

IMPACT DE LA FORMULATION SUR LE POTENTIEL ANTIFONGIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DU BIGARADIER *CITRUS AURANTIUM* L.

BENDALI Abdelaziz^{1*}, OULEBSIR Chahinez¹, EL HADI Djamel² et DJAZOULI Zahr-Eddine³

1. Université Blida 1, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Biotechnologie, Laboratoire de Recherche des Plantes Aromatiques et Médicinales. B.P. 270, Route de Soumaâ, Blida, Algérie
2. Université Blida 1, Département de Chimie Industrielle, Laboratoire d'Analyses Fonctionnelles des Procédés Chimiques. B.P. 270, Route de Soumaâ, Blida, Algérie
3. Université de Blida 1. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Département de Biotechnologie. Laboratoire de Biotechnologie des Productions Végétales, B.P. 270, Route de Soumaâ, Blida, Algérie

Reçu le 23/08/2019, Révisé le 11/10/2019, Accepté le 19/11/2019

Résumé

Description du sujet : Les produits biologiques sont recherchés pour leur efficacité dans plusieurs secteurs pharmaceutiques et agricoles. La formulation permet de sécuriser, de réduire et de préserver les ressources phylogénétiques tout en protégeant le principe actif

Objectifs : Notre étude a porté sur l'évaluation de l'activité antifongique de quatre formulations de l'huile essentielle des feuilles de *Citrus aurantium* (L.) à savoir la formulation en gel, au Tween, au DMSO et à l'acétone vis à vis d'un champignon phytopathogène (*Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici*) suivant deux modes d'administration, diffusion par disque et diffusion par micro-atmosphère.

Méthodes : L'huile essentielle de *Citrus aurantium* (L.) a été extraite par hydrodistillation-entraînement à la vapeur. 4 formulations ont été préconisées à partir de l'HE du bigaradier (F1 : Formulation en gel, F2 : Formulation au Tween, F3 : Formulation au DMSO, F4 : Formulation à l'Acétone). L'activité antifongique a été estimée selon une gradation positive de concentration (200, 400, 800, 1600 et 3200 µl/ml).

Résultats : Les résultats ont montré que les diverses formulations expriment un fort pouvoir inhibiteur suivant le gradient des concentrations du principe actif. La caractéristique propre aux différentes formulations se voit distincte entre diffusion par disque et diffusion par micro-atmosphère. La formulation en gel est performante suivant les concentrations de l'huile essentielle pour les deux méthodes. Tandis que les préparations au DMSO et à l'acétone sont très performantes par diffusion par disque.

Conclusion : Cette approche nous permet de valider l'utilisation des huiles essentielles dans divers domaines relatifs à la gestion antimicrobienne

Mots clés : feuilles d'oranger amer, CG/SM, adjuvant, *Fusarium*, diffusion par disque, diffusion par micro-atmosphère.

IMPACT OF THE FORMULATION ON THE POTENTIAL ANTI FUNGAL ACTIVITY ESSENTIAL OIL OF *CITRUS AURANTIUM* L.

Abstract

Description of the subject: Organic products are explored for their phytopharmaceutical impact. The formulation helps to secure, reduce and preserve phylogenetic resources while protecting the active ingredient.

Objective: Our study evaluated the antifungal activity of four (04) formulations of *Citrus aurantium* L the essential oil. namely the formulation on gel, Tween, DMSO and acetone against a phytopathogenic fungus (*Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici*) according to two modes of administration, by diffusion by disk and by micro-atmosphere.

Methods : *Citrus aurantium* L. essential oil was extracted by steam hydrodistillation. 4 formulations were recommended from the HE of the bigarade orange (F1: Gel formulation, F2: Tween formulation, F3: DMSO formulation, F4: Acetone formulation). The antifungal activity was estimated according to ascending concentration (200, 400, 800, 1600 and 3200 µl / ml).

Results : The results showed that the various formulations express a strong inhibitory power according to the gradient concentrations of active principle. The specific characteristic of the different formulations is distinct between diffusion by disk and diffusion by micro-atmosphere. The gel formulation was effective according to essential oil concentrations for both methods. While the preparation from DMSO and acetone was highly efficient by disk diffusion.

Conclusion : This approach allows us to validate the use of essential oils in various areas related to antimicrobial management.

Keywords : leaves of bigarade orange, CG/MS, adjuvant, *Fusarium*, disk diffusion, micro-atmosphere diffusion.

* Auteur correspondant: BENDALI Abdelaziz, E-mail: Aziz.Bendali@hotmail.com

INTRODUCTION

L'intérêt pour les biopesticides d'origine végétale, comme alternatifs aux applications fortuites d'une pharmacopée aveugle s'est développé, en particulier ceux qui préservent un environnement sain, biodégradables, non toxiques et spécifiques dans leur action, gagnent une attention considérable [1]. Ils sont également nécessaires pour combattre l'évolution de la résistance aux produits de synthèses [2].

Les nouvelles recherches ont soulevé la possibilité d'employer de nouveaux composés naturels qui peuvent agir en tant que biofongicides [3, 4, 5]. La lutte contre les champignons par l'application de fongicides naturels a pris un envol très important dans les stratégies alternatives aux fongicides de synthèse. Ces derniers sont à l'origine de beaucoup de maladies de plantes. Ils causent de grandes pertes de rendement dans les champs et affectent la qualité des aliments en conservation [6].

Les huiles essentielles avec leurs larges spectres d'action vis-à-vis d'un grand nombre d'espèces fongiques constituent une alternative très prometteuse, sans être une source de danger pour la santé humaine ou de pollution pour l'environnement [7].

Le potentiel d'utilisation des huiles essentielles et de leurs constituants comme fongicides est renforcé par leur biodégradabilité. En outre, l'apparition de souches fongiques résistantes aux fongicides à base d'huiles essentielles est fortement improbable à cause de la composition souvent polymoléculaire de ces huiles et de l'action synergique de leurs constituants [8].

L'exploitation des huiles essentielles dans la protection des végétaux est encore dans ses débuts, mais ces produits ont un potentiel fongicide prémuni pour remplacer les fongicides de synthèse. Des biofongicides à base d'huile essentielle sont mis sur le marché pour les agriculteurs pratiquant de l'agriculture biologique. Il s'agit du SporanTM (*Rosemarinus officianalis*), PromaxTM (*Thymus vulgaris*), TrilogyTM (*Azadirachta indica*) et E-RaseTM (*Simmondsia californica*) [9].

Les huiles essentielles de *Citrus aurantium* (L.) sont utilisées dans plusieurs produits comme aromatisants et additives tels que les aliments, les jus, les produits cosmétiques et médicinaux.

Elles sont utilisées pour leurs propriétés antioxydantes, germicides et anticancérigènes [10, 11]. Les huiles essentielles de *Citrus aurantium* (L.) occupent un large spectre des propriétés antifongiques qui sont dévoilées par les différentes formulations en leur permettant d'être considérées comme des agents antimicrobiens efficaces dans le traitement de certaines infections et dans la lutte contre certains organismes phytopathogènes. Le but principale de la présente étude et d'évaluer les potentialités antifongiques d'une même huile essentielle sous diverses formulations. Le recours à ce type d'étude apportera une valeur ajoutée aux secteurs pharmaceutique et agricole, compte tenu de l'importance économique de la disponibilité du matériel végétal dans la production de produits antimicrobiens naturels

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Présentation du matériel végétal et reconnaissance botanique

Les échantillons de *Citrus aurantium* (L.) ont été collectés pendant la phase phénologique de feuillaison (avant floraison), durant les mois de mars et avril de l'année 2018. Les collectes ont eu lieu au même endroit, au niveau du jardin botanique de la Station Régionale de la Protection des Végétaux de Boufarik. La station est située à 3 km de la sortie nord du chef-lieu de la commune (36° 34' 00" Nord, 2° 55' 00" Est) à 63 mètres d'altitude. Ledit jardin botanique, s'étale sur une superficie de 5 hectares composé de rangés de bigaradier, clémentinier, pommier, poirier, néflier, abricotier, pêcher, prunier et grenadier. En bordure de ce jardin sont plantées des lignes d'oliviers et de figuiers envahi par une broussaille d'églantier et très infesté de phragmites et de chiendent.

Seulement les feuilles ont été utilisées. L'identification du spécimen étudié a été réalisée selon la nouvelle flore de l'Algérie [12], par l'équipe du Jardin d'Essai d'EL Hamma à Alger.

Le matériel végétal obtenu a été séché à l'abri de la lumière et de l'humidité, à température ambiante (24±1°C) pendant 7 jours au laboratoire de Phytopharmacie du Département des Biotechnologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (Université de Blida 1).

2. Procédure d'extraction des huiles essentielles du bigaradier

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de substances organiques aromatiques liquides qu'on trouve naturellement dans diverses parties des végétaux. Elles sont très concentrées, volatiles et sensibles à la décomposition sous l'effet de la chaleur [13]. Dans la présente étude, Les huiles essentielles ont été obtenues par hydrodistillation en utilisant un appareil de type Clevenger, Par référence aux directive de la pharmacopée européenne, l'extraction est effectuée durant trois heures, durée nécessaire à l'épuisement de la matière première (environ 90%) en huile essentielle. Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène. Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Sachant que la température d'ébullition d'un mélange est atteinte lorsque la somme des tensions de vapeur de chacun des constituants est égale à la pression d'évaporation, elle est donc inférieure à chacun des points d'ébullition des substances pures. Ainsi le mélange azéotropique « eau + huile essentielle » distille à une température égale 100°C à pression atmosphérique alors que les températures d'ébullition des composés aromatiques sont pour la plupart très élevées. Il est ensuite refroidi et condensé dans un essencier. Une fois condensées, eau et molécules aromatiques du fait de leurs différences de densité, se séparent en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle. Le stockage des huiles essentielles à -4°C à l'obscurité dans des flacons codés, dans l'attente de leur analyse. Le rendement en huiles essentielles (RHE) est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M). Selon Boussaada et Chemli [14], le rendement est exprimé en pourcentage, il est exprimé par la formule suivante : $RHE\% = (m_h/m_v) \times 100$, Avec : RHE : Rendement en huile essentielle en %, M' : Masse d'huile essentielle en gramme, M : Masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme.

3. Caractérisation chimique de l'huile essentielle du bigaradier par Couplage chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse (CPG/SM)

Une fois l'huile essentielle obtenue, l'analyse chimique permet d'identifier et de quantifier les produits qui la composent. L'analyse de la partie volatile est réalisée par deux techniques chromatographiques (CPG & CPG/SM). Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CPG/SM) permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse des différents constituants d'un mélange complexe. Ce couplage est la technique la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles et réunit le meilleur de ces deux techniques et permet de connaître, dans la grande majorité des cas, la masse moléculaire d'un composé et d'obtenir des informations structurales relatives à une molécule à partir de sa fragmentation.

L'analyse chromatographique est réalisée à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse (GC-2014 Shimadzu Gas Chromatograph), équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne capillaire DB5 peu polaire de longueur 30 m, de diamètre interne 25 µm et ayant un film d'épaisseur 0,25 µm. L'injecteur fonctionne en mode split avec un ratio de 1/50, le chromatographe est alimenté par trois gaz : l'azote, l'hydrogène et l'air, le gaz vecteur inerte est l'hydrogène ayant un flux total de 5,61 ml/min, un débit de 1 ml/min et une pression de 80,1 kPa. La température de l'injecteur est de 250°C et celle du détecteur est de 270°C, et la température de la colonne suit le programme suivant : la colonne à une température initiale de 50°C qui est maintenue pendant une minute ; puis de 50 à 175°C, elle suit un palier à raison de 5°C par minute. La température de 175°C est maintenue pendant dix minutes. Ensuite, la température passe de 175 à 250°C selon un palier, à raison de 15°C par minute [15].

L'identification des composants individuels est fondée sur la comparaison des indices de rétention (I_r) calculés, sur les colonnes polaires et apolaires, avec ceux de composés authentiques ou des données de la littérature (National Institute of Standards and Technology, 2008), et des bibliothèques commerciales [16, 17], et par l'analyse de chaque spectre de masse des composés constitutifs.

4. Préparation des différentes formulations de l'huile essentielle du bigaradier

La formulation consiste à additionner à l'huile essentielle un ou plusieurs adjuvants afin de faciliter sa conservation et d'homogénéiser son étalement et son absorption par le substrat. Nous avons préparé 4 formulations à partir de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* (L.), comme suit :

-Formulation 1 : L'huile essentielle obtenue a été formulée ainsi que son témoin positif en gel selon le protocole établi par Moussaoui et al. [18].

-Formulation 2 : L'huile essentielle obtenue a été formulée ainsi que le témoin positif par une substance le Monooléate de polyoxyéthylène sorbitane selon le protocole établi par Hamdani et Allem [19].

-Formulation 3 : L'huile essentielle obtenue a été formulée ainsi que le témoin positif par un solvant polaire organique (organosulfuré) le diméthylsulfoxyde selon le protocole établi par Daghbouche et al. [20].

-Formulation 4 : L'huile essentielle obtenue a été formulée ainsi que le témoin positif par un solvant organique, l'acétone selon le protocole établi par Daghbouche et al. [20].

5. Mise en évidence de l'activité antifongique de l'huile essentielle du bigaradier

5.1. Micro-organisme et conditions de culture

L'activité antimicrobienne (activité biocide et/ou biostatique) de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* (L.) a été évaluée sur une souche fongique qui provient de l'American Type Culture Collection ATCC, USA. Il s'agit de *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*, elle attaque principalement la plante au début de la floraison. La plante attaquée présente des symptômes de flétrissement et de jaunissement partiel, puis total du feuillage [21].

La souche fongique a été pré-cultivée avant son utilisation. La suspension fongique a été préparée en inoculant une boucle de la souche testée dans 3 ml de bouillon (milieu PDA) et incubée à 37°C pendant 48 h afin d'avoir une culture jeune. La turbidité correspond à une densité optique de 0,5 étalon de McFarland à 620 nm pour atteindre une concentration de 5×10^5 CFU/ml.

5.2. Mise en évidence de l'activité antifongique

La mise en évidence de l'activité antifongique de *Citrus aurantium* (L.) a été exprimé par deux méthodes à savoir ;

la méthode de diffusion par disques [22] et la méthode par micro atmosphère [23, 24].

Pour l'ensemble des formulations, les dilutions testées ont été préparées selon une gradation de concentration obéissant à une suite géométrique de raison r^2 (200, 400, 800, 1600 et 3200 $\mu\text{l/ml}$) [25].

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

Quelques colonies fongique ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine, puis disposées sur le centre d'une boîte de pétri préalablement coulée du milieu de culture spécifique pour les champignons (PDA) puis incubés à 27°C pendant 5 à 6 jours. Après incubation des disques mycéliens de 8mm de diamètre issu d'une culture âgée de 7 jours de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* ont été prélevé avec un emporte-pièce et inoculés au centre de chaque boîte de pétri précédemment coulé avec 15ml de PDA (1disque/boîte).

- Pour la méthode par disque ; on a utilisé une pince pour mettre 5 disques dans la boîte, à l'aide d'une micropipette on a imbibé chaque disque par 10 μl d'huile essentielle formulée [22].

- Pour la méthode par micro atmosphère ; on a déposé les disques de papier sur le couvercle de la boîte de pétri puis on les a imbibé par 10 μl sans que l'huile essentielle entre en contact avec notre milieu de culture (PDA) contenant le disque mycélien, la boîte est hermétiquement fermée [23, 24]. Après diffusion de l'HE durant 1 heure les boîtes ont été incubées à l'obscurité à une température de 27°C, durant 7 jours.

6. Évaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle du bigaradier

6.1. Cinétique de la croissance mycélienne

La cinétique de la croissance mycélienne correspond aux variations dans le temps, du diamètre du champignon avec différentes concentrations. La cinétique de croissance mycélienne a été évaluée toutes les 48 heures en mesurant la moyenne de cinq diamètres perpendiculaires passant par le milieu de la rondelle [26]. Cette lecture est toujours réalisée en comparaison avec les cultures témoins dans les mêmes conditions et en utilisant le logiciel Digimizer avec un support pour respecter le même pixel.

6.2. Croissance mycélienne

La croissance mycélienne a été évaluée à la fin de l'expérience, à savoir au bout de 168h (7 jours) d'incubation, en mesurant la moyenne de cinq diamètres sans prendre en compte le diamètre du disque. Cette lecture est toujours réalisée en comparaison avec les cultures témoins ayant démarré le même jour et dans les mêmes conditions [26].

6.3. Détermination de l'indice antifongique

D'après Sharma et Tripathi [27], le pourcentage d'inhibition de croissance $I(\%)$ est exprimé par la réduction du diamètre de la colonie fongique par rapport au témoin, selon la formule suivante $I(\%) = [(D_{\text{témoin}} - D_{\text{test}})] / D_{\text{témoin}} \times 100$. $D_{\text{témoin}}$: témoin diamètre de la colonie témoin en (mm), D_{test} : diamètre de la colonie dans le test en (mm)

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

Selon Cahagnier et Richard-Molard [28], la vitesse de la croissance mycélienne de chaque concentration est déterminée par la formule suivante : $VC = [D1/Te1] + [(D2 - D1)/Te2] + [(D3 - D2)/Te3] + \dots + [(Dn - Dn-1)/Ten]$. D : diamètre de la zone de croissance journalière, Te : temps d'incubation.

7. Analyse statistique des données

Les résultats sont rapportés comme valeurs de trois répétitions (Moyenne \pm SE) sur la base d'un C.V. <15%. L'analyse de la variance (type GLM et type ANOVA) suivie du test de post-Hoc a été utilisée pour établir l'effet des dilutions et des formulations sur l'activité antifongique de l'huile essentielle du Bigaradier *Citrus aurantium* (L.), les différences ont été considérées comme significatives à $p < 0,05$. Les données ont été déroulées par le logiciel SYSTAT ver. 12 [29] et par le logiciel PAST ver. 1.37 [30].

RÉSULTATS

1. Rendement et analyse de la composition chimique de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* (L.) par la CG/MS

L'huile essentielle de *Citrus aurantium* (L.), extraite par hydrodistillation-entraînement à la vapeur a exprimé un rendement de l'ordre de 0,57%.

D'après le tableau 1, on constate que les composés majoritaires de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* (L.), sont le Terpèneol et le Geraniolacetate avec des taux respectifs de 21% et de 18% suivit de l'Anthranilic acid. 1,5-dimethyl-1-vinyl-4-hexeryl ester et du Caryophyllene avec des taux de 12% et 11,66%, ainsi que le Phytol qui est moins disponible par rapport aux premiers composés cités avec un taux de concentration de 4,36%.

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

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

Selon la figure 1, l'évolution temporelle du taux d'inhibition fongique sous l'effet des huiles essentielles formulées en gel (F1), au Tween (F2), au DMSO (F3), et à l'acétone (F4) appliquées par diffusion sur gel et par micro-atmosphère montre un effet fongicide plus important selon le degré de concentration des dilutions utilisées, obéissant à un gradient positif $D1 > D2 > D3 > D4 > D5$. L'activité fongicide et/ou fongistatique s'installe dès les 4 jours de confrontation des bioproduits au champignon. Elle s'accroît au-delà du 6 jours (Fig. 1).

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

La Figure 2, représente l'évolution mycélienne de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* enregistrant des taux d'inhibition plus imposant selon le degré de concentration des dilutions utilisées,

obéissant à un gradient positif $D1 > D2 > D3 > D4 > D5$ pour la formulation au DMSO, et la formulation à l'acétone. Le taux d'inhibition signalé sous l'effet de l'HE formulé au DMSO par la méthode de diffusion par disque se détache nettement du taux d'inhibition signalé sous l'effet de la même formulation par méthode de diffusion par micro-atmosphère en termes d'importance. L'efficacité des deux formulations (DMSO et acétone) apparaît dès 24h d'incubation. Sous l'effet de l'HE formulée avec l'acétone, l'activité fongicide du principe actif augmente graduellement dans le temps.

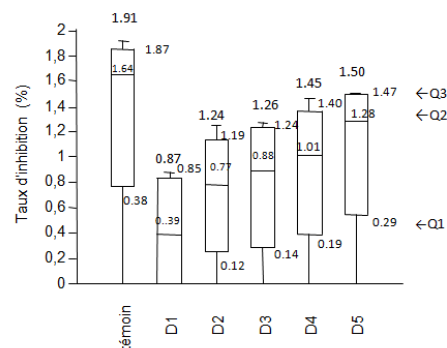
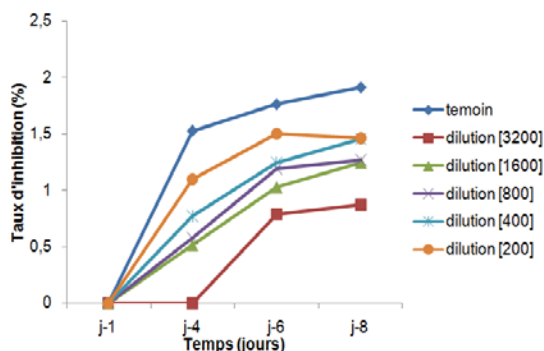
Elle affiche des taux d'inhibitions importantes jusqu'au 4^{ème} jour d'incubation dans les deux méthodes.

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

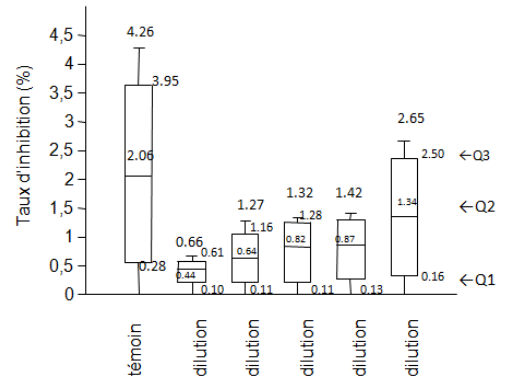
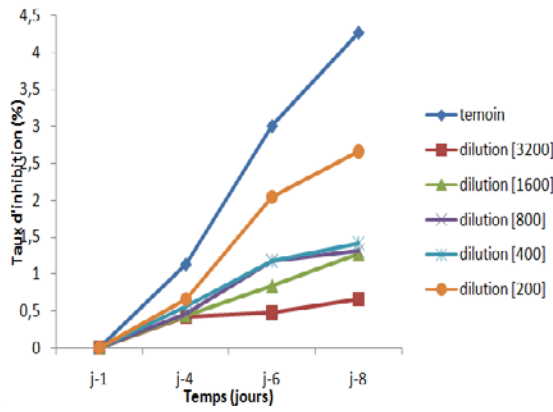
Tableau 1: Composition chimique de l'HE de *Citrus aurantium L.*

Composés	Familles	Formule brute	%
1 Terpénoïde	Monoterpènes	$C_{10}H_{18}O$	21
2 Anthranilic acid. 1,5-diméthyl-1-vinyl-4-hexéryl ester	Alcaloïdes	$C_7H_7NO_2$	12
3 2-Méthoxy-4-vinylphénol	Alcools	$C_9H_{10}O_2$	4,3
4 Nerolacétate	Ester D Alcool	$C_{12}H_{20}O_2$	2,1
5 Geraniolacétate	Monoterpènes	$C_{12}H_{20}O_2$	18
6 Caryophyllène	Sesquiterpènes	$C_{15}H_{24}$	11,66
7 Elixène	Sesquiterpènes	/	2,92
8 Nerolidol	Sesquiterpènes	/	1,48
9 Germacrène D-4-ol	Sesquiterpènes	$C_{15}H_{26}O$	3,96
10 A-cadinol	Sesquiterpènes	$C_{15}H_{26}O$	3,50
11 Phytol	Alcool Diterpènes	$C_{20}H_{40}O$	4,36
Total des substances identifiées en %			
Sesquiterpènes			23,52
Alcools			10,76
Monoterpènes			39
Alcaloïdes			12
Total			85,28

Méthode de diffusion par disque

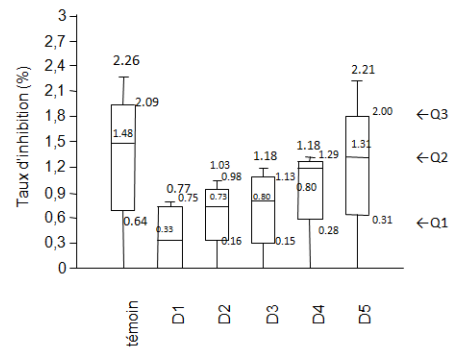
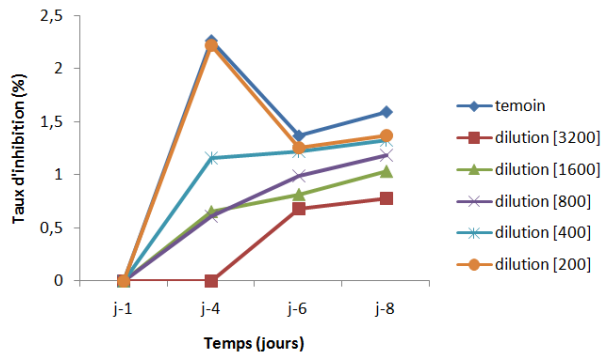


Méthode de diffusion par micro-atmosphère



Formulation au Tween (F2)

Par disque



Méthode de diffusion par micro-atmosphère

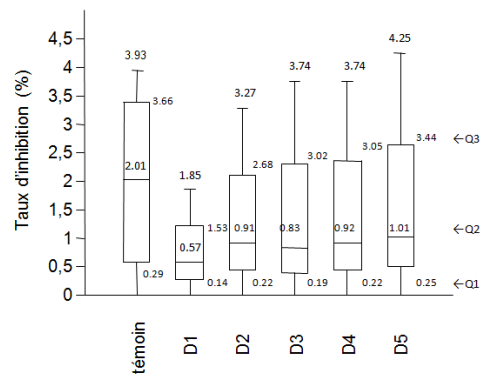
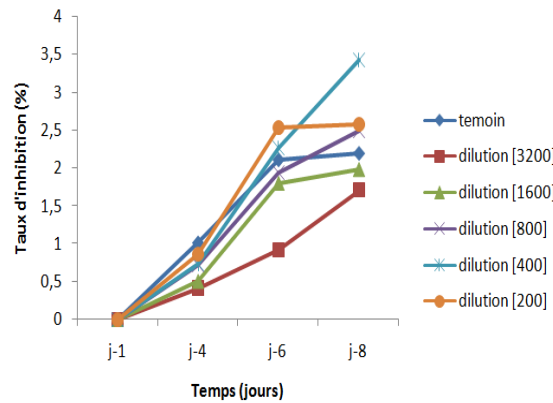


Figure 1: Variation des zones d'inhibition de *Fusarium oxysporum fsp lycopersici* sous l'effet des formulations en gel et au Tween

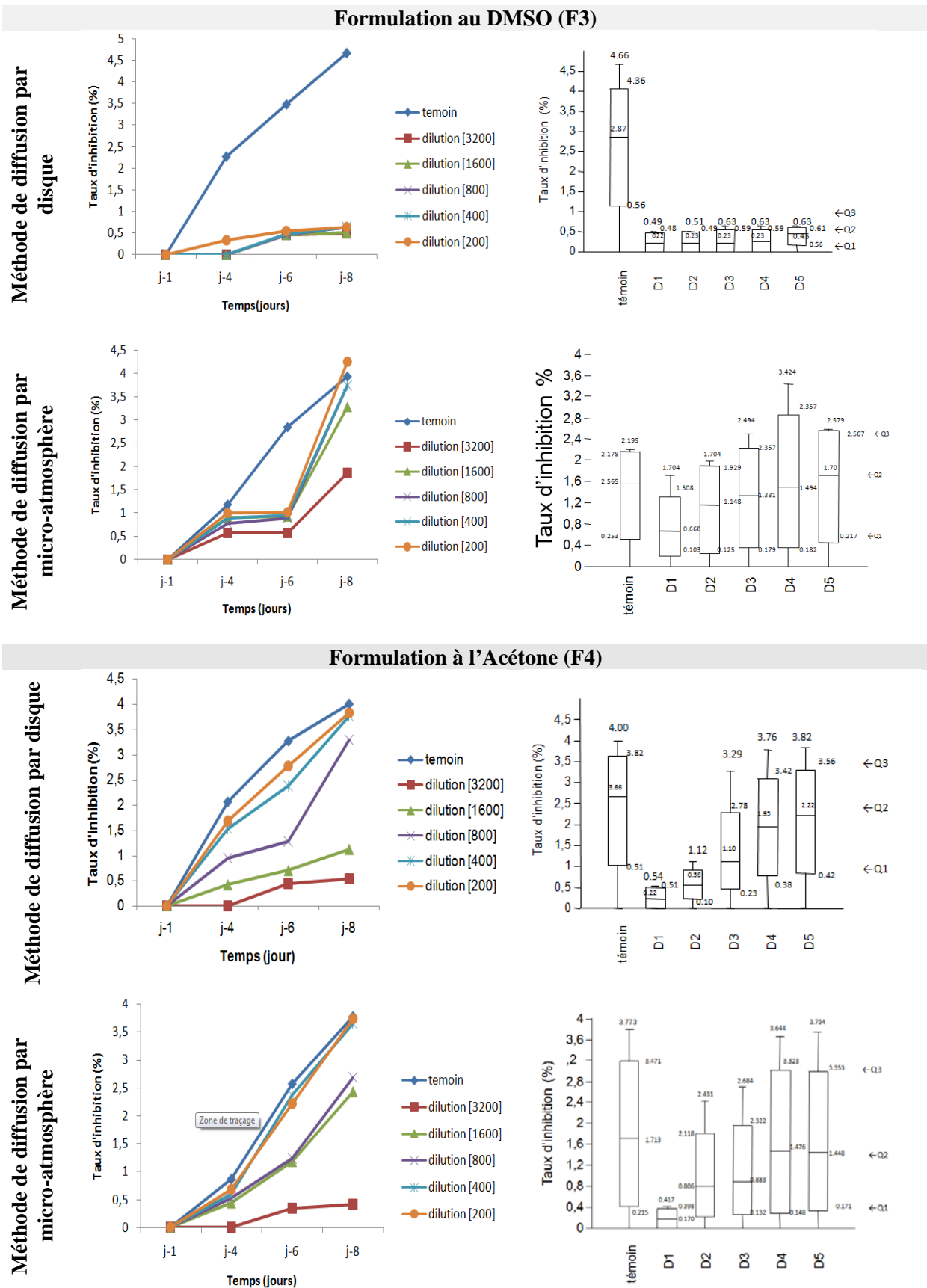


Figure 2: Variation des zones d'inhibition de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* sous l'effet des formulations au DMSO et à l'Acétone

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

3.1. Méthode de diffusion par disque

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

est partagé entre les formulations 1 et 2. Tandis que le quatrième palier est largement visible comportant les taux d'inhibitions les plus prononcés, affilié au groupe homogène (d). Enfin, le test de comparaison désigne pour les différentes concentrations testées la présence de 6 groupes. Le premier palier est signalé chez le témoin et chez la dernière concentration à savoir la concentration 200 $\mu\text{l/ml}$, qui montre un taux d'inhibition le plus faible, affilié au groupe homogène (a). Le deuxième palier est visible chez les concentrations C4, C3 et C2 exprimant un taux d'inhibition qui se rapprochent entre les 3 concentrations, respectivement affilié au groupe hétérogène (ab, bc et cd). Le troisième palier est remarquablement visible dès chez la 1^{ère} concentration exprimant le taux d'inhibition le plus important, affilié au groupe homogène (d) (Fig. 3).

La vision globale des potentialités fongicides des différents traitements montre à travers le test de Tukey que les fortes doses de l'huile essentielle des différentes formulations testées engendrent des taux d'inhibitions très similaires à l'exception de la formulation au DMSO qui se démarque des autres par sa forte inhibition au cours de l'évolution temporelle (Fig. 3).

L'analyse ANOVA nous a dressé les profils temporels des taux d'inhibition selon les différentes formulations testées par la méthode de diffusion par disque. L'effet de la formulation à base du DMSO est significativement différent car il affiche une inhibition quasi constante au cours du temps d'incubation (Fig. 4).

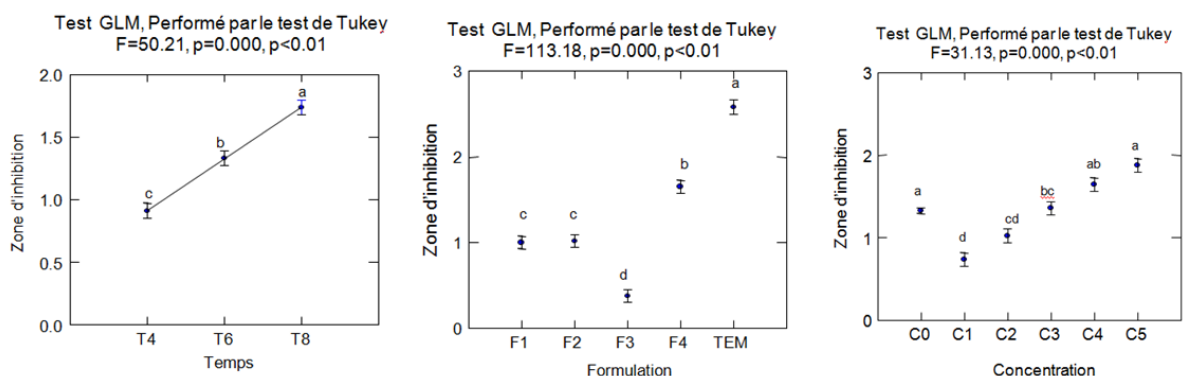


Figure 3: Effets du temps, des concentrations et des formulations sur le pouvoir antifongique de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* (L.) par la méthode de diffusion par disque

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

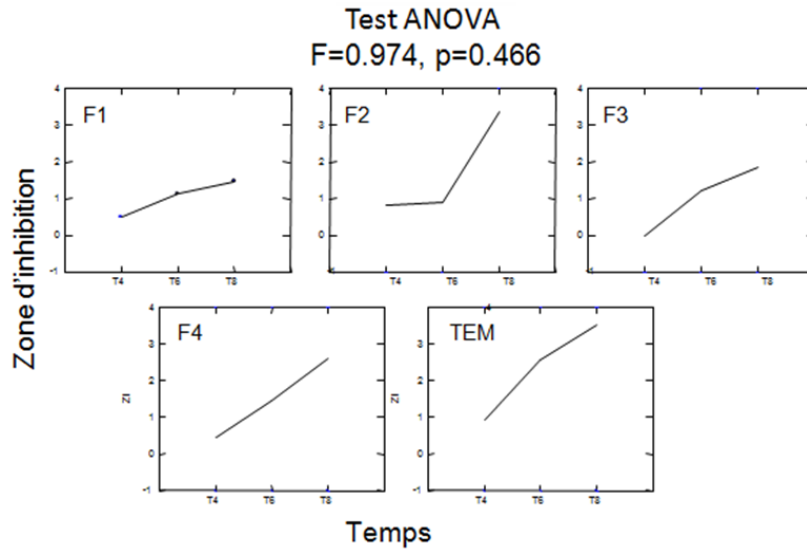


Figure 4: Evolution temporelle des zones d’inhibitions selon les formulations par la méthode de diffusion par disque

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

3.2.

Méthode de diffusion par micro-atmosphère

Les résultats graphiques de l’analyse de la variance type GLM relatifs aux facteurs étudiés sont consignés dans la figure 5. Ils montrent que le temps d’incubation du champignon sous l’effet des huiles essentielles enregistre un effet très significatif sur le taux d’inhibition. Le test Post-Hoc de Tukey, désigne la présence de 3 groupes homogènes relatifs aux paliers temporels d’efficacité des différentes formulations par la méthode de micro-atmosphère. Le premier palier est signalé à T8 d’incubation dévoilant le taux d’inhibition le plus faible, affilié au groupe homogène (a). Le deuxième palier est remarquable pareillement chez T6 où l’incubation dévoile une inhibition plus

important, affiliée au groupe homogène (b) tandis que le troisième palier montre que T4 représente le taux d’inhibition le plus prononcé, affilié au groupe (c) (Fig. 5). Concernant, le facteur formulations, le test de comparaison signale la présence de 3 groupes homogènes. Le premier palier est signalé chez le témoin qui montre le taux initial de la croissance mycélienne, affilié au groupe homogène (a). Le deuxième palier montre une inhibition similaire chez les formulations 4 et 2 à savoir (acétone et Tween), affilié au groupe homogène (b). Le troisième palier est visible chez la formulation par gel et par le DMSO exprimant le taux d’inhibition le plus important, affilié au groupe homogène (c) (Fig. 5).

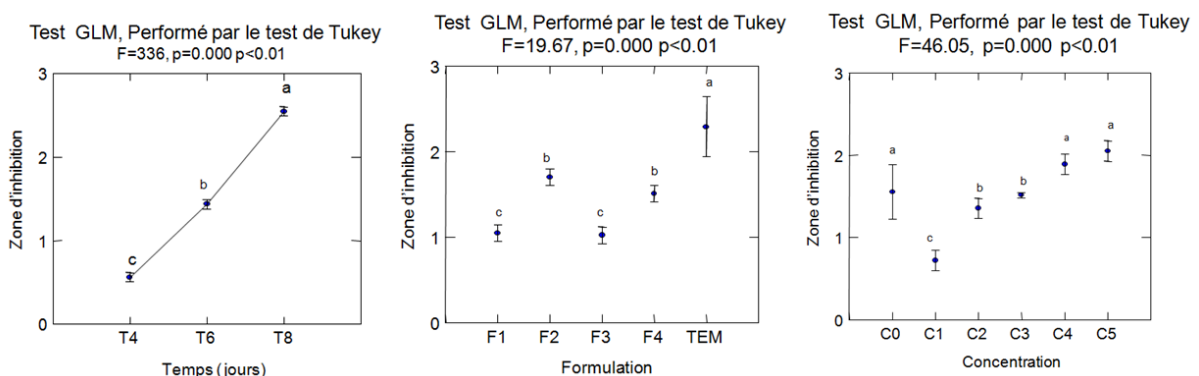


Figure 5: Effets du temps, des concentrations et des formulations sur le pouvoir antifongique de l’huile essentielle de *Citrus aurantium* (L.) par la méthode de diffusion par micro-atmosphère

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

Le taux d'inhibition est significativement différent sous l'effet du *facteur concentration* des huiles essentielles formulées. Globalement, le Test de Tukey désigne la présence de 3 groupes homogènes d'efficacité à savoir : le premier palier qui est partagé entre 3 concentrations C0 (témoin), C4 (400 µl) et C5 (200 µl/ml) qui affiche les taux d'inhibition les plus faibles, affilié au groupe homogène (a). Le deuxième palier annonce un taux d'inhibition modéré chez les C3 et C2, affilié au groupe homogène (b). Enfin, le troisième

palier exprime la plus importante inhibition constaté chez la C₁ qui représente la concentration la plus élevée, affilié au groupe homogène (c) (Fig. 5).

L'analyse ANOVA nous a dressé les profils temporels des taux d'inhibition selon les différentes formulations testées par la méthode de diffusion par micro-atmosphère. L'effet de la formulation en gel est significativement différent car elle est durable dans le temps (Fig. 6).

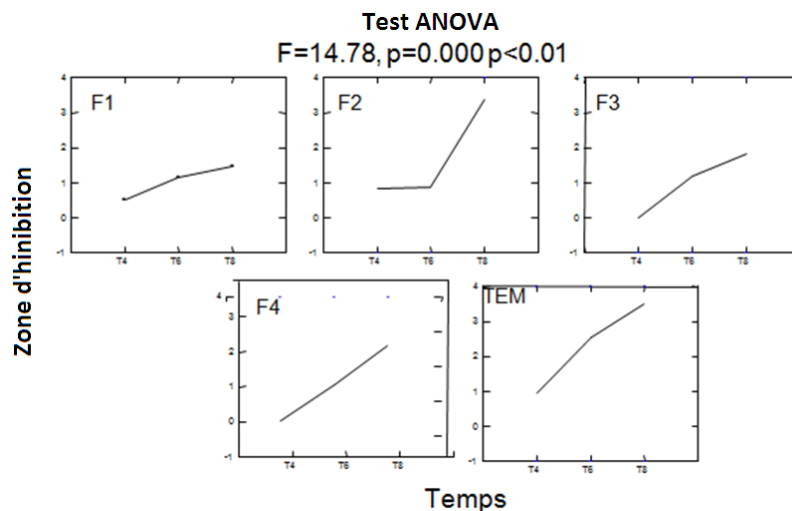


Figure 6: Evolution temporelle des zones d'inhibitions selon les formulations par la méthode de diffusion par micro-atmosphère

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

4.

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

Dans l'esprit de mieux visualiser l'effet fongicide/et ou fongistatique des bioproduits formulés à base d'huile essentielle de *Citrus aurantium* (L.), nous avons été conduits à confronter les mêmes paliers de concentrations des différentes formulations. Cette dernière a permis d'avancer que certaines formulations affectent pareillement la croissance mycélienne. Par ailleurs, les formulations expriment des effets divergents sous mode de diffusion par disque et diffusion par micro-atmosphère (Tableau 2). La lecture individualisée des taux d'inhibitions selon la

méthode de diffusion par disque, fait ressortir le facteur formulation comme élément de restriction de la croissance mycélienne. Ce constat est confirmé par le rapprochement d'effet entre F1 et F2 pour les concentrations C1 et C2. Aussi, sous l'effet des concentrations C3, C4 et C5 nous signalons le rapprochement entre F1, F2 et F4 (groupe homogène identique). En revanche, selon la méthode de diffusion par micro-atmosphère, à la forte concentration C1, F1 se rapproche de F4 tandis que F2 se rapproche de F3. Concernant les concentrations moyennement faibles et faibles, le comportement des formulations présente une multitude de rapprochement (voir les groupes homogènes) (Tableau 2).

Tableau 2 : Taux d'inhibition de la croissance mycélienne

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

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

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

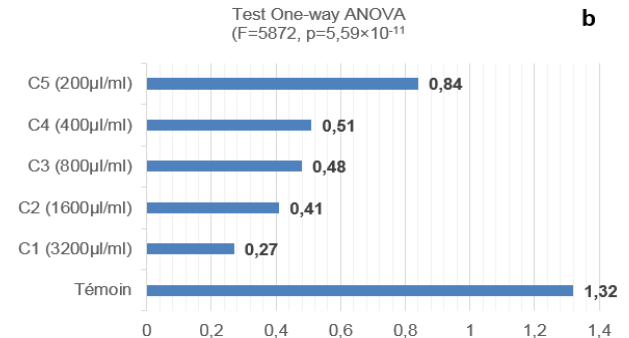
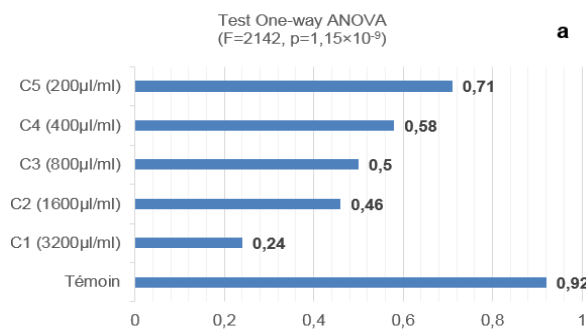
Dans le but d'appréhender l'activité biocide des bioproduits formulés, nous avons eu recours à l'estimation de la vitesse de croissance mycélienne. Cette dernière permis à travers le rythme d'évolution mycélienne de définir un certain nombre de paramètres de toxicité d'une matière active à savoir : (i) *effet Knock Down (effet choc)* (ii) *concentration létale ou inhibitrice* (Fig. 7). Par référence à la figure 7, et sur le plan degré de toxicité des

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

Méthode de diffusion par disque

Méthode de diffusion par micro-atmosphère

Formulation en gel à 10% (F1)



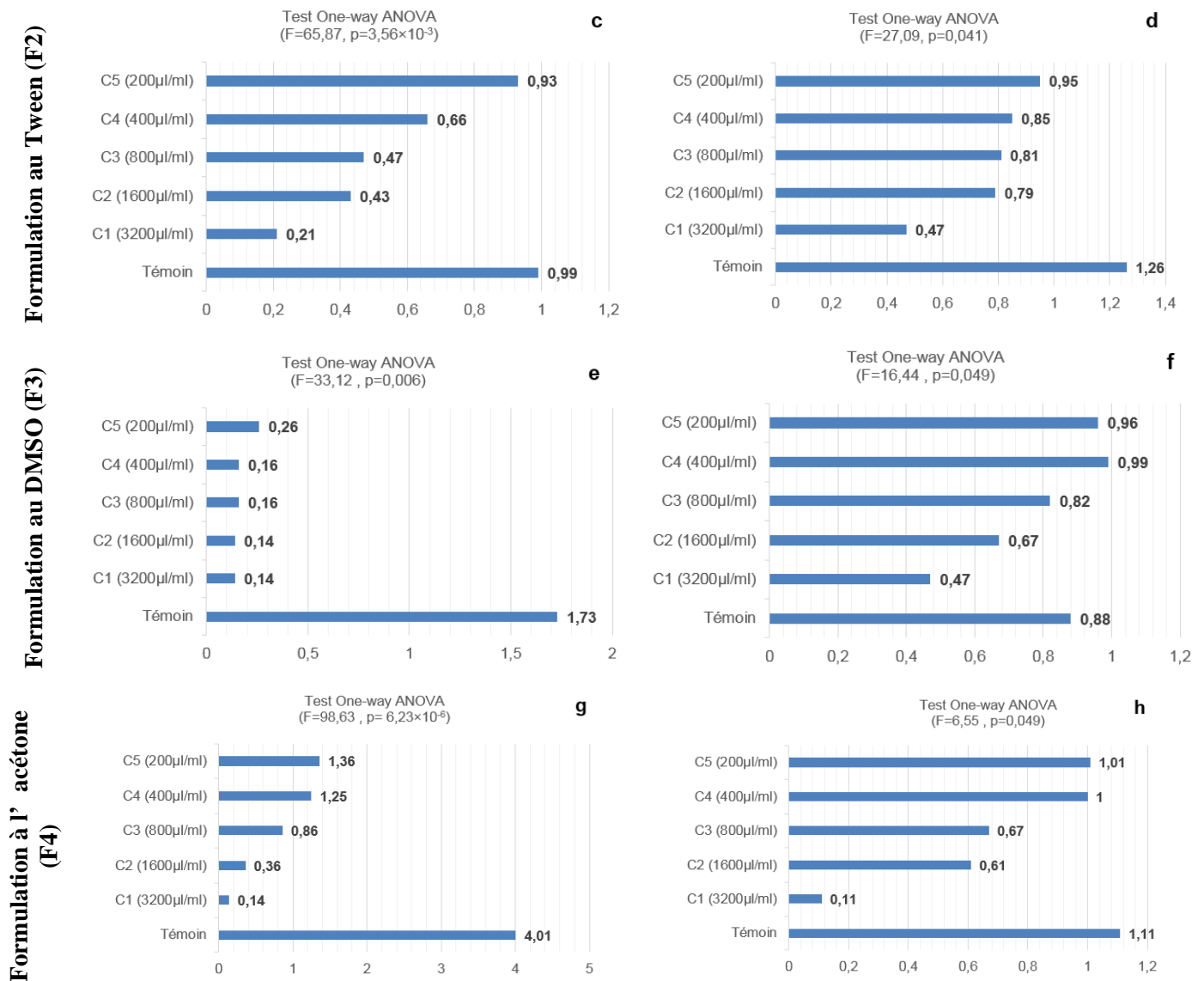


Figure 7: Variation de la vitesse de croissance de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* sous l'effet des différentes formulations et des modes d'administration

DISCUSSION

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

1. Effet des dilutions sur l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Citrus aurantium* (L.)

La susceptibilité fongique à l'huile essentielle de *Citrus aurantium* (L.) montre des pourcentages d'inhibition élevés.

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

Matasyoh et al. [31], annoncent que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est censée être associée à des composants phytochimiques tels que les monoterpènes.

Une réduction dans la concentration de l'huile essentielle entraîne une diminution dans le pouvoir inhibiteur de celle-ci avec toutes les espèces fongiques. Les huiles essentielles des citrus sont un mélange complexe de composés volatils qui présentent une activité antifongique en réduisant ou inhibant totalement la croissance fongique [33].

Caccioni et al. [34], ont déduit une corrélation positive entre l'activité antifongique et la teneur en monoterpènes. Singh et al. [35], rapportent que ces derniers sont reconnus comme de bons composés fongitoxiques

Les composés chimiques tels le limonène, caryophyllène oxide, α -pinène, β -pinène, α -terpinéol et le citral ont des activités antifongiques et antibactériennes ; composés largement présents dans la composition chimique des huiles essentielles des *Citrus* [31].

Van Hung et al. [36], rapportent que la croissance mycélienne diminue avec l'augmentation de la concentration en huile essentielle de *Citrus reticulata*. Ils obtiennent un PIC de 50.9 % vis-à-vis de *Fusarium proliferatum*.

Cox et al. [37], ont montrés que la présence des monoterpènes dans les huiles essentielles est capable d'affecter l'intégrité cellulaire des champignons, ce qui entraîne une inhibition de la respiration et une altération de la perméabilité.

De copieuses études ont montrés que l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle est souvent le résultat de l'activité des monoterpènes plutôt que des sesquiterpènes [38]. Il a été prouvé que la même activité est apparemment liée à sa teneur élevée en alcools et en esters et d'autres composés mineurs entre autres le linalool, le terpinène-4-ol, le camphre, le trans-pinocarveol, le t- Cadinol, l' α -cadinol et le β -caryophyllène oxide qui agissant de manière synergique ou additive [39, 40].

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

Une efficacité variable a été enregistrée vis-à-vis de l'espèce fongique testée selon les deux méthodes d'application et selon les différentes formulations,

est principalement due à l'action synergique et solubilisant de certains adjuvants avec l'huile essentielle comme l'acétone et le DMSO, qui ont montré une performance remarquable lors de leurs utilisation dans la méthode de diffusion par disque. Tandis que pour l'application par la méthode de diffusion par micro-atmosphère, c'est la formulation en gel qui a donné un meilleur résultat. Par conséquent, on peut avancer l'hypothèse que les formulations testées constituent une synergie potentielle avec l'huile essentielle de *Citrus aurantium* (L.) et que ces dernières ne retiennent pas les composés volatils qui sont responsables de l'activité antifongique, de même le choix de la méthode d'évaluation des activités biologiques de certaines huiles essentielles agissent différemment vis-à-vis des souches fongiques. On se basant sur l'hypothèse avancée, nous pouvons l'accorder avec les travaux de plusieurs chercheurs qui ont mentionné que l'activité antifongique est le résultat du synergisme ou l'antagonisme des divers composés d'huile essentielle des *Citrus* [41, 42]. Aussi, Bajpai et al. [43], estiment que les performances antimicrobiennes dévoilées par les huiles essentielles pourraient être le résultat d'un certain équilibre quantitatif des divers composants.

Baser et Buchbauer [44], considèrent que le choix de la technique d'évaluation de l'activité antifongique peut influencer le résultat obtenu. Sharma et Tripathi [27], obtiennent deux Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) différentes pour l'huile essentielle de *Citrus sinensis* avec *Alternaria alternata*, et ceci lorsqu'ils emploient deux techniques différentes pour l'étude de la fongitoxicité de l'huile essentielle. Nakahara et al. [24], remarquent que l'huile essentielle de *Citronellae aetheroleum* était inactive vis-à-vis de neuf espèces de champignons avec la méthode de dilution, mais elle a inhibé la croissance de la totalité des espèces fongiques dans la méthode micro atmosphère. Les huiles essentielles des *Citrus* sont un mélange complexe de composés volatils qui présentent une activité antifongique en réduisant ou inhibant totalement la croissance fongique [33].

Ces résultats semblent valider certaines utilisations des huiles essentielles de *Citrus aurantium* (L.) en pharmacognosie et en agriculture biologique.

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

CONCLUSION

L'ensemble des formulations ont montré un fort pouvoir inhibiteur sur la croissance mycélienne qui est proportionnel avec les concentrations et ceci avec l'espèce représentative du genre *Fusarium*. Cette démarche, nous a permis de prouver que l'action biocide est fortement liée à la forte présence en composés volatils regroupant les monoterpènes comme composés majoritaire dans l'huile essentielle de *Citrus aurantium* (L.) et la capacité de sa libération. Selon les taux d'inhibitions obtenues, l'efficacité a été démontrée pour toutes les formulations. Cette caractéristique propre aux différentes formulations se voit distincte entre diffusion par disque et diffusion par micro-atmosphère. La formulation en gel est performante suivant les concentrations de l'huile essentielle pour les deux méthodes. Tandis que les préparations au DMSO et à l'acétone sont très performantes par diffusion par disque.

À la lumière des résultats obtenus, le travail ouvre la voie à d'autres perspectives. Notamment, la proposition de formulations biofongicide commerciale et d'approfondir les recherches concernant la relation entre la composition chimique et l'activité antifongique des huiles essentielles.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Sharma N. et Tripathi A. (2008). Effects of *Citrus sinensis* (L.) Obseck epecarp essential oil one growth and morphogenesis of *Aspergillus Niger* (L.) Van Tieghem . *Microbiological Research*, 163(3): 337-344
- [2]. Isman MB. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protect*, 19:603–608
- [3]. Regnault- Roger C. (2012). Trends for Commercialization of Biocontrol Agent (Biopesticide) Products. *Plant Defense Biological control*. 12(6) : 139- 60
- [4]. Kassi FM., Badou OJ., Tonzibo ZF., Salah Z., Lndge A., et Kone D. (2014). Action du fongicide naturel NECO contre la cercosporiose noire (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) chez le bananier plantain (AAB) en Côte d'Ivoire. *J. Applied Biosciences*, 75 (8): 6183– 6191.
- [5]. Xue A .G., Chen Y., Voldeng H.D ., Fedak G ., Savard M .E ., Langle T ., Zhang J ., et Harman G .E. (2014). Concentration and cultivar effects on efficacy of CLO-1 biofungicide in controlling *Fusarium* head blight of wheat. *Biological Control*, 73(22): 2-7
- [6]. Laplace J.P. (2006). Agriculture et alimentation Réflexions croisées. *Cahiers Agricultures*, 15(4): 375 -78.
- [7]. Broydé H. et Doré T. (2013). Effets des pratiques agricoles sur la contamination des denrées par les mycotoxines issues de *Fusarium* et *Aspergillus spp.* *Cahier Agriculture*, 2(2): 182-94.
- [8]. Bagamboula C.F., Uyttendaele M., et Debevere J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbio.*, 2(1): 33- 42.
- [9]. Isman A. (2011). Instructional Design in Education: New Model. TOJET: *The Turkish Online Journal of Educational Technology*, 10(1).
- [10]. Mukhopadhyay M. (2000). *Natural extracts using Supercritical Carbon Dioxide*. 1Ed, CRC Press LLC, Boca Raton, Florida. 339p.
- [11]. Sawamura M. (2010). *Citrus essential oils flavor and fragrance*. Ed John Wiley. New Jersey, 398p.
- [12]. Quezel P. et Santa S. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, ed, C.N.R.S. Vol. 1, Paris. 1170p.
- [13]. Bruneton J. (1999). *Pharmacognosie, Phytochimie – Plantes médicinales – 3^{ème} Ed* Techniques et documentations. Paris. pp: 227-310-312-313-314.494.
- [14]. Boussaada O. et Chemli R. (2007). Seasonal Variation of Essential Oil Composition of *Citrus aurantium* L. var. amara. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 10(2): 109-120.
- [15]. Proestos C., Serehi D. and Komaitis M. (2006). Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chemistry*, 95: 44-52.

- [16]. NIST/EPA/NIH. (2002). Mass Spectral Library Gaithersburg. National Institute of Standard and Technology
- [17]. Adams R.P. (2007). *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/mass Spectrometry*. 4th Edition Allured Publishing Corporation, Carol Stream.
- [18]. Moussaoui K., Ahmed Hadjlal O., Zitouni G. et Djazouli Z.E. (2014). Estimation de la toxicité des huiles essentielles formulées de Thym et d'Eucalyptus et d'un produit de synthèse sur le parasite de l'abeille tellienne *Varroa destructor* (Arachnida, Varroidae). *Revue Agrobiologia*, 4(1) :17-26
- [19]. Hamdani F.Z. et Allem R. (2017). Antifungal activity of the leaf essential oil of *Citrus* against *Alternaria alternata* and *Penicillium sp in vivo*. *Phytothérapie*, 15:263–266.
- [20]. Daghbouche S., Daghbouche A., Boulessnam A., Snoussi S.A. et Djazouli Z.E. (2017). Variation phénologique du contenu phytochimique et de l'activité antibactérienne de *Cytisus triflorus* l'Her. *Revue Agrobiologia*, 7(2): 548-561.
- [21]. Joffin N. (2013). *Les techniques de laboratoires utilisées en mycologie*, pp. 1-20.
<http://www.techmicrobio.eu/index.php/microbio/mycologie/laboratoire>
- [22]. Aouni M., Pelen F. et Soulimani R. (2013). Étude de l'activité antimicrobienne d'un mélange de 41 huiles essentielles et domaines d'application. *Phytothérapie*, 11(4): 225-236.
- [23]. Inouye S., Takizawa T. et Yamaguchi H. (2001). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(5): 565–573.
- [24]. Nakahara K., Alzoreky N.S., Yoshihashi T., Nguyen H.T.T. et Trakoontivakorn G. (2003). Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cymbopogon nardus* (Citronella grass). *Japan Agricultural Research Quarterly*. 37(4) : 249-252.
- [25]. Kucukbay F., Yildiz B., Kuyumcu E. et Gunal S. (2011). Chemical Composition and Antimicrobial Activities of the Essential Oils of *Teucrium orientale var. orientale* and *Teucrium orientale var. puberulens*. *Chemistry of Natural Compounds*, 47(5): 833-836.
- [26]. Trong L. et Elsner S. (1986). *Etude de croissance mycélienne de 4 champignons d'origines africaine, océanienne et européenne utilisées dans les essais au CTFT-Nogent*. Kourou : CIRAD-CTFT, 12 p.
- [27]. Sharma N. et Tripathi A.; (2008). Effects of *Citrus sinensis* (L) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L). *Van Tieghem Microbiological Research*, 163(3): 337-344
- [28]. Cahagnier B. et Richard-Molard D. (1998). *Moisissures des aliments peu-hydratés, les moisissures. Collection sciences et techniques agroalimentaires*. Ed. : Lavoisier. pp: 39-41.
- [29]. SPSS, Inc. (2016). **SYSTAT 12.00 for windows, statistics and graphics**
- [30]. Hammer Øyvind, David A.T., Harper, et Paul D. Ryan. (2001). **Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis**. *Palaeontologia Electronica*, vol. 4, issue 1, art. 4: 9pp., 178kb .
- [31]. Matasyoh J .C., Kiplimo J. J., Karubiu N.M. et Hailstorks T.P. (2007). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Tarchoanthus camphorates*. *Food Chemistry*, 101(3): 1183–1187.
- [33]. Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernandez-Lopez J. et Perez-Alvarez J. (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus limon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*, 19(8): 1130–1138.
- [34]. Caccioni D.R.L., Guizzardi M., Biondi D.M., Renda A. et Ruberto G. (1998). Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Food Microbiology*, 4(3) :73–79.
- [35]. Singh P., Shukla R., Prakash B., Kumar A., Singh S., Mishra A.K. et Dubey N.K. (2010). Chemical profile, antifungal, antiaflatoxicogenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. *Food and Chemical Toxicology*, 48(12): 1734–1740.
- [36]. Van Hung P., Thi Lan Chi P. et Thi Lan Phi N. (2013). Comparison of antifungal activities of Vietnamese *Citrus* essential oils. *Natural Product Research Formerly Natural Product Letters*, 27(4-5): 506-508,
- [37]. Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R. et Wyllie S.G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* 88: 170–175.
- [38]. Haddouchi F., Lazouni H., Ahammer KA., Carson CF. et Riley TV. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 86, pp: 985-990.

- [39]. **Muanda FN. (2010).** Identification de polyphénols, Evaluation de leur Activité Antioxydante et Etude de leurs Propriétés Biologiques. Thèse de Doctorat. Université Paul Verlaine-Metz. 239p.
- [40]. **Milane H. (2004).** La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques, Thèse de Doctorat. Université Louis Pasteur Strasbourg. 263 p.
- [41]. **Sonboli A., Babakhani B. et Mehrabian A.R. (2006).** Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*. *Zeitschrift fur Naturforschung Section C. Biosciences*, 61(5): 160–164.
- [42]. **Deba F., Xuan T.D., Yasuda M. et Tawata S. (2007).** Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa*. *Food Control*, 19(2) : 346–352.
- [43]. **Bajpai V.K., Sharma A. et Baek K.H. (2013).** Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens. *Food Control.*, 3(2): 582-90.
- [44]. **Baser K.H.C. et Buchbauer G. (2010).** *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. Ed Taylor & Francis Group.994p.