

Composition chimique et activité antifongique *in vitro* des huiles essentielles de *Citrus* sur la croissance mycélienne de *Phaeoramularia angolensis*

Pierre Michel Jazet Dongmo^a, Jean Kuate^{b*}, Fabrice Fekam Boyom^c, Daniel Ducelier^b, François Damesse^b, Paul Henri Amvam Zollo^a, Chantal Menut^d, Jean Marie Bessiere^d

^a Université de Douala,
Faculté des Sciences,
BP 24157,
Douala,
Cameroun

^b Institut de recherches
agricoles pour le
développement (Irad),
BP 2067,
Yaoundé,
Cameroun

^c Université de Yaoundé I,
Faculté des sciences,
BP 812,
Yaoundé,
Cameroun

^d Université de Montpellier II,
34095 Montpellier,
France

Chemical composition and *in vitro* antifungal activity against *Phaeoramularia angolensis* of *Citrus* essential oils.

Abstract — Introduction. That essential oil extracts have antiviral, antibacterial and antifungal properties has been known for a long time. The work presented thus sought to evaluate the effect of oils extracted from various citrus varieties on the *in vitro* mycelial growth of *Phaeoramularia angolensis*, a fungus responsible for the phaeoramulariosis of *Citrus*. **Materials and methods.** The essential oils extracted by hydrodistillation from the fruit pericarps of six *Citrus* varieties were analyzed to determine their chemical composition and to evaluate their antifungal activity regarding *P. angolensis*. The extract activity was studied *in vitro* using the incorporation technique described by Grover and Moore. The oils were analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry. **Results.** The growth of *P. angolensis* was inhibited by the essential oil extracts by various degrees, with a more marked activity for oils from *Citrus latifolia* and *C. limon*. The chemical composition analysis showed that the most active have a relatively high citral content (geranial + neral > 5%). This agrees with the fact that citrals are known to have antifungal properties. **Conclusion.** These preliminary results are all the more interesting since *C. latifolia* and *C. limon* are known to be tolerant to *P. angolensis* in the field. The probable role of essential oils in varietal resistance regarding *P. angolensis* is discussed. Further studies on this topic will contribute to a better understanding of the host-parasite relationships.

Cameroun / *Citrus* / disease control / *Phaeoramularia* / essential oils / chemical composition / antifungal properties

Composition chimique et activité antifongique *in vitro* des huiles essentielles de *Citrus* sur la croissance mycélienne de *Phaeoramularia angolensis*.

Résumé — Introduction. Les extraits d'huiles essentielles possèdent des propriétés antivirales, antibactériennes et antifongiques connues de longues dates. Le travail présenté a donc cherché à évaluer l'effet d'huiles extraites de différentes variétés d'agrumes sur la croissance mycélienne *in vitro* de *Phaeoramularia angolensis*, champignon responsable de la phaeoramulariose des *Citrus*. **Matériel et méthodes.** Les huiles essentielles extraites par hydrodistillation des péricarpes de fruits de six variétés d'agrumes ont été analysées pour en déterminer la composition chimique et évaluer leur activité antifongique vis-à-vis de *P. angolensis*. L'activité des extraits a été évaluée *in vitro* par la technique d'incorporation décrite par Grover et Moore. Les huiles ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. **Résultats.** La croissance de *P. angolensis* a été inhibée par les huiles essentielles à des degrés variés, avec une activité plus prononcée pour les huiles issues de *C. latifolia* et de *C. limon*. L'analyse de la composition chimique des huiles testées a montré que les plus actives ont une teneur relativement importante en citrals (néral + géranial > 5 %), ce qui s'accorde avec l'existence de propriétés antifongiques connues chez les citrals. **Conclusion.** Ces résultats préliminaires sont d'autant plus intéressants que *C. limon* et *C. latifolia* sont des variétés réputées peu sensibles à la phaeoramulariose en conditions naturelles. Le rôle probable des huiles essentielles dans la résistance variétale vis-à-vis de *P. angolensis* est discuté. La poursuite de ces recherches contribuera à une meilleure compréhension des relations hôte-parasite.

* Correspondance et tirés à part

Reçu le 19 décembre 2000
Accepté le 27 septembre 2001

Fruits, 2002, vol. 57, p. 95–104
© 2002 Cirad/EDP Sciences
All rights reserved
DOI: 10.1051/fruits:2002009

RESUMEN ESPAÑOL, p. 104

Cameroun / *Citrus* / contrôle de maladies / *Phaeoramularia* / huile essentielle / composition chimique / propriété antifongique

1. Introduction

Les agrumes appartiennent à la famille des rutacées et correspondent aux espèces exploitées chez les genres *Citrus*, *Fortunella* et *Poncirus*. Dans certaines conditions écologiques, ils sont la cible de nombreux parasites. En Afrique tropicale, la phaeoramulariose (cercosporiose) des agrumes provoquée par un champignon, *Phaeoramularia angolensis*, constitue une sérieuse contrainte de production. Les fruits dépréciés peuvent représenter 50 à 100 % de la récolte en zone de forte incidence de la maladie [1, 2].

Des essais de lutte chimique menés après apparition de cette maladie au Cameroun ont montré l'efficacité des produits à base de cuivre ainsi que des fongicides du groupe des benzimidazoles. Les benzimidazoles se sont révélés plus efficaces que les produits cupriques et surtout les triazoles alors utilisés dans la lutte contre les cercosporioses des bananiers [3, 4]. Malgré ces résultats, la lutte chimique constitue une approche difficile à mettre en œuvre pour plusieurs raisons :

- coûts élevés des fongicides, surtout après la dévaluation du franc CFA et le désengagement de l'État qui, jadis, subventionnait les intrants agricoles,
- risque de pollution de l'environnement,
- difficultés pratiques liées au fait qu'il s'agit en général d'arbres isolés, dispersés autour des cases et qu'il serait nécessaire, en outre, d'utiliser un appareillage complexe pour atteindre les frondaisons élevées (plants de semis),
- risque d'apparition de souches résistantes aux benzimidazoles, ce qui a déjà été observé dans d'autres pathosystèmes : *Mycosphaerella* sp. / bananier [5], *Colletotrichum gloeosporioides* / manguier [6], *Venturia* sp. / pommier, *Botrytis* sp. / betterave, *Cercospora* sp. / arachide et céleri [7].

Face aux effets indésirables des pesticides chimiques, d'importantes recherches ont été réalisées ces dernières années sur l'effet de divers extraits végétaux en général et des huiles essentielles en particulier comme moyen potentiel de contrôle naturel

des micro-organismes parasites [8–12]. Il a pu s'agir de simples décoctions végétales [13], de jus de fruits [14] ou d'huiles essentielles extraites par différents procédés.

Dans le cas des huiles essentielles, cette démarche s'appuie sur le fait que ces extraits possèdent des propriétés antivirales, antibactériennes et antifongiques connues de longues dates [15–17]. C'est ainsi que, lors de travaux relatifs à la biologie *in vitro* de *P. angolensis*, des inhibitions de croissance mycélienne observées sur milieu obtenu à partir d'extraits de peau de fruits d'agrumes ont pu être attribuées à l'action des huiles essentielles contenues dans la peau de fruits utilisée pour confectionner ce substrat [18]. Les espèces et variétés d'agrumes présentant vis-à-vis de cet agent pathogène des niveaux de résistance variables [4, 19], ces huiles pourraient peut-être constituer une composante de la résistance variétale. Il a donc semblé intéressant d'évaluer l'effet d'huiles extraites de différentes variétés d'agrumes sur la croissance mycélienne *in vitro* de *P. angolensis*. Le travail présenté a ainsi permis d'étudier l'effet des huiles issues de six variétés d'agrumes de sensibilité différente et d'en analyser la composition chimique.

2. Matériel et méthodes

2.1. Obtention et analyse des extraits

Les expérimentations ont porté sur lime Tahiti (*Citrus latifolia*, var. Tahiti), oranger Valencia Late (*C. sinensis*, var. Valencia-late), pomelo Reed (*C. paradisi*, var. Reed), citronnier Eurêka (*C. limon*, var. Eurêka), pamplemoussier Reinking (*C. grandis*, var. Reinking) et satsuma Saint-Jean (*C. unshiu*, var. Saint-Jean) présents dans le verger de l'Institut de recherches agricoles pour le développement (Irad) de Nkolbisson à Yaoundé (Cameroun). Ces variétés ont été choisies parce qu'elles sont de sensibilités différentes vis-à-vis de la phaeoramulariose : peu sensibles en ce qui concerne le pamplemoussier, le satsuma Saint-Jean, la lime Tahiti et le citronnier Eurêka ; sensible dans le cas de l'oranger Valencia Late ; très sensible pour le pomelo Reed.

Le matériel végétal utilisé a été constitué de la peau de fruits récoltés en début de maturité (ramollissement de la peau). Les huiles essentielles ont été extraites par la méthode d'hydrodistillation à l'aide d'un appareillage de type Clevenger. L'analyse de la composition chimique a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et confirmée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM).

La CPG a été faite avec un appareil de marque Shimadzu GC-14A muni de deux colonnes capillaires en silice fondue (25 m de long et 0,25 mm de diamètre), de polarité différente (OV101, apolaire et Carbowax 20 M, polaire), à programmation de température de (50 à 200) °C, à raison de 5 °C.min⁻¹.

Le couplage CPG/SM a été réalisé avec un appareil Hewlett Packard (modèle 5970), à colonne capillaire type DB1 (25 m de long et 0,23 mm de diamètre), à programmation de température de (50 à 250) °C, gradient de 4 °C.min⁻¹ et voltage de 70 eV.

Les composés ont été identifiés d'après leur indice de rétention sur les deux types de colonnes et leurs spectres de masse. Les pourcentages relatifs ont été calculés par la méthode des aires (Intégrateur Shimadzu modèle C-R4A).

2.2. Évaluation biologique

Pour évaluer l'activité des huiles essentielles sur la croissance mycélienne de *P. angolensis*, nous avons utilisé la technique d'incorporation décrite par Grover et Moore [20]. Les huiles essentielles ont été diluées dans du diméthylsulfoxyde dans les proportions 1/9 (v/v) et sept concentrations de ces huiles ont été testées vis-à-vis de *P. angolensis*: (500, 1000, 2000, 2500, 3000, 4000 et 5000) µL.L⁻¹.

Pour tester ces différents extraits, une souche de *P. angolensis* isolée à partir des péricarpes de fruits de *C. sinensis* var. Hamlin a été utilisée. À partir d'une culture âgée de 15 j sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar), des explants de 3 mm de diamètre ont été prélevés et déposés sur milieu PDA

dans des boîtes de Pétri de 55 mm, à raison de six boîtes par dose. Les boîtes scellées ont été incubées à l'obscurité à 22 °C.

L'évaluation de l'inhibition a été faite tous les 10 j en mesurant le diamètre moyen des colonies fongiques au travers du fond extérieur des boîtes suivant deux directions perpendiculaires et constantes. Le champignon se développant très lentement, les observations ont duré 50 j. Il a alors été possible de calculer les pourcentages d'inhibition pour les différentes concentrations d'extraits d'huiles essentielles en appliquant la formule : $P_i = [(d_t - d_e) / d_t] \times 100$, où P_i est le pourcentage d'inhibition ; d_t , le diamètre de la colonie fongique dans la boîte témoin ; d_e = diamètre de la colonie fongique dans le traitement à l'huile essentielle.

Les données ont été analysées par la méthode de Duncan au seuil de 5 %. Les concentrations minimales inhibitrices (cmi) des différentes huiles ont été évaluées en µL.L⁻¹. Seuls ont été considérés comme actifs les extraits ayant une (cmi) inférieure à 5 000 µL.L⁻¹.

3. Résultats et discussion

L'analyse de la composition chimique des six extraits nous a permis d'identifier au total 76 composés (*tableau 1*). L'analyse montre que les monoterpènes représentent de loin les composés majeurs de ces huiles essentielles avec des teneurs comprises entre (89,8 et 99,08) %. Le limonène est en général le composé le plus abondant avec des teneurs variant de (23,54 à 86,6) %.

La somme des teneurs des composés tels que le citral a et le citral b, aux propriétés antimicrobiennes connues et qui ont entre eux une filiation biogénétique directe, a été de 5,45 %, 6,49 %, 0,76 %, 0 %, 0,66 % et 0,22 %, pour les essences de *C. latifolia*, *C. limon*, *C. sinensis*, *C. paradisi*, *C. grandis* et *C. unshiu*, respectivement.

L'analyse des résultats obtenus par utilisation d'une gamme de concentrations en huiles essentielles variant de (500 à 5000) µL.L⁻¹ a montré qu'à 500 µL.L⁻¹, la

Tableau I.

Composition chimique fonctionnelle (%) des huiles essentielles de six espèces d'agrumes du genre *Citrus* cultivées à Nkolbisson (Yaoundé). Extraction par hydrodistillation et analyse par chromatographie en phase gazeuse.

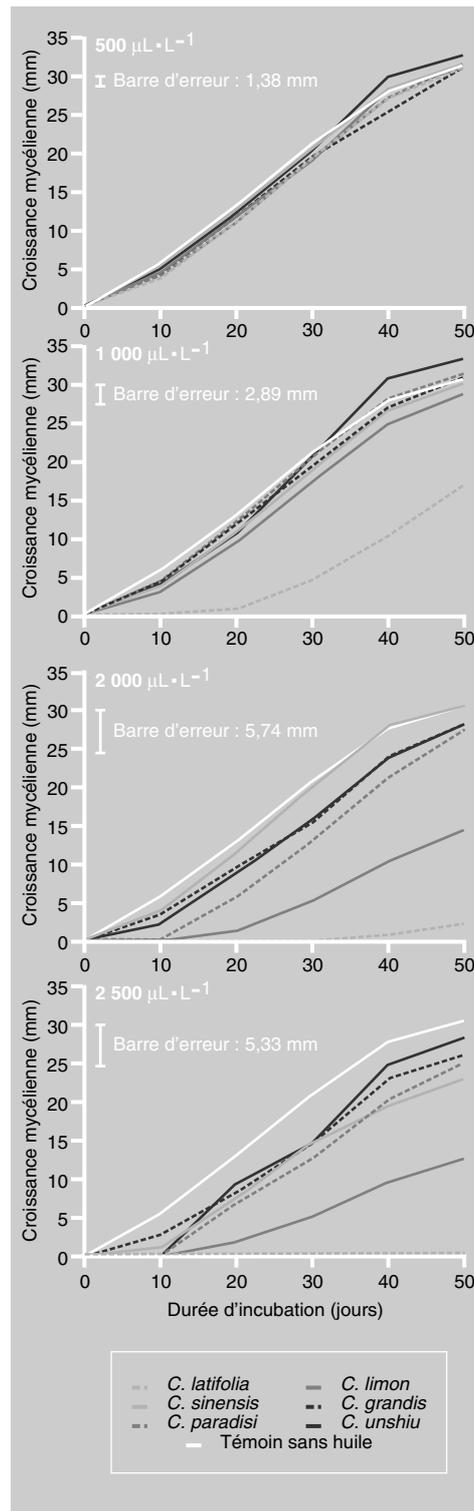
Composés	<i>C. latifolia</i> var. Tahiti	<i>C. limon</i> var. Euréka	<i>C. sinensis</i> var. Valencia Late	<i>C. paradisi</i> var. Reed	<i>C. grandis</i> var. Reinking	<i>C. unshiu</i> var. Satsuma Saint-Jean
Monoterpènes	97,02	98,4	97,12	89,87	96,67	99,08
Monoterpènes hydrocarbonés	81,06	79,07	91,73	30,38	76,84	95,64
α-thuyiène	0,44	0,24	0,06	–	0,21	0,12
α-pinène	1,64	1,20	0,56	–	0,95	0,50
Camphène	0,05	0,05	traces	–	–	–
Sabinène	1,28	1,23	4,98	6,84	3,72	0,26
β-pinène	11,18	9,74	0,42	–	1,65	0,42
Myrcène	1,25	1,34	1,50	–	1,46	1,89
α-phellandrène	–	0,03	0,06	–	–	–
Δ ³ -carène	–	0,04	0,64	–	0,24	–
α-terpinène	–	–	0,06	–	–	–
P-cymène	5,54	2,93	0,18	–	8,10	2,22
Limonène	46,41	56,99	82,36	23,54	60,33	86,64
E-β-ocimène	0,10	0,19	0,57	–	–	0,14
γ-terpinène	12,54	4,79	0,22	–	–	3,37
Terpinolène	0,63	0,30	0,12	–	0,18	0,08
Monoterpènes oxygénés	15,96	19,33	5,39	59,49	19,83	3,44
Hydrate de sabinène	–	–	0,29	3,26	–	0,13
Oxyde de linalol-2	–	–	–	–	0,21	–
Linalol	0,74	1,29	2,18	30,92	1,54	1,33
Z-P-menthène-2 ol-1	–	0,09	–	–	0,51	–
Oxyde de limonène-1	0,09	0,11	0,07	–	1,85	0,09
Oxyde de limonène-2	0,05	0,12	–	–	1,06	–
Terpinen 1-ol	–	0,08	–	–	–	–
Camphre	0,07	0,05	–	–	0,19	–
Isopulégol	0,06	0,14	0,11	–	–	0,06
Menthone	–	0,03	–	–	–	–
α-terpinéol	0,07	0,09	–	–	–	–
Bornéol	–	–	0,04	–	0,67	–
Terpinen 4-ol	0,95	1,88	0,64	6,80	0,82	0,41
Myrténal	–	0,04	–	–	–	–
α-terpinéol	1,47	2,92	0,48	9,18	1,32	0,80
P-cymen 8-ol	0,06	0,11	–	–	0,30	–
γ-terpinéol	0,11	–	0,23	–	0,66	0,10
Verbénone	0,05	0,04	–	–	–	–
Carvéol	–	0,03	–	–	1,06	–
Citronellol	0,05	–	–	–	0,17	–
Néral (cital b)	1,56	1,06	0,15	–	0,47	0,06
Nérol	3,10	4,26	0,52	4,57	1,23	0,23
Acétate de myrtényle	–	–	–	–	0,15	–
Géranol	1,55	0,58	0,07	4,76	0,14	–

Tableau I.
 (Suite).

Composés	<i>C. latifolia</i> var. Tahiti	<i>C. limon</i> var. Eureka	<i>C. sinensis</i> var. Valencia Late	<i>C. paradisi</i> var. Reed	<i>C. grandis</i> var. Reinking	<i>C. unshiu</i> var. Satsuma Saint-Jean
Géranial (citral a)	3,89	5,43	0,61	0	0,19	0,16
Acétate de linalyle	–	–	–	–	0,16	–
Acétate de bornyle	–	–	–	–	0,29	–
Thymol	–	0,04	–	–	1,43	0,06
Acétate de pinyle	–	0,07	–	–	1,05	–
Cinnamaldéhyde	–	–	–	–	0,93	0,06
Acétate de ceytonellyle	0,05	0,05	–	–	–	–
Acétate de terpényle	1,56	0,56	–	–	1,62	0,06
Acétate de néryle	–	–	–	–	0,27	–
Acétate de géranyle	0,38	0,26	–	–	1,54	–
Sesquiterpènes	2,57	1,13	0,66	4,54	1,05	0,78
Sesquiterpènes hydrocarbonés	2,28	0,99	0,48	4,54	0,87	0,78
δ-élémente	0,07	0,06	–	–	0,69	–
α-ubébène	–	–	–	–	0,18	–
α-copaène	–	–	–	4,54	–	0,65
β-élémente	0,08	–	0,24	–	–	0,07
β-caryophyllène	0,28	0,23	0,16	–	–	–
(E,E) α-bergamotène	0,56	0,17	–	–	–	–
Z-β-farnésène	0,05	–	–	–	–	–
E-β-farnésène	–	–	0,04	–	–	–
α-humulène	–	–	0,04	–	–	–
Germacrène D	0,06	–	–	–	–	–
Bicyclogermacrène	0,10	0,24	–	–	–	–
(E,E) α-farnésène	0,15	–	–	–	–	0,06
β-bisabolène	0,85	0,29	–	–	–	–
Germacrène B	0,08	–	–	–	–	–
Sesquiterpènes oxygénés	0,29	0,14	0,18	–	0,18	–
Globulol	–	0,03	–	–	–	–
Spathuléol	0,06	–	–	–	0,18	–
β-eudesmol	0,10	0,04	–	–	–	–
(Z,Z) farnésol	0,06	0,03	–	–	–	–
β-sinensal	0,07	0,04	0,12	–	–	–
α-sinensal	–	–	0,06	–	–	–
Composés linéaires	0,18	0,20	2,00	5,54	0,71	–
Z-3-hexenol	0,09	–	0,04	–	–	–
Méthylhepténone	0,09	0,20	–	–	–	–
Octanal	–	–	1,90	–	–	–
Octanol	–	–	–	5,54	0,42	–
Décénol	–	–	–	–	0,29	–
Décanol	–	–	0,06	–	–	–
C.A.	–	0,03	0,06	–	0,23	–
Méthylnaphtalène-1	–	0,03	0,06	–	0,23	–

Figure 1.

Effet *in vitro* de différentes doses d'huiles essentielles extraites des fruits de six espèces du genre *Citrus*, sur la croissance mycélienne de *Phaeoramularia angolensis*. Doses testées : (500, 1000, 2000 et 2500) $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$. L'erreur correspond à la moyenne des écart-types.



dose d'huile est trop faible pour réduire de façon notable la croissance mycélienne (*figure 1*). À cette dose, il n'y a donc pas eu de différences significatives au seuil de 5 % entre les traitements. La situation a été tout autre à 1 000 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ (*figure 1*) : l'huile extraite de la peau de lime Tahiti a alors réduit significativement la croissance mycélienne qui n'a démarré que 20 à 30 j après la mise en culture. De même, à 2000 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ (*figure 1*), les huiles issues de limes Tahiti et de citrons Eurêka ont montré une activité inhibitrice assez prononcée vis-à-vis de *P. angolensis*. En particulier, l'extrait de lime Tahiti n'a permis un léger développement mycélien que vers la fin de l'expérimentation, soit au bout de (40 à 50) j.

Entre (2500 et 3000) $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ (*figures 1, 2*), la croissance mycélienne a été nulle sur les extraits de lime Tahiti et très faible pour les huiles du citron Eurêka. À partir de 4000 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ (*figure 2*), la croissance mycélienne n'a commencé qu'après au moins 10 j d'incubation pour les extraits étudiés. Quelle que soit la variété d'agrumes, l'effet inhibiteur des huiles a donc augmenté dans le même sens que les doses testées.

Les pourcentages d'inhibition mesurés à l'issue de 50 j d'incubation de *P. angolensis* en présence de différentes concentrations des six types d'huiles essentielles étudiées ont montré que les extraits d'huiles essentielles de *C. latifolia* et de *C. limon* étaient particulièrement actifs vis-à-vis du champignon avec 100 % d'inhibition dès 2500 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ pour la première espèce et dès 4000 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ pour la seconde (*figure 3*). À de telles concentrations, les autres essences ont exercé une activité inhibitrice variant de (32 à 72) %. Il est intéressant de remarquer que les deux essences qui se révèlent très actives sont issues de variétés peu sensibles à la phaeoramulariose en conditions naturelles. Des résultats similaires avaient été obtenus avec des huiles issues d'oranges (*C. sinensis*) contre *Aspergillus flavus* avec 60 % d'inhibition à 3000 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ [9]. Par ailleurs, l'effet de l'huile de citron (*C. limon*) a été observé contre *Trichophyton mentagrophytes* (900 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$), *Epidermophyton floccosum* et *Microspora gypseum* (1 000 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$) [10].

En confrontant la mesure des pourcentages d'inhibition et la composition

chimique des extraits étudiés, il apparaît que les deux essences les plus actives ont eu les teneurs en citrals les plus élevées (5,45 % pour *C. latifolia* et 6,49 % pour *C. limon*) (tableau II). Compte tenu des propriétés antimicrobiennes et antifongiques connues chez ces composés [21], il serait possible de leur attribuer l'activité inhibitrice observée. Il peut être constaté, par ailleurs, que l'essence de *C. paradisi* qui est une variété très sensible à la maladie n'a pratiquement pas présenté de citral dans l'échantillon d'huiles essentielles analysé.

Inversement aux faits qui viennent d'être relevés, les huiles essentielles de *C. grandis* et *C. unshiu*, qui sont deux espèces tolérantes à la phaeoramulariose, ont montré peu d'effet *in vitro* sur la croissance mycélienne de *P. angolensis*. Leur faible teneur en citral, de (0,67 et 0,22) % respectivement, ne saurait totalement expliquer leur comportement variétal dans la mesure où *C. sinensis* qui a eu une teneur en citral légèrement plus élevée (0,76 %) est en revanche beaucoup plus sensible à la maladie que *C. grandis*. Par ailleurs, le β -pinène qui est un monoterpène hydrocarboné a été environ 7 à 20 fois plus présent dans les extraits de *C. latifolia* et de *C. limon* que dans ceux des autres variétés (tableau I). D'un autre côté, certains composés comme le sabinène ont été beaucoup plus représentés dans les extraits de *C. sinensis* (variété sensible) et de *C. paradisi* (variété très sensible) que dans les autres variétés d'agrumes peu sensibles à la maladie. Ainsi, le sabinène a été de l'ordre de 19 à 26 fois plus présent dans les extraits de *C. sinensis* et *C. paradisi*, respectivement, que dans ceux de *C. unshiu* (variété peu sensible). Ce composé pourrait donc jouer un rôle dans la sensibilité variétale.

Il ne serait pas impossible, cependant, que l'inhibition soit le fait de certains composés plus faiblement représentés et agissant isolément ou de manière synergique avec d'autres substances. Par ailleurs, il convient de noter que ces résultats obtenus *in vitro* ne reflètent pas nécessairement ce qui se passe *in vivo*. Des modifications importantes peuvent en effet survenir pendant ou après l'extraction des huiles essentielles [17]. Par exemple, au champ, d'autres

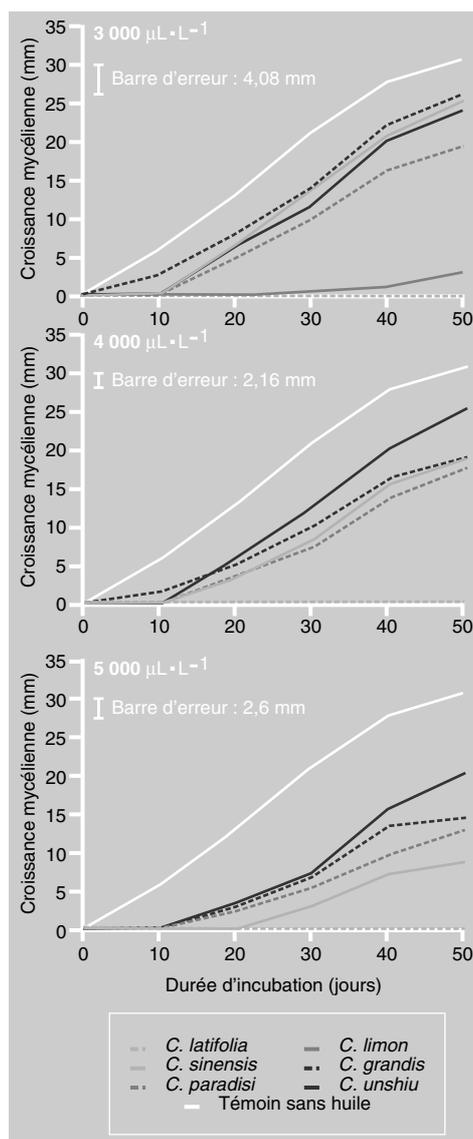


Figure 2. Effet *in vitro* de différentes doses d'huiles essentielles extraites des fruits de six espèces du genre *Citrus*, sur la croissance mycélienne de *Phaeoramularia angolensis*. Doses testées : (3 000, 4 000 et 5 000) $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$. L'erreur correspond à la moyenne des écart-types.

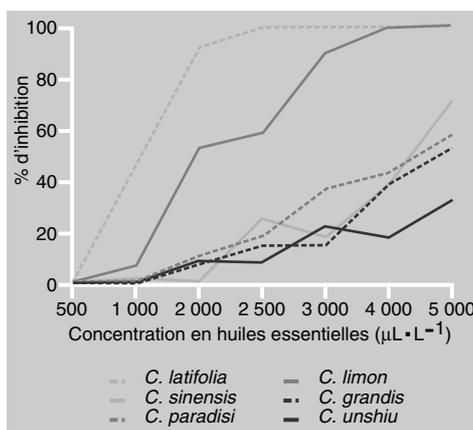


Figure 3. Évolution du pourcentage d'inhibition vis-à-vis de *Phaeoramularia angolensis* d'huiles essentielles extraites des fruits de six espèces du genre *Citrus*, en fonction de différentes doses testées.

Tableau II.Relation entre les activités antifongiques des huiles essentielles de six variétés d'agrumes du genre *Citrus* et leur composition en citrals (Yaoundé, Cameroun).

Espèces classées par ordre décroissant d'activité antifongique	Néral (%)	Géranial (%)	Total composés actifs (%)
<i>C. latifolia</i> var. Tahiti	1.56	3.89	5.45
<i>C. limon</i> var. Eurêka	1.06	5.43	6.49
<i>C. sinensis</i> var. Valencia Late	0.15	0.61	0.76
<i>C. paradisi</i> var. Reed	–	–	0
<i>C. grandis</i> var. Reinking	0.47	0.19	0.67
<i>C. unshiu</i> var. Satsuma Saint-Jean	0.06	0.16	0.22

composés préformés ou induits du type phytoalexines lors des interactions hôte-parasite pourraient agir. De plus, dans les fruits approchant la maturité, il pourrait y avoir une activité accrue des enzymes de dégradation (chitinases, glucanases, etc.) qui seraient susceptibles de contribuer aux effets observés. Nos résultats ne permettent donc pas d'établir une relation de causalité entre les extraits d'huiles essentielles et les effets observés. Beaucoup de recherches devront être encore menées dans ce domaine pour savoir si les huiles essentielles jouent un rôle effectif dans les relations hôte-parasite au champ. À partir de plusieurs autres espèces d'agrumes, il sera intéressant par exemple de rechercher l'existence éventuelle d'une corrélation entre l'activité *in vitro* des huiles et le degré de sensibilité vis-à-vis de *P. angolensis* des cultivars dont ces huiles sont issues. Dans cette perspective, outre la croissance mycélienne, d'autres paramètres comme la sporulation (production de conidies) et la germination de ces conidies pourraient être pris en compte. L'action séparée des principaux composés sur le développement de *P. angolensis* est un autre axe important de recherches qui seront intéressantes à poursuivre pour pouvoir répondre aux nombreuses questions qui se posent.

4. Conclusion

L'analyse de la composition chimique des huiles essentielles extraites de péricarpes

frais de six variétés d'agrumes a permis d'identifier 76 composés en majorité hydrocarbonés. L'activité dépressive de ces extraits d'huiles sur la croissance mycélienne de *P. angolensis* a été évaluée. Les extraits les plus actifs se sont révélés beaucoup plus riches que les autres en citral et en β -pinène, ce qui est en accord avec les propriétés antimicrobiennes connues chez les citrals. D'autres composés (sabinène) ont été beaucoup plus présents chez les deux variétés sensibles étudiées. Cette étude ne permet pas cependant de conclure sur le rôle des huiles essentielles dans les comportements variétaux vis-à-vis de *P. angolensis* étant donné que, dans les extraits étudiés, d'autres métabolites agissant isolément ou en synergie auraient pu intervenir. Par ailleurs, il serait utile d'étudier l'action séparée, sur *P. angolensis*, des différents composés identifiés dans les extraits d'huiles essentielles analysés. Notre étude souligne cependant l'intérêt de poursuivre des travaux dans ce domaine afin de parvenir à une meilleure compréhension des relations hôte-parasite.

Remerciements

L'extraction des huiles ainsi que les études *in vitro* sur la croissance mycélienne ont été réalisées avec l'appui du Projet FAC-Recherche fruits et légumes de L'IRAD. Toute l'équipe du verger de Nkolbisson est remerciée pour sa collaboration. Les auteurs remercient tous ceux qui ont aidé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Références

- [1] Seif A.A., Hillocks R.J., Phaeoramularia, fruit and leaf spot of *Citrus* with special reference to Kenya, *Int. J. Pest Manage.* 39 (1993) 44–50.
- [2] Kuate J., Bella Manga, Fouré É., Rey J.Y., Symptômes de la cercosporiose des agrumes due à *Phaeoramularia angolensis*, *Fruits* 49 (1994) 31–36.
- [3] Rey J.Y., Ducelier D., Njonga B., Maladies et ennemis des agrumes, Mesres, Ira, Yaoundé, Cameroun, 1986, pp. 7–9.
- [4] Rey J.Y., Njonga B., Damesse F., Fouré É., Sensibilité variétale à la cercosporiose et premiers résultats des tests fongicides dans la province du Centre Cameroun, Cirad-Irfa, Réunion annuelle Agrumes, doc. interne n° 20, Montpellier, France, 1988.
- [5] Romero R.A., Control of black leaf streak of banana, in: Jones D.R. (Ed.), *Diseases of banana, abaca and enset*, CABI, UK, 1999, pp. 72–79.
- [6] Arauz L.F., Mango anthracnose: economic impact and current options for integrated management, *Plant Dis.* 84 (6) (2000) 600–611.
- [7] Delp C.J., Benzimidazole and related fungicides, in: Horst Lyr (Ed.), *Modern selective fungicides – Properties, application, mechanisms of action*, Gustav Fisher Verlag (CVH), 1995, pp. 291–322.
- [8] Kishore N., Mishra A.K., Chansouria J.P.N., Fungitoxicity of essential oils against dermatophytes, *Mycoses* 36 (1992) 211–215.
- [9] Mishra A.K., Dubey N.K., Evaluation of some essential oils, their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities, *Appl. Environ. Microb.* 60 (4) (1994) 1101–1105.
- [10] Misra N., Batra S., Mishra D., Fungitoxic properties of the essential oil of *Citrus limon* (L.) Burm. against a few dermatophytes, *Mycoses* 31 (7) (1988) 380–382.
- [11] Onawunmi G.O., Yisak W., Ogunlana E.O., Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) stapf, *J. Ethnopharmacol.* 12 (1984) 279–286.
- [12] Siddiqui R.R., Ahmad H., Shakoob Ch.S., Ehteshamuddin A.F.M., Shirreen S., Antimicrobial activity of essential oils. Part II, *Pakistan J. Sci. Ind. Res.* 39 (1 4) (1996) 43–47.
- [13] Afzal Akhtar M., Rahber-Bhatti M.H., Aslam M., Antimicrobial activity of plant decoctions against *Xanthomonas campestris* pv. *citri* on detached citrus leaves, *Trop. Agr. (Trinidad)* 74 (3) (1997) 226–228.
- [14] Dalsgaard A., Reichert P., Mortensen H.F., Sandström A., Kofoed P.-E., Larsen J.L., Molbak K., Application of lime (*Citrus aurantifolia*) juice to drinking water and food as a cholera-preventive measure, *J. Food Protect.* 60 (11) (1997) 1329–1333.
- [15] Baratta M.T., Dorman H.J.D., Deans S.G., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Ruberto G., Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils, *Flavour Frag. J.* 13 (4) (1998) 235–244.
- [16] Berahia T., Comportement couplage chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse et activité antioxydante de polyméthoxyflavones. Application aux huiles essentielles de *Citrus sinensis*, Univ. Droit Econ. Sci. Aix-Marseille, thèse, Marseille, France, 1993, 183 p.
- [17] Violon C., Activités antibactériennes et antifongiques de quelques huiles essentielles végétales et de leurs constituants principaux. Application au respect de l'équilibre de la microflore de tissus cutanés et muqueux, Univ. Franche-Comté, thèse, France, 1993, 95 p.
- [18] Kuate J., La cercosporiose des agrumes due à *Phaeoramularia angolensis* (De Carvalho & O. Mendes) P.M. Kirk. Epidémiologie, biologie *in vitro* du champignon et relations hôte-parasite, Univ. Dschang/CARFOP, thèse, Dschang, Cameroun, 1997, 184 p.
- [19] Bella Manga, Dubois C., Kuate J., Mimbimi Ngbwa M., Rey J.Y., Sensibilité à *Phaeoramularia angolensis* de divers groupes d'agrumes cultivés en zone forestière humide du Cameroun, *Fruits* 54 (3) (1999) 167–176.
- [20] Grover R.K., Moore J.D., Toximetric studies of fungicides against brown rot organism: *S. fructicola* and *S. laxa*, *Phytopathology* 52 (1962) 876–880.
- [21] Knobloch K., Pauli A., Ibrl B., Antibacterial and antifungal properties of essential oil components, *J. Essent. Oil. Res.* 1 (1989) 119–128.

Composición química y actividad antifúngica *in vitro* de los aceites esenciales de *Citrus* en el desarrollo micelial de *Phaeoramularia angolensis*.

Resumen — Introducción. Los extractos de aceites esenciales poseen propiedades antivirales, antibacterianas y antifúngicas que se conocen desde hace mucho tiempo. Este estudio intentó evaluar el efecto de aceites extraídos de diferentes variedades de cítricos en el desarrollo micelial *in vitro* de *Phaeoramularia angolensis*, hongo responsable de la phaeoramulariosis de los *Citrus*. **Material y métodos.** Los aceites esenciales extraídos mediante hidrodestilación de los pericarpios de frutos de seis variedades de cítricos fueron analizados para determinar su composición química y evaluar su actividad antifúngica con respecto a *P. angolensis*. Se evaluó la actividad de los extractos *in vitro* mediante la técnica de incorporación descrita por Grover y Moore. Los aceites se analizaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa. **Resultados.** El desarrollo de *P. angolensis* fue inhibido por los aceites esenciales en diversa medida, teniendo una actividad más pronunciada los aceites procedentes de *C. latifolia* y de *C. limon*. El análisis de la composición química de los aceites probados mostró que los más activos tienen una composición relativamente importante en citrales (neral + geranial > 5%), lo que concuerda con la existencia, ya conocida, de propiedades antifúngicas en los citrales. **Conclusión.** Estos resultados preliminares son tanto más interesantes cuanto que *C. limon* et *C. latifolia* son variedades consideradas poco sensibles a la phaeoramulariosis en condiciones naturales. Se analiza el papel que puedan desempeñar los aceites esenciales en la resistencia varietal frente a *P. angolensis*. La continuación de estas investigaciones contribuirá a un mejor conocimiento de las relaciones huésped-parásito.

Camerún / *Citrus* / control de enfermedades / *Phaeoramularia* / aceites esenciales / composición química / propiedades antimicóticas

To access this journal online:
www.edpsciences.org
