

Soumis le: 10/10/2018

Forme révisée acceptée le: 25/01/2019

Correspondant: [boughendjioua.hicham@yahoo.com](mailto:boughendjioua.hicham@yahoo.com)



**Nature et Technologie**

**Nature & Technology**

<http://www.univ-chlef.dz/revuenatec>

ISSN: 1112-9778 – EISSN: 2437-0312

# Activité antifongique de l'huile essentielle extraite à partir des feuilles de *Citrus reticulata*.

BOUGHENDJIOUA Hicham

Département des sciences naturelles, l'école normale supérieure d'enseignement technologique (ENSET) de Skikda, 21000, Algérie.

## Résumé :

La région de Skikda (nord est algérien) est une région à vocation agrumicole dont les agrumes occupent une importante superficie. La valorisation des déchets de taille (feuilles) peut constituer une source en matériel végétal très exploitable comme biofongicide par le secteur agricole. L'activité antifongique des huiles essentielles des feuilles de Mandarine (*Citrus reticulata*) a été évaluée vis-à-vis de : *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* et *Alternaria* sp. par la méthode de contact direct. L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée par hydrodistillation et la caractérisation moléculaire par CG/SM. L'huile essentielle montre un grand pouvoir inhibiteur de la croissance mycélienne (*in vitro*). Le Limonène (32,04 %) et le  $\gamma$ -Terpinène (25,52 %) possèdent les pouvoirs inhibiteurs les plus importants. Les résultats obtenus ouvrent la voie à l'utilisation de l'huile essentielle des feuilles de *Citrus reticulata* comme alternative aux fongicides chimiques.

Mots-clés : *Citrus reticulata*, huile essentielle, composition chimique, CG/SM, activité antifongique.

## Abstract:

The Skikda region (northeastern Algeria) is a citrus-growing region with a large citrus area. The recovery of the size waste (leaves) can constitute a source of plant material very exploitable as biofongicide by the agricultural sector. The antifungal activity of the essential oils of Mandarin leaves (*Citrus reticulata*) was evaluated with respect to: *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* and *Alternaria* sp. by the direct contact method. Extraction of the essential oil was carried out by hydrodistillation and molecular characterization by GC/MS. The essential oil shows a great inhibitory power of mycelial growth (*in vitro*). Limonene (32.04 %) and  $\gamma$ -Terpinene (25.52 %) have the most important inhibitory powers. The results obtained pave the way for the use of leaves essential oil of *Citrus reticulata* as an alternative to chemical fungicides.

Keywords: *Citrus reticulata*, essential oil, chemical composition, CG/MS, antifungal activity.

## 1. Introduction

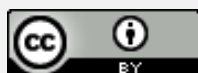
La lutte contre les champignons par l'application de fongicides naturels a pris une place très importante dans les stratégies alternatives aux fongicides de synthèse. Ces derniers sont à l'origine de beaucoup de maladies de plantes. Ils causent de grandes pertes de rendement dans les champs et affectent la qualité des aliments en conservation [01].

De nouveaux pesticides sont découverts et développés [02]. L'intérêt pour les pesticides d'origines naturelles (en particulier d'origine végétale) comme alternatifs s'est développé, en particulier ceux qui préservent un environnement sain, biodégradables, non toxiques et spécifiques dans leur action, gagnent une attention considérable [03]. Ils sont également nécessaires pour combattre l'évolution de la résistance aux pesticides [04].

*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* (Kill et Maire) Malençon et Gordon, est l'agent du "Bayoud"<sup>1</sup> du Palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Apparue au Maroc vers 1870, la maladie a affecté la plupart des palmeraies marocaines (provoquant la mort de 12 millions d'arbres parmi les meilleurs variétés) avant d'atteindre progressivement une partie des palmeraies algériennes et de menacer celles de Tunisie [05].

*Alternaria* est un genre de champignons deutéromycètes de la famille des *Pleosporaceae*. Ce genre renferme un grand nombre d'espèces parasites ou saprophytes présents dans le sol, les matériaux en

<sup>1</sup> Le terme « bayoud » est dérivé de l'arabe, *abyed* (blanc), en référence à la décoloration blanchâtre des palmiers touchés par la maladie : [https://fr.wikipedia.org/wiki/Bayoud\\_du\\_palmier\\_dattier](https://fr.wikipedia.org/wiki/Bayoud_du_palmier_dattier)



Cet article est mis à disposition selon les termes de la licence [Creative Commons Attributions 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

This article is available under [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

décomposition et l'air. Plusieurs espèces d'*Alternaria* sont responsables de maladies des plantes cultivées ou non (tomate, carotte, céréales...). Ces maladies sont parfois regroupées sous le terme d'alternariose. Par exemple *Alternaria dauci* infecte les feuilles de carottes cultivées, plus ou moins selon les caractéristiques génétiques de la souche en cause, et selon l'espèce de carotte infectée. C'est un champignon à croissance rapide dans différents milieux de culture, tels que l'agar, Sabouraud, le dextrose de pomme de terre, la farine de blé et le maïs. Cependant, l'agar à la pomme de terre et à la carotte est le choix pour l'identification, l'incubation est effectuée à 25 °C pendant 7 heures par jours [06].

Il y a 299 espèces dans ce genre omniprésents dans l'environnement et font partie intégrante de la flore fongique partout. Au moins 20 % de l'altération agricole est causée par les espèces d'*Alternaria*. Cependant, les espèces de ce genre sont souvent des producteurs prolifiques d'une variété de composés toxiques. Les effets de la plupart de ces composés sur la santé animale et végétale sont peu connus [07].

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 [08].

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Matériel végétal

Des feuilles fraîches de mandarinier ont été échantillonnées à partir d'un verger agrumicole de la région de Azzaba<sup>2</sup> willaya de Skikda (Algérie) durant la période du mois de Novembre (2016), l'identité taxonomique de la plante a été confirmée par la célèbre flore algérienne de Quezel et Santa [09].

### 2.2. Extraction de l'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger [10]. Une distillation a été réalisée par ébullition pendant 03 h de 300 g de matériel végétal frais avec 02 L d'eau selon la Pharmacopée Européenne [11]. L'huile essentielle a été stockée à 4 °C à l'obscurité en présence de sulfate de

sodium anhydre. Elle est diluée dans du méthanol (1/20, v/v) avant de procéder à son analyse par CG/SM<sup>3</sup>.

### 2.3. Analyse chromatographique

L'identification des constituants a été réalisée en se basant sur leurs indices de Kováts (IK) et sur la CG/SM avec un chromatographe en phase gazeuse de type Hewlett Packard (série HP 6890) couplé avec un spectromètre de masse (série HP 5973). La fragmentation est effectuée par impact électronique à 70 eV. La colonne utilisée est une colonne capillaire HP-5MS (30 m × 0,25 mm), l'épaisseur du film est de 0,25 µm. La température de la colonne est programmée de 50 à 250 °C à raison de 4 °C.min<sup>-1</sup>. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est fixé à 1,5 ml.min<sup>-1</sup>. Le mode d'injection est du mode split (rapport de fuite : 1/70). L'appareillage est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse NIST 98.

### 2.4. Évaluation de l'activité antifongique

La méthode de contact direct a été appliquée pour tester la sensibilité des moisissures vis-à-vis de l'huile essentielle [12-14]. La technique consiste à additionner l'huile à différentes concentrations au milieu de culture encore liquide à la température de 56 °C. Après solidification du milieu de culture, pour chaque moisissure, un disque mycélien de 6 mm de diamètre est déposé aseptiquement à la surface du milieu gélosé au centre de la boîte de pétri de 9 cm de diamètre en verre. Le volume du milieu utilisé est de 20 ml/boîte de pétri. En parallèle des témoins composés de PDA "potatoes dextrose agar" sans huile servent de contrôle. L'incubation a été effectuée dans une étuve à la température de 25 ± 2 °C.

Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne radiale est calculé selon la formule suivante [15] :

$$PIc (\%) = (dt - dT/dt) \times 100$$

dt étant la croissance diamétrale du témoin et dT la croissance diamétrale du champignon en présence d'une concentration (c) du fongicide.

<sup>2</sup> 500 km N-E de la capital Alger

<sup>3</sup> Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Rendement et composition chimique

Les résultats obtenus indiquent que le rendement d'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation est de  $0,50 \pm 0,2$  %. Nos résultats sont en accord avec ceux de Hamdani [16] avec un faible rendement de 0,51 % pour *Citrus reticulata* et respectivement 0,96 et 1,02 % pour *Citrus sinensis* et *Citrus limon*.

La cinétique d'extraction a montré que la quasi-totalité de l'huile essentielle est extrait au bout des 95 premières minutes.

L'analyse de l'huile essentielle étudiée par CG/SM a permis d'identifier et de caractériser 20 composés représentant 96,87 % de la totalité de l'huile essentielle (Tableau 1) révèle que ses principaux composés sont : le Limonène (32,04 %), le  $\gamma$ -terpinène (25,52 %) et le N-méthyl anthranilate de méthyle (24,50 %).

Tableau 1.  
Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Citrus reticulata*.

N°	Composants	IK	(%)
01	$\alpha$ -Thujène	928	2.02
02	$\alpha$ -Pinène	938	3.30
03	Sabinène	974	Traces
04	$\beta$ -Pinène	980	3.35
05	Myrcène	985	1.10
06	$\alpha$ -Phellandrène	1004	0.30
07	$\Delta^3$ Carène	1013	0.88
08	<b>Limonène</b>	1029	<b>32.04</b>
09	Z- $\beta$ -ocimène	1042	0.91
10	<b><math>\gamma</math>-Terpinène</b>	1056	<b>25.52</b>
11	Terpinolène	1087	1.87
12	Linalol	1091	0.21
13	Terpinène-1-ol	1138	0.03
14	Terpinèn-4-ol	1175	0.15
15	$\alpha$ -terpinéol	1187	0.10
16	Citronellol	1218	0.11
17	Nérol	1220	0.30
18	Néral	1227	0.09
19	<b>N-méthyl anthranilate de méthyle</b>	1402	<b>24.50</b>
20	$\beta$ -caryophyllène	1434	0.09
<b>Total</b>			<b>96.87</b>

Des études réalisées également menées par Hamdani [16] dans la région de Chlef<sup>4</sup> (Algérie) ont donné :  $\gamma$ -terpinène (26,62 %), D-limonène (22,52 %),  $\alpha$ -pinène (4,36 %) et  $\beta$ -pinène (4,35 %). La composition trouvée étant aussi similaire à celle trouvée dans la littérature pour *Citrus reticulata* en Algérie par Baaliouamer *et al.* [17] et en Uruguay par Verzera *et al.* [18].

Choi-Hyang, [19] a analysé les composés volatils de l'huile essentielle provenant de Satsuma mandarin cultivé en Corée. Il mentionne l'abondance du D-limonène comme composant majoritaire (82,8 à 89,2 %), suivi du  $\gamma$ -terpinène (4,2 à 5,1 %) et le myrcène (1,7 %). Contrairement, d'autres travaux rapportent l'abondance du linalool (54,51 %), du  $\beta$ -pinène (18,85 %) et  $\gamma$ -terpinène (4,5 %) pour l'huile essentielle de *Citrus reticulata* [20].

Dans les travaux de Ekundayo *et al.* [21], une combinaison de GC et GC/MS a été utilisée pour caractériser la composition chimique de l'huile de feuille de mandarine (*Citrus reticulata*) du Nigeria. Un total de vingt-deux composés a été identifiés dans l'huile. Les principaux composés se sont révélés être le  $\gamma$ -terpinène (20,15 %), le p-cymène (16,29 %), le linalol (9,55 %) et le terpinen-4-ol (7,13 %).

Parveen *et al.* [22] rapportent que le principal constituant de l'huile essentielle hydro-distillée de *Citrus reticulata* Blanco var. kinnow du Pakistan analysé par (GC-MS) était le  $\beta$ -phellandrène (62,00 %), Le  $\beta$ -pinène (6,53 %), le  $\beta$ -myrcène (2,81 %), le limonène (2,81 %) et le caryophyllène (0,51 %) ce qui représente une quantité considérable de 74,66 % de l'huile.

#### 3.2. Activité antifongique de l'huiles essentielle

Les résultats de l'activité antifongique de l'huile essentielle des feuilles de *Citrus reticulata* sont résumés dans le tableau 2. L'huile essentielle a exercé une importante activité inhibitrice vis-à-vis des champignons. Les deux souches fongiques ; *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* a été inhibées à partir de la concentration minimale 1/2000 v/v et la concentration de 1/3000 v/v a été suffisante pour arrêter la croissance de *Alternaria* sp. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportées par Hamdani qui montrent qu'avec les huiles essentielles de *Citrus reticulata*, l'inhibition de la croissance mycélienne a été complète (PIC de 100 %) avec les concentrations allant de 0,1 à 1 mg/ml pour l'espèce testée du genre *Fusarium* [16].

<sup>4</sup> 200 km à l'Est la capital Alger

Van Hung et al. [23] 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*. Chutia et al. [24] enregistrent un PIC de 42 % pour *Fusarium oxysporum*.

Tableau 2.  
Activité antifongique de l'huiles essentielles des feuilles de *Citrus reticulata*.

Souches	Dose (mg/ml)							T
	1/100 v/v	1/250 v/v	1/500 v/v	1/1000 v/v	1/2000 v/v	1/3000 v/v	1/5000 v/v	
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>albedinis</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Alternaria</i> sp.	-	-	-	-	-	+	+	+

T : témoin ; (-) : inhibition ; (+) : croissance

#### 4. Conclusion

L'huile essentielle extraite à partir des feuilles de *Citrus reticulata* cultivée dans de la région d'Azzaba willaya de Skikda (Algérie), a montré, in vitro, une activité antifongique contre les deux champignons ; *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* et *Alternaria* sp. testés. Ce pouvoir bioactif observé chez l'huiles est attribué principalement à leurs teneurs en Limonène et  $\gamma$ -Terpinène connus pour leurs vertus inhibitrices de la croissance mycélienne. D'après ces résultats, on peut penser que l'huile essentielle des feuilles de *Citrus reticulata* méritent une étude plus approfondie pour exploiter ces propriétés antifongiques dans le domaine de la préservation des légumes secs à l'échelle alimentaire.

#### Références

- [01] Laplace J.P., Agriculture et alimentation : Réflexions croisées, Cahiers Agricultures, 15 (4) (2006) 375-78.
- [02] Tripathi P., Dubey N., Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables, Postharvest Biology and Technology, 32 (2004) 235-245.
- [03] Isman M.B., Plant essential oils for pest and disease management, Crop Protection, 19 (2000) 603-608.
- [04] Ishii H., Impact of fungicide resistance in plant pathogens on crop disease control and agricultural environment, Japan Agricultural Research Quarterly, 40 (2006) 205-211.
- [05] Tantaoui A., Fernandez D., Comparaison entre *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* et *Fusarium oxysporum* des sols de palmeraies par l'étude du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP), Phytopathologia Mediterranea, 32 (1993) 235-244.
- [06] Site n° 1 : <https://fr.wikipedia.org/wiki/Alternaria>, consulté le 30 Novembre 2016.
- [07] Site n° 2 : *Alternaria* sp, <https://www.humpath.com/spip.php?article16507>, consulté le 30 Novembre 2016.
- [08] Broydé H., Doré T., Effets des pratiques agricoles sur la contamination des denrées par les mycotoxines issues de *Fusarium* et *Aspergillus* spp, Cahier Agriculture, 22 (2013) 182-94.
- [09] Quezel P., Santa S., Nouvelles Flores d'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales, Vol 2. CNRS, Paris. Éditions du centre national de la recherche scientifique, (1962) 793.
- [10] Clevenger JF., Apparatus for the determination of volatile oil, Journal of the American Pharmacists Association, 17 (1928) 346-1.
- [11] Pharmacopée Européenne, Conseil de l'Europe and Pharmacopée Européenne, 1 (1996).
- [12] Hamrouni L., Hanana M., Amri I., Romane A., Gargouri S., Jamoussi B., Allelopathic effects of essential oils of *Pinus halepensis* Miller : chemical composition and study of their antifungal and herbicidal activities, Archives of Phytopathology and Plant Protection, 48 (2) (2014)1-14.
- [13] Messgo-Moumene S., Li Y., Bachir K., Houmani Z., Bouznad Z., Chemat F., Antifungal power of citrus essential oils against potato late blight causative agent, Journal of Essential Oil Research, 27 (2) (2014) 169-176.
- [14] Sameza M.L., Boat M.A.B., Nguemezi S.T., Mabou L.C.N., Jazet Dongmo P.M., Boyom F.F., Menut C., Potential use of Eucalyptus globules essential oil against *Phytophthora colocasiae* the causal agent of taro leaf blight, European Journal of Plant Pathology, 140 (2) (2014) 243-250.
- [15] Leroux P., Credet A., Document sur l'étude de l'activité des fongicides, INRA, Versailles, France, (1978), 12 p.
- [16] Hamdani F.Z., Propriétés antifongiques des huiles essentielles des feuilles de Citrus vis-à-vis d'*Alternaria alternata* et *Penicillium* sp in vitro, Phytothérapie, 15 (2017) 263-266.
- [17] Baaliouamer A., Meklai B.Y., Frisse D., Scharff C., The chemical composition of some cold-pressed citrus oils produced in Algeria, Journal of Essential Oil Research, 4 (3) (1992) 251-258.
- [18] Verzera A., Trozzi A., Mondello L., Dellacassa E., Lorenzo D., Uruguayan Essential Oil. Part X. Composition of the oil of Citrus Clementine, Hort. Flavour and Fragrance Journal, 13 (1998) 189-195.
- [19] Choi-Hyang S., Volatile constituents of Satsumam growing in Korea, Flavour fragrance Journal, 19 (5) (2004) 406-412.
- [20] Fadel H., Comparative studies on leaf oils of Egyptian Citrus varieties, Food Chemistry Journal Islamic Academy of Sciences, 4 (3) (1991) 196-199.
- [21] O. Ekundayo, O. Bakare, A. Adesomoju, E. Stahl-Biskup, Leaf Volatile Oil Composition of Mandarin (*Citrus reticulata*) from Nigeria, Journal of Essential Oil Research, 2 (6) (1990) 329-330.
- [22] Z. Parveen, S. Siddique, A. Zeeshan, Chemical composition of essential oil from leaves of seeded and seedless *Citrus reticulata* blanco var. kinnow, Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research, 49 (3) (2014) 181-184.
- [23] Van Hung P., Thi Lan Chi P., Thi Lan Phi N., Comparison of antifungal activities of Vietnamese citrus essential oils, Natural Product Research, Formerly Natural Product Letters, 27 (4,5) (2013) 506-508.
- [24] Chutia M., Deka Bhuyan P., Pathak M.G., Sarma T.C., Boruah P., Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. Food Science and Technology, 42 (2009) 777-780.