

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Alimentaires
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : sciences alimentaires
Option : Industrie des corps gras



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

*Effet d'association des huiles
essentielles de l'écorce de
pamplemousse et de composés
phénoliques*

Présenté par :

ADRAR Lynda et AISSIOU Tassila

Soutenu le : 19 Juin 2017

Devant le jury composé de :

M^{me} BOUALI N.

M^{me} SOUFI O.

M^{me} OUKIL N.

MAA

MCB

MCA

Président

Examineur

Encadreur

Année universitaire : 2016 / 2017

Remerciements

Nous remercions tout d'abord ALLah - notre créateur - pour nous avoir guidé et apporté de l'aide tout au long de notre vie.

Nous tenons à remercier nos parents, qui nous ont aidés dans tous les domaines, qui ont supporté nos caprices. Sans eux, jamais nous n'avions abouti à quoi que ce soit.

Nos remerciements s'adressent à Mme OUKIL, notre promotrice, aux membres de jury d'avoir accepté de juger notre mémoire.

Enfin mais pas en dernier, nous remercions nos amis et tous ceux qui nous ont apporté leur aide, de près ou de loin, afin de réaliser notre projet de fin d'études.

Dédicaces

*À nos parents, les êtres les plus
chers à nos yeux.*

*À nos frères et sœurs, nos alliés
avec qui nous partageons nos vies.*

*À nos amis, les personnes qui
nous tiennent à cœur.*

*Merci d'être là, nous vous
dédions notre humble travail.*

Lynda, Tassila

Liste des tableaux

Tableau I : Classification de <i>Coriandrum sativum</i>	2
Tableau II : Classification de <i>Citrus × paradisi</i>	4
Tableau III : Les souches testées.....	9
Tableau IV: Les milieux de culture.....	9
Tableau V: Les composés majoritaires.....	10
Tableau VI : Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de <i>Coriandrum sativum</i> et <i>Citrus × paradisi</i>	16
Tableau VII : Le rendement en huiles essentielles de <i>Coriandrum sativum</i> et <i>Citrus × paradisi</i>	16
Tableau VIII : Les CMFc de l'huile essentielle de <i>Coriandrum sativum</i> et de <i>Citrus × paradisi</i> sur les quatre souches de moisissures.....	18
Tableau IX : Les CMFc de l'extrait phénolique (EPP) testé sur les différentes souches fongiques.....	21
Tableau X : Les CMFc des deux composés majoritaires sur les souches testées.....	23
Tableau XI: Les CMFs des deux huiles essentielles sur les souches testées.....	25
Tableau XII : Effets de l'association des deux huiles essentielles sur les moisissures testées.....	26
Tableau XIII : Les CMFs de l'extrait phénolique de pépins de pamplemousse sur les souches testées.....	27
Tableau XIV : Effets de l'association HE / EPP sur les souches testées.....	28
Tableau XV : Les CMFs des composés majoritaires (Eugénol, thymol) testés sur les différentes souches de moisissures.....	29
Tableau XVI : Effet de l'association HE / composé majoritaire sur les souches testées.....	30

Liste des figures

Figure 01 : Photo de la coriandre(a) et du pamplemousse(b) utilisés	8
Figure02 : Dispositif d'hydrodistillation.....	11
Figure 03 : Photo d'une microplaque.....	14
Figure 04 : Rendement en HE de <i>Coriandrum sativum</i> et <i>Citrus × paradisi</i>	17
Figure 05 : Les isobogrammes montrant les effets de l'association des deux huiles essentielles sur les moisissures testées.....	19
Figure 06 : Les isobogrammes montrant les effets de l'association de l'HE de <i>Coriandrum sativum</i> avec l'EPP sur les souches de moisissure testées.....	21
Figure 07 : les isobogrammes montrant l'effet de l'association de l'HE de <i>Citrus×paradisi</i> avec l'EPP.....	22
Figure 08 : Les isobogrammes montrant les effets de l'association d'HE de <i>Citrus × paradisi</i> avec l'eugénol sur les souches tétées.....	23
Figure 09 : Les isobogrammes montrant les effets de l'association de l'HE de <i>Citrus × paradisi</i> avec le Thymol sur les souches de moisissures testées.....	24

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Sommaire

Introduction.....1

Partie I : Synthèse bibliographique

Généralités sur les plantes étudiées.....2

I.1 Généralités sur la coriandre.....2

I.1.1 Etymologie.....2

I.1.2 Description botanique.....2

I.1.3 Taxonomie.....2

I.1.4 Répartition géographique.....3

I.1.5 Composition physico-chimique.....3

I.2 Généralités sur le pamplemousse.....3

I.2.1 Etymologie.....3

I.2.2 Description botanique.....4

I.2.3 Taxonomie.....4

I.2.4 Répartition géographique.....5

I.2.5 Composition physico-chimique.....5

I.3 Effets thérapeutiques des plantes étudiées.....3

I.3.1 La coriandre.....6

I.3.2 Le pamplemousse.....6

Partie II : Partie pratique

Matériels et méthodes.....8

I. Matériel végétal8

II. Matériel biologique.....8

II.1 Les souches testées.....8

II.2 Les milieux de culture.....9

II.3 Les composés majoritaires.....	10
III. Méthodes.....	10
III.1 Extraction des huiles essentielles.....	10
III.2 Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité antifongique des huiles essentielles.....	12
III.2.1 Préparation des inocula fongiques.....	12
III.2.2 Standardisation des inocula fongiques.....	12
III.2.3 Préparation des dilutions.....	13
III.2.4 Détermination de l'activité antifongique.....	13
Résultats et interprétations.....	16
I. Rendement en huiles essentielles.....	16
II. L'activité antifongique	18
II.1 Détermination des paramètres de croissance.....	18
II.1.1 Activité antifongique de l'association HE / HE.....	18
II.1.2 Activité antifongique de l'association HE / EPP.....	21
II.1.3 Activité antifongique de l'association HE / composés majoritaires.....	23
II.2 Détermination des paramètres de croissance.....	25
II.2.1 Effet de l'association HE / HE.....	25
II.2.2 Effet de l'association HE / EPP.....	27
II.2.3 Effet de l'association HE / Composés majoritaires d'huiles essentielles.....	29
Conclusion et perspectives.....	32
Références bibliographiques	
Annexes	

INTRODUCTION

De nos jours, les huiles essentielles suscitent de plus en plus l'intérêt des chimistes, biologistes... et médecins en raison de leur utilisation dans le traitement de certaines maladies infectieuses grâce à leur forte action antimicrobienne développée depuis plusieurs années (Roux et Catier, 2007).

Les huiles essentielles communément appelées « essences » sont des produits huileux, volatils, odorants et incolores ou légèrement teintés, obtenus par plusieurs méthodes (Budavari et *al*, 1996).

Les huiles essentielles, vu la diversité des molécules qu'elles contiennent sont connues pour être douées de propriétés antiseptiques,... et antimicrobiennes. En effet, l'activité biologique d'une essence est à mettre en relation avec sa composition chimique, des effets synergiques sont possibles entre ses composants (Lahlou, 2004).

Malgré leurs effets bénéfiques, les huiles essentielles sont loin d'être non toxiques. La majorité des huiles essentielles à de très fortes doses, causent des effets toxiques, pour cela elles doivent être diluées (Hammer et Carson, 2011).

Dans ce contexte nous nous sommes donc intéressés à l'étude de l'activité antifongique des huiles essentielles de la coriandre et celle du pamplemousse seules et en association avec l'extrait de pépins de pamplemousse et composés majoritaires (thymol et eugénol).

Dans notre travail on s'est fixé pour objectifs :

- Etude des effets d'association des huiles essentielles extraites à partir des feuilles de coriandre et d'écorce de pamplemousse d'une part, l'association de chacune avec l'extrait phénolique de pépins de pamplemousse et l'association de l'huile essentielle de *Citrus × paradisi* avec le thymol et l'eugénol d'autres parts, sur des souches de moisissures à savoir *Aspergillus sp*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* et *Botrytis cinerea*.
- Détermination de la concentration minimale fongicide et fongistatique, afin de déterminer le FIC_{index} permettant de caractériser un effet de synergie, d'addition, d'antagonisme ou d'indifférence.

**SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE**

**GENERALITES SUR
LES PLANTES
ETUDIEES**

Généralités

I.1 Généralités sur la coriandre : *Coriandrum sativum*

I.1.1 Etymologie

Le nom français coriandre dérive du grec ‘*Koris*’ signifiant punaise à cause de l’odeur forte de ses feuilles (Avry et Galloin, 2003). Ce mot est du genre féminin aussi bien lorsqu’il désigne la plante que le fruit (épice) (Dodinet et *al*, 2001).

I.1.2 Description botanique

La coriandre est une plante annuelle d’environ 30 à 60 cm de hauteur (parfois jusqu’à 1,40 m). Les feuilles sont toujours découpées, mais sont plus larges à la base, ressemblant beaucoup alors au persil. Celles du sommet de la plante sont d’avantage découpées, devenant carrément plumeuses. Les fleurs sont portées au sommet de la plante en petites ombelles. Les minuscules fleurs sont blanches ou rose très pâle. Celles de l’extérieur de l’ombelle portent des pétales asymétriques, nettement plus longues (Schauenmberget et Paris, 2013).

I.1.3 Taxonomie

Tableau I : Classification de *Coriandrum sativum* (Cronquist 1981).

Règne	Végétal
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Rosidae
Ordre	Apiales
Famille	Apiaceae
Genre	Coriandrum
Espèce	<i>Coriandrum sativum</i>

I.1.4 Répartition géographique

La coriandre est une plante probablement originaire du Proche-Orient ou du Sud de l'Europe et s'est propagée très tôt à travers l'Ancien Monde. Elle est aujourd'hui cultivée un peu partout sur la planète, principalement dans l'hémisphère nord. Elle a été décrite comme une plante sauvage en région méditerranéenne (Europe, Afrique du Nord, Proche-Orient), au sud de la Russie, en Arménie, en Asie centrale, en Inde et en Chine. Toutefois il s'agit probablement de plantes échappées de cultures il y a plus ou moins longtemps, il est difficile de préciser où la coriandre est subspontanée (Diederichsen, 1996).

I.1.5 Composition physico-chimique

Comme beaucoup de végétaux verts et frais, dans 100g de feuilles de coriandre, on trouve :

- Des flavonoïdes antioxydants (2,5 mg);
- Des vitamines (26 mg);
- Des acides-phénols antioxydants (39,74 mg).

Il n'y a pas d'alcaloïdes toxiques mais moins d'huile essentielle contenant le cyclododecanol (environ 20%), le tétradécanal (environ 17%), le 2-dodécenal (environ 10%) et le 1-décanol (environ 7%). Les feuilles de coriandre quand on les froisse libèrent les aldéhydes de l'huile essentielle qui possèdent une odeur très marquée, plutôt désagréable (Hurtel, 2001).

I.2 Généralités sur le pamplemousse : *Citrus × paradisi*

I.2.1 Étymologie

Le mot "pamplemousse", provient du hollandais "pompelmoes", lui-même dérivé de "pompel" signifiant "gros" et "limoes", "citron". Le mot "pomelo" semblerait tout simplement être une altération du mot "pompelmoes". D'autres sources disent qu'il serait une contraction de "pomme-melon". Quant à "grape-fruit", ce surnom aurait pour origine le fait que les pomelos poussent en grappes (Boulan, 1934).

I.2.2 Description botanique

Le pamplemousse est un agrume d'origine hybride récente. Il est né dans les Caraïbes comme un croisement entre un pomelo et une orange douce (Spiegel et Goldschmidt, 1996).

L'arbre à pamplemousse pousse habituellement 4.5 à 6 mètres de haut. Ses feuilles sont persistantes et généralement ovales de 7.5 à 17.5 cm de long et de 4.5 à 7.5 cm de largeur. Quant à ses fleurs, sont blanches et aromatiques poussent généralement en grappe et produisent de gros fruits globuleux.

Le fruit du pamplemousse a une peau épaisse parfois lisse ou granuleuse munie de glandes à essences et une chair assez juteuse divisant en 11 à 14 segments en variant du jaune en orange au rouge rosâtre avec peu ou moins de pépins (Bachès, 2011).

I.2.3 Taxonomie

Tableau II : Classification de *Citrus × paradisi* (Aswini et al, 2012).

Règne	Végétal
Embranchement	Magnoliophytes
Classe	Magnoliposida
Sous classe	Rosidae
Ordre	Sapindales
Famille	Rutacées
Genre	Citrus
Espèce	<i>Citrus × paradisi</i>

I.2.4 Répartition géographique

Le pamplemoussier connu des Chinois 2 200 ans avant notre ère, on le retrouve en Europe au cours du XIIe siècle. Le détail des étapes qu'il a pu faire au cours des siècles reste inconnu, sans doute parce qu'il n'a pas été consommé.

Il est cultivé aux USA, en Israël, en Argentine, à chypre, au Mexique, à Cuba, en Afrique du Sud et dans d'autres pays du monde. En Europe et en Afrique du Nord, une dizaine de cultivars sont présents. Le 1er pays producteur de pamplemousse est les USA (la Floride), suivi d'Israël.

L'espèce *Citrus × paradisi* est originaire des Antilles, et a été introduite en Floride au début du XIXe siècle. Sa culture commerciale a commencé vers 1885, puis quelques décennies plus tard en Californie, en Arizona et au Texas (Hodgson, 1967).

I.2.5 Composition physico-chimique

Dans 100g de pamplemousse, on trouve :

- Des Flavonoïdes : Le pamplemousse renferme différents types de flavonoïdes, il contient surtout de la naringine, mais aussi l'hespérétine en plus petite quantité. C'est la partie blanche de la pelure du fruit qui renferme le plus de flavonoïdes, et les concentrations varient grandement selon les cultures.
- De la vitamine C (33,3 mg) : Les pamplemousses frais, peu importe leur couleur, contiennent environ la même quantité de vitamine C.
- De la vitamine B5 (0,28 mg).
- Des limonoïdes (1,48 mg) : Se retrouvent principalement dans les pépins mais aussi dans le jus.
- De Bêta-Carotène (14 µg) : Les pamplemousses contiennent des quantités élevées de bêta-carotène. Les pamplemousses renferment également d'autres caroténoïdes, mais en quantité moins importante.
- Des fibres (0,89g) : Environ les 2/3 des fibres du pamplemousse seraient des fibres solubles, comme la pectine. Elles se retrouvent principalement dans l'écorce et dans la membrane blanche autour de la chair (albédo) (Aruna et Baskaran, 2010).

I.3 Effets thérapeutiques des plantes étudiées

I.3.1 La coriandre (*Coriandrum sativum*)

Depuis l'antiquité, la coriandre est considérée comme une plante aromatique et médicinale. Elle est employée comme aromate dans les préparations culinaires, servant principalement comme correcteur de goût dans l'industrie agro-alimentaire.

La coriandre est employée en médecine traditionnelle comme carminative, spasmolytique, digestive et diurétique (Aruna et Baskaran, 2010).

La coriandre est utilisée parfois pour le traitement et la gestion du diabète, des études ont montré que de la coriandre pourrait diminuer l'hyperglycémie et prévenir ou réduire les complications cardio-vasculaires (Aissaoui et *al*, 2011).

Au niveau des troubles digestifs, la coriandre est considérée comme une épice sûre et efficace dans le traitement de la perte d'appétit, de ballonnements, d'indigestion, des flatulences et des maux d'estomac et crampes.

La coriandre présente également des propriétés antioxydantes (combat la formation de radicaux libres due au stress et toxines) et Antiseptiques (ralentir ou empêcher la croissance des micro-organismes dans ou sur la surface extérieure du corps) (Casetti et coll, 2011).

Eberhard et *al*, (2005) Ont démontré qu'à dose usuelle, la consommation de la coriandre comme condiment ne présente à notre connaissance aucun risque de toxicité ni aiguë, ni chronique.

I.3.2 Le pamplemousse (*Citrus × paradisi*)

Le pamplemousse est un fruit qui présente d'excellents avantages pour la santé.

➤ Il réduit le cholestérol

Une étude réalisée sur des patients atteints d'hypercholestérolémie a révélé que la consommation de 2 pamplemousses par jour aurait la propriété de diminuer les taux de cholestérol et de triglycérides sanguins (Gorinstein et *al*, 2004).

Généralités

➤ **Possède des propriétés anti-inflammatoires**

Plusieurs études ont démontré que les flavonoïdes des agrumes auraient des propriétés anti-inflammatoires (Benavente et Castillo, 2008).

➤ **Possède un pouvoir anti-glycémique**

Une étude réalisée sur des animaux diabétiques a révélé que le glucose sanguin a été significativement réduit après injection de naringine. Ce composé pourrait donc jouer un rôle important dans la prévention de l'hyperglycémie (Jung et al, 2004).

En effet, une étude portant sur des personnes obèses atteintes du syndrome métabolique a révélé que la consommation d'un demi-pamplemousse par jour avant chaque repas pendant 12 semaines entraînait une perte de poids (Fujioka et Greenway, 2006).

➤ **C'est un puissant antioxydant**

Le pamplemousse est riche en vitamine C et en naringine, un flavonoïde rarement présent dans les agrumes et très précieux dans la lutte contre les radicaux libres. (Ceux-ci, rappelons-le, sont à l'origine de l'oxydation des tissus et des cellules de notre organisme, accélérant ainsi leur vieillissement). Il contient également des limonoïdes, que l'on trouve principalement dans ses pépins et dans son jus, également reconnus pour ses capacités antioxydantes importantes (Wang et Yu, 2005).

➤ **Il réduit les risques de cancer**

Ainsi la présence de flavonoïdes, de limonoïdes, de vitamine C et de caroténoïdes lui confère des effets bénéfiques dans la prévention des cas de cancers de la bouche, du pharynx, de l'œsophage et de l'estomac (Lam et al, 2000).

PARTIE PRATIQUE

MATERIEL ET METHODES

Dans cette partie, nous présenterons le protocole expérimental pour l'extraction et l'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles des feuilles de coriandre et d'écorce de pamplemousse seules, et en association avec l'extrait phénolique de pépins de pamplemousse (EPP) et composés majoritaires d'huiles essentielles (Eugénol et thymol).

I. Matériel végétal

La matière végétale utilisée dans ce travail est les feuilles de coriandre et l'écorce de pamplemousse.



(a) La coriandre



(b) Le pamplemousse

Figure 01 : Photo de la coriandre (a) et du pamplemousse (b) utilisés

II. Matériel biologique

II.1 Les souches testées

➤ **Les moisissures :**

Les moisissures représentent un groupe hétérogène de champignons microscopiques saprophytes et parfois parasites. Les souches utilisées sont représentées dans le tableau III.

Tableau III : les souches testées

Moisissures	Classes	Références
<i>Aspergillus sp</i>	Ascomycètes	ATCC16703
<i>Aspergillus niger</i>	Ascomycètes	ATCC16702
<i>Aspergillus flavus</i>	Ascomycètes	ATCC16704
<i>Botrytis cinerea</i>	Ascomycètes	ATCC16664

* ATCC : American Type Culture Collection.

II.2 Les milieux de cultures utilisés

Tableau IV: Les milieux de culture

Milieux	Utilisation
Bouillon nutritif	Mise en culture.
Bouillon Mueller Hinton (BMH)	Détermination des paramètres de croissance (CMFs et CMFc des HE).
Solution d'Agar-Agar à 0,2%	Préparation des dilutions d'huiles essentielles et composés majoritaires.
Gélose glucosée à l'oxytétracycline (OGA)	Culture des souches fongiques.

II.3 Les composés majoritaires

Tableau V: Les composés majoritaires

Composés majoritaires	Références
Thymol	Riedel-de Haén, Trademark registered by Honeywell.
Eugénol	500350100, C.A.S.97-530.EINECS :202-589-1.New office :315 place youville suite 343 .Montréal, Québec.

III Méthodes

III.1 Extraction des huiles essentielles

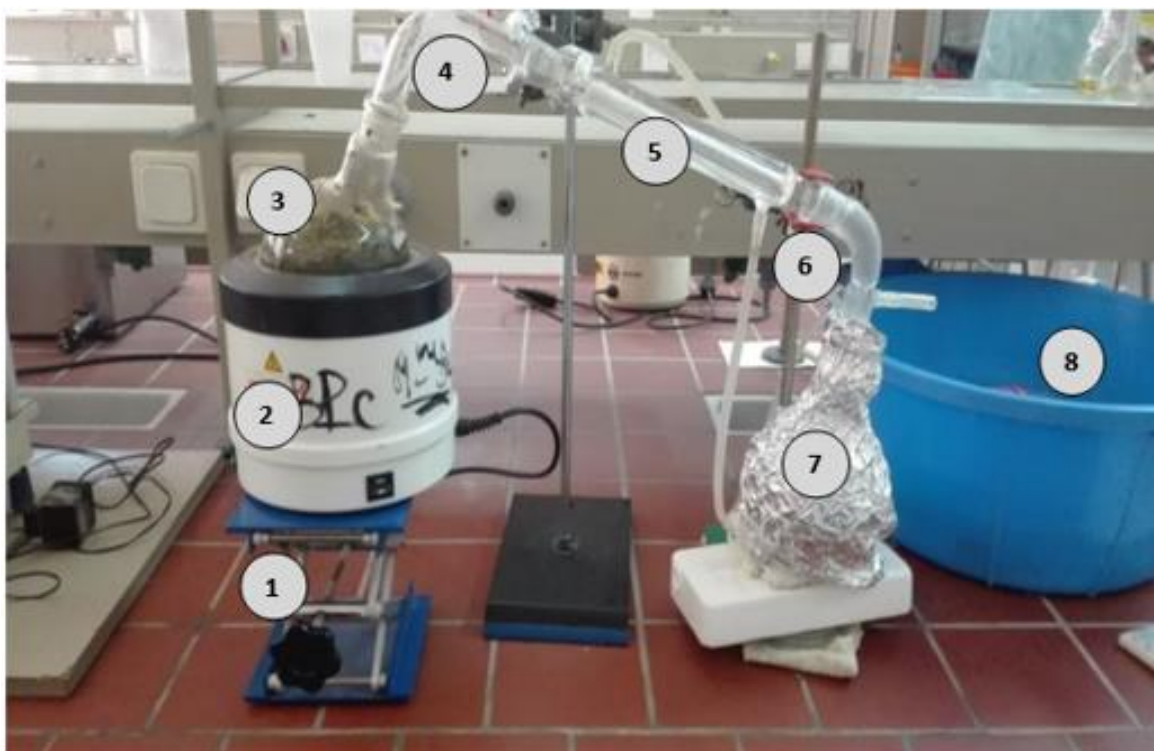
Le pamplemousse a été acheté et épluché, les écorces ont été récupérés et découpés en petit morceaux.

La coriandre (de la variété coriandre longue) a été achetée à l'état frais, les feuilles ont été séchées à l'étuve à une température de 37°C.

L'extraction des huiles essentielles de la matière végétale peut être réalisée au moyen de nombreux et divers procédés.

L'hydrodistillation reste la méthode la plus prisée du fait qu'elle est facile à mettre en œuvre. Elle consiste à immerger la matière première directement dans l'eau, puis l'ensemble est porté à ébullition. Les vapeurs formées sont condensées par un système de réfrigération par courant d'eau.

L'étape d'extraction nécessite plusieurs heures. C'est le cas de la méthode de Clevenger (Clevenger, 1928).



1 : Support élévateur	5 : Réfrigérant
2 : Chauffe ballon	6 : Coude femelle-mâle
3 : Ballon	7 : Ballon de récupération du distillat
4 : Coude mâle-mâle	8 : Bassine d'eau congelée

Figure 02 : Dispositif d'hydrodistillation

Protocole expérimental

100 grammes de feuilles de coriandre ou d'écorce de pamplemousse ont été introduits dans un ballon de 2 litres (L) contenant 1L d'eau de source et ont été laissés macérés pendant une nuit. L'ensemble est porté à ébullition pendant 2 heures. Une série de vingt-trois extractions a été effectuée pour *Coriandrum sativum*, également pour *Citrus × paradisi*.

Le distillat ainsi recueilli est introduit dans une ampoule à décanter afin de séparer l'eau de l'HE qui surnage.

L'huile essentielle obtenue après décantation est conservée dans des flacons hermétiques à l'abri de la lumière et à basse température pour éviter l'oxydation (Sahin et al, 2004).

➤ **Rendement en huiles essentielles :**

Le rendement en HE est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids du matériel végétal utilisé (Mrabet et al, 1999). Le rendement est exprimé en pourcentage (%) est calculé par la formule suivante :

$$Rd\% = (M_i / M_0) \times 100$$

Rd : Rendement.

M_i : Poids de L'huile essentielle extraite.

M₀ : Poids du matériel végétal utilisé.

III.2 Evaluation *in vitro* de l'activité antifongique des huiles essentielles

Afin de déterminer l'activité antifongique des huiles essentielles (*Coriandrum sativum* et *Citrus×paradis*) et l'effet de leurs associations, nous avons opté pour la méthode de l'échiquier en milieu « Bouillon Mueller Hinton ».

Les associations ont été testées sur quatre souches : *Aspergillus sp*, *Aspergillus flavus*, *aspergillus niger* et *Botrytis cinerea*.

III.2.1 Préparation des inocula fongiques

Repiquage des quatre souches de moisissures sur bouillon nutritif et incubation à 30°C pendant 24h puis ensemencement sur une gélose nutritive (OGA) par touches, ensuite incubation pendant 48h à 30°C pour avoir des colonies bien isolées et en culture pure.

III.2.2 Standardisation des inocula fongiques

Les colonies jeunes de chaque souche de moisissures sont récupérées dans de l'eau physiologique stérile, à partir de cette suspension mère, on prépare les différentes dilutions

dans des tubes à essai contenant de l'eau physiologique stérile. La détermination de la densité optique (DO) de la suspension fongique est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 630 nm dans le but de standardiser la suspension à 10^7 Unité formant colonie / millilitre (UFC/ml). On estime qu'une DO de 0,04 correspond à une concentration de 10^7 UFC/ml (Clinical And Laboratory Standards Institute, 2006).

III.2.3 Préparation des dilutions

En raison de la non miscibilité des huiles essentielles, de l'extrait de pamplemousse et des composés majoritaires dans l'eau nous avons utilisé une solution d'agar à 0,2% pour préparer les solutions mères et les cinq dilutions en double (1/2, 1/4... 1/32) des huiles essentielles, des composés majoritaires et de l'extrait de pamplemousse.

Ces dilutions sont préparées en quantités suffisantes dans des tubes en verre stériles, conservées à 4°C et à l'abri de la lumière et renouvelées chaque deux jours.

III.2.4 Détermination de l'activité antifongique

L'activité antifongique des composés testés est évaluée au laboratoire par la méthode de dilutions sur microplaque (technique de l'échiquier) (Eliopoulos et *al*, 2005).

Le travail présenté dans ce manuscrit est réparti en trois parties :

- L'activité antifongique de l'association des deux huiles essentielles (*coriandrum sativum* et *citris×paradisi*) testées sur quatre souches de moisissures.
- L'activité antifongique de l'association des deux huiles essentielles avec l'extrait de pépins de pamplemousse testés sur quatre souches de moisissures.
- L'activité antifongique de l'association de l'huile essentielle d'écorce de pamplemousse avec deux composés majoritaires (Thymol et Eugénol) testés sur quatre souches de moisissures.

La figure 03 ci-dessous représente la microplaque utilisée pour effectuer les différentes associations.

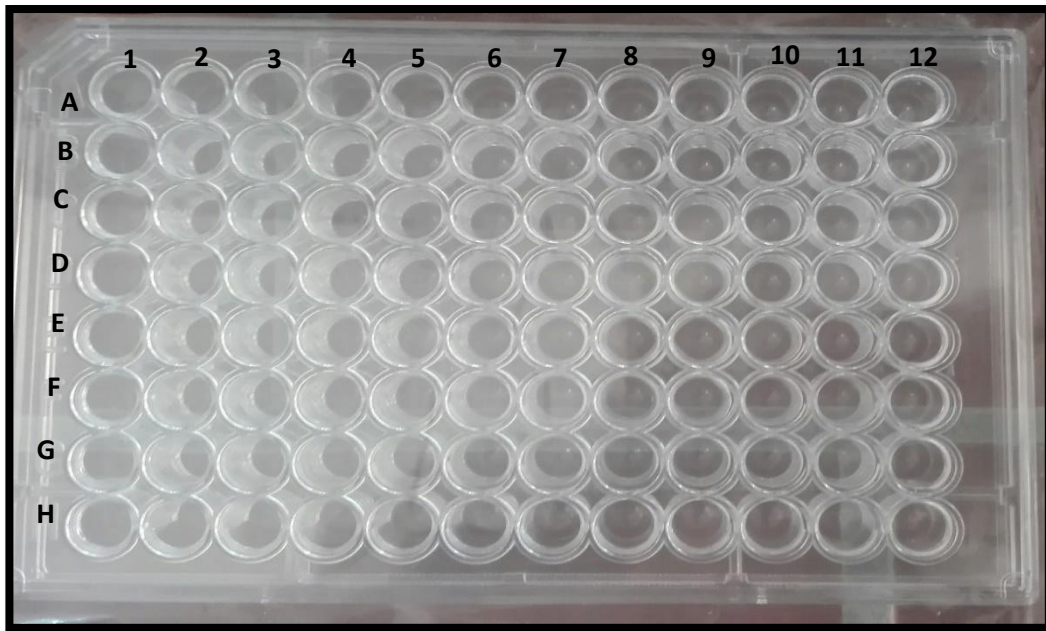


Figure 03 : Photo d'une microplaque

- Introduire dans le puits (H1) 100 microlitres (μl) de BMH, 5 μl de la suspension fongique et 50 μl de la solution d'Agar à 0.2% qui serviront comme témoin.
- Tous les autres puits de la ligne H, contiennent 100 μl du BMH, 5 μl de la suspension fongique et 50 μl d'une dilution d'un agent antimicrobien (de la plus concentrée à la moins concentrée) pour déterminer les CMFc de cet agent antimicrobien.
- Tous les autres puits de la colonne H, contiennent 100 μl du BMH, 5 μl de la suspension fongique et 50 μl d'une dilution d'un autre agent antimicrobien pour déterminer sa CMFc.
- Chaque puits du reste de la microplaque contient 100 μl du BMH, 5 μl de la suspension fongique et 25 μl de chaque agent antimicrobien (combinaison des dilutions des axes des abscisses et ordonnées) pour déterminer les effets de l'association.
- Lecture des microplaques après une incubation à 30°C pendant 24h : les concentrations inhibitrices se trouvent dans les puits clairs où il n'y a pas de croissance. Repiquage de ces puits sur une gélose nutritive (OGA) puis incubation à 30°C pendant 24h. les concentrations dans les puits où il n'y a aucune croissance correspondent aux concentrations minimales fongicides.

Pour déterminer l'effet synergique d'une association des antifongiques, on se base sur la concentration inhibitrice fractionnaire index (FIC_{index}) donné par la formule suivante (Vaubourdolle, 2007).

$$\text{FIC}_{\text{index}} = \frac{\text{CMFs (A/B)}}{\text{CMFs (A)}} + \frac{\text{CMFs (B/A)}}{\text{CMFs (B)}}$$

- Un FIC_{index} ≤ 0,75 représente une synergie ;
- Un FIC_{index} = 1 représente une addition ;
- Un FIC_{index} > 1 et < 2 représente une indifférence, et un FIC_{index} ≥ 2 un antagonisme.

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

I. Rendement en huiles essentielles

Les paramètres organoleptiques des huiles essentielles obtenues par l'hydrodistillation des deux plantes. Leur couleur, odeur et aspect sont résumés dans le tableau VI.

Tableau VI : Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de *Coriandrum sativum* et *Citrusn × paradisi*.

Origine d'huile essentielle	Couleur	Odeur	Aspect
<i>Coriandrum sativum</i>	Transparente	Forte odeur (Désagréable)	Liquide limpide
<i>Citrus × paradisi</i>	Jaune clair	Forte odeur (Agréable)	Liquide limpide

Le tableau VII regroupe les rendements calculés pour les deux huiles essentielles étudiées.

Tableau VII : Le rendement en huiles essentielles de *Coriandrum sativum* et *Citrus × paradisi*.

Espèce	Quantité de la biomasse (g)	Quantité d'huile essentielle obtenue (g)	Rendement (%)
<i>Coriandrum sativum</i>	2300	2,48	0,11
<i>Citrus × paradisi</i>	2300	4,32	0,18

Coriandrum sativum

Le rendement en huile essentielle des feuilles de coriandre est de 0,11%, ce rendement est moins important par rapport à celui obtenu par Ouis lors d'un travail réalisé à l'université d'Oran qui est de 0,48% (Ouis, 2015). Cette différence est peut être due à la différence géographique des régions de récolte ainsi la période de récolte.

Citrus × paradisi

Le rendement d'extraction obtenu à partir de l'écorce de pamplemousse est de 0,18%. Par ailleurs, Hellal a obtenu une teneur en huile essentielle d'écorce de *Citrus limonum*, *Citrus aurantium* et *Citrus sinensis* de l'ordre de 0,7 ; 0,6 et 0,58% respectivement (Hellal, 2011). Ces résultats signifient que les trois variétés d'agrumes précédentes sont plus riches en huiles essentielles que le *Citrus × paradisi*.

Des études avaient montré, d'une part, l'influence de la durée d'extraction et d'autre part, l'influence du cycle végétatif sur le rendement et la qualité de l'huile essentielle (Gomes et al, 2004).

La variation des teneurs en huiles essentielles sont peut être liées à des conditions environnementales notamment la température, la lumière, la pluviométrie et les conditions édaphiques (Aprotosoia et al, 2010).

Les conditions culturales telles que les techniques de récolte, la date de semis, l'emploi d'engrais, les traitements phytosanitaires influencent également la composition et le rendement des huiles essentielles (Benini, 2007).

Les rendements obtenus sont représentés dans la figure 04.

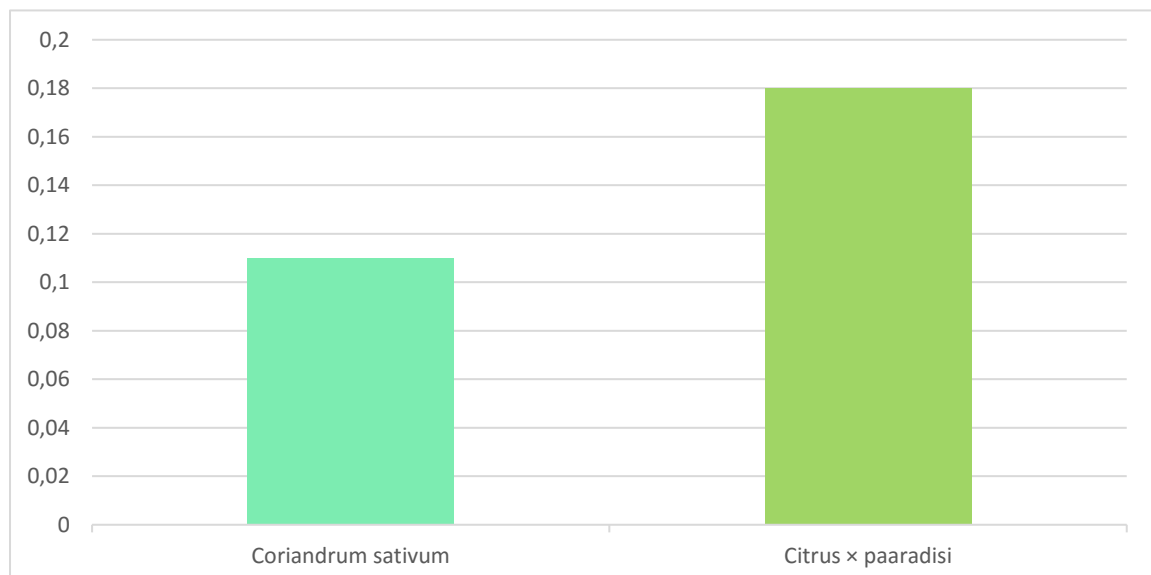


Figure 04 : Rendement en huiles essentielles de *Coriandrum sativum* et *Citrus × paradisi*

II. L'activité antifongique

II.1 Détermination des concentrations minimales fongicides (CMFc)

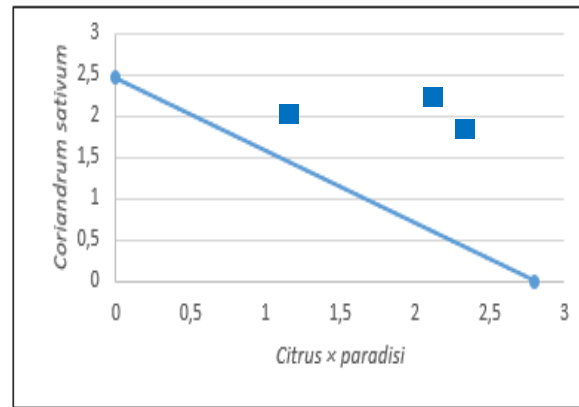
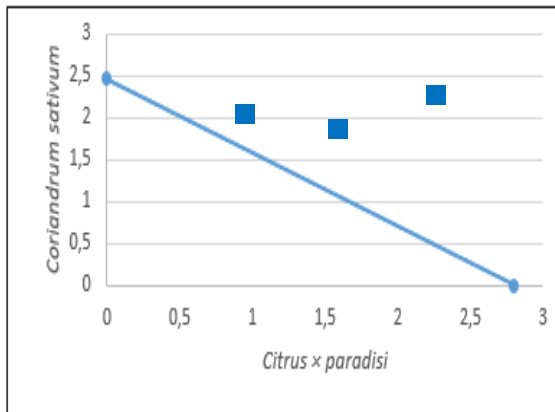
La concentration minimale fongicide est la concentration minimale d'huile essentielle nécessaire pour détruire l'inoculum initial après incubation en conditions standards et les microorganismes ne sont plus viables (Klaric et al, 2006).

II.1.1 Activité antifongique de l'association HE / HE

Tableau VIII : les CMFc de l'huile essentielle de *Coriandrum sativum* et de *citrus × paradisi* sur les quatre souches de moisissures.

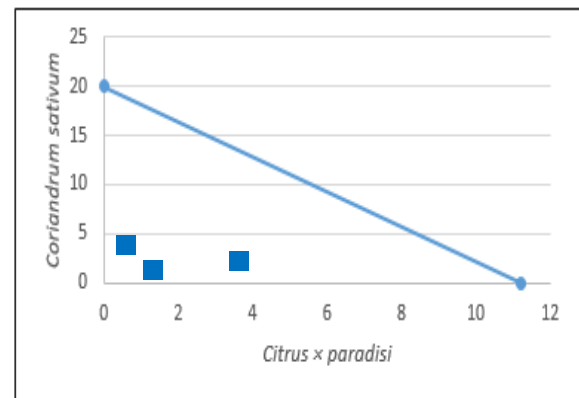
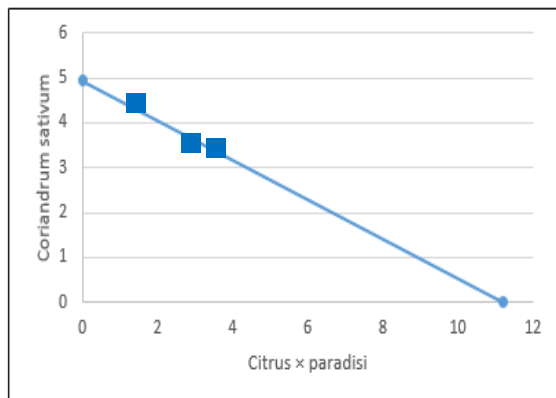
Moisissures	CMFc (mg/ml)	
	HE de <i>coriandrum sativum</i>	HE de <i>citrus × paradisi</i>
<i>Aspergillus sp</i>	2,46	2,8
<i>Aspergillus flavus</i>	2,46	2,8
<i>Aspergillus niger</i>	4,93	11,21
<i>Botrytis cinerea</i>	19,72	11,21

Les isobogrammes montrant l'effet de l'association de l'HE de *Coriandrum sativum* avec l'HE de *Citrus × paradisi* sur les souches de moisissures testées, sont présentés dans la figure 05.



a) Effet d'antagonisme sur *Aspergillus sp*

b) Effet d'antagonisme sur *Aspergillus flavus*



c) Effet d'addition sur *Aspergillus niger*

d) Effet de synergie sur *Botrytis cinerea*

Figure 05 : Les isobogrammes indiquant les effets de l'association des deux huiles essentielles sur les moisissures testées.

D'après les résultats présentés dans le tableau VIII, Les huiles essentielles des deux plantes étudiées, *Coriandrum sativum* et *Citrus x paradisi* ont une activité antifongique.

Chaque huile essentielle agit d'une manière différente sur les moisissures testées. Leurs CMFc sont comprises entre 2,46 et 19,72 mg/ml pour *Coriandrum sativum*, entre 2,8 et 11,21 mg/ml pour *Citrus x paradisi*.

Pour l'HE de *Coriandrum sativum*, la souche *Botrytis cinerea* est la moins sensible avec une CMFc de 19,72 mg/ml.

Botrytis cinerea et *Aspergillus niger*, sont les souches les moins sensibles vis-à-vis de l'HE de *Citrus x paradisi*.

Les deux huiles essentielles présentent une meilleure activité vis-à-vis de *Aspergillus sp* et *Aspergillus flavus* avec une CMFc de 2,46 mg/ml pour l'HE de *Coriandrum sativum* et 2,8 mg/ml pour l'HE de *Citrus × paradisi*.

Plusieurs méthodes testant l'activité antifongique des huiles essentielles sont disponibles, mais puisqu'elles ne se basent pas sur le même principe, les résultats peuvent être influencés par la méthode (Mesa et al, 2009).

D'après les travaux de certains chercheurs, l'HE des feuilles de coriandre contient des monoterpénol (60 à 85%) tel que le linalool et des monoterpènes (10 à 25%) tels que le terpinène et le limonène, elle contient également des cétones (3 à 6%) tel que le camphre. Cette composition biochimique varie en fonction des différents chemotypes (Xuetong et al, 2002).

L'activité biologique d'une huile essentielle est liée à sa composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et leur effets synergiques (Dorman, 2000).

L'HE d'écorce de pamplemousse est un mélange complexe de plusieurs constituants, elle contient des monoterpènes (95 à 98%) tel que le limonène, des coumarines, des furocoumarines et des aldéhydes terpéniques (2 à 3%) tel que le citral. La plupart des études sur le mécanisme d'action des huiles essentielles se sont accentuées sur leurs effets sur les membranes cellulaires. En fait, les composés actifs attaquent la paroi et la membrane cellulaire, affectant de ce fait la perméabilité et le dégagement des constituants intracellulaires, en interférant également avec la fonction de la membrane (Bajpai et Kang, 2010).

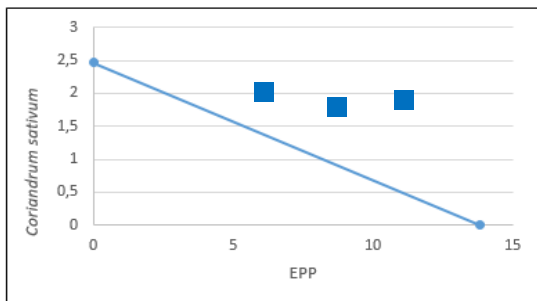
Plusieurs travaux ont mis en évidence les différentes activités biologiques des plantes aromatiques et médicinales, en particulier leurs pouvoirs antifongiques et antibactériens (Jazet et al, 2009).

II.1.2 Activité antifongique de l'association HE/ EPP

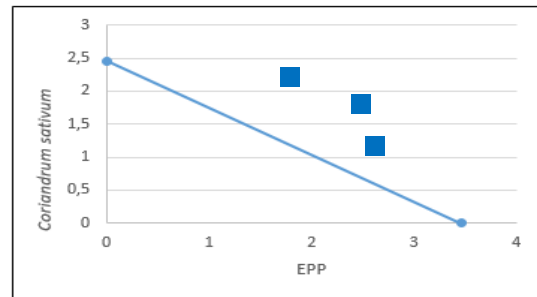
Tableau IX : Les CMFc de l'extrait phénolique (EPP) testé sur les différentes souches fongiques.

Moisissures	CMFc (mg/ml)
	EPP
<i>Aspergillus sp</i>	13,83
<i>Aspergillus flavus</i>	3,46
<i>Aspergillus niger</i>	3,46
<i>Botrytis cinerea</i>	6,93

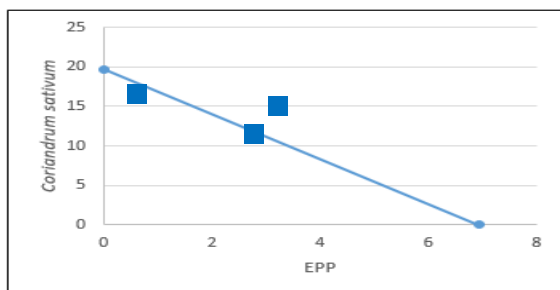
Les isobogrammes montrant les effets de l'association des deux huiles essentielles avec l'EPP sur les souches testées sont présentés dans les figures 06 et 07.



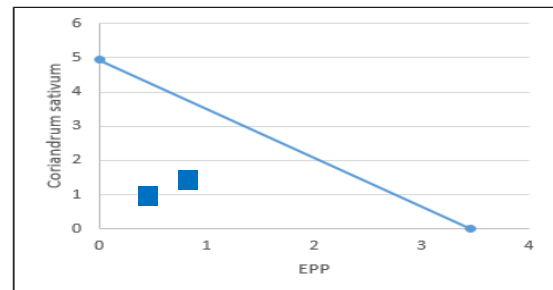
a) Effet d'antagonisme sur *Aspergillus sp*



b) Effet d'antagonisme sur *Aspergillus flavus*

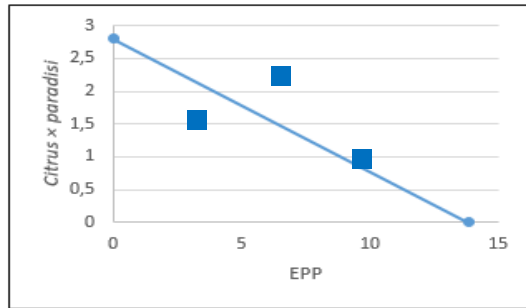


c) Effet d'indifférence sur *Aspergillus niger*

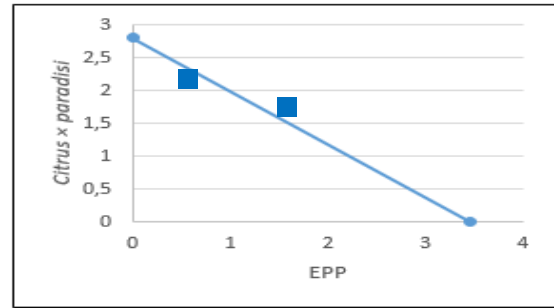


d) Effet de synergie sur *Botrytis cinerea*

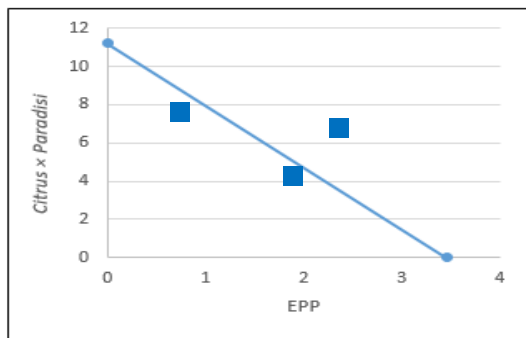
Figure 06 : Les isobogrammes montrant les effets de l'association de l'HE de *Coriandrum sativum* avec l'EPP sur les souches de moisissure testées.



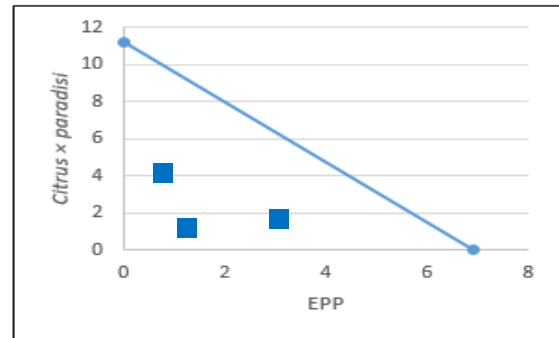
a) Effet d'indifférence sur *Aspergillus sp*



d) Effet d'indifférence *Aspergillus flavus*



c) Effet d'indifférence sur *Aspergillus niger*



d) Effet de synergie sur *Botrytis cinerea*

Figure 07 : les isobogrammes montrant les effets de l'association de l'HE de

Citrus x paradisi avec l'EPP sur les souches de moisissures testées

Ces résultats montrent que l'extrait phénolique des pépins de pamplemousse semble avoir une activité antifongique intéressante. Il est plus actif vis-à-vis *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger* avec une CMFc de 3,46 mg/ml.

D'après des études préliminaires, l'extrait de pépins de pamplemousse (EPP) est un antimicrobien naturel puissant. Il est actif sur environ 100 souches de champignons. Il est constitué principalement de bioflavonoïdes tels que la naringine, l'hesperidine et la poncirine qui sont responsables des nombreuses activités antimicrobiennes du pamplemousse.

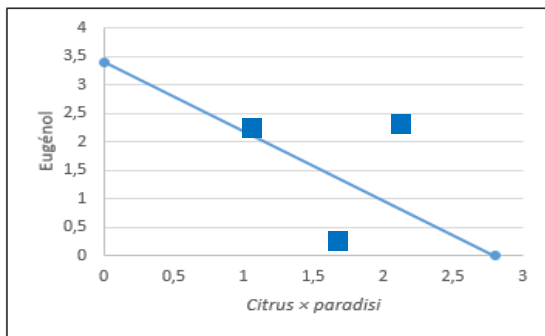
L'EPP contient également des composants organiques tels que l'acide ascorbique, l'acide citrique, acides aminés, des tocophérols, des sucres et des amines et autres composants mineurs. Les composés de l'EPP perturbent la membrane bactérienne et fongique, et fait éclater la cellule dans les 15 minutes après le contact, même à des concentrations plus diluées. Cet effet est surtout en lien avec la teneur en flavonoïdes des pépins de pamplemousse (Cvetnić et vladimir, 2004).

II.1.3 Activité antifongique de l'HE / composés majoritaires d'huiles essentielles

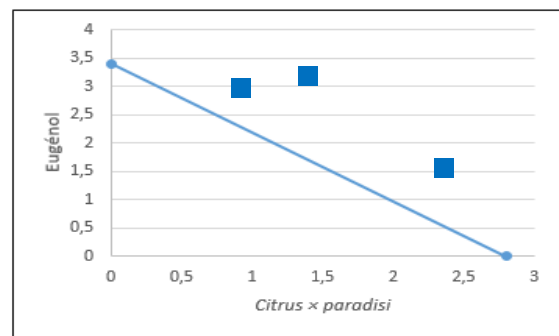
Tableau X : Les CMFc des deux composés majoritaires sur les souches testées

Moisissures	CMFc (mg/ml)	
	Eugénol	Thymol
<i>Aspergillus sp</i>	3,4	2,87
<i>Aspergillus flavus</i>	3,4	2,87
<i>Aspergillus niger</i>	3,4	2,87
<i>Botrytis cinerea</i>	3,4	2,87

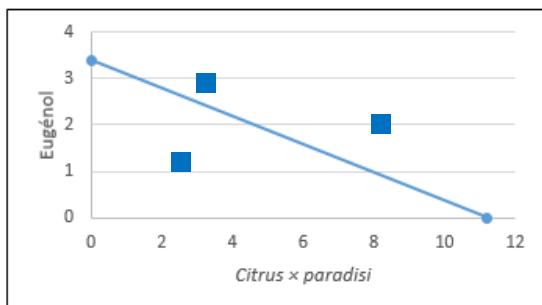
La figure 08 représente les isobogrammes montrant les effets de l'association de l'HE de *Citrus × paradisi* avec l'Eugénol sur les souches de moisissures testées.



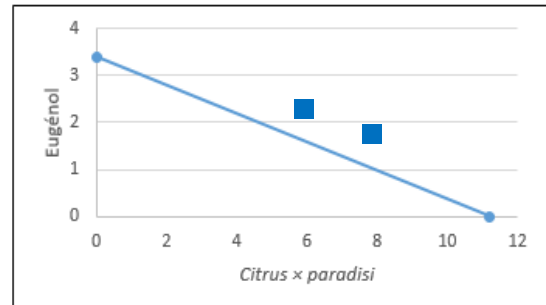
a) Effet d'indifférence sur *Aspergillus sp*



b) Effet d'antagonisme sur *Aspergillus flavus*



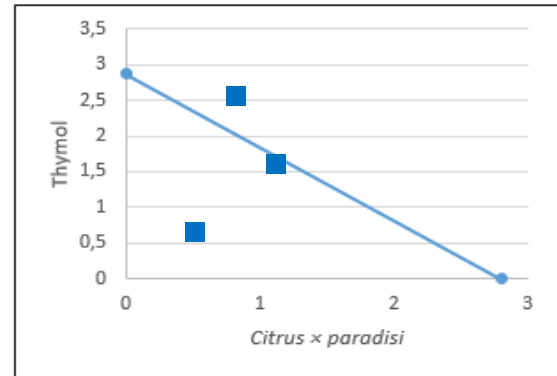
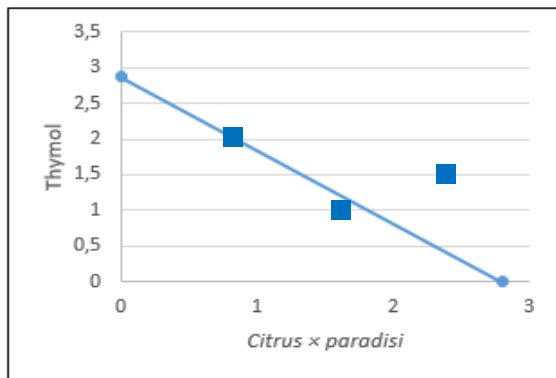
c) Effet d'indifférence sur *Aspergillus niger*



d) Effet d'antagonisme sur *Botrytis cinerea*

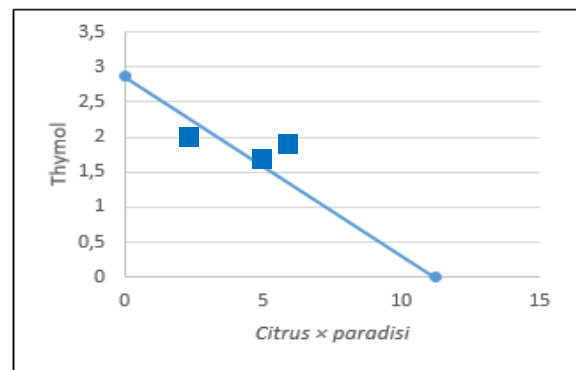
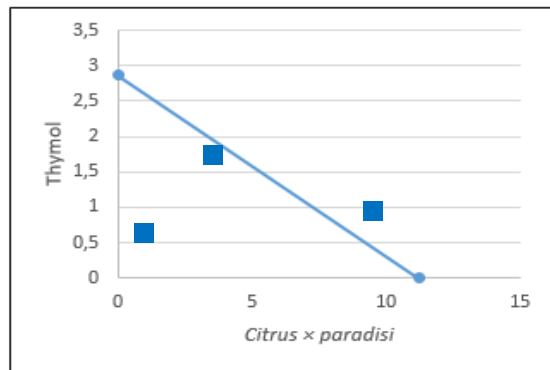
Figure 8 : Les isobogrammes montrant les effets de l'association d'HE de *Citrus × paradisi* avec l'Eugénol sur les souches tétées.

La figure 10 représente les isobogrammes de l'association de l'HE de *Citrus × paradisi* avec le Thymol sur les souches de moisissures testées.



a) Effet d'indifférence sur *Aspergillus sp*

b) Effet d'indifférence sur *Aspergillus flavus*



c) Effet d'indifférence sur *Aspergillus niger*

d) Effet d'indifférence sur *Botrytis cinerea*

Figure 09: Les isobogrammes montrant les effets de l'association de l'HE de *Citrus × paradisi* avec le Thymol sur les souches de moisissures testées.

D'après ces résultats présentés dans le tableau X, les deux composés majoritaires agissent de la même manière sur les souches testées avec une CMFc de 2,87 mg/ml pour le thymol et 3,4 mg/ml pour l'eugénol. Le thymol a une meilleure activité antifongique par rapport à l'eugénol.

Selon Bouaoun et ses collaborateurs (2007), la plupart des composés chimiques des HE sont dotés de propriétés antimicrobiennes, mais ce sont les composés volatils majeurs qui présentent les propriétés antimicrobiennes les plus importantes, et en particulier les phénols, les aldéhydes, l'eugénol, le linalool, et le thymol.

Des études réalisées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 1999) ont montré que le thymol possède une forte activité antifongique et antibactérienne contre de nombreuses espèces.

II.2 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMFs)

La plus faible concentration d'huile essentielle inhibant toute croissance visible à l'œil nu après 16 à 20 heures d'incubation. Les microorganismes restent cependant viables (Yang et al, 2009).

II.2.1 Effet de l'association HE / HE

Les résultats de l'activité antifongique de l'HE de *Coriandrum sativum* et de *Citrus × paradisi* vis-à-vis des quatre souches de moisissures testées, sont représentées dans le tableau XI.

Tableau XI: Les CMFs des deux huiles essentielles sur les souches testées

Moisissures	CMFs (mg/ml)	
	HE de <i>Coriandrum sativum</i>	HE de <i>Citrus×paradisi</i>
<i>Aspergillus sp</i>	2,46	5,6
<i>Aspergillus flavus</i>	2,46	2,8
<i>Aspergillus niger</i>	4,93	5,6
<i>Botrytis cinerea</i>	9,86	11,21

Les résultats du tableau XI montrent que l'HE de *Coriandrum sativum* agit de la même manière sur *Aspergillus sp* et *Aspergillus flavus* avec une CMFs de 2,46 mg/ml et différemment sur *Aspergillus niger* (CMFs : 4,93 mg/ml) et *Botrytis cinerea* (CMFs : 9,86 mg/ml).

Par contre, l'HE de *Citrus × paradisi* agit de la même manière sur *Aspergillus sp* et *Aspergillus niger* avec une CMFs de l'ordre de 5,6 mg/ml et différemment vis-à-vis de *Aspergillus flavus* et *Botrytis cinerea* avec des CMFs de 2,8 et 11,21 mg/ml respectivement.

D'après certaines études, les huiles essentielles peuvent être utiles en tant qu'agents antifongiques parce qu'elles affectent plusieurs cibles simultanément et il n'y a aucun rapport de résistance ou d'adaptation des microorganismes à cause de la diversité des composés chimiques (Bakkali et al, 2008).

Plusieurs chercheurs ont rapporté que les terpénoïdes et leurs dérivés oxygénés sont les composants principaux des huiles essentielles ; ces composés ont un potentiel inhibiteur fort sur des souches microbiennes pathogènes (Cakir et al, 2004; Fontenelle et al, 2007; Hossain et al, 2008).

L'activité inhibitrice peut être due aux différents modes d'action de tous les composants de l'huile essentielle sur les moisissures (Bajpai et Kang, 2010).

- ❖ Les résultats de l'activité antifongique de l'association HE / HE sur les souches de moisissures testées sont présentés dans le tableau XII.

Tableau XII : Effets de l'association des deux huiles essentielles sur les souches de moisissures testées.

Association	Moisissures	FIC _{index}	Effets de l'association
HE de <i>Coriandrum sativum</i> et HE de <i>Citrus × paradisi</i>	<i>Aspergillus sp</i>	5,42	Antagonisme
	<i>Aspergillus flavus</i>	9,98	Antagonisme
	<i>Aspergillus niger</i>	1	Addition
	<i>Botrytis</i>	0,24	Synergie

Les résultats obtenus montrent que l'association de l'HE de *Coriandrum sativum* et de *Citrus × paradisi* présente un effet synergique sur la souche *Botrytis cinerea* avec un FIC_{index} de 0,24 qui est inférieur à 0,75 (Vaubourdolle, 2007). Un effet d'addition sur *Aspergillus niger* avec un FIC_{index} de 1 et un effet d'antagonisme sur *Aspergillus flavus* et *Aspergillus sp* avec des FIC_{index} de 9,98 et 5,42 respectivement qui sont supérieurs à 2 (Vaubourdolle, 2007).

D'après les résultats de l'activité antifongique des deux huiles essentielles étudiées par la méthode de la microdilution en milieu BMH, il est clair que les souches étudiées n'ont pas les mêmes valeurs de FIC_{index} .

Cette différence serait peut être due à la nature de la paroi des souches fongiques qui se compose d'un réseau complexe de protéines et de polycarbohydrates et qui varient en composition selon les espèces fongiques. La perturbation de cette matrice peut avoir comme conséquence une paroi défectueuse, qui devient sensible à la lyse osmotique et aux agents antifongiques (Yen et Chang, 2008).

Contre les moisissures, les phénols terpéniques des huiles essentielles provoquent plusieurs effets tels que des perturbations morphologiques des hyphes mycéliens, la rupture de la membrane plasmique et l'altération de la structure des mitochondries (Arras et al, 2001).

II.2.2 Effet de l'association HE / EPP

Tableau XIII : Les CMFs de l'extrait phénolique de pépins de pamplemousse sur les souches de moisissures testées.

Moisissures	CMFs (mg/ml)
	EPP
<i>Aspergillus sp</i>	13,83
<i>Aspergillus flavus</i>	3,46
<i>Aspergillus niger</i>	6,93
<i>Botrytis cinerea</i>	6,93

Les résultats obtenus montrent que *Aspergillus sp* est la souche la plus résistante vis-à-vis l'EPP avec une valeur de CMFs de 13,83 mg/ml. Les autres souches sont moins résistantes avec une valeur de CMFs de 6,93 mg/ml pour *Aspergillus niger* et *Botrytis cinerea* et 3,46 mg/ml pour *Aspergillus flavus*.

L'extrait de pépins de pamplemousse est un antibiotique naturel puissant. En effet, les flavonoïdes présents dans les pépins sont inhibiteurs de la croissance de la plupart microorganismes (Cvetnić et Vladimir, 2004).

- ❖ Les résultats de l'activité antifongique de l'association HE / EPP sur les souches de moisissures testées sont présentés dans le tableau XIV.

Tableau XIV : Effets de l'association HE / EPP sur les souches testées.

Association	Moisissures	FIC _{index}	Effets de l'association
HE de <i>Citrus × paradisi</i> et l'EPP	<i>Aspergillus sp</i>	1,43	Indifférence
	<i>Aspergillus flavus</i>	4,08	Antagonisme
	<i>Aspergillus niger</i>	1,41	Indifférence
	<i>Botrytis</i>	0,55	Synergie
HE de <i>Coriandrum sativum</i> et l'EPP	<i>Aspergillus sp</i>	2,98	Antagonisme
	<i>Aspergillus flavus</i>	7,04	Antagonisme
	<i>Aspergillus niger</i>	1,05	Indifférence
	<i>Botrytis</i>	0,52	Synergie

Ces résultats montrent que l'association HE de *Citrus × paradisi* / EPP, présente un effet de synergie vis-à-vis de la souche *Botrytis cinerea* avec un FIC_{index} de 0,55, un effet d'indifférence vis-à-vis *Aspergillus niger* et *Aspergillus sp* avec des FIC_{index} de 1,41 et 1,43 respectivement et un effet d'antagonisme vis-à-vis *Aspergillus flavus* avec un FIC_{index} de 4,08.

Pour l'association HE de *Coriandrum sativum* / EPP, un effet synergique a été noté vis-à-vis de la souche *Botrytis cinerea*, un effet d'antagonisme vis-à-vis de *Aspergillus sp* et *Aspergillus flavus* et un effet d'indifférence vis-à-vis de *Aspergillus niger*.

Les flavonoïdes et les triterpénoïdes ainsi que d'autres composés de nature phénolique ou groupes hydroxyle libres sont reconnus comme composés antibiotiques très actifs (Rojas et al. 1992).

L'efficacité optimale d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif principal, mais à l'action combinée (synergie) de différents composés à l'origine de cet extrait (Essawi et Srour, 2000).

II.2.3 Effet de l'association HE / Composés majoritaires d'huiles essentielles

Tableau XV : Les CMFs des composés majoritaires (Eugénol, thymol) testés sur les différentes souches de moisissures testées.

Moisissures	CMFs (mg/ml)	
	Eugénol	Thymol
<i>Aspergillus sp</i>	3,4	2,87
<i>Aspergillus flavus</i>	3,4	2,87
<i>Aspergillus niger</i>	3,4	2,87
<i>Botrytis cinerea</i>	3,4	2,87

Ces résultats montrent que le thymol et l'eugénol agissent de la même manière sur les quatre souches fongiques, le thymol est plus actif avec une CMFs de 2,87mg/ml alors que l'eugénol est moins actif avec une valeur de 3,4 mg/ml.

Le thymol et l'eugénol sont responsables de l'activité fongicide (Bennis et Chami, 2004) et bactéricide des HE qui en contiennent (Cox et *al*, 2000).

La molécule de thymol a un effet inhibiteur et létal sur diverses souches. Plus les teneurs en phénols sont élevées, plus les HE sont efficaces (Cosentino et Tubroso, 1999).

- ❖ Les résultats de l'activité antifongique de l'association HE / Composés majoritaires d'huiles essentielles sur les souches de moisissures testées sont présentés dans le tableau XVI.

Tableau XVI : Effet de l'association HE / composé majoritaire sur les souches testées

HE	Composés majoritaire	Moisissures	FIC _{index}	Effets
HE de <i>Citrus × paradisi</i>	Eugénol	<i>Aspergillus sp</i>	1,42	Indifférence
		<i>Aspergillus flavus</i>	2,03	Antagonisme
		<i>Aspergillus niger</i>	1,12	Indifférence
		<i>Botrytis cinerea</i>	2,03	Antagonisme
	Thymol	<i>Aspergillus sp</i>	1,48	Indifférence
		<i>Aspergillus flavus</i>	1,99	Indifférence
		<i>Aspergillus niger</i>	1,22	Indifférence
		<i>Botrytis cinerea</i>	1,94	Indifférence

D'après les résultats présentés dans le tableau XVI, l'association de l'HE d'écorce de pamplemousse avec le thymol a donné un effet d'indifférence sur les quatre souches testées avec un FICindex de 1,48 pour *Aspergillus sp*, 1,99 pour *Aspergillus flavus*, 1,22 pour *Aspergillus niger* et 1,94 pour *Botrytis cinerea*.

Par contre, l'association de l'huile essentielle d'écorce de pamplemousse avec l'eugénol a montré deux effets, un effet d'indifférence sur *Aspergillus sp* et *Aspergillus niger* avec des FICindex de 1,42 et 1,12 respectivement et un effet d'antagonisme sur *Aspergillus flavus* et *Botrytis cinerea* avec des FICindex de 2,03.

En plus de l'activité antibactérienne, des études (réalisées *in vitro* et *in vivo*) ont prouvé que le thymol possède des propriétés antifongiques contre un certain nombre de mycètes (Giordani et al, 2008).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le travail que nous avons entrepris porte sur l'étude de l'activité antifongique des huiles essentielles de l'écorce de *Citrus × paradisi* et des feuilles de *Coriandrum sativum* seules, et en association avec l'extrait phénolique de pépins de pamplemousse et des composés majoritaires (Thymol et Eugénol), testées sur quatre souches de moisissures à savoir *Aspergillus sp*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* et *Botrytis cinerea*.

L'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation a été réalisée en utilisant un dispositif de type Clevenger. La valeur du rendement en huile essentielles d'écorce de pamplemousse était de 0,18% et celui des feuilles de coriandre était de 0,11%.

La détermination *in vitro* du pouvoir antifongique des huiles essentielles a été réalisée par la méthode de l'échiquier. Les deux huiles essentielles testées seules ont montré une bonne activité antifongique avec des CMFc (Concentration minimale fongicide) variant de 2,8 à 11,21 mg/ml pour *Citrus × paradisi* et de 2,46 à 19,72 mg/ml pour *Coriandrum sativum* dont *Aspergillus sp* et *Aspergillus flavus* sont les souches les plus sensibles.

D'après les résultats obtenus, le composé majoritaire Thymol a une bonne activité antifongique par rapport à l'Eugénol et l'extrait phénolique de pépins de pamplemousse avec une CMFc de 2,87 mg/ml.

Concernant les CMFs (Concentration minimale inhibitrice), on a constaté que *Botrytis cinerea* est la souche la plus résistante vis-à-vis de l'HE de *Citrus × paradisi* avec une valeur de 11,21 mg/ml et de l'HE de *Coriandrum sativum* avec une valeur de 9,86 mg/ml.

Les deux composés majoritaires (Eugénol et Thymol) et l'extrait phénolique de pépins de pamplemousse ont des CMFs qui varient de 2,87 à 13,83 mg/ml dont le Thymol est le moins sensible avec une CMFs de 2,87 mg/ml.

Parmi toutes les combinaisons effectuées, seules les combinaisons, HE de *Citrus × paradisi* / HE de *Coriandrum sativum*, HE de *Citrus × paradisi* / EPP et HE de *Coriandrum sativum* / EPP ont montré un effet synergique vis-à-vis de la même souche (*Botrytis cinerea*) avec un FICindex variant de 0,24 à 0,55.

Enfin, on conclut que les deux plantes étudiées sont douées d'activité biologique. Leur association avec l'extrait phénolique de pépins de pamplemousse et les deux composés majoritaires d'huiles essentielles a montré une activité antifongique.

En perspectives, il serait intéressant:

- Evaluer d'autres activités antimicrobiennes telle que l'activité antiparasitaire, antivirale et antiinflammatoire ;
- Effectuer plusieurs essais pour une meilleure exploitation des huiles essentielles ;
- Etudier d'autres associations en combinant d'autres composés majoritaires pour l'obtention de l'effet synergique;
- Réaliser des tests *in vivo* pour l'évaluation d'autres propriétés thérapeutiques.
- Evaluer la toxicité des huiles essentielles.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

Arras G. & Usai M. (2001). Fungitoxic activity of 12 essential oils against four postharvest *Citrus* pathogens: Chemical analysis of *Thymus capitatus* oil and its effect in subatmospheric pressure conditions. *J. Food Prot.* 64, 1025-1029p.

Avry M. & Galloiu F. (2003). Epices, aromates et condiments. Ed. Bellin, Paris, France. 305p.

Aprotosoiaie A. C, Spac A. D, Hancianu M, Miron A, Tanasescu V. F, Dorneanu V. & Stanescu U. (2010). The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). *FARMACIA*, Vol. 58 (1). 46-54p.

Aruna G. & Baskaran V. (2010). *Food Chemistry.* 123, 404–409p.

Aissaoui A, Zizi S, Israili Z. H. & Lyoussi B. (2011). *Journal of Ethnopharmacology.* 137, 652-661p.

Aswini K, Mangesh K, Kailash V, Pratibha C. & Mahavir G. (2012). Pharmacognostic investigation on leaves of *Citrus maxima* (Burm). Merr. (Rutaceae) *CIB Tech Journal of pharmaceutical sciences.*

B

Boulan H. (1934). Les mots d'origine étrangère en français. 1650-1700. Amsterdam, H.J. Paris. 229p.

Botton B. (1990). « Moisissures utiles et nuisibles – Importance industrielle », Ed. Masson, Paris.

Budavari S, Neil O. M. J, Smith A, Heckelman P. E. & Kinneary J. F. (1996). The Merck Index-Twelfth edition, Whitehouse Station: Merck and Co, INC, 2350p.

Bennis S. & Chami. S. (2004). Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. *Letters in Applied Microbiology.* 38, 454-458p.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D. & Idaomar M. (2007). Biological effects of essential oils-A Review-Food and Chemical Toxicology. 46. 446-475p.

Benini C. (2007). Contribution à l'étude de la diversification de la production d'huiles essentielles aux Comores. Mémoire d'ingénieur. Université Gembloux. 109p.

Bouaoun D, Hilan C, Garabeth F. & Sfeir R. (2007). Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'une plante sauvage Prangos asperula Boiss. Phytothérapie. 5, 129-134p.

Benavente G. O. & Castillo J. (2008). Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. J. Agric Food Chem. 56:185-205p.

Bajpai V. K. & Kang S. C. (2010). Antifungal activity of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. J. Am. Oil. Chem. Soc. 87: 327-336p.

Bachès M. (2011). Les agrumes. Italie édition : Eugen ulmer, 440-01.106p.

C

Clevenger J. F. (1928). Apparatus for the determination of volatile oil. Journal of the American pharmaceutical Association. 17: 345-349p.

Cosentino S. & Tuberoso C. I. G. (1999). *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of *Sardinian Thymus* essential oils. Lett Appl Microbiol. 29, 130-135p.

Cox S. D, Mann C. M. & Markham J. L. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). J. Appl Microbiol. 88, 170-175p.

Cakir A, Kordali S, Zengin H, Izumi S. & Hirata T. (2004). Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. Flavour Frag. J. 19 (1), 62-68p.

Cvetnić Z. & Vladimir K. S. (2004). Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract. *Acta Pharm.* 54(3): 243-50p.

Casetti F. & coll. (2011). Antimicrobial activity against bacteria with dermatological relevance and skin tolerance of the essential oil from *Coriandrum sativum L.* fruits. *Phytother Res.* 10,100-.151p.

D

Diederichsen A. (1996). Coriander (*Coriandrum sativum*), Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Gatersleben - International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome, coll. « Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops » (no: 03).83 p.

Dorman H. J. D. (2000). Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oil. *Journal of Applied Microbiology.* 88:308-316p.

Dodinet E, Chauvet M, Melot J, Adriaens A, Armagne E, Blais P. M, Cambornac M, Jacob J. P, Rongier A. & Zumbiehl R. (2001). Synthèse sur les origines du mot « Coriandre » *Coriandrum sativum*.

E

Essawi T. & Srour M. (2000). Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharm.* 70: 343-349p.

Eberhard T, Robert A. & Annelise L. (2005). « Plantes aromatiques ».199-201p.

Eliopoulos G. M, Pillai S. K. & Moellering J. R. (2005). Antimicrobial combination. *In:* V. Lorian V. (5th ed.), *Antibiotics in laboratory medicine.* The Willams et Wilkins Co Philadelphia, USA. 365-425p.

F

Farnsworth N. R, Akerele O, Bingel. A. S, Soejarto D. D. & Guo Z. (1986). Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé. 2: 159-175p.

Fujioka K. & Greenway F. (2006). The effects of grapefruit on weight and insulin resistance: relationship to the metabolic syndrome. *J. Med Food.* 9:49-54p.

Fontenelle R. O. S, Morais S. M, Brito E. H. S, Kerntopf M. R, Brillhante R. S. N, Cordeiro R. A, Tome A. R, Queiroz M. G. R, Nascimento N. R. F, Sidrim J. J. C. & Rocha M. F. G. (2007). Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippiasidoides* Cham. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 59,934-940p.

G

Gudziec B, Djokovic D, Vajs V, Palic R. & Stojanovic G. (2002). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hypericumma culatum* Crantz. *FlavourFrag.J.* 17 (5), 392-394p.

Gorinstein S, Caspi A. & al. (2004). Preventive effects of diets supplemented with sweetie fruits in hypercholesterolemic patients suffering from coronary artery disease. *Prev Med.* 38:841p.

Gomes P. B, Mata V. G, Rodrigues A. E. (2004). « Characterization of Portuguese grown geranium oil (*Pelargonium* sp.) ». *J. Essent. Oil Res.* 16: 490–495p.

Giordani R, Hadeif Y, Kaloustian J. (2008). Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia.* 79: 199-203p.

H

Hodgson R.W. (1967). Horticultural varieties of citrus: University of California, Division of Agricultural Sciences. 22: 431-591p.

Hellal Z. (2011). Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des *Citrus*. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de magister de biochimie appliquée et biotechnologie. Université Mouloud Mammeri de Tizi-ouzou, faculté des sciences biologiques et agronomiques, 127p.

Hurtel J. M. (2001). Phytothérapie, plantes médicinales, aromathérapie, huiles essentielles.

Hossain M. A, Ismail Z, Rahman A. & Kang S. C. (2008). Chemical composition and antifungal properties of the essential oils and crude extracts of *Orthosiphon stamineus* Benth. *Industrial Crops And Products* 2, 7: 328–334p.

Hammer k. A. & Carson C. F. (2011). Antibacterial and antifungal activities of essential oil. In: Thormar H. *Lipids and essential oils as antimicrobial agents*. John Wiley & Sons, LTD. Singapore. 255-315p.

J

Jazet D. P. M, Kuate J, Fekam B. F, Ducelier D, Damesse F, Amvam Z. P. H, Menut C. & Bessière J. M. (2002). Composition chimique et activité antifongique *in vitro* des huiles essentielles des citrus 57: 95-104p.

Jung U. J, Lee M. K. & al. (2004). The hypoglycemic effects of hesperidin and naringin are partly mediated by hepatic glucose-regulating enzymes. 134: 2499-503p.

K

Klaric M. S, Kosalec I, Mastelic J, Pieckova E. & Pepeljnak S. (2006). Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris L.*) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Letters in Applied Microbiology*. 44 (1):36-42p.

Kaori K, Reiko K, Hiroshi K, Koji S. & Yasuyoshi H. (2006). *Food Sci. Technol. Res.* 12(1): 38-42p.

L

Lahlou M. (2004). *Phytotherapy Research*. 18:435-448p.

Lam L. K. T, Hasegawa S. & al. (2000). *Citrus Limonoids Functional Chemicals in Agriculture and Foods*. American Chemical Society. 185-200p.

M

Mrabet N, Lahlou H. & Benjilali B. (1999). Effect of marocan *Cistus ladaniferus* L. (rochrose) extracts on the growth of four fungi- J. Cryptogamie mycology. Maroc. 23-33p.

Mesa A. A. C, Montiel R. J, Zapata B, Durán C, Betancur G. L. & Stashenko E. (2009). Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba*.

O

Organisation Mondiale de la Santé (OMS). (1999). Monographs on selected medicinal plants. Geneva, Switzerland: OMS.

Ouis N. (2015). Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil et de persil. Thèse de doctorat de chimie organique. Université d'Oran 1, faculté des sciences exactes et appliquées, 198p.

R

Raper K. & Fennell D. J. (1965). « The genus *Aspergillus* ». Williams and Wilkins editors, Baltimore.

Rojas A, Hernandez L, Pereda M. R. & Mata R. (1992). Screening for antimicrobial activity of crude drugs extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants.35: 275-283p.

Roux D. & Catier. (2007). « Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie », 3^{ème} Edition. Porphyre. 13p.

S

Spiegel R. P. & Goldschmidt E. E. (1996). Biology of Citrus. 1^{ère} édition; Edition Cambridge University Press. 239p.

Sahin F, Gulluce M, Daferera D, Sokmen M, Polissiou M, Agar G. & Ozer H. (2004). Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *Vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*. 15: 549-557p.

Shunying Z, Yang Y, Huaidong Y, Yue Y. & Guolin Z. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. *J. Ethnopharmacol.* 96.151–158p.

Su Y. C, Ho C. L, Wang I. C. & Chang S. T. (2006). Antifungal activities and chemical compositions of essential oils from leaves of four eucalypts. *Taiwan J. For Sci.* 21: 49-61p.

Su Y. C, Lu S. Y, Ho C. L, Wang E. I. C. & Wei X. T. (2008). Composition and bioactivities of the leaf essential oils of *Cinnamomum subavenium* Miq. From Taiwan. *Journal of Essential Oil Research* .Vol. 20. 328-335p.

Silva F. & coll. (2011). Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. *J Med Microbiol.* 60: 1479-86p.

Schauenmberg P. & Paris F. (2013). Les plantes médicinales. Edition: delachaux et Niestlé, Paris.270p.

V

Vaubourdolle M. (2007). Infectiologie. 3^{ème} édition. Wolters Kluwer SA. France 1037p.

W

Wang L. & Yu J. (2005). Antioxidant activity of *Citrus* limonoids, flavonoids, and coumarins. *J. Agric. Food Chem.* 53(6): 2009p.

X

Xuetong F, Kimberly J. B & Sokorai A. (2002). *J. Agric. Food Chem.* 50:7622-7626p.

Y

Yen T. B. & Chang S. T. (2008). Synergistic effects of cinnamaldehyde in combination with eugenol against wood decay fungi. *Bioresource Technology*. 99: 232-236p.

Yang E. J, Kim S. S, Oh T. H, Baik J. S, Lee N. H. & Hyun C. G. (2009). Essential oil of citrus fruit waste attenuates LPS-induced nitric oxide production and inhibits the growth of skin pathogens. *Int. J. Agric. Biol.* 11: 791–794p.

ANNEXES

Annexe I**I. Compositions et préparations des milieux de culture****I.1 compositions :**

- **Solution d'Agar à 0,2 % :**

Agar	0,2g
Eau distillée	1000 ml

- **Eau physiologique :**

NaCl	9g
Eau distillée	1000 ml

- **Bouillon Muller-Hinton :**

Extrait de viande	2g
Hydrolysate acide	17,5g
Amidon	1,5g
Gélose	10g

- **Milieu OGA:**

Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Agar	12g

- **Bouillon nutritif :**

Peptone	10g
Extrait de viande	5g
Chlorure de sodium	5g

I.2 préparations

I.2.1 Solution d'Agar à 0,2 % :

- Dissoudre 2g de la poudre d'agar dans un litre d'eau distillée jusqu'à dissolution totale.
- Stérilisation à 120°C pendant 15-20 minutes.

I.2.2 Eau physiologique :

- Dissoudre 9g de Na Cl dans un litre d'eau distillée jusqu'à dissolution complète.
- Stérilisation à 120°C pendant 15-20 minutes.

I.2.3 Milieu OGA :

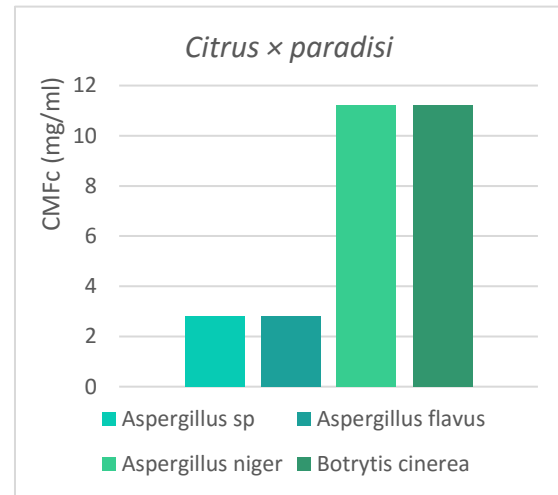
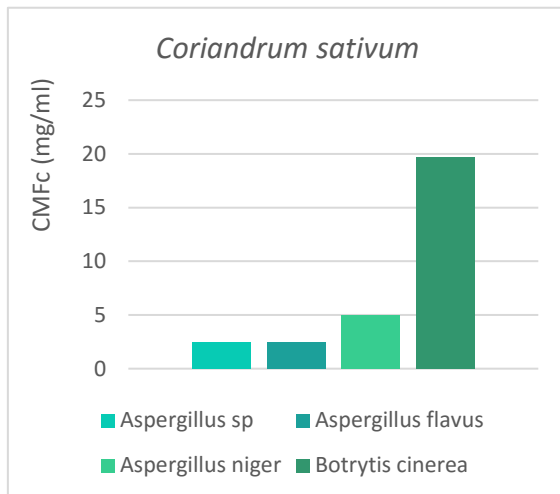
- Dissoudre 33g de la poudre d'OGA dans un litre d'eau distillée jusqu'à dissolution complète.
- Stérilisation à 120°C pendant 15-20 minutes.

I.2.4 Bouillon Muller Hinton :

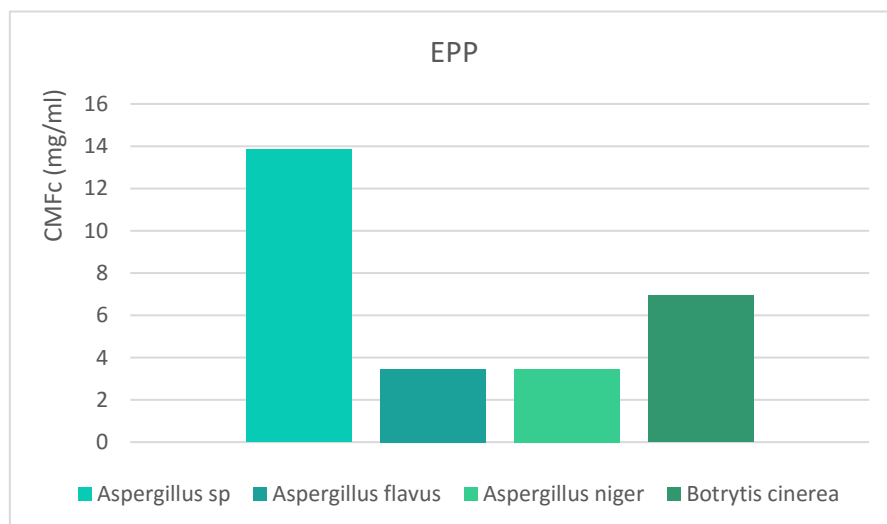
- Dissoudre 21g de la poudre dans un litre d'eau distillée jusqu'à dissolution totale.
- Stérilisation à 120 °C pendant 15-20 minutes.

Annexe II

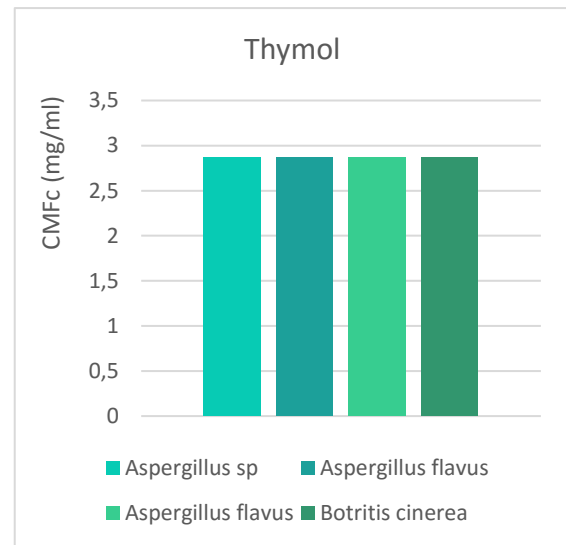
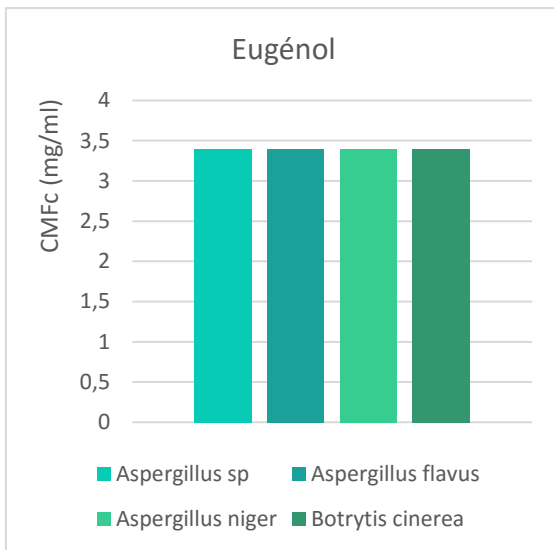
II.1 Les CMFc des deux huiles essentielles sur les quatre souches de moisissures testées.



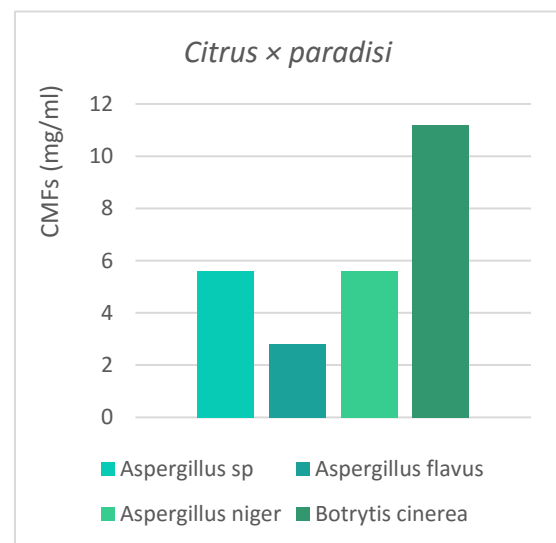
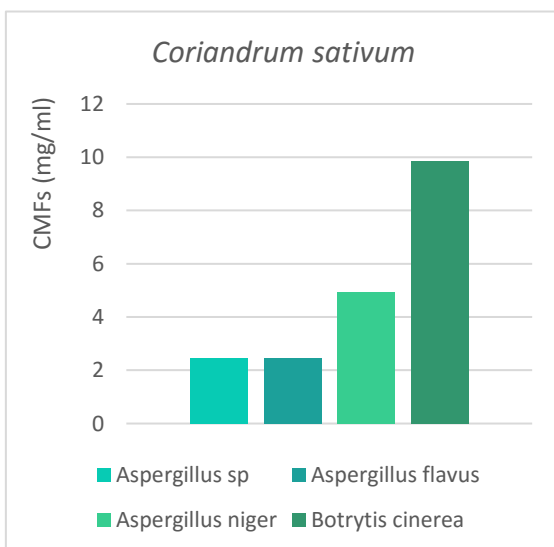
II.2 Les CMFc de l'extrait phénolique de pépins de pamplemousse (EPP) sur les différentes souches de moisissures testées.



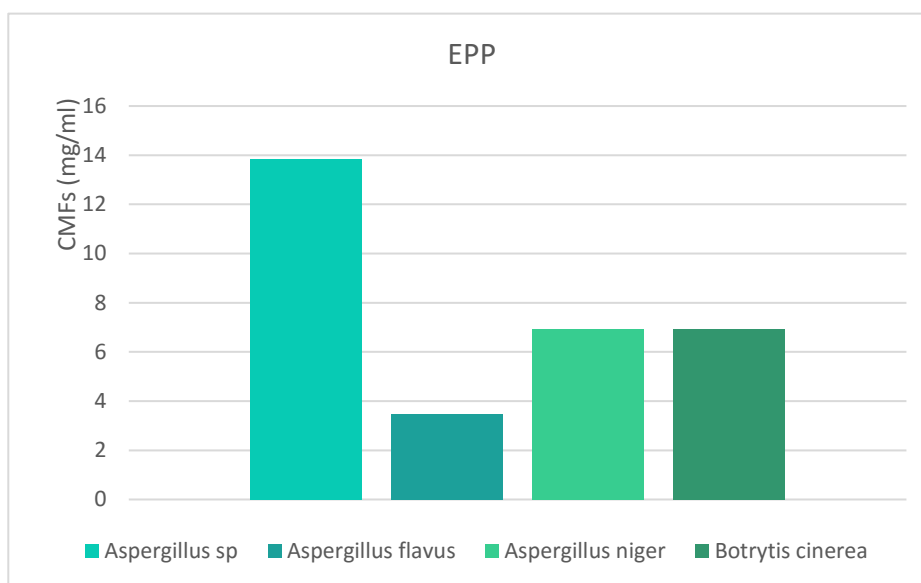
II.3 Les CMFc des deux composés majoritaires sur les quatre souches de moisissures testées.



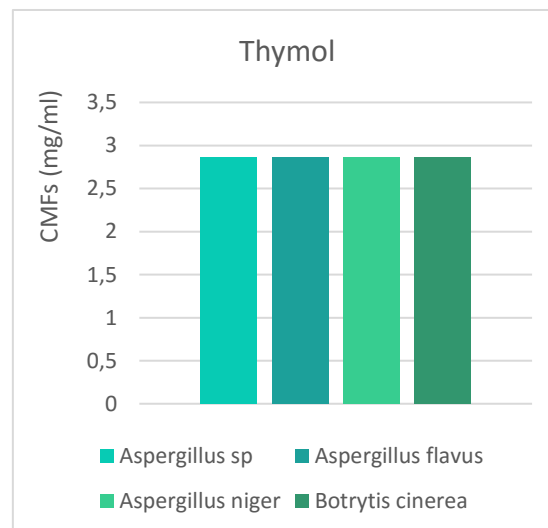
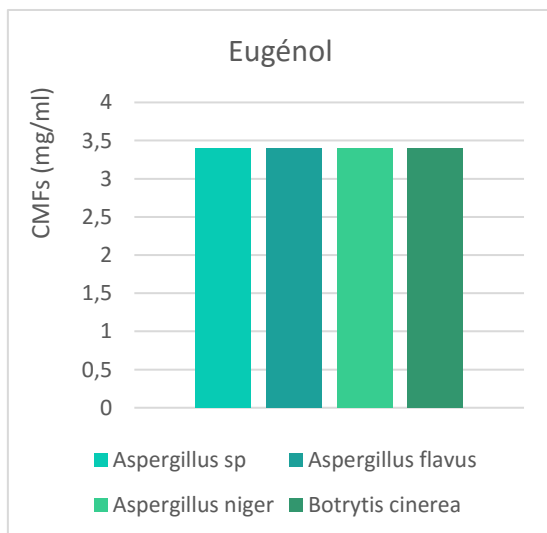
II.4 Les CMFs des deux huiles essentielles sur les quatre souches de moisissures testées.



II.5 Les CMFs de l'extrait de pépins de pamplemousses sur les quatre souches de moisissures testées.



II.6 Les CMFs des deux composés majoritaires sur les quatre souches de moisissures testées.



Résumé :

La tendance actuelle des scientifiques à chercher des antibiotiques plus naturels a augmenté durant ces dernières décennies. Plusieurs travaux de recherche ont été concentrés sur les huiles essentielles extraites des plantes médicinales et aromatiques. Dans ce contexte, nous avons essayé d'évaluer *in vitro* l'activité antifongique de l'huile essentielle extraite d'écorce de *Citrus × paradisi* et des feuilles de *Coriandrum sativum* seules, ou en association avec l'EPP et les composés majoritaires d'HE. L'extraction a été réalisée par hydrodistillation et a donné un rendement de 0,18% pour *Citrus × paradisi* et de 0,11% pour *Coriandrum sativum*. L'activité antifongique a été évaluée sur quatre souches de moisissures par la méthode de l'échiquier en milieu BMH. Les deux huiles essentielles ont montré une activité antifongique intéressante dont les CMFc varient de 2,8 à 11,21 mg/ml pour *Citrus × paradisi* et de 2,46 à 19,72 mg/ml pour *Coriandrum sativum*. La CMFs s'est avérée aussi intéressante. L'association des huiles essentielles entre elles ou avec l'EPP et les composés majoritaires a donné divers effets dont la synergie est observée vis-à-vis de la même souche *Botrytis cinerea*.

Mots clés : *Citrus × paradisi*, *Coriandrum sativum*, huiles essentielles, EPP, thymol, eugénol, activité antifongique, association, méthode de l'échiquier.

Abstract:

The current trend of scientists seeking more natural antibiotics is increased during recent decades. Several research studies have been concentrated on essential oils extracted from aromatic and medicinal plants. In this context, we have tried to evaluate *in vitro* antifungal activity of essential oil extracted from bark of *citrus × paradisi* and leaves of *coriandrum sativum* alone or in association with the EPP and the majority Essential oil compounds. The extraction was performed by hydrodistillation and gave a performance of 0.18% for *citrus × paradise* and 0.11% for *coriandrum sativum*. Antifungal activity was evaluated on four strains of mold by the method of the Exchequer BMH mid-week. Two essential oils showed interesting antifungal activity which the CMFc range from 2.8 to 11.21 mg/ml for *citrus × paradisi* and 2.46 to 19.72 mg/ml for *coriandrum sativum*. The CMFs was also interesting. The association of essential oils, or with the EPP and the majority compounds gave various effects which the synergy is observed with the same strain of *botrytis cinerea*.

Key words: *citrus × paradisi*, *coriandrum sativum*, essential oils, EPP, thymol, eugenol, antifungal activity, association, method of the Exchequer.