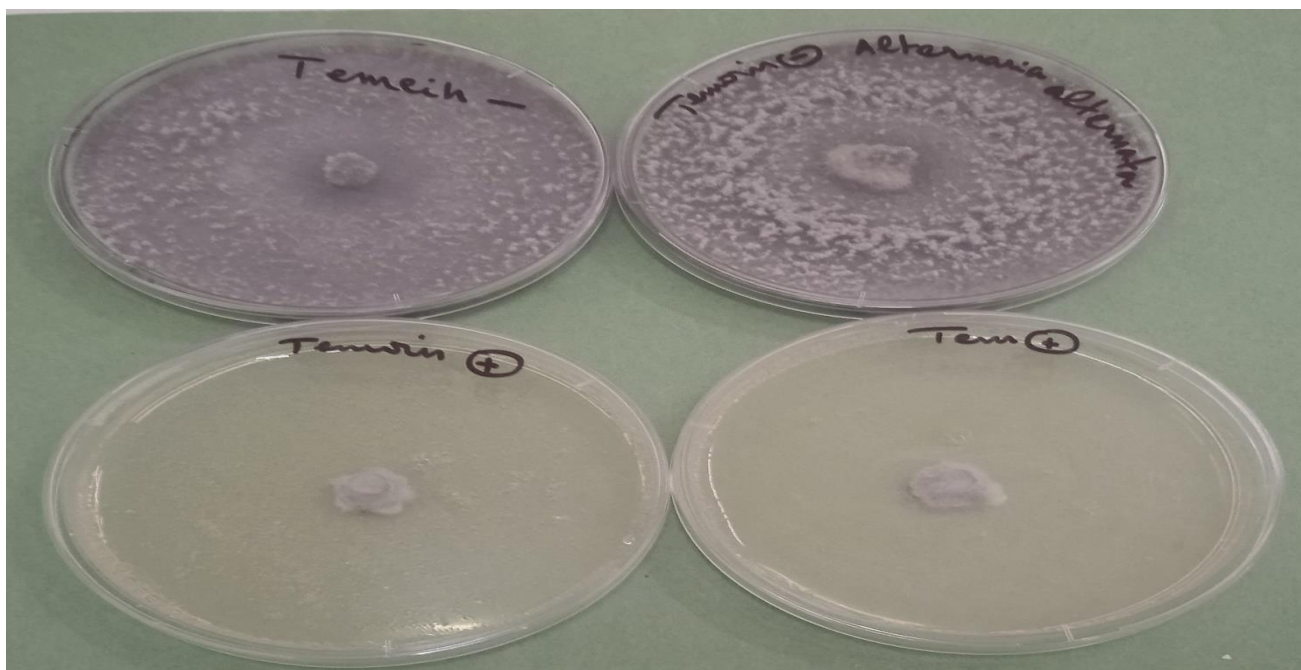
122. **Teuscher E., Anton R. et Lobstein A., 2005.** Plantes aromatiques: épices, aromates, condiments et huiles essentielles, Tec et Doc.
123. **Tsuchiya H., Sato M., Miyazaki T., Fujiwara S., Tanigaki S., Ohyama M, Tanaka T, Linuma M., 1996.** Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J.Ethnopharmacol.* 50: 27-34.
124. **Van Hung, P., Chi, P. T. L., & Phi, N. T. L. (2013).** Comparison of antifungal activities of Vietnamese citrus essential oils. *Natural product research*, 27(4-5), 506-508.
125. **Vieira B.S., 2004.** Alternariaeuphorbiicolacomomicoherbicida para leiteiro (Euphorbiaheterophylla):produçãomassal e integração com herbicidasquímicos. Tese de Doutorado. Viçosa MG. UniversidadeFederal de Viçosa.
126. **YAACOUB R. et TLIDJANE Imane., 2018.** Caractérisation physico-chimiques et analyses biologiques de l'huile essentielle des grains de *Cuminum cyminum* L. et de *Foeniculum vulgare* Mill. extraite par hydrodistillation et CO2 supercritique : Etude comparative. Mémoire de MASTER académique en génie chimique ; université ELARBI BEN M'HIDI Oum El Bouaghi faculté des sciences et des sciences appliquées.
127. **Youssef K., Ligorio A., Sanzani S.M., Nigro F., Ippolito A., 2012.** Control of storage diseases of citrus by pre-and postharvest application of salts. *Postharvest Biology and Technology* 72: 57-63.
128. **Zermane A., 2004.** Etude de l'extraction supercritique Application aux systèmes agroalimentaires »; thèse de doctorat, université de Mentouri ; Constantine ; 2010.
129. **Zohra H. F., Rachida A., Malika M., Benali S., Samir A. A. et Meriem B., 2015.** Chemical composition and antifungal activity of essential oils of Algerian citrus. *African Journal of Biotechnology*, 14(12), 1048-1055.
130. **Zoubeydi.C ;** « Etude des antioxydants dans le *Rosmarinus officinalis* .Labiataea »; thèse de magistère ; université de Ouargla.

# *Annexes*

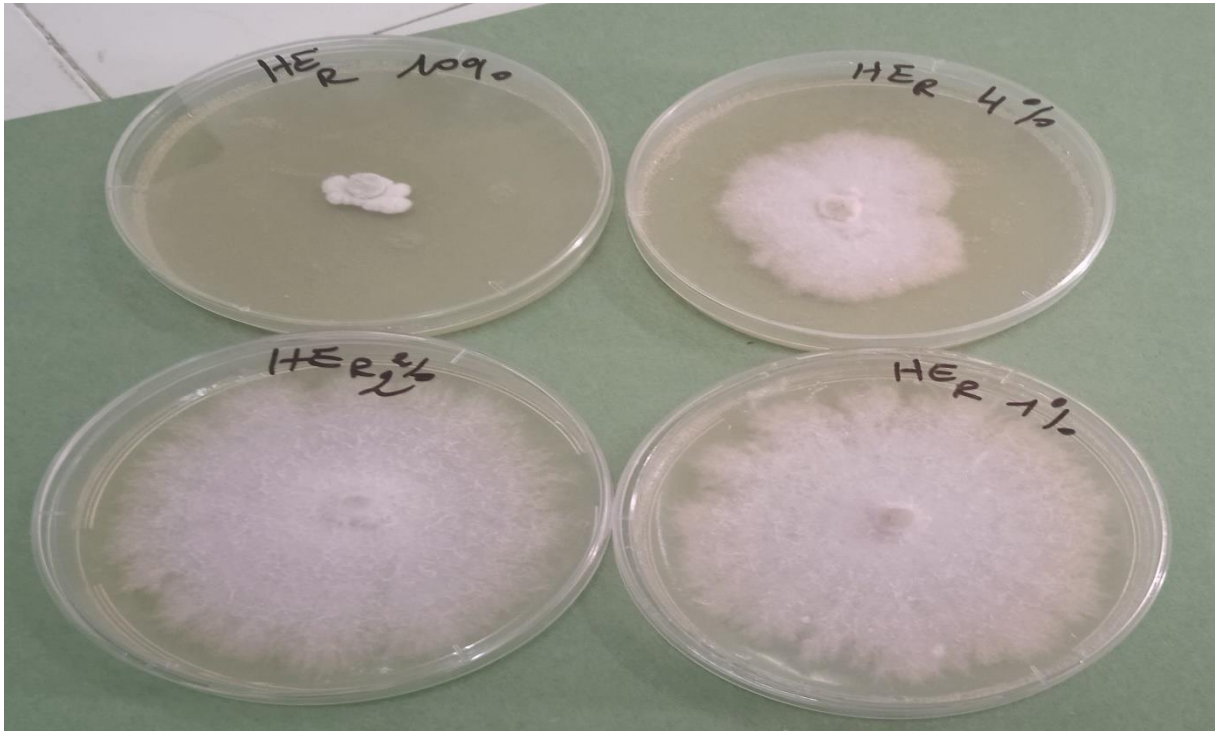
Annexe 01 :



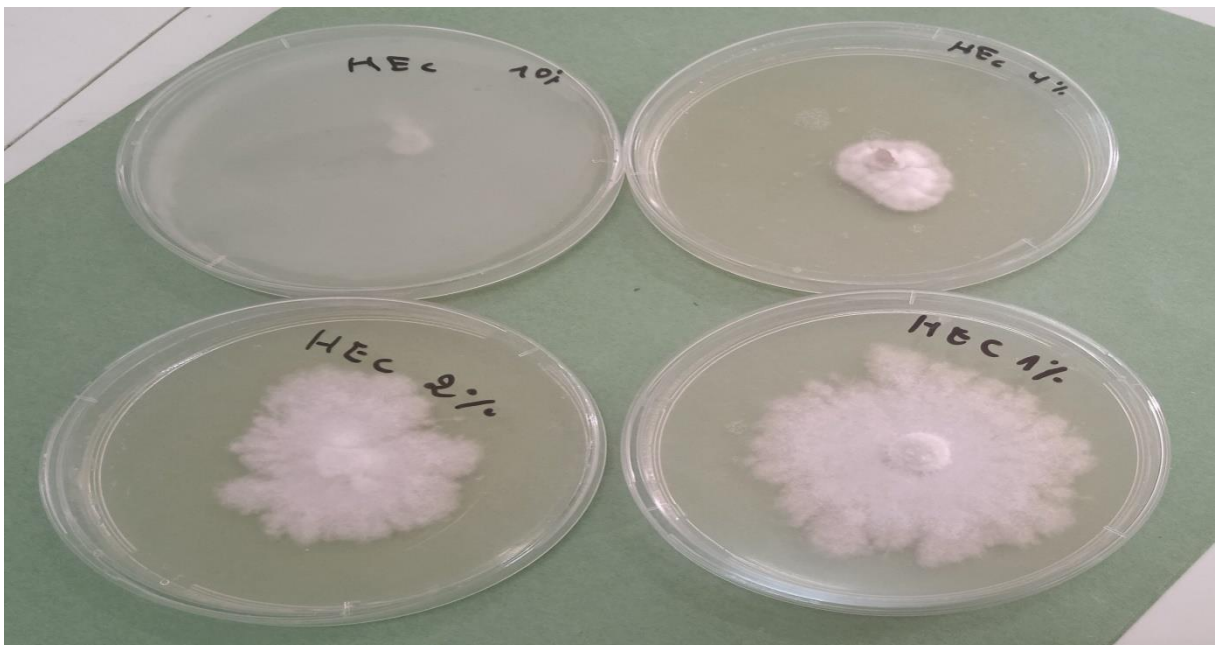
**Figure 24 :** Photo des témoins de la croissance mécylienne de *Fusarium oxysporium* au septième jour.



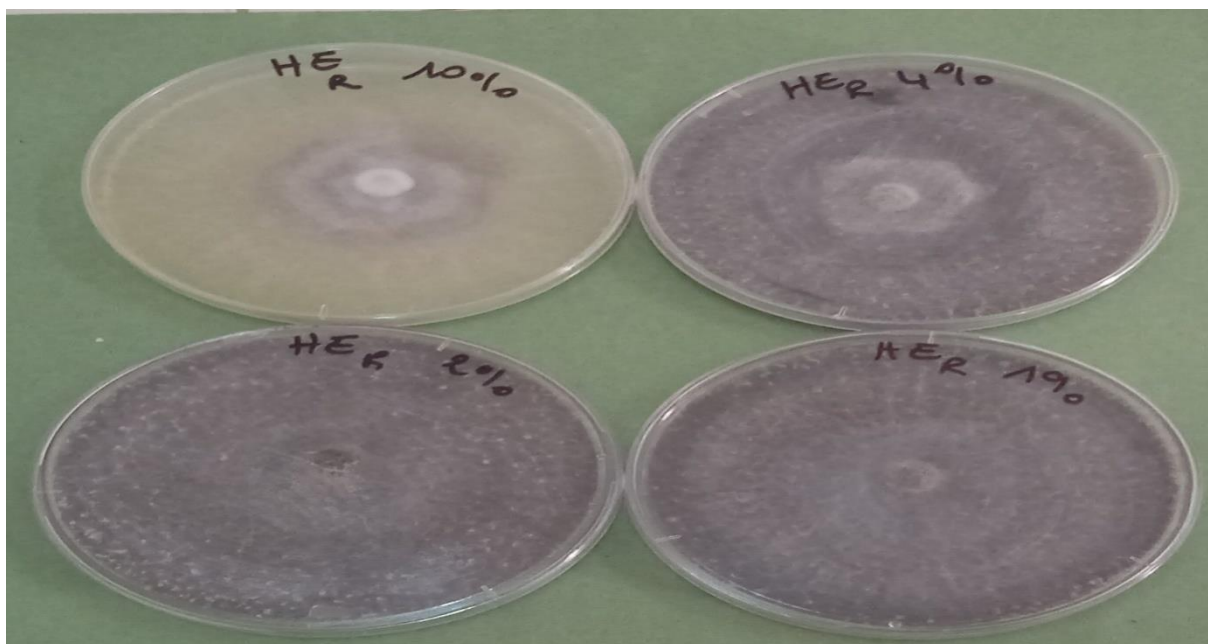
**Figure 25 :** Photo des témoins de la croissance mécylienne d'*Alternaria sp.* au septième jour (photo originale 2021).



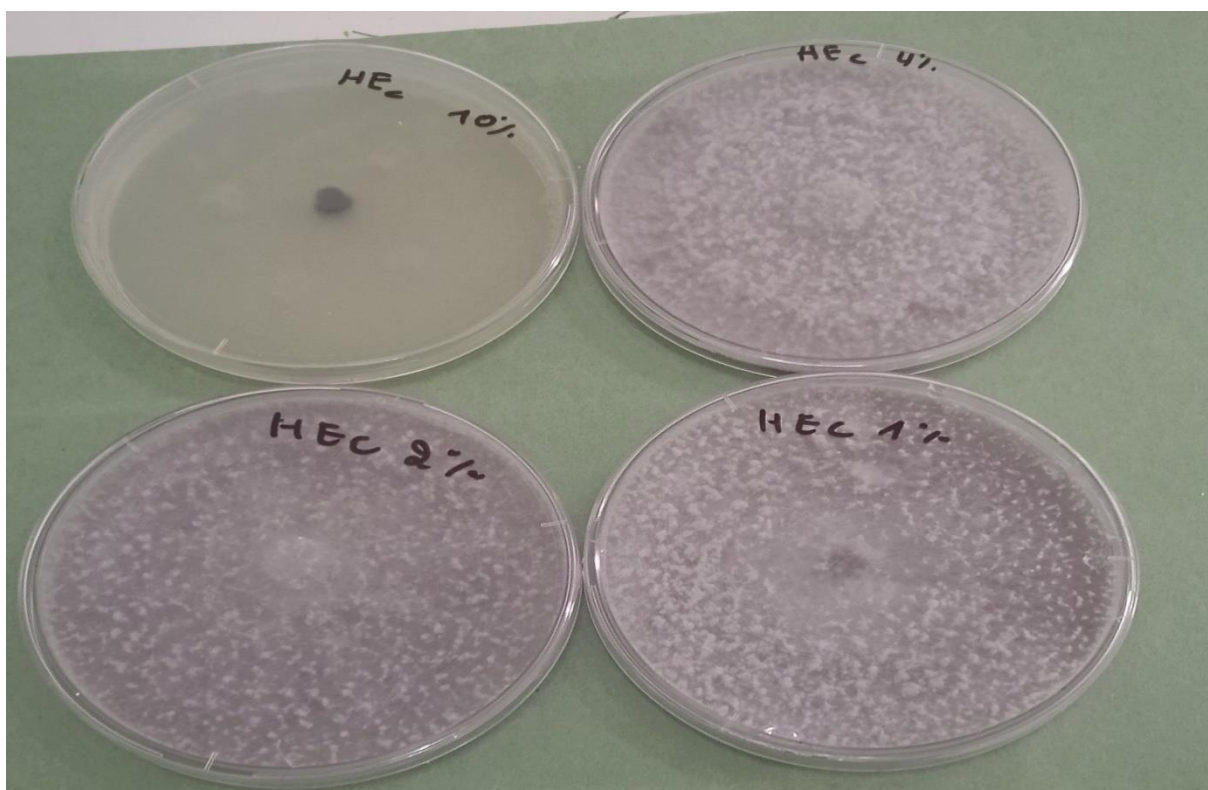
**Figure 26 :** Photo de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporium* au septième jour en fonction des différentes concentrations appliquées de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.



**Figure 27 :** Photo de la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporium* au septième jour en fonction des différentes concentrations appliquées de l'huile essentielle de *Citrus aurantium*.



**Figure 28 :** Photo de la croissance mycélienne d'*Alternaria sp.* au septième jour en fonction des différentes concentrations appliquées de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.



**Figure 29 :** Photo de la croissance mycélienne d'*Alternaria sp.* au septième jour en fonction des différentes concentrations appliquées de l'huile essentielle de *Citrus aurantium*.