

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة 8 ماي 1945 قالمة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la nature et de la Vie
Filière : Sciences Agronomiques
Département : Ecologie et génie de l'environnement
Spécialité/Option : Phytopharmacie et protection des végétaux

Thème

Contribution à l'étude de l'activité antifongique des huiles essentielles des oranges douces (*Citrus sinensis*)

Présenté par :

- BELLIROUN Nouha
- KHELIL Meryem Yassamine

Devant le jury composé de :

Dr. Ouchtati N. : Présidente	(MCA)	(Université 8 Mai 1945 Guelma)
Dr. Khaladi O. : Examineur	(MCB)	(Université 8 Mai 1945 Guelma)
Dr. Allioui Nora : Encadreur	(MCA)	(Université 8 Mai 1945 Guelma)

Juin 2022

Remerciements

En tout premier lieu, nous tenons à remercier notre encadreur Dr **ALLIOUI N.**, de nous avoir guidée et soutenue durant ce travail avec rigueur et tolérance et pour son aide, son expérience et sa compétence, c'est grâce à ses précieux conseils et remarques qu'on a pu faire ce modeste travail, nous sommes très honorées par son accompagnement.

Notre gratitude et nos sincères remerciements vont à Dr **Ouchtati N.** d'avoir bien voulu présider ce jury.

Nos remerciements s'adressent à Dr **Khaladi O.**, qui nous fait l'honneur de faire partie du jury, et pour avoir accepté d'examiner notre travail.

Nos vifs remerciements s'adressent aussi à Dr. **Zitouni A.** pour son aide dans le traitement statistique des résultats

Nous tenons à remercier également Professeur **BENHAMIDA A.** pour son aide très précieuse dans la caractérisation de l'huile essentielle de notre étude, et son accompagnement au niveau des laboratoires pédagogiques du Département de Génie des Procédés de la Faculté des Sciences et de la Technologie, Université 8 mai 1945 Guelma, ainsi que pour sa gentillesse et son soutien.

Nos remerciements vont également à l'ensemble du personnel technique des laboratoires de notre faculté SNV/STU université 8 mai 1945 GUELMA, dans lesquels ce travail été réalisé pour la sympathie et l'aide qu'ils nous ont accordé durant toute la période de la réalisation du travail, et plus particulièrement Mesdames **Louiza & Houria.**

Nos remerciements les plus sincères et notre gratitude vont à tous les enseignants du département d'Ecologie et génie de l'environnement qui ont contribué à notre formation, Ainsi qu'à ceux qui ont contribué de loin ou de près à la réalisation de ce travail, enfin nos remerciements s'adressent à tous les étudiants de la promotion de phytopharmacie et protection des végétaux 2021/2022.

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail :

A moi-même.

A mes très chers parents que Dieu me les garde.

A ma chère mère **S. ZAHIA** « Tu m'a donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir. Tout ce que je peux offrir ne pourra jamais exprimer l'amour et la reconnaissance que je te porte ».

A mon père héro **CHERIF** « l'épaule solide, l'œil attentif et compréhensif. Aucune dédicace ne saurait exprimer mes sentiments, que dieu te préserve et te procure santé et longue vie ».

A Ma moitié ma sœur ma confidente **SOFI** pour son soutien moral et ses conseils.

A Mes chers frères **CHEMSSOU** et **DOUDOU**, auxquels je souhaite une très bonne Continuité et réussite dans leurs vies.

A mes chers neveux que j'aime beaucoup **JADOU**, **IDOU** et **NOUSSI**, ainsi que toute ma famille, pour leur affection, soutien et encouragements incessants et déterminants dans ce travail.

A mon cher binôme dans ce travail **B. NOUHA** à mes chères amies **H. WIDAD**, **S. RANIA**, **K. RAYANE**, **M. INES**, **H. SERINE**, **H. MERYEM** et **B. NOURHANE** pour leurs encouragements.

A toute autre personne que je n'ai pas citée et dont l'aide m'a été précieuse.

Yassamine

Je tiens à remercier **DIEU** de m'avoir donné la force et le courage de mener à bien ce modeste travail.

Je tiens à dédier cet humble travail à :

Ma très chère **maman**, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

Mes chers frères **MOUHAMED** et **WASSIM**.

Spécial dédicace à vous : madame **ALLIOUI NORA**.

Mon cher oncle **FOUAD** et ma très chère copine **AMEL**.

A mon cher binôme **YASSMINE** ainsi que sa copine **RANIA**.

A mon entraîneur **BAHIDJ** et toute l'équipe de natation.

A mes enseignants, mes amies et à toute la promotion de **MASTER** en
Phytopharmacie.

A tous ceux qui sont dans mes pensées et que je n'ai pas cités.

NOUHA

Liste des tableaux	i
Liste des figures	ii
Liste des abréviations	iii
Introduction générale	1
Chapitre 01 : Matériel et Méthodes	7
1.1 Objectif de l'étude	7
1.2 Extraction de l'huile de <i>Citrus sinensis</i> et détermination du rendement	7
1.2.1. Matériel végétal utilisé	7
1.2.2. Traitement des échantillons.....	9
1.2.3. Extraction des huiles essentielles.....	9
1.3 Caractérisation des huiles essentielles de <i>Citrus sinensis</i>	11
1.3.1. Matériel et produits chimiques.....	11
1.3.2 Techniques d'analyse.....	12
1.3.2.1. Les caractéristiques organoleptiques	12
1.3.2.2. Indice d'acide	12
1.3.2.3. Indice de réfraction	13
1.3.2.4. Mesure du pH	15
1.3.2.5. Chromatographie sur couche mince (CCM)	16
1.3.2.6. Analyses spectroscopiques	17
1.4 Evaluation de l'activité antifongique de l'HE de <i>C. sinensis</i>	20
1.4.1. Matériel fongique	20
1.4.2. Détermination de l'activité antifongique de l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i> ..	21
1.5 Traitement statistique des résultats	24
Chapitre 02 : Résultats et discussion	25
2.1. Rendement en huile essentielle de la plante utilisée	25
2.1. Caractérisation de l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i>	26
2.2.1. Propriétés organoleptiques	26
2.2.2. Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i>	27

2.2.3. Analyse chromatographique sur couche mince CCM	28
2.2.4. Analyses spectroscopiques	29
2.2.4.1. Analyse de la structure par Spectroscopie IRTF	29
2.2.4.2. Spectroscopie UV-visible	31
2.3. Test de l'activité antifongique de l'huile de <i>Citrus sinensis</i>	32
2.3.1. Effets de l'huile testée sur le <i>Fusarium roseum</i>	32
2.3.2 Effets de l'huile testée sur <i>Zymoseptoria tritici</i>	34
2.3.3. Effets de l'huile testée sur <i>Botrytis cinerea</i>	35
2.3.4. Effets de l'huile testée sur l' <i>Aspergillus niger</i>	37
Conclusion	41
Références bibliographiques	

Liste des tableaux

Tableau 01	Résultats relatifs aux paramètres organoleptiques de l'HE de <i>Citrus sinensis</i>	26
Tableau 02	Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de l'écorce de <i>Citrus sinensis</i>	27
Tableau 03	Facteurs de rétention des espèces chimiques détectées dans notre HE. de <i>Citrus sinensis</i>	28
Tableau 04	Résultat de l'analyse de la variance pour <i>Fusarium roseum</i>	33
Tableau 05	Résultats du test de Dunnett pour <i>Fusarium roseum</i> / HE. de <i>Citrus sinensis</i>	33
Tableau 06	Résultats de l'analyse de la variance pour <i>Zymoseptoria tritici</i> , confronté à l'huile testée.....	35
Tableau 07	Résultats du test de Dunnett pour <i>Zymoseptoria tritici</i> / HE. De <i>Citrus sinensis</i>	35
Tableau 08	Résultats de l'analyse de la variance pour <i>Botrytis cinerea</i>	37
Tableau 09	Résultats du test de Dunnett pour <i>Botrytis cinerea</i> / HE. de <i>Citrus sinensis</i>	37
Tableau 10	Résultats de l'analyse de la variance pour l' <i>Aspergillus niger</i>	39
Tableau 11	Résultats du test de Dunnett pour l' <i>Aspergillus niger</i> / HE. de <i>Citrus sinensis</i>	40

Liste des figures

Figure 01	Photographie du matériel végétal utilisé (Peau d'orange douce).....	7
Figure 02	Localisation de la wilaya de Guelma.....	8
Figure 03	Photographie du montage de type Clevenger utilisé pour l'extraction des huiles essentielles.....	10
Figure 04	Mode opératoire de la détermination de l'indice d'acide de l'HE.....	13
Figure 05	Le refractomètre Abbe, utilisé pour la détermination de l'indice de réfraction de l'HE.....	14
Figure 06	Papier indicateur du pH utilisé pour déterminer le pH de l'HE.....	15
Figure 07	La cuve de CCM et la lampe UV utilisés pour les analyses chromatographiques de l'HE.....	16
Figure 08	Spectromètre infrarouge utilisé pour l'analyse de l'HE.....	18
Figure 09	Spectromètre HACH LANGE DR6000 utilisé pour l'analyse de L'HE..	19
Figure 10	Photographie des cultures jeunes des souches fongiques sur milieu PDA.....	20
Figure 11	Préparation des suspensions sporales.....	22
Figure 12	Test de l'activité antifongique de l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i> à l'égard des différentes souches fongiques.....	23
Figure 13	Huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i> de la région de Guelma, extraite par hydrodistillation.....	26
Figure 14	Résultats du test de CCM.....	28
Figure 15	Spectre IRTF de l'HE de <i>Citrus sinensis</i> enregistré entre 4000 et 500 cm-1.....	31
Figure 16	Spectre UV- visible de l'HE de <i>Citrus sinensis</i>	31
Figure 17	Résultats du test de confrontation de <i>Fusarium roseum</i> avec l'huile essentielle de <i>Citrus cinensis</i>	32
Figure 18	Résultats du test de confrontation de <i>Zymoseptoria tritici</i> avec l'huile essentielle de <i>Citrus cinensis</i>	34
Figure 19	Résultats du test de confrontation de <i>Botrytis cinerea</i> avec l'huile essentielle de <i>Citrus cinensis</i>	36
Figure 20	Résultats du test de confrontation de l' <i>Aspergillus niger</i> avec l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i>	38

Abréviations

AFNOR : Association Française de Normalisation

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

GC-MS : Gas Chromatography – Mass Spectrometry

EO : Essential Oil

HE : Huile Essentielle

IRTF : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

KOH : hydroxyde de potassium

PDA : Potato Dextrose Agar

pH : Potentiel d'Hydrogène

Rdh (%) : Rendement d'huile en (%)

UV : Ultra-Violet

STB : Septoria Tritici Blotch

Introduction

Introduction générale

Depuis le siècle dernier, l'effet d'une importante densité des espèces végétales sur nos sols cultivés a facilité l'installation de pathogènes au sein des cultures. De plus, cela a favorisé la diversification des organismes indésirables et ceux-ci ont su s'adapter aux nouvelles cultures et à l'évolution de leur(s) plante(s) hôte(s) (**Rocher, 2017**).

Selon **Agrios (2005)**, les ravageurs et les maladies causent 31 à 42 % des pertes des récoltes mondiales chaque année dont 14,1 % sont attribuées aux maladies seules.

Les pertes potentielles provoquées par les maladies fongiques sont estimées entre 10 et 30%. En dehors des effets quantitatifs, il existe des champignons pouvant affecter les qualités des productions végétales comme la présence de mycotoxines toxiques pour l'homme, ou des altérations organoleptiques comme la présence de *Botrytis cinerea* sur le raisin (**Batsch, 2011**).

Les champignons filamenteux forment un groupe important d'agents pathogènes connus pour causer des maladies chez les plantes, conduisant à de graves pertes économiques à l'échelle mondiale. Parmi ces espèces, certaines sont polyphages et sont très destructives pour les cultures en cas de plantes sensibles et des conditions environnementales favorables au développement du pathogène ; d'autres sont spécifiques et s'attaquent aux cultures vivrières (céréales, légumineuses et cultures maraichères), au champ ou bien dans les locaux de stockage et occasionnent des pertes économiques considérables, ainsi que des dommages occasionnels pour la santé du consommateur, par la libération de métabolites secondaires, notamment certaines espèces des genres *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Alternaria* sp.

Dans cette partie du document nous décrivons quelques champignons phytopathogènes d'intérêt économique considérable :

- Les espèces du genre *Fusarium* sont très répandues dans la nature ; présentes sous forme de saprophytes dans le sol, dans la végétation en décomposition de toutes sortes, et comme parasites des plantes, et sont capables de produire des mycotoxines telles que la zéaralenone, les trichothécènes, la butenolide et la moniliformine. L'ingestion de ces mycotoxines par l'homme ou les animaux peut entraîner des problèmes de santé pouvant conduire à la mort (**Lee et al., 1985**).

Le genre *Fusarium* infecte presque toutes les plantes cultivées, y compris les céréales, les légumineuses, et les cultures maraîchères et horticoles, causant le flétrissement vasculaire, la pourriture des tiges et la mort prématurée des plantes infectées (**Gurdaswani & Ghag, 2020**). Différentes parties des plantes peuvent être colonisées par des espèces du genre *Fusarium*, notamment, les tiges, les racines, les épis, les plantules et les graines, ce qui entraîne des pertes considérables des rendements (**Askun, 2018**).

Fusarium roseum est le champignon responsable de la fusariose de l'épi du blé et qui peut engendrer des dégâts allant de 30 à 70 % de pertes (**Syngenta, 2018**). La maladie se manifeste par le dessèchement précoce de certains épillets. Des taches décolorées cernées de brun apparaissent sur les glumes ; les grains et/ou les épillets sont échaudés et montrent alors une coloration rose. Dans le cas d'une attaque au col de l'épi, on observe un échaudage total de l'épi (**Syngenta, 2020**). La résistance de *Fusarium* aux antifongiques a été confirmée par de nombreux chercheurs (**Askun, 2018**).

- La tache septorienne (*Septoria Tritici* Blotch : STB), causée par le champignon ascomycète *Zymoseptoria tritici* / *Mycosphaerella graminicola* (**Quaedvlieg et al., 2011**) est actuellement l'une des principales maladies fongiques du blé dans de nombreuses régions du monde, notamment en Algérie (**Allioui et al., 2016 ; Harrat, 2018; Allioui et al., 2021**). Dans la plupart des cas, la maladie attaque les feuilles basales et les symptômes apparaissent sous forme de petites lésions chlorotiques en automne ou au printemps. Les taches de couleur vert clair, puis jaune, deviennent brunes à leur périphérie, tandis que le centre se dessèche en raison de la mort des tissus ; les nécroses sont très souvent allongées, délimitées par les nervures et parsemées de très nombreuses fructifications sous forme de points noirs ou bruns appelés pycnides. Les épidémies graves peuvent réduire les rendements de 35 à 50 % (**Ponomarenko et al., 2011**).

- *Botrytis cinerea* Pers, l'anamorphe de *Botryotinia fuckeliana* (**Romanazzi & Feliziani, 2014**) ; est un champignon ascomycète commun et répandu responsable des maladies de la moisissure grise. Décrit pour la première fois par Christiaan Hendrik Persoon en 1794 (**Cheung et al., 2020**), la gamme d'hôtes de ce pathogène, rassemble de nombreuses cultures importantes ; cette espèce fongique s'attaque à plus de 200 cultures dans le monde (**Williamson et al. 2007**). Elle provoque la pourriture, principalement, sur un large éventail d'espèces de plantes dicotylédones, y compris les fruits, les légumes et les plantes ornementales, telles que la

vigne, la fraise, le concombre, la tomate et les fleurs à bulbes (**Fillinger & Elad, 2016 ; Stamelou et al., 2021**).

B. cinerea, est un phytopathogène aéroporté au mode de vie nécrotrophe, difficile à contrôler parce qu'il peut survivre sous forme de sclérotés dans les débris de cultures pendant de longues périodes (**Williamson et al. 2007**). À l'échelle mondiale, la pourriture grise est considérée comme la maladie fongique la plus préjudiciable en serre (**Bouchard, 2020**).

- Parmi les mycètes qui s'attaquent aux produits agricoles en post-récolte, les genres *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Alternaria sp.*....., constituent une véritable menace pour la conservation des produits et la santé du consommateur. Le champignon filamenteux *Aspergillus niger* est un champignon mésophile qui peut survivre jusqu'à des températures de l'ordre de 60 °C et provoque une dégradation rapide des substrats (**Ladaniya, 2008**). C'est un contaminant fongique commun des produits agricoles (**Delucca et al, 1983**). Le contrôle de ce champignon n'est pas aisé car lorsqu'il s'installe, il est difficile de le déloger (**Dedi & Otchoumou, 2010**).

La lutte contre les ravageurs et les parasites phytopathogènes repose principalement sur l'utilisation des pesticides. Ces derniers sont généralement classés en fonction de l'organisme cible. Ils regroupent cinq familles moléculaires aux modes d'action très divers : fumigants, fongicides, herbicides, rodenticides et insecticides ; auxquelles peuvent s'ajouter les acaricides et des molluscicides. Chaque famille comprend des sous-familles de produits et de métabolites aux compositions chimiques distinctes (**Thany et al., 2013**).

Les fongicides, destinés à lutter contre les champignons phytopathogènes, ont certes permis l'amélioration des rendements en agriculture, cependant leur utilisation abusive a engendré à long terme l'apparition de phénomènes de résistance chez les champignons, en plus de la pollution de l'environnement (**Amri et al. 2014 ; Jarroudi et al., 2019**), et les risques sanitaires néfastes associés à leur utilisation, aussi bien pour le manipulateur que pour le consommateur ont été prouvés par plusieurs travaux de recherche (**Ahouangninou et al., 2013**). L'irritation cutanée, les maux de tête, la toux, les vertiges, les troubles respiratoires, la fatigue, la diarrhée, etc. sont autant de symptômes d'intoxication dus à l'usage de ces pesticides (**Yarou et al., 2017**). Différentes voies sont susceptibles de permettre l'entrée des substances actives dans l'organisme : par ingestion volontaire ou non (mains souillées), par inhalation, par contact

cutané., ce qui conduit à l'apparition des : Intoxications aiguës; intoxications chroniques ; Cancers (de l'estomac ; de la prostate ; du cerveau...) ; maladies neurodégénératives... (**Batsch, 2011**).

De nombreux cas de résistance des ravageurs aux pesticides de synthèse sont révélés partout. Actuellement, aucun groupe parmi les organophosphorés, organochlorés, pyréthrinoïdes ou encore fumigants n'échappe à la résistance des ravageur (**Guèye et al., 2011**).

Face à ces contraintes d'utilisation des pesticides chimiques, le besoin de recherche d'autres stratégies de lutte, s'impose, pour réduire les pertes subies par les pathogènes aux cultures et minimiser le risque d'exposition à ces produits pour les humains et l'environnement (**Sharma & Tripathi, 2006**).

La lutte biologique, par utilisation de molécules naturelles (bio-fongicides) semble être une stratégie prometteuse pour préserver les cultures et réduire l'usage des pesticides chimiques. La majorité des molécules naturelles sont biodégradables et moins toxiques pour les humains et se décomposent plus rapidement dans l'environnement (**Sharma & Tripathi, 2006 ; Dara, 2018**).

Il existe de nombreuses formes de lutte biologique, mais celle qui retient actuellement l'attention des chercheurs passe par l'utilisation de substances naturelles d'origine végétale. Les plantes médicinales constituent des ressources précieuses pour la grande majorité des populations rurales en Afrique, où plus de 80% de cette population s'en sert pour assurer les soins de santé (**Tahri et al., 2012**). Cependant, peu d'espèces végétales sont connues et seule une minorité d'entre elles est explorée chimiquement (**Guinoiseau, 2010**).

En effet, certains extraits de plantes, notamment les huiles essentielles ont montré une activité antibiotique importante et sont à large spectre d'action (**Mnayer et al., 2014**).

Les huiles essentielles sont des composés volatils, naturels et complexes caractérisés par une forte odeur et sont formées chez les plantes aromatiques en tant que métabolites secondaires. Ils sont généralement obtenus par vapeur ou par hydrodistillation. Ils jouent un rôle important dans la protection des plantes et agissent comme agents antibactériens, antiviraux, antifongiques, insecticides et aussi contre les herbivores (**Bakkali et al., 2008**).

Elles sont obtenues à partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs, de brindilles, d'herbes, d'écorces, de bois, de racines ou de fruits, mais également à partir des gommés qui s'écoulent du tronc des arbres (**Guinoiseau, 2010**).

Les domaines de recherche de l'activité antibactérienne des huiles essentielles sont très diversifiés, et il existe de nombreuses études sur les propriétés biologiques des huiles essentielles et leurs activités antimicrobiennes, antioxydantes et leur utilisation possible en agroalimentaire (**Mnayer et al., 2014**). Cependant, peu de travaux sont réalisés sur l'activité antifongique des huiles essentielles contre les champignons phytopathogènes. Les mécanismes d'action des propriétés pesticides des huiles essentielles sont encore méconnus, malgré les études relativement nombreuses réalisées à ce sujet (**Taleb, 2015**).

Au cours du siècle dernier, l'industrie a montré une volonté de convertir les déchets d'agrumes en produits commerciaux à haute valeur ajoutée. Les agrumes sont utilisés pour la transformation du jus, ce qui produit évidemment beaucoup de déchets, principalement l'écorce. Il s'agit toujours d'un grave problème de pollution de l'environnement. Le recyclage de ces déchets est devenu une étude majeure aux implications énormes. Ces produits intéressent plusieurs domaines (agro-industrie, parfumerie, pharmaceutique, phytopharmaceutique...) et sont utilisés dans des applications variées, telles que l'aromathérapie, les parfums, arômes alimentaires, biopesticides... (**Allaf, 2013**).

Ferhat et al., (2010) signale que, le genre *Citrus* occupe la seconde place dans les échanges mondiaux des produits végétaux actuels, environ 105 millions de tonnes, et présente une importance économique considérable en tant que culture de rapport dans de nombreux pays, en tant que produit d'exportation dans la plupart d'entre eux, et enfin comme source d'emploi et d'activité économique, aussi bien dans le secteur agricole que dans diverses branches auxiliaires (conditionnement, emballages, transformation, transport etc...).

L'orange douce, *Citrus sinensis*, est l'une des espèces d'agrumes populairement cultivées dans le monde. Les oranges douces, en vertu de leur valeur nutritionnelle reconnue et souhaitable, sont principalement utilisés comme fruits frais, jus, salades, desserts et confitures. En outre, ils fournissent des huiles essentielles précieuses de large applications commerciales dans la transformation alimentaire (**Njoroge et al., 2005 ; Gmitter et al., 2007**).

L'Algérie est reconnue pour la qualité de ses agrumes ainsi que pour son savoir-faire tant dans la sélection des espèces que dans la production de fruit, de jus et des huiles essentielles d'agrumes. Ce genre de la famille des Rutaceae comprend environ 17 espèces réparties dans les régions tropicales et tempérées (**Ferhat et al., 2010**).

Citrus sinensis est une espèce d'arbustes fruitiers, cultivée dans les régions chaudes, comme les pays méditerranéens (**Gargouri & Akrouti, 2017**). Elle provient d'un hybride naturel entre le mandarin *C. reticulata* Blanco et le pummelo *C. maxima* (**Penjor et al., 2010**). Cet hybride ancien contient des composés phytochimiques actifs qui peuvent protéger la santé ; et une riche source de vitamine C (**Rafiq et al., 2018**).

Les huiles essentielles des agrumes s'accumulent tout au long de la vie du fruit, de la feuille ou du pétale dans des poches appelées glandes à essence. Ces poches sont entourées par les cellules sécrétrices qui isolent les tissus voisins du contenu de la poche (**Huet, 1991**).

La première huile essentielle mondiale en tonnage provient du *Citrus sinensis* (**Krausz, 2015**). Cependant, dans la littérature, peu de données sont disponibles sur l'activité antifongique de cette huile (**Hamdani, 2012**).

L'objectif visé par cette étude est de tester l'activité antifongique des huiles essentielles de *Citrus sinensis* extraites des écorces, sur des champignons phytopathogènes, en vue de chercher des molécules naturelles pouvant être utilisées en protection des cultures, afin de limiter l'utilisation des pesticides. Les champignons faisant l'objet de cette étude sont : l'agent causal de la fusariose des épis du blé (*Fusarium roseum*), l'agent causal de la tache septorienne des feuilles du blé (*Zymoseptoria tritici*), l'agent causal de la pourriture grise chez beaucoup d'espèces végétales (*Botrytis cinerea*) et *Aspergillus niger*, qui se développe plus particulièrement dans les locaux de stockage des produits agricoles.

Le présent document comporte une introduction générale, un premier chapitre qui décrit le matériel et les méthodes utilisés dans les différentes manipulations réalisées pour répondre aux objectifs du travail, un deuxième chapitre qui présente les résultats obtenus et leur discussion, et en fin une conclusion.

Chapitre 01 : Matériel et Méthodes

Chapitre 01 : Matériel et Méthodes

1.1. Objectif de l'étude

Le présent travail a pour objectif d'évaluer le rendement en huiles essentielles des écorces des oranges douces *Citrus sinensis* et d'étudier leur activité antifongique.

1.2. Extraction de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* et détermination du rendement

1.2.1. Matériel végétal utilisé

L'étude a porté sur une seule variété des oranges (Orange douce : *Citrus sinensis*). Seule, l'épicarpe et le mésocarpe (**Fig. 01**) ont été utilisés. Cette espèce de plante a été choisie pour les raisons suivantes :

- Large répartition de cette espèce dans la région Est du pays,
- Plusieurs unités industrielles en agroalimentaire existent dans la région Est du pays, et la fabrication des jus et des confitures d'orange permet de restituer de grandes quantités de d'écorce d'orange,
- Nombre très limité de travaux de recherche sur les propriétés biopesticides, et plus spécifiquement le pouvoir antifongique des huiles essentielles de cette espèce végétale.

Les oranges douces ont été achetées du marché local de Guelma



Figure 01 : Photographie du matériel végétal utilisé (Peau d'orange douce)

- Situation géographique et caractéristiques pédoclimatiques de la région de Guelma, zone de culture du matériel végétal.

La wilaya de Guelma se situe au Nord-Est du pays (**Fig. 02**) et constitue, du point de vue géographique, un point de rencontre, voire un carrefour entre les pôles industriels du Nord (Annaba – Skikda) et les centres d'échanges au Sud (Oum-El-Bouaghi et Tébessa), outre la proximité du territoire Tunisien à l'Est.



Figure 02 : Localisation de la wilaya de Guelma [1]

La wilaya de Guelma se situe au sein d'une grande région agricole dans le Nord-Est de l'Algérie, à une altitude de 36°27'43" Nord et une longitude de 7°25'33" Est. La géographie de la Wilaya se caractérise par un relief diversifié dont on retient essentiellement une importante couverture forestière et le passage de la Seybouse qui constitue le principal cours d'eau.

Le territoire de la Wilaya se caractérise par un climat subhumide au centre et au Nord et semi-aride vers le Sud. Ce climat est doux et pluvieux en hiver et chaud en été. La température qui varie de 4° C en hiver à plus de 35° C en été est en moyenne de 17,3° C [1].

1.2.2. Traitement des échantillons

L'écorce (peau des fruits) a été récupérée, nettoyée et séchée à l'air libre aux conditions ambiantes de température et d'humidité, pendant 8 jours, puis conservée dans des sacs en papier propres jusqu'au moment d'utilisation. Le séchage a pour but d'abaisser la teneur en eau contenue dans le matériel végétal, afin d'obtenir le maximum de quantité d'huile par distillation.

1.2.3. Extraction des huiles essentielles

a) Matériel utilisé

- Matière sèche de l'espèce végétale étudiée.
- Montage d'hydrodistillateur de type *Clevenger*
- Balance de précision
- Eau distillée
- Flacons en verre fumé (de 5-10 ml), lavés et séchés
- Glace.

b) Procédé d'extraction

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydro-distillation dans un appareil de type *Clevenger* (**Fig. 03**), au niveau des laboratoires de la faculté des sciences de la nature et de vie et des sciences de la terre et de l'univers de l'université 8 Mai 1945 de Guelma.

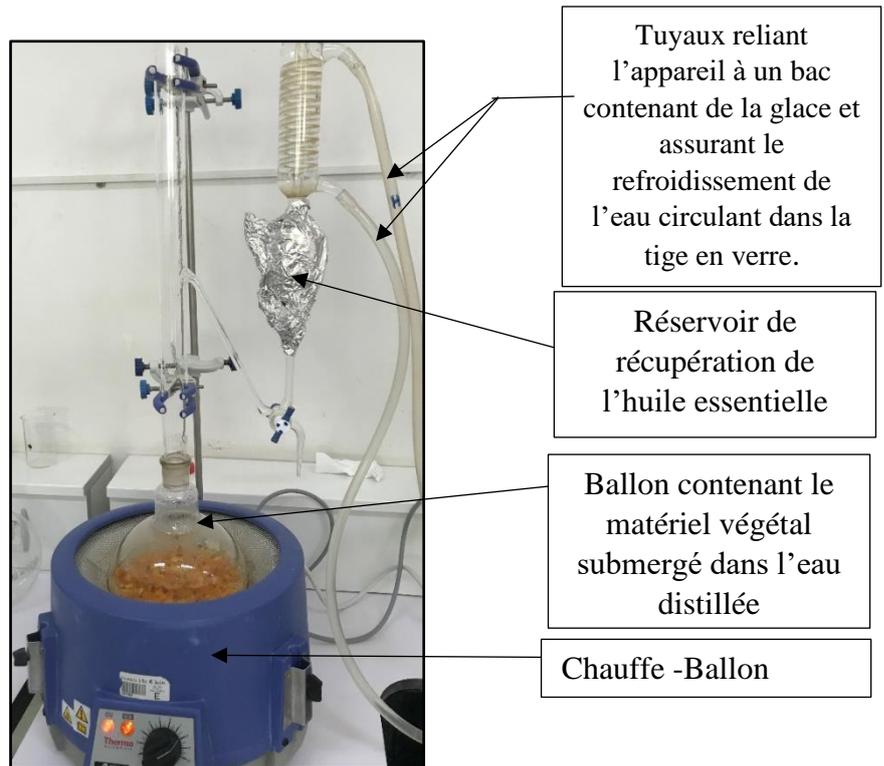


Figure 03 : Photographie du montage de type *Clevenger* utilisé pour l'extraction des huiles essentielles (Photo personnelle)

- **Principe de l'hydrodistillation**

Elle consiste à submerger une quantité du matériel végétal sèche de l'espèce utilisée (100 à 200 g) contenant la substance volatile dans l'eau distillée, dans un ballon en verre de 2 L, le tout est porté à ébullition pendant 03 heures de temps, puis le distillat obtenu est recueilli dans une ampoule à décanter. Le mélange est laissé au repos quelques minutes, ce qui résulte de l'apparition de deux phases, une phase organique (huile essentielle) et l'autre est aqueuse (eau). L'huile essentielle sera par la suite récupérée dans un flacon approprié.

c) Conservation de l'huile essentielle obtenue

Les huiles essentielles récupérées sont conservées au congélateur, dans des flacons fumés et bien scellés, conformément aux recommandations de **Mayer (2012)** et **Laghchimi et al. (2014)**, qui signalent que les huiles essentielles peuvent être conservées au congélateur dans des flacons sombres, plusieurs années.

d) Détermination du rendement en huiles essentielles

Le rendement en huile essentielle (volume en ml) de l'espèce végétale étudiée a été déterminé par rapport à 100 g de la matière sèche ; exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante (Mahboub et al., 2019). Une moyenne de 04 distillations a été retenue.

$$R (\%) = Mhe / Mvg \times 100$$

Où :

R : Rendement d'huile en pourcentage (%)

Mhe : Masse de l'huile essentielle

Mvg : Masse végétale sec

1.3. Caractérisation des huiles essentielles de *Citrus sinensis*

Cette partie du travail a été réalisé au niveau du laboratoire pédagogique du département de Génie des Procédés de la Faculté des Sciences et de la Technologie, Université 8 mai 1945 Guelma, sous la direction du Professeur BENHAMIDA A. Dans ce qui suit, nous présenterons le matériel utilisé et toutes les procédures expérimentales ainsi que les techniques analytiques utilisées dans cette étude.

1.3.1. Matériel et produits chimiques

- Tubes en verre.
- Une balance.
- Pipette pasteur.
- Erlenmeyer.
- Burette.
- Eau distillée.
- Hydroxyde de potassium (KOH).
- L'éthanol.
- Indicateur coloré.
- Dichloro-méthane.
- Cyclohexane.

1.3.2. Techniques d'analyse

1.3.2.1. Les caractéristiques organoleptiques

Les caractéristiques organoleptiques (aspect, odeur, couleur, saveur) sont des indicateurs qui permettent l'évaluation initiale de la qualité d'une huile essentielle. Ils ont été déterminés sans aucun instrument ni équipement.

1.3.2.2. Indice d'acide

L'indice d'acide d'une matière grasse correspond aux nombres de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaires pour neutraliser les acides gras libres présents dans 1 gramme de matière. La connaissance de l'indice d'acide permet de quantifier les acides gras libres dans l'huile, dont la présence constitue un facteur de détérioration de l'huile (Noumi et al., 2011).

- **Principe**

L'indice d'acide des huiles essentielles équivaut à neutraliser l'acide libre de ces huiles essentielles avec de l'hydroxyde de potassium (KOH).

- **Mode opératoire**

- 0,2 g d'HE de *Citrus sinensis* sont pesés avec précision et sont ensuite
- Introduits dans un erlenmeyer de 25ml sec et propre.
- L'HE est dissous dans 5 ml d'éthanol puis 3 gouttes de phénol phtaléine sont ajoutées, ce dernier est utilisé comme indicateur coloré.
- Le liquide est ensuite neutralisé avec une solution de KOH (0,1N) contenue dans une burette.
- Le titrage est arrêté au moment du virage de la couleur (Fig. 04).
- Le volume de KOH consommé (V KOH) est noté.

- **Mode de calcul**

L'indice d'acide est donné par la formule suivante (Mahboub et al., 2019)

$$I_A = \frac{56,1 \times M \times v}{m}$$

Où :

v = volume de KOH

m = masse d'huile

56.1 = masse de KOH

M = molarité de KOH

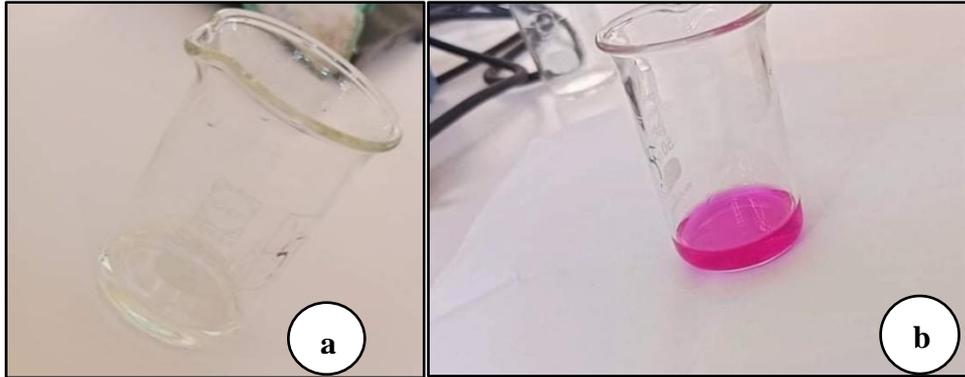


Figure 04 : Mode opératoire de la détermination de l'indice d'acide de l'HE.
(a) avant le changement de couleur ; (b) après le changement de couleur

1.3.2.3. Indice de réfraction

L'indice de réfraction est le rapport entre le sinus des angles d'incidence et de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante (AFNOR, 2000).

Le terme de réfractomètre est utilisé pour nommer des appareils qui permettent de déterminer l'indice de réfraction d'un liquide, bien qu'il existe également des instruments qui permettent la détermination de l'indice de réfraction d'un solide (Edith, 2004).

Les indices de réfraction (n) des huiles essentielles sont mesurés avec un réfractomètre CONVEX. Son principe est basé sur de la déviation angulaire provoquée par la réfraction de la lumière.

- **Mode opératoire**

La mesure de l'indice de réfraction des huiles essentielles a été réalisée par un réfractomètre Abbe (Fig. 05).

- Après s'être assuré de la propreté de l'appareil, on place une goutte d'HE au centre du prisme.

- Fermer doucement le prisme secondaire. L'échantillon s'étale normalement entre le prisme principal et le prisme secondaire en un film mince.
- Attendre que la température se stabilise pour effectuer la mesure.
- Regarder dans l'oculaire et on mesure en tournant le bouton de réglage de l'indice de réfraction pour amener les zones sombres et éclairées au centre du réticule.
- Prendre la valeur de l'indice par l'échelle de lecture.
- Lire l'indicateur de température pour déterminer le degré de mesure réelle et le joindre sans faute à la valeur mesurée.



Figure 05 : Le refractomètre Abbe, utilisé pour la détermination De l'indice de réfraction de l'HE.

- **Mode de calcul**

L'indice de réfraction est évalué par la formule suivante décrite par **Likibi et al. (2019)**.

$$I_D^{20} = I + 0,00045 (T - 20 \text{ } ^\circ\text{C})$$

Où :

I = indice de réfraction à la température de mesure.

T = température de mesure.

0.00045 = Constante de variation de l'indice d'acide quand la température varie de 1°C.

1.3.2.4. Mesure du pH

Le pH est l'abréviation de potentiel d'hydrogène, c'est un coefficient qui indique le degré d'acidité ou de basicité d'une solution dans notre cas c'est le degré d'acidité ou de basicité d'HE de *Citrus sinensis*, permettant de savoir si l'huile est acide, basique ou neutre.

• Mode opératoire

Ce test consiste à déposer une goutte d'HE de *citrus sinensis* sur le papier indicateur, et on élimine les premiers jets. Après 20 à 30 secondes de contact, on obtient le changement de la couleur, qu'il faut comparer avec une gamme de couleurs de référence qui varient selon le pH (**Fig.06**).



Figure 06 : Papier indicateur du pH utilisé pour déterminer le pH de l'HE.

1.3.2.5. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie de partage sur papier s'est révélée comme étant une technique très intéressante par sa précision et sa sensibilité nettement supérieure à celles qu'offraient les tests de microcristallisations. Cette technique est forcément subjective, et il est très difficile de déterminer la marge d'erreur dont on dispose (Faucon et al., 1977).

• Principe

La chromatographie sur couche mince est une méthode physico-chimique analytique. La phase stationnaire est constituée d'une couche polaire fine d'alumine ou silice déposée sur la plaque (Fig. 07). L'éluant ou la phase mobile (solvant ou bien un mélange de solvants) migre par capillarité à la surface de la plaque CCM. Une fois l'élution terminée, la plaque est traitée avec une lampe UV (le produit absorbe les rayons UV).

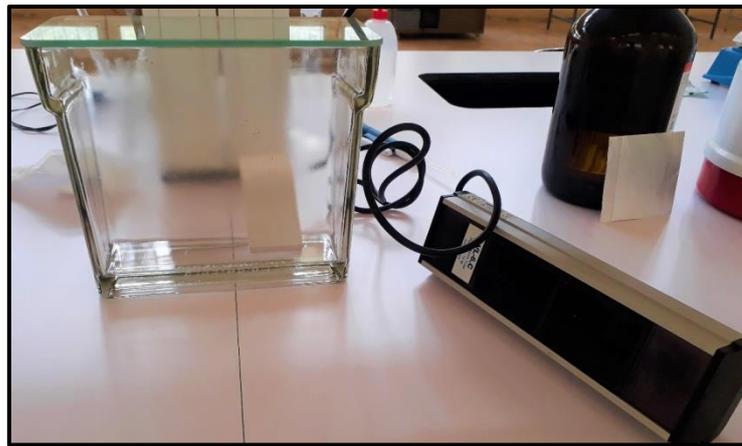


Figure 07 : La cuve de CCM et la lampe UV utilisés pour Les analyses chromatographiques de l'HE.

• Mode opératoire

- En premier lieu, tracer une ligne de dépôt de 1,5 cm à partir du bas de la plaque CCM.
- A l'aide d'une micropipette, ajouter une goutte d'HE de *Citrus sinensis* sur la ligne de dépôt.
- Placer la plaque dans la cuve avec l'éluant qui est le cyclohexane et s'assurer que le niveau du solvant dans la cuve ne dépasse pas la ligne de sédimentation.

- Couvrir ensuite la cuve et laisser étaler.
- Retirer la plaque de la cuve et tracer le front d'éluant.

- **Révélation**

- La visualisation de la plaque de chromatographie est faite sous une lampe UV de longueur d'onde de 254 nm.
- Chaque espèce migre à sa propre vitesse selon sa nature et celle du solvant. Le rapport frontal (Rf) est ensuite déterminé. Il est compris entre 0 et 1 (**Ousmane, 2011**).

- **Mode de calcul**

Le calcul se fait selon la formule ci-dessous (**Ousmane, 2011**).

$$Rf = \frac{\text{hauteur de la tache}}{\text{hauteur du front de l'éluant}}$$

1.3.2.6. Analyses spectroscopiques

- **Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)**

La spectroscopie infrarouge est une technique couramment utilisée dans les laboratoires d'analyses pour la caractérisation physico-chimique des matériaux organiques. C'est une méthode quantitative et qualitative qui renseigne en général sur les fonctions chimiques présentes dans les molécules et permet également de différencier les isomères, par l'examen de la partie du spectre dite « des empreintes digitales ». Le spectre obtenu peut être comparé à ceux contenus dans une bibliothèque informatisée de spectres Infra-Rouge (**Sutour, 2010**).

- **Mode opératoire**

L'analyse de spectroscopie infrarouge a été réalisée à l'aide d'un appareil de type Agilent Technologies Cary 360 FTIR (**Fig. 08**).



Figure 08 : Spectromètre infrarouge utilisé pour l'analyse de l'HE.

L'équipement a été calibré, après le nettoyage de la zone de dépôt afin d'éliminer les traces de l'échantillon précédent, l'analyse se fait comme suit :

- Mettre une goutte d'HE de *Citrus sinensis* dans le cristal.
- Introduire le cristal dans l'appareil pour faire l'analyse
- L'analyse se fait en mode ATR avec une vitesse de résolution de $4 \text{ cm}^{-1}/\text{min}$ et une cumulation de 16 scans.
- Le spectre s'affiche dans l'ordinateur qui pilote l'appareil d'analyse.

- Analyse avec la spectroscopie UV-Vis

L'analyse avec la spectroscopie UV-Vis repose sur la mesure de l'absorption de la lumière par les substances dissoutes ou en suspension dans des gammes de longueurs d'onde allant de l'ultraviolet au visible (**De Bénédittis & Bertrand-Krajewski, 2006**).

Les spectrophotomètres UV-Vis peuvent estimer les concentrations d'éléments particuliers ou solubles grâce au traitement statistique des spectres d'absorption (**Faucheux and Fovet, 2014**).

- **Principe**

La technique est basée sur l'atténuation de la lumière de mesure lors de son passage dans l'effluent traversant la cellule de mesure. Les longueurs d'onde couvrent la gamme UV et visible de 200 nm à 750 nm par pas de 2,5 nm. Les deux faisceaux sont analysés après traitement optique par un récepteur composé de 256 pixels et d'un processeur électronique. Les résultats sont transmis via le

port de communication et peuvent être visualisés en temps réel sous forme de spectres sur un PC (De Bénédictis and Bertrand-Krajewski, 2006). Pour cette étude, nous avons utilisé un spectromètre de modèle HACH LANGE DR 6000 (**Fig. 09**) et le solvant utilisé pour diluer l'huile essentielle était le cyclohexane.



Figure 09 : Spectromètre HACH LANGE DR6000 utilisé pour l'analyse de L'HE.

- **Mode opératoire**

- Nettoyer la cuve avec le cyclohexane (le solvant utilisé).
- Remplir la cellule de référence avec du cyclohexane et l'introduire dans le spectromètre UV afin d'effectuer une ligne de base.
- Remplir à nouveau la cuve de cyclohexane et ajouter quelques gouttes d'huile essentielle pour l'analyse.
- Placer la cuve remplie dans le spectromètre UV, où elle est traversée par le faisceau lumineux.

1.4. Evaluation de l'activité antifongique de l'HE de *C. sinensis*

1.4.1. Matériel fongique

Quartres moisissures, isolées à partir des plantes infectées, ont fait l'objet de cette étude : *Zymoseptoria tritici*, *Fusarium roseum*, *Botrytis cinerea* et *Aspergillus niger*. Elles ont été choisies selon leur importance économique, relative aux dégâts considérables qu'elles causent aux cultures.

Après isolement, les souches fongiques sont régulièrement entretenues par repiquage sur le milieu nutritif PDA (Potato Dextrose Agar). Pour la préparation de colonies jeunes, les souches sont repiquées sur un milieu PDA propre par le dépôt de fragments de 1 cm de côté, prélevés à partir de la périphérie de la boîte Pétri de chaque espèce, à l'exception de *Zymoseptoria tritici* pour laquelle le repiquage se fait par la méthode des stries. L'incubation se fait à l'étuve pendant 7 j à 24°C. La **figure 10** montre l'aspect des moisissures après repiquage sur milieu PDA. Ces cultures jeunes ont servi par la suite pour la préparation des solutions sporales.

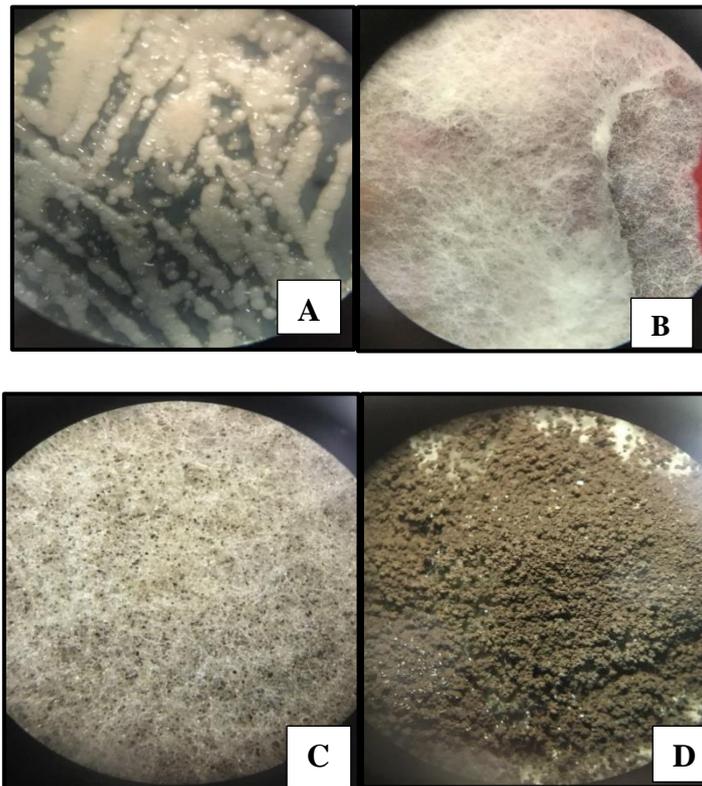


Figure 10 : Photographie des cultures jeunes des souches fongiques sur milieu PDA. A : *Zymoseptoria tritici*, B : *Fusarium roseum*, C : *Botrytis cinerea* et D : *Aspergillus niger*

1.4.2. Détermination de l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Citrus sinensis*

L'activité antifongique de l'huile a été testée à l'égard des souches fongiques citées ci-dessus par la méthode de contact direct, par diffusion à travers des disques de papier wattman selon la méthode décrite par **Abdallah et al. (2019)**.

- **Matériel utilisé**

Pour mettre en évidence l'activité antifongique, nous avons utilisé le matériel suivant :

- Microscope optique
- Etuve, réglée à 24 °C.
- Autoclave
- Bain-marie (Memmert)
- Vortex
- Bec bunsen
- Papier Wattman
- Perforeuse de papier wattman
- Cellule de Malassez + lamelles
- Boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre
- Tubes coniques en plastique stérile
- Anse de platine
- Micro pipette (2,5 µL, 10 µL, 100 µL) + embouts
- Pipettes Pasteur
- Milieu de culture : PDA
- Ethanol 95° (Alcool)
- Tween 80
- Huile essentielle de *citrus sinensis*
- Eau distillée stérilisée
- Parafilm

- **Préparation des suspensions sporales des différentes souches fongiques**

Les suspensions sporales ont été préparées à partir des colonies jeunes âgées de 7 jours, pour les différentes espèces fongiques étudiées : *Fusarium roseum*, *Zymoseptoria tritici*, *Botrytis cinerea* et *Aspergillus niger*, selon les étapes suivantes :

- Récolter les spores dans des tubes coniques en plastique, contenant une solution saline à 0,9 % et une goutte de Tween 80, qui a pour rôle de mettre les spores en solution, en grattant la colonie, à l'aide de l'anse de platine.
- Agiter le mélange au vortex (**Fig. 11**).

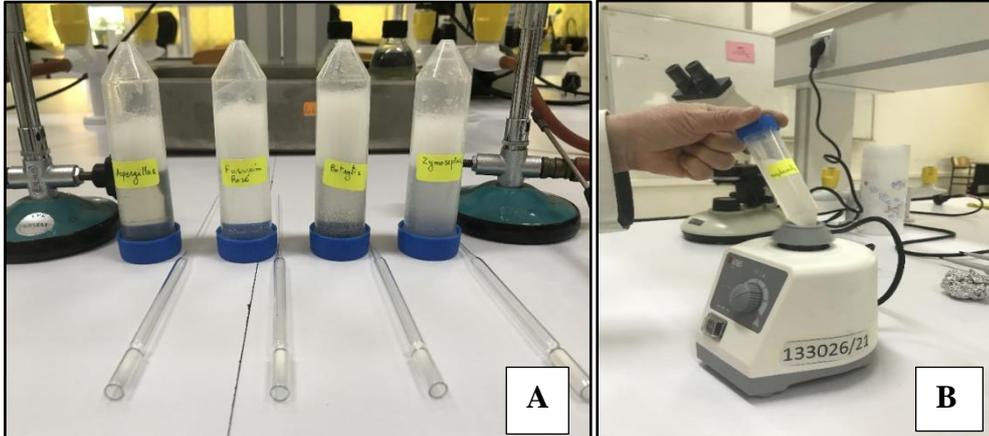


Figure 11 : Préparation des suspensions sporales.

A : récupération des spores. **B** : agitation au vortex.

- Ajuster les concentrations aux valeurs spécifiques aux différents pathogènes étudiés, à l'aide d'une cellule de Malassez :
 - Pour *Fusarium roseum* : une concentration sporale de 10^5 spores / ml a été utilisée (Remmal *et al.*, 1993).
 - Pour *Zygomycetes tritici* : une concentration sporale de $3 \cdot 10^6$ spores / ml a été utilisée (Perellô *et al.*, 2013).
 - Pour *Botrytis cinerea* : une concentration sporale de 10^4 spores / ml a été utilisée (Soylu *et al.*, 2010).
 - Pour l'*Aspergillus niger* : une concentration sporale de 10^4 spores / ml a été utilisée (Athamnia *et al.*, 2018).

- **Volumes de l'huile essentielle testés**

Cinq volumes d'huile essentielle ont été testés : 0 μ l, 5 μ l, 10 μ l, 20 μ l et 40 μ l. Le volume 0 μ l représente le témoin négatif pour chaque souche, les boîtes étaient traitées avec de l'eau distillée stérilisée sans l'ajout de l'huile.

- **Technique de confrontation**

La confrontation des différentes souches fongiques à l'huile essentielle de *Citrus sinensis* a été réalisée par la méthode de contact direct, en milieu solide, par diffusion de l'huile à travers des disques de papier wattman de 6 mm de diamètre, déposés aux centres des boîtes. Ce test est réalisé dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre contenant le milieu de culture PDA.

Une quantité de suspension sporale (100 ml), préparée le jour même, est étalée de manière uniforme sur le milieu. Après un séchage de quelques minutes, et à l'aide d'une emporte-pièce stérile, on place le disque au centre imprégné de des différents volumes de l'huile essentielle à l'aide d'une micro pipette (**Fig. 12**). Trois répétitions sont réalisées pour chaque souche et chaque traitement.

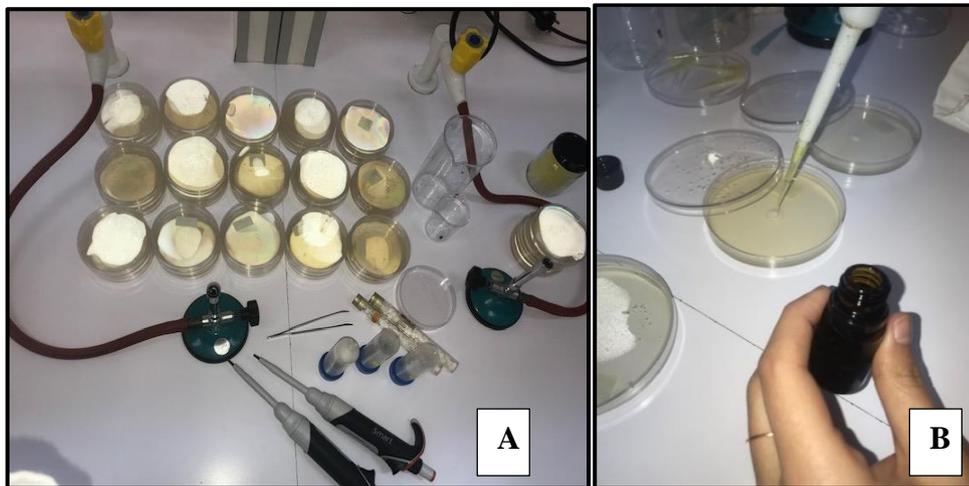


Figure 12 : Test de l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* à l'égard des différentes souches fongiques.

A : Boîtes contenant la suspension sporale, **B** : dépôt de l'HE sur les disques

A la fin des manipulations, les boîtes sont bien scellées à l'aide du parafilm, et incubées dans l'étuve à 24 °C. Les résultats sont exprimés par la présence ou l'absence d'un halo justifiant l'inhibition de la croissance du champignon au voisinage du disque imprégné de l'HE. La lecture des résultats se fait par examen et mensuration des diamètres de le halo à l'aide d'une règle graduée.

1.5. Traitement statistique des résultats

Le calcul des moyennes et des écartypes ont été réalisés à l'aide de l'Excel STAT (version 2010). Une analyse de la variance a été conduite par les résultats pour déterminer les variations entre les traitements pour chaque souche fongique, en plus du test de Dunnett qui a servi pour déterminer l'importance des variations entre le témoin et les autres traitements pour chaque souche fongique, et ce en utilisant le Logiciel MINITAB (version 2017).

Chapitre 02 : Résultats et Discussion

Chapitre 02 : Résultats et discussion

Ce chapitre est dédié à la présentation des résultats de notre étude et leur discussion. Il est divisé en trois parties essentielles, la première consacrée à l'extraction d'huile essentielle de *Citrus sinensis* et la détermination du rendement, la deuxième partie pour la caractérisation physicochimique de la même huile et à la troisième, partie seront présentés les résultats de l'étude de l'activité antifongique d'huile essentielle de *Citrus sinensis*.

2.1. Rendement en huile essentielle de la plante utilisée

La moyenne obtenue pour le rendement en huile essentielle de *Citrus sinensis* est de 0.657 ± 0.169 %. En comparant nos résultats avec ceux rapportés dans la littérature, nous remarquons que :

- Nos résultats sont en accord avec ceux de **Kamal et al. (2011)** qui ont enregistré un rendement de 0,24 à 1,07 % des huiles essentielles extraites par hydrodistillation des écorces séchées à température ambiante de *C. sinensis*.
- **Hamdani & Allem (2017)** ont obtenu un rendement en huile essentielle de 0.96 % à partir des feuilles de *Citrus sinensis*.
- Le rendement moyen en huile essentielle des écorces de *Citrus sinensis* trouvé dans cette étude est faible par rapport à celui rapporté par **EL-Akhal et al. (2014)** pour la même espèce, les auteurs ont obtenu un rendement de 1,2 %, pour des échantillons collectés en mois de mars 2011 au niveau de la province de Taounate (Maroc), extraite par la même méthode, à l'aide d'un dispositif de type *Clevenger*.
- Par contre, nos résultats sont supérieurs à ceux obtenus par **Bouhali (2015)** de l'huile essentielle extraite de la même espèce récoltée d'Oued Ghir, wilaya de Bejaïa, le mois d'avril, extraite par la même méthode, qui a annoncé la valeur de 0.39%.

Ces différences entre les résultats peuvent s'expliquer par le fait que le rendement en huiles essentielles est influencé par plusieurs facteurs : ceux liés aux conditions agroclimatiques de la région de culture, à la plante (espèce, variété, etc.) ou ceux liés aux conditions expérimentales (extraction), notamment le processus, temps d'extraction, etc..., de plus, la différence dans le rendement de l'écorce sèche en HE peut être attribuée à une variation du temps de séchage des échantillons d'écorce. **Bouderbala et al. (2020)**, pour des échantillons de la même espèce, de la même région et extraite par le même procédé, les auteurs ont obtenu un rendement en HE des écorces de 1.56% après séchage de 8 jours, et 0.75% après un séchage de 21 jours. Ceci peut être attribué à l'évaporation des HE du matériel végétal, pendant le séchage prolongé.

2.2. Caractérisation de l'huile essentielle de *Citrus sinensis*

Les propriétés organoleptiques et les propriétés physico-chimiques constituent un élément de vérification et de contrôle de la qualité de l'huile essentielle.

2.2.1. Propriétés organoleptiques

Les relatifs aux paramètres organoleptiques de nos échantillons de l'HE de *Citrus sinensis*, sont présentés dans le **tableau 01** et la **figure 13**.

Tableau 01 : Résultats relatifs aux paramètres organoleptiques de l'HE de *Citrus sinensis*

Paramètres	Couleur	Odeur	Aspect	Saveur
<i>C. sinensis</i>	Jaune pâle	Odeur forte et fraîche	Liquide limpide	Aromatique



Figure 13 : Huile essentielle de *Citrus sinensis* de la région de Guelma, extraite par hydrodistillation

Les résultats obtenus pour les paramètres organoleptiques montrent que l'HE obtenue à partir de l'écorce d'orange douce est de couleur jaune pâle, caractérisée par une forte odeur propre

aux oranges, et un aspect mobile et limpide. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par **Millet (2014)**.

2.2.2. Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de *Citrus sinensis*

Les huiles essentielles sont caractérisées par leurs propriétés physiques (spectroscopie, indice de réfraction, ...) ainsi que par leurs propriétés chimiques (indice d'acide, pH, ...).

Le **tableau 02** affiche les résultats relatifs aux tests : pH, indice d'acide et indice de réfraction, obtenus par analyse de l'huile essentielle de l'écorce de *Citrus sinensis* collecté de Guelma (récolte 2022), comparés à ceux de **Hamdani et Allem (2017)**.

Tableau 02 : Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle de l'écorce de *Citrus sinensis*

	Notre étude	Hamdani & Allem (2017)
pH	< 3	--
Indice d'acide	2.80	2.24
Indice de réfraction (20° C)	1.474	1.475

L'indice d'acide donne une idée sur le taux d'acides libres. Il peut aussi nous renseigner sur la susceptibilité d'huile à subir des altérations, notamment l'oxydation.

L'analyse des résultats obtenus dans notre étude et leur comparaison avec ceux rapportés en littérature, permet de déduire ce qui suit :

- L'indice d'acide enregistré pour nos échantillons est de 2.80, et il est plus ou moins identique à celui obtenu par **Hamdani & Allem (2017)**, qui ont enregistré un indice d'acide de 2,24 pour des HEs de la même espèce.
- L'indice de réfraction calculé à l'aide d'un réfractomètre, a affiché la valeur de 1.474, qui est quasi-identique à celle rapportée par **Hamdani & Allem (2017)**, qui ont obtenu un indice de réfraction de 1.475 de la même espèce. L'indice de réfraction est un paramètre d'identification qualitative, permettant de vérifier la pureté des huiles essentielles (**Edith, 2004**).

- Le pH de nos échantillons est très bas, inférieur à 3. Cette valeur est en adéquation avec celles rapportées en littérature. **Belgharbi (2020)** rapporte que la majorité des huiles essentielles possèdent un caractère acide.

2.2.3. Analyse chromatographique sur couche mince CCM

Cette analyse a été effectuée sur des plaques de gel de silice comme phase stationnaire, et le cyclohexane comme une phase mobile. Les résultats de l'analyse, après révélation sous la lumière UV sont représentés dans la **figure 14**. La carte révèle la présence de nombreux spots, dont deux sont plus importants, indiquant la présence de deux espèces chimiques majoritaires. Le **tableau 03** montre les facteurs de rétention (Rf) des deux constituants chimiques détectés.



Figure 14 : Résultats du test de CCM

Tableau 03 : Facteurs de rétention des espèces chimiques détectées dans notre HE. de *Citrus sinensis*

Nombre de spots	Espèce chimique 1	Espèce chimique 2
Facteur de rétention	0.14	0.21

L'analyse de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* par la méthode de chromatographie sur couche mince, révèle l'existence de deux zones bien distinctes avec des facteurs de rétention (Rf) différents, qui sont synonymes de la présence de deux espèces chimiques majoritaires et d'autres composants chimiques avec des concentrations plus faibles. Les composés

majoritaires pourraient être le **Limonene** et le **Linalol** qui sont les principaux constituants de l'huile essentielle de *Citrus sinensis*.

Des informations plus précises sur la composition des huiles essentielles peuvent être obtenues par des techniques plus performantes telles que la Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG).

En comparant les résultats obtenus dans notre étude, par la méthode de CCM avec ceux obtenus par la méthode de GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry), réalisée par **Njoroge et al. (2005)** et **Sharma & Tripathi (2006)**, nous pouvons confirmer que les taches obtenues pour notre HE sont relatives aux **Limonene** et **Linalol**. En effet, ces auteurs ont trouvé que les deux composés majoritaires d'huile essentielle de *Citrus sinensis* sont le **Limonene** avec un pourcentage de 84.2 % et le **Linalol** avec un pourcentage de 4.4%.

Des résultats similaires ont été obtenus par (**Kuate et al., 2003**) qui ont trouvé que le **Limonène** est le composé majeur de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* avec une teneur variant de 81,64 à 84,87 %.

2.2.4. Analyses spectroscopiques

Les analyses spectroscopiques permettent d'identifier les principaux groupements fonctionnels présents dans l'huile essentielle et par conséquent connaître sa structure chimique.

2.2.4.1. Analyse de la structure par Spectroscopie IRTF

Cette analyse permet l'identification et la caractérisation des différents pics correspondants aux groupements fonctionnels présents dans l'huile essentielle de *Citrus sinensis*. La **figure 15** affiche les résultats de ce test.

L'examen du spectre infrarouge obtenu, permet de déterminer les groupes fonctionnels contenus dans une molécule : cétone, alcool, acide, aldéhyde..., ainsi que les liaisons entre les atomes d'une chaîne de carbone en indiquant les principales bandes de vibration et en s'appuyant sur les tables fournies.

L'étude de trois grandes régions du spectre permet de repérer les groupements fonctionnels importants :

- **La région 4000 - 1500 cm^{-1}** contient les bandes de vibration longitudinale des principaux groupements C-H, O-H, C=O, N-H, ... Pour OH et N-H, on observe souvent des bandes plus ou moins larges en raison de l'existence de liaisons hydrogène.
- **La région 1500 - 1000 cm^{-1}** contient entre autres, la bande de vibration longitudinale de la liaison C-O c'est par ailleurs, une zone appelée « empreinte digitale » car on y trouve de nombreuses absorptions correspondant aux déformations angulaires de la molécule.
- **La région 1000 – 600 cm^{-1}** correspond généralement aux déformations angulaires des liaisons C-H des composés éthyléniques et des cycles aromatiques.

L'analyse du spectre IRTF de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* (**Fig. 15**) montre l'apparition de plusieurs pics correspondant essentiellement aux groupements fonctionnels qui se trouvent dans la structure du Limonene tels que : la double liaison carbone-carbone (C=C) localisée à 1645 cm^{-1} , la liaison carbone-hydrogène simple (C-H) identifiée à 2724 et à 2918 cm^{-1} et la double liaison (= C-H) identifiée à 3080 cm^{-1} .

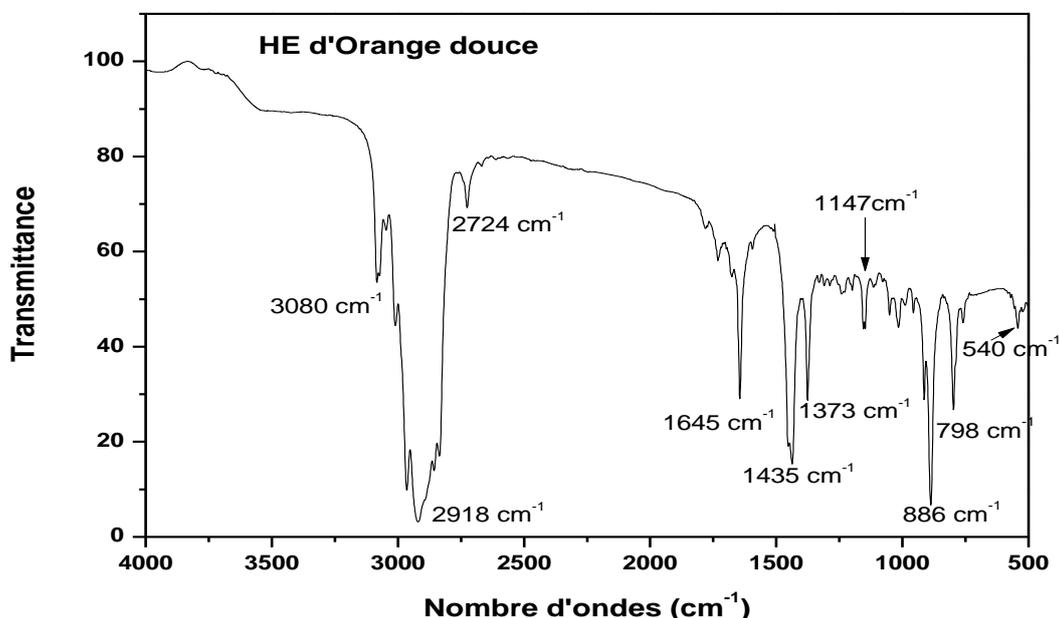


Figure 15 : Spectre IRTF de l'HE de *Citrus sinensis* enregistré entre 4000 et 500 cm^{-1}

Le spectre IRTF obtenu dans cette étude est similaire à celui obtenu par **Sahib et al. (2019)**, qui a obtenu un pic reflétant la double liaison carbone-carbone (C=C) localisée à $1647, 21 \text{ cm}^{-1}$.

Ces résultats sont en adéquation avec ceux obtenus par l'analyse chromatographique en couche mince (CCM).

2.2.4.2. Spectroscopie UV-visible

L'analyse par spectroscopie UV-Vis nous permet de faire un balayage de longueur d'onde entre 140 et 400 nm pour détecter les bandes d'absorption caractéristiques de l'huile essentielle de *Citrus sinensis*. Cette analyse nous a permis d'enregistrer un maximum d'absorption vers $\lambda = 224$ nm (**Fig. 16**).

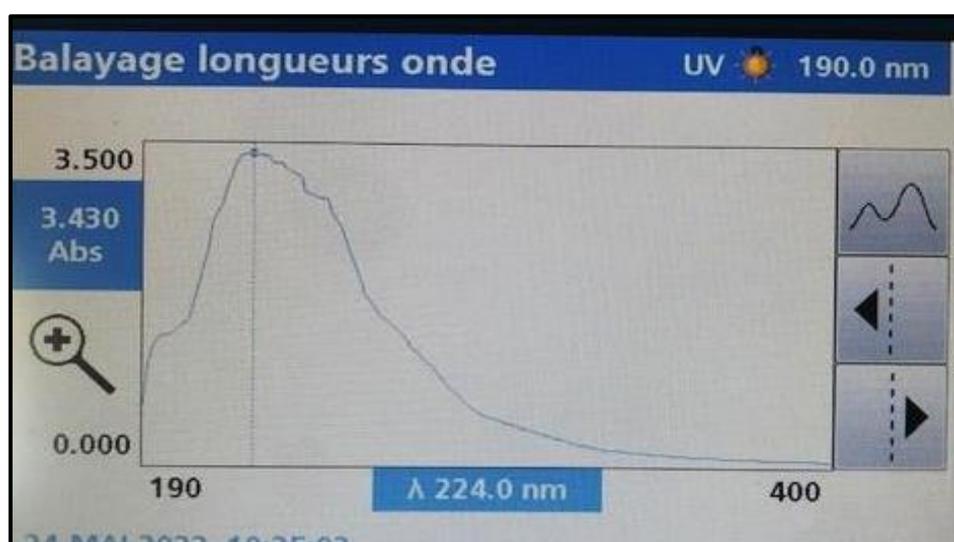


Figure 16 : Spectre UV- visible de l'HE de *Citrus sinensis*

Le spectre obtenu, montre clairement l'apparition d'une large bande d'absorption maximale située dans le domaine UV et plus précisément à 224 nm. Cette bande pourrait être attribuée aux composés contenant des doubles liaisons conjuguées particulièrement les diènes et les triènes tels ceux qu'on retrouve dans la structure du Limonène. Encore une fois, lorsque l'huile essentielle a été soumise à une analyse chromatographique sur couche mince, deux séparations majeures de bandes ont été observée (**Fig. 14**), ce qui confirme le résultat du balayage UV-visible, révélant ainsi la présence majoritairement d'un composant particulier de l'huile parmi les autres.

2.3. Test de l'activité antifongique de l'huile de *Citrus sinensis*

L'analyse globale des résultats relatifs à cette partie de l'étude, révèle que l'huile essentielle des écorces des oranges douces a exercé une importante activité inhibitrice vis-à-vis des quatre champignons qui ont fait l'objet de ce test.

2.3.1. Effets de l'huile testée sur le *Fusarium roseum*

La **figure 17** présente les résultats du test *in vitro* de l'activité de l'huile essentielle testée sur la croissance mycélienne de *Fusarium roseum*.

Les résultats obtenus ont montré que l'huile essentielle d'orange douce (*Citrus sinensis*) a enregistré une activité antifongique remarquable contre la souche de *Fusarium roseum* utilisée dans cette étude. Des zones d'inhibition de diamètres importants ont été notées même à de faibles volumes d'HE (5 μ L). L'inhibition de la croissance du champignon au voisinage de l'huile essentielle des oranges douces augmente proportionnellement avec le volume de l'HE. Une moyenne des diamètres de l'ordre de 3.85 cm a été notée au volume de 40 μ L d'HE.

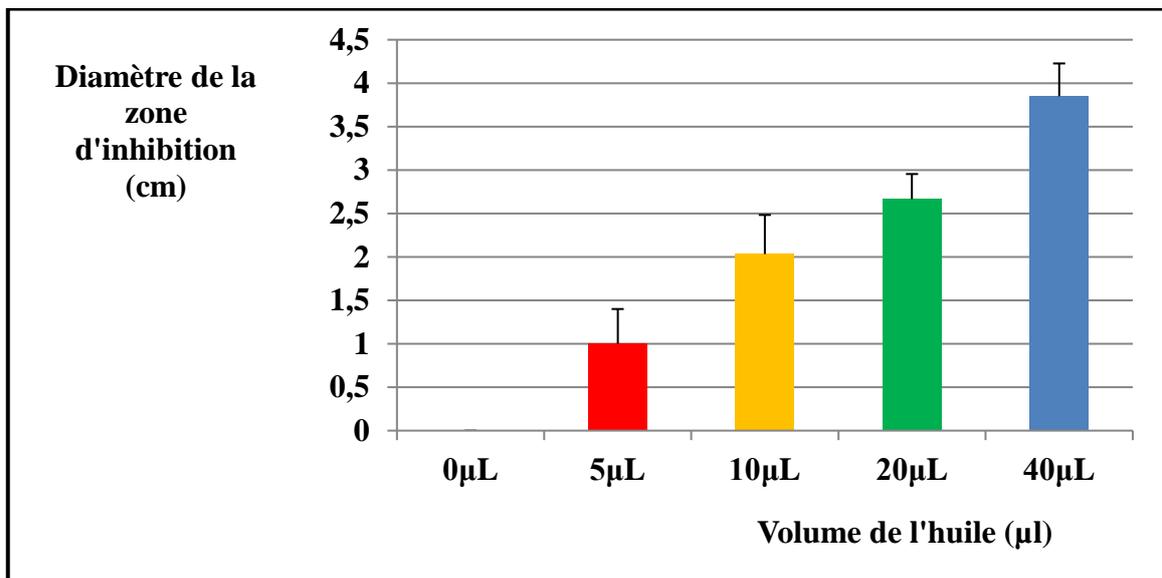


Figure 17 : Résultats du test de confrontation de *Fusarium roseum* avec l'huile essentielle de *Citrus cinensis*.

Boughendjioua (2019) a testé l'activité antifongique de l'huile essentielle extraite des feuilles de Mandarine (*Citrus reticulata*) par la méthode de contact direct, et il a constaté un

pouvoir inhibiteur remarquable, de la croissance du *Fusarium oxysporum in vitro*. **Van Hung et al. (2013)** ont également confirmé que la croissance mycélienne de *Fusarium proliferatum* diminue avec l'augmentation de la concentration en huile essentielle de *Citrus reticulata*.

Les résultats de l'analyse de la variance (**Tab. 04**) ont affiché des différences très hautement significatives entre les volumes pour le *Fusarium roseum* confronté à l'huile testée.

Tableau 04 : Résultat de l'analyse de la variance pour *Fusarium roseum* confronté à l'huile testée.

Sources de variation	DL	SC	CM	Valeur F	Valeur de p
Volumes de l'huile	4	21,263	5,3157	14,26	0,000 ***
Erreur	10	3,728	0,3728		
Total	14	24,991			

DL : Degrés de liberté

SC : Somme des carrés des écarts

CM : Carré moyen

F : Valeur observée de F de Fisher

P : Probabilité de mettre en évidence des différences significatives

*** $p < 0.001$: différence très hautement significative.

Le test de Dunnett (**Tab. 05**) a affiché des différences significatives entre le témoin et les volumes 10 μL , 20 μL et 40 μL , et des différences non significatives entre le témoin et le volume 5 μL , au seuil 95 %. ($\alpha = 0.05$).

Tableau 05 : Résultats du test de Dunnett pour *Fusarium roseum* / HE. de *Citrus sinensis*

Volume d'HE	0 μL	5 μL	10 μL	20 μL	40 μL
$\bar{X} \pm \sigma$	0.0 0.00	1.0 0.40 NS	2.03 \pm 0.45 *	2.66 \pm 0.28 *	3,53 \pm 1.19 *

NS : différences non significatives.

* : différences significatives ($\alpha = 0.05$).

2.3.2. Effets de l'huile testée sur *Zymoseptoria tritici*

D'après les résultats obtenus (**Fig. 18**), on remarque que l'inhibition de la croissance de l'isolat de *Zymoseptoria tritici* est proportionnelle à la dose de l'HE, en effet, plus le volume augmente plus l'effet d'inhibiteur augmente.

Une inhibition de la croissance au voisinage du disque contenant de l'huile a été observée même à la dose de 5 µl avec un diamètre de 0.76 cm, et avec des diamètres supérieurs à 1 cm pour 20 µl, et à la dose 40 µl, la croissance du champignon était fortement inhibée au voisinage de l'huile, la valeur enregistrée et de l'ordre de 2.66 cm de diamètre.

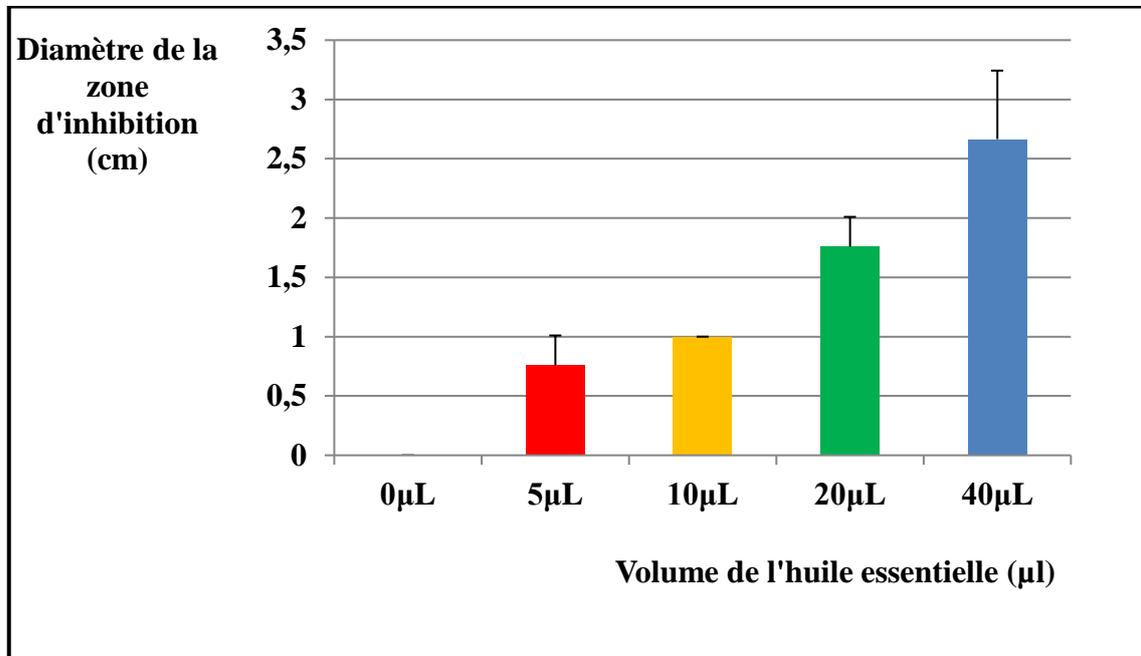


Figure 18 : Résultats du test de confrontation de *Zymoseptoria tritici* avec l'huile essentielle de *Citrus cinensis*.

Les résultats obtenus ont montré une forte sensibilité de cet agent pathogène (*Zymoseptoria tritici*) à l'huile essentielle testée.

L'analyse de la variance (**Tab. 06**) a affiché des différences significatives entre les volumes.

Tableau 06 : Résultats de l'analyse de la variance pour *Zymoseptoria tritici*, confronté à l'huile testée.

Sources de variation	DL	SC	CM	Valeur F	Valeur de p
Volumes de l'huile	4	8,716	2,1790	4,02	0,034*
Erreur	10	5,420	0,5420		
Total	14	14,136			

DL : Degrés de liberté

SC : Somme des carrés des écarts

CM : Carré moyen

F : Valeur observée de F de Fisher

P : Probabilité de mettre en évidence des différences significatives

* $p < 0.05$: différence significative.

Le test de Dunnett (**Tab. 07**) a affiché des différences significatives entre le témoin et les volumes 20 μL et 40 μL , et des différences non significatives entre le témoin et les volumes 5 μL et 10 μL , au seuil 95 %. ($\alpha = 0.05$), pour ce pathogène.

Tableau 07 : Résultats du test de Dunnett pour *Zymoseptoria tritici* / HE. De *Citrus sinensis*.

Volume d'HE	0 μL	5 μL	10 μL	20 μL	40 μL
$\bar{X} \pm \sigma$	0,00 \pm 0.00	0,76 \pm 0.25	1,00 \pm 0.00	1,76 \pm 0.25	2,16 \pm 1.60
		NS	NS	*	*

NS : différences non significatives.

* : différences significatives ($\alpha = 0.05$).

2.3.3. Effets de l'huile testée sur *Botrytis cinerea*

La **figure 19** présente les résultats du test *in vitro* de l'activité de l'huile essentielle testée sur la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea*.

Les résultats obtenus révèlent que le volume 5 μL n'a enregistré aucun effet inhibiteur sur la croissance de *Botrytis cinerea* ; alors que pour le volume 10 μL nous avons noté une moyenne de 2,16 cm de diamètre de la zone d'inhibition de la croissance, et avec une légère augmentation (2,33cm) au volume 20 μL . Cependant, pour la dose 40 μL les diamètres des zones d'inhibition étaient plus ou moins importants (3,33 cm).

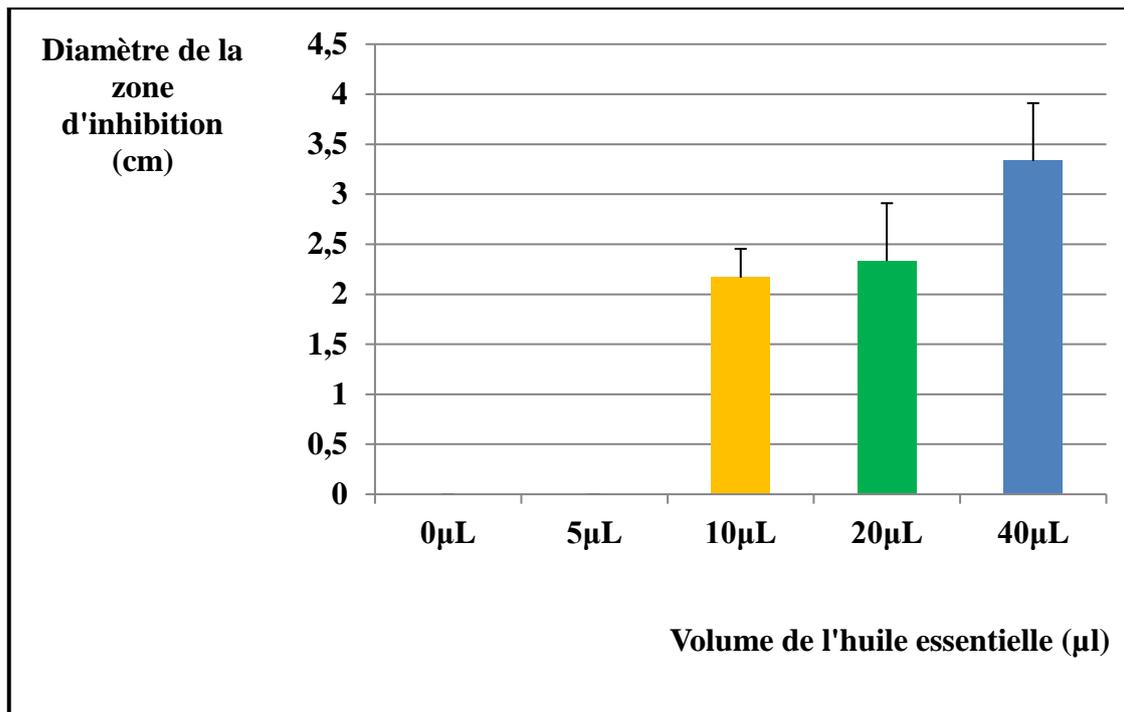


Figure 19 : Résultats du test de confrontation de *Botrytis cinerea* avec l'huile essentielle de *Citrus sinensis*.

Les résultats obtenus ont montré que l'huile testée (*Citrus sinensis*) possède une activité antifongique plus ou moins importante aux fortes doses vis-à-vis de *B. cinerea*.

Des résultats similaires ont été obtenus par **Dir & Guemane (2021)**, qui ont montré que les extraits de l'écorce d'orange (*Citrus* sp.) possèdent une activité antifongique contre la pourriture grise.

Soylu et al. (2010), ont testé *in vitro*, des huiles essentielles obtenues à partir de parties aériennes de plantes aromatiques appartenant à la famille des Lamiaceae, telles que l'origan (*Origanum syriacum* L. var. *bevanii*), la lavande (*Lavandula stoechas* L. var. *stoechas*) et le romarin (*Rosmarinus officinalis* L), sur *Botrytis cinerea* ; ils ont obtenu une inhibition complète de la croissance de ce pathogène à des concentrations élevées des huiles testées. **Kasmi et al. (2017)**, signalent que, les extraits aqueux de *Cymbopogon citratus* et de *Thymus vulgaris* sont les plus efficaces sur les plantes pour le contrôle biologique de la pourriture grise.

Le traitement statistique des résultats (**Tab.8**) a révélé des différences très hautement significatives entre les volumes utilisés pour *Botrytis cinerea* confronté à l'huile de *Citrus sinensis*.

Tableau 8 : Résultats de l'analyse de la variance pour *Botrytis cinerea* confronté à l'huile testée.

Sources de variation	DL	SC	CM	Valeur F	Valeur de p
Volumes de l'huile	4	22,267	5,5667	15,18	0,000***
Erreur	10	3,667	0,3667		
Total	14	25,933			

DL : Degrés de liberté

SC : Somme des carrés des écarts

CM : Carré moyen

F : Valeur observée de F de Fisher

P : Probabilité de mettre en évidence des différences significatives

*** $p < 0.001$: différence très hautement significative.

Le test de Dunnett (**Tab. 9**) a affiché des différences significatives entre le témoin et les volumes 10 μL , 20 μL et 40 μL , et des différences non significatives entre le témoin et le volume 5 μL .

Tableau 9 : Résultats du test de Dunnett pour *Botrytis cinerea* / HE. de *Citrus sinensis*.

Volume d'HE	0 μL	5 μL	10 μL	20 μL	40 μL
$\bar{X} \pm \sigma$	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	2.16 \pm 0.50	2.33 \pm 0.76	3.33 \pm 1.00
		NS	*	*	*

NS : différences non significatives.

* : différences significatives ($\alpha = 0.05$).

2.3.4. Effets de l'huile testée sur l'*Aspergillus niger*

La **figure 20** présente les résultats de test *in vitro* de l'activité de l'huile essentielle testée sur la croissance mycélienne de l'*Aspergillus niger*.

Les résultats obtenus ont montré que l'huile essentielle d'orange douce (*Citrus sinensis*) a enregistré une activité antifongique remarquable, contre cet agent pathogène. Des zones

d'inhibition de diamètres importants ont été notées même à de faibles volumes d'HE (5 μ L). L'inhibition de la croissance fongique au voisinage de l'huile essentielle d'orange douce est proportionnelle au volume d'HE. A un volume de 40 μ L d'HE, le diamètre moyen est de l'ordre de 3,16 cm.

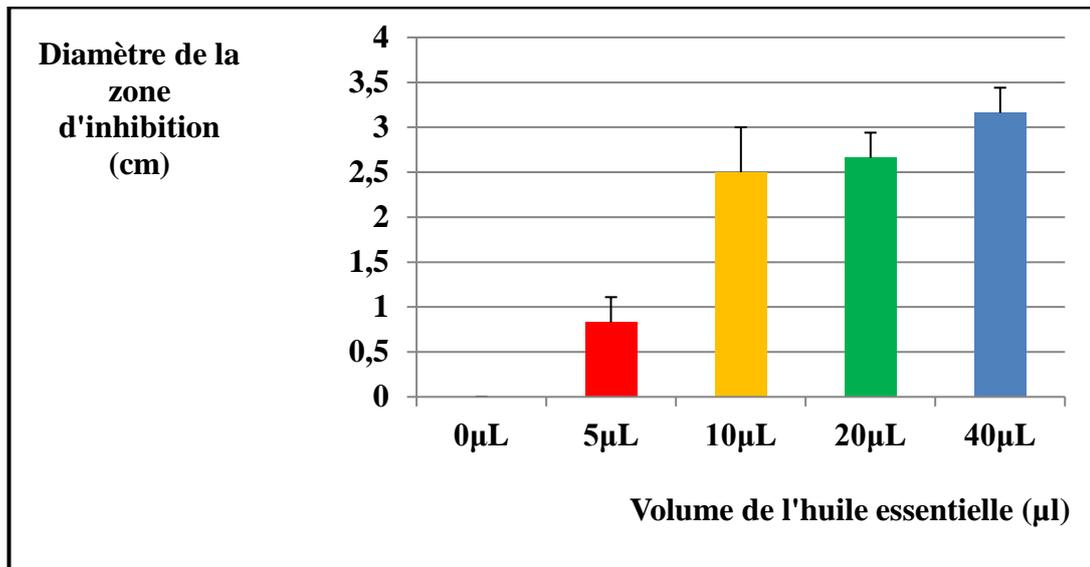


Figure 20 : Résultats du test de confrontation de l'*Aspergillus niger* avec l'huile essentielle de *Citrus sinensis*

Plusieurs travaux ont montré que l'huile essentielle d'orange a un effet inhibiteur sur *Aspergillus niger*. Des résultats similaires ont été rapportés par **Sharma & Tripathi (2006)** sur l'huile essentielle d'épicarpe frais de *Citrus sinensis*, extraite par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type *Clevenger*. L'huile extraite a montré un grand pouvoir antifongique contre *Aspergillus niger*.

Kaibi & Timizar (2016) ont testé l'effet de l'huile essentielle des feuilles de *Citrus sinensis* fraîches et ont obtenu des résultats satisfaisants sur les pathogènes *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisia* et *Aspergillus niger* avec des zones d'inhibition de 19, 19 et 17 mm, respectivement.

D'autre part, les résultats d'une étude Tunisienne (**Ben Hsouna et al. 2017**) sur l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Citrus limon* contre les espèces *Aspergillus niger* et *Fusarium*

oxysporum, montrent un effet inhibiteur important de l'HE sur *Aspergillus niger* avec une zone d'inhibition de 26 mm.

D'autres travaux ont montré que ce pathogène est très sensible aux huiles essentielles, notamment, celles de *Myrtus communis* et *Thymus vulgaris* (Touaibia, 2015 ; Zaid & Tifourghi, 2020).

L'analyse de la variance conduite par les résultats obtenus (Tab. 10) a affiché des différences très hautement significatives entre les volumes pour l'huile d'orange et *Aspergillus niger*.

Tableau 10 : Résultats de l'analyse de la variance pour *l'Aspergillus niger* confronté à l'huile testée.

Sources de variation	DL	SC	CM	Valeur F	Valeur de p
Volumes de l'huile	4	21,833	5,4583	54,58	0,000***
Erreur	10	1,000	0,1000		
Total	14	22,833			

DL : Degrés de liberté

SC : Somme des carrés des écarts

CM : Carré moyen

F : Valeur observée de F de Fisher

P : Probabilité de mettre en évidence des différences significatives

*** $p < 0.001$: différence très hautement significative.

Le test de Dunnett (Tab. 11) a montré des différences significatives entre le témoin et tous les volumes testés pour cette huile.

Tableau 11 : Résultats du test de Dunnett pour *l'Aspergillus niger*/ HE. de *Citrus sinensis*.

Volume d'HE	0 μ L	5 μ L	10 μ L	20 μ L	40 μ L
$\bar{X} \pm \sigma$	0,00 \pm 0.00	0,83 \pm 0.28	2,50 \pm 0.50	2,66 \pm 0.28	3,16 \pm 0.28
		*	*	*	*

NS : différences non significatives.

* : différences significatives ($\alpha = 0.05$).

Selon **Celikel & Kavas (2008)**, la sensibilité des microorganismes aux molécules bioactives peut être définie par l'échelle de Ponce et *al.* (2003), décrite comme suit :

- Une souche est considérée sensible si le diamètre de la zone d'inhibition de la croissance est de : 9-14 mm.
- Une souche est considérée très sensible si le diamètre de la zone d'inhibition de la croissance est de : 15-19 mm.
- Une souche est considérée comme extrêmement sensible si le diamètre de la zone d'inhibition de la croissance est supérieur à 20 mm.

De ce fait, les résultats obtenus pour l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* ont montré que les quatre souches fongiques testées dans cette étude sont sensibles à cette huile.

Conclusion

Conclusion

La position géographique de l'Algérie lui confère une concentration de la biodiversité d'une valeur inestimable. L'objectif principal de ce travail est la caractérisation physico-chimiques et l'évaluation de l'activité antifongique d'huile essentielle de *C. sinensis* à l'égard de quatre champignons phytopathogènes, l'agent responsable de la pourriture grise (*Botrytis cinerea*), l'agent responsable de la fusariose de l'épi du blé (*Fusarium roseum*), *Zymoseptoria tritici* et *Aspergillus niger* ; afin de déduire une éventuelle valeur ajoutée, qui pourra réorienter cette espèce vers une voie de valorisation.

Les résultats obtenus dans cette étude peuvent être résumés comme suit :

- Le rendement moyen, exprimé en pourcentage par rapport à la matière sèche ; enregistré dans nos conditions d'expérimentation, pour l'orange douce (*Citrus sinensis*) est de 0.66 %.
- L'HE d'orange douce se caractérise par une couleur jaune pâle et une odeur fraîche.
- L'analyse des paramètres physicochimiques a révélé que nos résultats sont en adéquation avec différents travaux réalisés sur cette espèce,
- L'évaluation de l'activité antifongique *in vitro* d'HE de *C. sinensis* sur quatre espèces de champignons phytopathogènes (*Zymoseptoria tritici*, *Fusarium roseum*, *Botrytis cinerea* et *Aspergillus niger*), effectuée par la confrontation directe, par diffusion d'huile à travers des disques de papier Wattman, a montré que l'huile essentielle des écorces (peau d'orange) possède une activité antifongique satisfaisante contre les quatre espèces fongiques étudiées.

Ces résultats semblent présenter ainsi, un intérêt scientifique important, pour l'utilisation de l'huile essentielle de cette espèce végétale, dans le domaine de la protection phytosanitaire, comme un procédé de lutte biologique basé sur les substances naturelles, en vue de limiter l'utilisation des pesticides chimiques et minimiser leurs effets non intentionnels sur l'agriculteur, le consommateur et l'environnement.

En perspectives à cette étude, il est important de faire une analyse en CPG de l'huile d'orange douce de notre région, pour identifier les différents composés et leurs principes actifs ; comme, nous suggérons de tester l'huile essentielle des oranges douces, ainsi que ses extraits aqueux sur d'autres agents phytopathogènes (autres champignons, bactéries, insectes), afin de déterminer avec précision ses potentialités antimicrobiennes et ses activités biologiques.

Résumé

Le présent travail a été mené dans le but de déterminer les caractéristiques physicochimiques des huiles essentielles de *Citrus sinensis* extraites des écorces par hydrodistillation, et de tester leurs effets antifongiques à l'égard de quatre champignons phytopathogènes : *Fusarium roseum*, *Zymoseptoria tritici*, *Botrytis cinerea* et *Aspergillus niger*, par la méthode de contact directe. Les résultats obtenus ont montré que, le rendement enregistré en HE est de 0.66%. Les analyses organoleptiques et physicochimiques ont révélé que cette huile se caractérise par une couleur jaune pâle, une odeur fraîche, un pH acide, un indice d'acide de 2.80, et un indice de réfraction de 1.474. Les analyses spectroscopiques et chromatographiques ont montré l'existence de deux composés majoritaires, le Limanone et le Linanol dans cette huile. Un pouvoir inhibiteur important a été noté pour cette huile contre toutes les souches fongiques testées, ce qui laisse supposer que cette HE, peut avoir une éventuelle application dans la protection des cultures contre certains parasites fongiques.

Mot clés : huile essentielle, *Citrus sinensis*, caractéristiques d'huile, activité antifongique, champignons phytopathogènes,

Abstract

The purpose of this work is to determine the physicochemical characteristics of the essential oils of pericarp of *Citrus sinensis* extracted by hydrodistillation, and to test their antifungal effects on four phytopathogenic fungi : *Fusarium roseum*, *Zymoseptoria tritici*, *Botrytis cinerea* and *Aspergillus niger*, by direct contact method. The results obtained showed that the yield recorded in EO is 0.66%. Organoleptic and physicochemical analyses revealed that this oil is characterized by a pale yellow colour, a fresh odour, an acidic pH, an acid index of 2.80, and a refractive index of 1.474. Spectroscopic and chromatographic analyses showed the existence of two major compounds, Limanone and Linanol in this oil. An important inhibitory effects was noted for this oil against all the fungal strains tested, which suggests that this EO may have a possible application in the protection of crops against certain fungal parasites.

Keywords : essential oil, *Citrus sinensis*, characteristics of oil, antifungal activity, phytopathogenic fungi

يهدف هذا العمل إلى تحديد الخصائص الفيزيوكيميائية للزيوت الأساسية المستخلصة من قشور البرتقال *Citrus sinensis* واختبار فعاليته كمبيد فطري ضد *Botrytis*، *Zygomycetia tritici*، *Fusarium*، *Aspergillus roseum*، *cinerea*.

أظهرت النتائج المتحصل عليها أن المردود قدر بـ 0.66% وأن الزيت المتحصل عليه ذو لون شاحب. وفيما يخص الخصائص الفيزيوكيميائية سجلنا حموضة عالية معامل الحموضة 2.80 معامل الانكسار 1.474 كما كشفت التحليلات الطيفية والكروماتوغرافية عن وجود مركبين رئيسيين *Limonon* و *Limonol*. أما فيما يخص تأثيره على الفطريات المختبرة فقد أظهر فعالة جيدة مما يدل على إمكانية استعمالها كمبيد فطري لحماية المحاصيل.

الكلمات المفتاحية: زيوت أساسية، *Citrus sinensis*، خصائص الزيت، تأثير مضاد فطريات المحاصيل.

Références bibliographiques

Abdallah, R.B., Frikha, D., Maalej, S., Sassi, E.S., 2019. Evaluation in vitro de l'activité antibactérienne et antifongique de quatre espèces algales marines in vitro 7

AFNOR. « Recueil de normes » : les huiles essentielles Tome 2. Monographies relatives aux huiles essentielles. AFNOR. Paris (France). 661-663, 2000.

Ahouangninou, C., 2013. Using *Aedes aegypti* larvae to Assess Pesticide Contamination of Soil, Groundwater and Vegetables. *Br. Biotechnol. J.* 3, 143–157.

<https://doi.org/10.9734/BBJ/2013/2161>

Allaf, T., Valerie, T., Colett, B., Chemat, F., 2013. Thermal and mechanical intensification of essential oil extraction from orange peel via instant autovaporization : 7

Allioui, N., Driss, F., Dhoub, H., Jlal, L., Tounsi, S., Frikha-Gargouri, O., 2021. Two Novel *Bacillus* Strains (*subtilis* and *simplex* Species) with Promising Potential for the Biocontrol of *Zymoseptoria tritici*, the Causal Agent of Septoria Tritici Blotch of Wheat. *BioMed Res. Int.* 2021, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2021/6611657>

ALLIOUI, N., SIAH, A., BRINIS, L., REIGNAULT, P., HALAMA, P., 2016. Identification of QoI fungicide-resistant genotypes of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in Algeria. *Phytopathologia Mediterranea* 55. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-16235

Amri, I., Hamrouni, L., Hanana, M., Gargouri, S., Jamoussi, B., 2014. Propriétés antifongiques des huiles essentielles de *Biota orientalis* L. *Phytothérapie* 12, 170–174. <https://doi.org/10.1007/s10298-013-0816-4>

Athamnia I. ; Djaibet C. et Zaghoudi C. 2018. Etude de l'activité antifongique des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. et de *Thymus capitatus* L. sur des agents d'Otomyose : cas d'*Aspergillus niger*. Mémoire de Master en sciences biologiques. Département de biologie. Université 08 Mai 1945 de Guelma : 18.

Askun, T., 2018. Introductory Chapter: *Fusarium*: Pathogenicity, Infections, Diseases, Mycotoxins and Management, in: Askun, T. (Ed.), *Fusarium - Plant Diseases, Pathogen Diversity, Genetic Diversity, Resistance and Molecular Markers*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76507>

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46, 446–475.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>

Batsch, D., 2011. L'impact des pesticides sur la santé humaine 185.

Ben Hsouna, A., Ben Halima, N., Smaoui, S., Hamdi, N., 2017. *Citrus lemon* essential oil: chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat. *Lipids Health Dis* 16, 146.
<https://doi.org/10.1186/s12944-017-0487-5>

Belgharbi, H., 2020. Etude de l'effet inhibiteur de corrosion de l'huile essentielle de Cyprès : Extraction, caractérisation et application, Mémoire de master. Département de Génie des Procédés, Faculté des Sciences et de la Technologie. Guelma : 47 p.

Bouchard-Rochette, M., 2020. *Bacillus pumilus* et *Bacillus subtilis* pour lutter contre la pourriture grise chez la tomate et le concombre de serre 86.

Bouderbala, A., Sandli R., Grana N., 2020. Etude du potentiel de rendement en huiles essentielles de deux espèces végétales du Nord-Est Algérien (*Eucalyptus camaldulensis* et *Citrus sinensis*). Mémoire de Master. Université 8 mai 1945 Guelma. Algérie.

Bouhandjioua, H., 2019. Activité antifongique de l'huile essentielle extraite à partir des feuilles de 4.

Bouhali, H., 2015. Caractérisation des huiles essentielles de *Citrus sinensis* et étude de leur activité antioxydante : étude comparative entre l'huile essentielle des écorces sèches et fraîches. Mémoire de Magister. Université A.MIRA-BEJAIA. Algérie.

Celikel, N., Kavas, G., 2008. Antimicrobial Properties of Some Essential Oils against Some Pathogenic Microorganisms. *Czech J. Food Sci.* 26: 174–181.

Cheung, N., Tian, L., Liu, X., Li, X., 2020. The Destructive Fungal Pathogen *Botrytis cinerea* Insights from Genes Studied with Mutant Analysis. *Pathogens* 9, 923.
<https://doi.org/10.3390/pathogens9110923>

Dara S.K. ; O'Neal M. & Bio M. 2018. Biopesticide development, registration, and commercial formulations. E-Journal Of Entomology And Biologicals, UCANR electronic extension journal previously published as "Strawberries and Vegetables" (janvier 2018): 01.

De Bénédictis, J., Bertrand-Krajewski, J.-L., 2006. Mesure de la concentration en polluants dans les eaux usées par spectrométrie UV-vis. *La Houille Blanche* 92, 136–142. <https://doi.org/10.1051/lhb:200604023>

Dedi, J., Otchoumou, A., 2010. Effet de l'interaction in vitro et in vivo entre *Aspergillus niger*, *Mucor* sp. et *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Phoma* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp 7.

Delucca, A.J., Ehrlich, K.C., Ciegler, A., 1983. TOXICITY OF EXTRACTS OF *ASPERGILLUS NIGER* ISOLATED FROM STORED COTTONSEED. *J Food Safety* 5, 95–101. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.1983.tb00460.x>

Edith, F., 2004. Le réflectomètre 9. culture science physique (10-5-2004). 9.

EL-Akhal, F., Guemmouh, R., Greche, H., Lalami, A.E.O., 2014. Valorisation en tant que bioinsecticide de deux huiles essentielles de *Citrus sinensis* et *Citrus aurantium* cultivées au centre du Maroc (Valorization as a bio-insecticide of essential oils of *Citrus sinensis* and *Citrus aurantium* cultivated in center of Morocco) 6.

Faucheux, M., Fovet, O., 2014. Mesures in situ et à haute fréquence de la chimie d'un cours d'eau par spectrophotométrie UV-visible 16.

Faucon, M., Teherani, A., Tantaoui Elaraki, A., Jacquet, J., 1977. Comparaison de deux méthodes de chromatographie en couche mince sur gel de silice pour le dosage des aflatoxines B1 et G1 et de l'ochratoxine A. *bavf* 130, 123–139. <https://doi.org/10.4267/2042/65991>

Ferhat., M.A., Meklati., B.Y., Chemat., F., 2010. Citrus d'Algérie les huiles essentielles et leurs procédés d'extractions. 1.03.5130. Place centrale Ben Aknoun. Alger.

Fillinger, S., Elad, Y. (Eds.), 2016. Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems. Springer International Publishing, Cham.

Gargouri., R.M., Akrouti., A., 2018. Etude phytochimique et antioxydante de six variétés de Citrus.19352. France.

Guèye, M.T., Seck, D., Wathelet, J.-P., Lognay, G., 2011. Lutte contre les ravageurs des stocks de céréales et de légumineuses au Sénégal et en Afrique occidentale : synthèse bibliographique. *Biotechnol. Agron. Soc.*

Guinoiseau, E., 2010. Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action 149.

Gurdaswani, V., Ghag, S.B., 2020. Toxins from *Fusarium* species and their role in animal and plant diseases, in: *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, pp. 7–27. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821006-2.00002-9>

Harrat. W., 2018. Diversité phénotypique et génotypique des populations de *Mycosphaerella graminicola* (= *Zymoseptoria tritici*) agent de la septoriose du blé en Algérie, these de doctorat en Sciences Agronomiques. Ecole Nationale Supérieure Agronomique (E.N.S.A.), El-Harrach, Alger : 140.

Hamdani, F., Allem, R., Meziane, M., Houari, A., Setti, B., Ali, A., Bourai, M., 2012. Chemical profile and antifungal activity of essential oils extracted from leaves of *Citrus aurantium* and *Citrus sinensis* (L.) osbeck of Algeria. International Science and Technology Conference, Dubai, 13-15 December 2012. 10p.

Hamdani, F.Z., Allem, R., 2017. Propriétés antifongiques des huiles essentielles des feuilles de *Citrus vis-à-vis d'Alternaria alternata* et *Penicillium* sp in vitro. *Phytothérapie* 15, 263–266. <https://doi.org/10.1007/s10298-015-0978-3>

Hicham, B., 2019. Activité antifongique de l'huile essentielle extraite à partir des feuilles de 4. Huet, R., 1991. Les huiles essentielles d'agrumes .vol . 13.

Jarroudi, Moussa El, Kouadio, L., Jarroudi, Mustapha El, Tychon, B., 2019. Lutte intégrée : Solution pour remédier aux problèmes de résistance des parasites des cultures dans l'optique des changements climatiques. 1.

Kaibi., F.Z., Timizar., A., 2016. Etude de quelques activités biologiques Antimicrobienne, antioxydant et cicatrisante de deux agrumes « *Citrus limonum* et *Citrus sinensis* ». Université Saad Dahleb Blida. Algérie.

Kasmi, M., Aourach, M., El Boukari, M., Barrijal, S., Essalmani, H., 2017. Efficacité des extraits aqueux des plantes aromatiques et médicinales contre la pourriture grise de la tomate au Maroc. *Comptes Rendus Biologies* 340, 386–393. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2017.07.010>

Krausz, P.M., 2015. Huiles essentielles : un marché mondial en croissance 3.

- Kuate, J., Jazet-Dongmo, P.M., Ducelier, D., Damesse, F., Menut, C., Bessière, J.M., 2003. Effet de la cercosporiose à *Phaeoramularia angolensis* sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles de peau d'orange. *Fruits* 58, 143–149. <https://doi.org/10.1051/fruits:2003002>
- Ladaniya, M.S. (2008) *Citrus Fruit : Biology, Technology and Evaluation*. Elsevier Inc., Atlanta, USA, 1-10.
- Laghchimi, A., Znini, M., Majidi, L., Renucci, F., Harrak, A.E., Costa, J., 2014. Composition chimique et effet des phases liquide et vapeur de l'huile essentielle de *Lavandula multifida* sur la croissance mycélienne des moisissures responsables de la pourriture de la pomme (Chemical composition and effect of liquid and vapor phase of *Lavandula multifida* essential oil on mycelial growth of fungi responsible for the rot of apple) 11.
- Lee, Y.-W., Mirocha, C.J., Schroeder, D.J., Hamre, M.L., 1985. The Effect of a Purified Water-Soluble Fraction of a *Fusarium roseum* 'Graminearum' Culture on Reproduction of White Leghorn Females. *Poultry Science* 64, 1077–1082. <https://doi.org/10.3382/ps.0641077>
- Likibi, B.N., Tsiba, G., Madiele Mabika, A.B., Etou Ossibi, A.W., Nsikabaka, S., Ouamba, J.-M., 2019. Composés carbonyles majeurs et indices physico-chimiques des huiles essentielles de deux espèces du genre *Cymbopogon* (*Poaceae*) du Congo-Brazzaville. *IJEAS* 6. <https://doi.org/10.31873/IJEAS.6.10.01>
- Mahboub, M., Slimani, N., Ben Nadji, S., Bouzeguag, C., Kadri, M., Khelil, A., 2019. EXTRACTION ET CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DES HUILES ESSENTIELLES A PARTIR DE. *Revue des BioRessources* 9, 14.
- Mayer, F., 2012. Utilisations thérapeutiques des huiles essentielles : Etude de cas en maison de retraite 108.
- Millet, F., 2014. Huiles essentielles et essence de citronnier (*Citrus limon* (L.) *Burm. f.*). *Phytothérapie* 12, 89–97. <https://doi.org/10.1007/s10298-014-0857-3>
- Mnayer, D., Fabiano-Tixier, A.-S., Petitcolas, E., Hamieh, T., Nehme, N., Ferrant, C., Fernandez, X., Chemat, F., 2014. Chemical Composition, Antibacterial and Antioxidant Activities of Six Essential Oils from the Alliaceae Family. *Molecules* 19, 20034–20053. <https://doi.org/10.3390/molecules191220034>

Nasma, M., 2019. EXTRACTION ET CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DES HUILES ESSENTIELLES A PARTIR DE. *Revue des BioRessources* 9, 14.

Njoroge, S.M., Koaze, H., Karanja, P.N., Sawamura, M., 2005. Essential oil constituents of three varieties of Kenyan sweet orange (*Citrus sinensis*). *Flavour Fragr. J.* 20, 80–85. <https://doi.org/10.1002/ffj.1377>

Noumi, G.B., Njouokam, Y.M., Njiné, C.B., Ngameni, E., Kapseu, C., 2011. Effets du séchage sur le rendement et la qualité de l'huile extraite de la pulpe de safou 5.

Taleb. T., 2015. Extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques provenant de la région de Kabylie (Nord Algérien). Evaluation de leurs effets sur le bruche du niébé *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : Bruchidae), These de doctorat en sciences biologiques. Département biologie animal et végétal. Université MOULOUD MAMMARI, Tizi-Ouzou : 206p.

Thany, S.H., Reynier, P., Lenaers, G., 2013. Neurotoxicité des pesticides: Quel impact sur les maladies neurodégénératives ? *médecine/sciences* 29, 273–278. <https://doi.org/10.1051/medsci/2013293013>

Ousmane. I., 2011. Opérationnalisation des kits minilabs, L'obtention du grade de docteur en pharmacie. Faculté de Medcine, dapharmacie et d'odonto-stomatol, Bamako : 122

Penjor, T., Anai, T., Nagano, Y., Matsumoto, R., Yamamoto, M., 2010. Phylogenetic relationships of Citrus and its relatives based on rbcL gene sequences. *Tree Genet. Genomes* 6, 931–939. <https://doi.org/10.1007/s11295-010-0302-1>.

Perelló, A., Noll, U., Slusarenko, A.J., 2013. In vitro efficacy of garlic extract to control fungal pathogens of wheat 9.

Ponomarenko A. ; Goodwin S.B. & Kema G.H.J. (2011). *Septoria tritici blotch (STB) of wheat*. APS net. Doi : 10.1094 / PHI - I - 2011-0407–01 : 16p.

Quaedvlieg, W., Kema, G.H.J., Groenewald, J.Z., Verkley, G.J.M., Seifbarghi, S., Razavi, M., Gohari, A.M., Mehrabi, R., Crous, P.W., 2011. *Zymoseptoria* gen. nov.: a new genus

to accommodate *Septoria*-like species occurring on graminicolous hosts. *Persoonia - Mol. Phylogeny Evol. Fungi* 26, 57–69. <https://doi.org/10.3767/003158511X571841>

Rafiq, S., Kaul, R., Sofi, S.A., Bashir, N., Nazir, F., Ahmad Nayik, G., 2018. Citrus peel as a source of functional ingredient: A review. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 17, 351–358. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2016.07.006>

Remmal, A., Bouchikhi, T., Rhayour, K., Ettayebi, M., Tantaoui-Elaraki, A., 1993. Improved Method for the Determination of Antimicrobial Activity of Essential Oils in Agar Medium. *J. Essent. Oil Res.* 5, 179–184. <https://doi.org/10.1080/10412905.1993.9698197>

Rocher, F., 2007. Lutte chimique contre les champignons pathogènes des plantes : évaluation de la systémie phloémienne de nouvelles molécules à effet fongicide et d'activateurs de réactions de défense 164.

Romanazzi, G., Feliziani, E., 2014. *Botrytis cinerea* (Gray Mold), in : Postharvest Decay. Elsevier, pp. 131–146. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00004-1>

Sharma, N., Tripathi, A., 2006. Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogens. *World J Microbiol Biotechnol* 22, 587–593. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-9075-3>

Stamelou, M.-L., Sperdouli, I., Pyrri, I., Adamakis, I.-D.S., Moustakas, M., 2021. Hormetic Responses of Photosystem II in Tomato to *Botrytis cinerea*. *Plants* 10, 521. <https://doi.org/10.3390/plants10030521>

Sungenta, 2020. Fusariose du blé. *fusarium roseum*. Fiche technique. 3.

Yarou, B.B., Silvie, P., Komlan, F.A., Mensah, A., Alabi, T., Verheggen, F., Francis, F., 2017. Plantes pesticides et protection des cultures maraichères en Afrique de l'Ouest (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Soc.*

Zaid, B., Tifourghi, H., 2020. Contribution d'étude de l'activité antifongique des huiles essentielles de thym (*Thymus vulgaris*) contre *Aspergillus niger*. Université Mohamed Khider de Biskra. Algérie.

Sites :

[1] <https://www.dcwguelma.dz/fr/index.php/wilaya-guelma>