

Dédicace

Je dédie ce travail,

A mon cher père

A Ma chère maman

À la mémoire de mon grand père

A ma sœur Aziza

A mes chers frères

A mes chères amies

Remerciements

La réalisation de ce travail de thèse a été possible grâce à la contribution de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma gratitude.

J'ai eu la chance et l'honneur de travailler durant ces dernières années au sein de l'équipe de recherche du **Laboratoire de Biotechnologie, Environnement, Agro-alimentaire et Santé (LBEAS)**

Je tiens, dans un premier temps à remercier chaleureusement mon directeur de thèse, Monsieur le **Pr. REMMAL Adnane**, pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour ses multiples conseils et pour toutes les heures qu'il a consacrées à diriger cette recherche. J'apprécie beaucoup ses qualités professionnelles et humaines. Je tiens aussi le remercier de m'avoir appris à devenir autonome.

Ce travail de thèse a été réalisé en collaboration avec la station de conditionnement des agrumes DELASSUS (Casablanca). Je tiens à adresser mes vifs remerciements à son Directeur général, Monsieur **FETTOUHI Ali**, qui a bien voulu m'accueillir au sein de la station. Je le remercie pour le matériel et les produits mis à ma disposition, son aide, ses recommandations et ses conseils précieux tout au long de ce travail. Je le remercie également d'avoir accepté de faire partie de jury.

Je remercie mon professeur **Chami Najat** pour tous les efforts et les aides qu'elle a fournis pour la correction de ce manuscrit. Voyez en ces mots l'expression de mes sincères remerciements.

- Je remercie profondément **Pr. BENSOUDA Saâd** d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je lui exprime ici toute ma reconnaissance pour ses précieux conseils et ses qualités humaines.

Je remercie les Professeurs **MIHAMOU Atika**, **EL GHACHTOULI Naima** et **RIHANI Mohammed** pour l'honneur qu'ils me font en acceptant d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Je les remercie pour le temps consacré à évaluer mes travaux.

J'adresse aussi mes plus sincères remerciements aux professeurs **BARI Amina** et **AMRANI JOUTEI Khalid** pour leur examen minutieux de ce travail et les remarques pertinentes dont ils m'ont fait part.

J'adresse enfin mes plus vifs remerciements à Mr. **MEDIANI Mohammed** et **Mr. BELMAHI Lotfi** d'avoir accepté de faire partie de jury.

Ma profonde reconnaissance va également aux docteurs **CHECHAOU Hanane, MZABI Aouatef, TANGHORT Mariam et HRIOUECH Soukayna** qui ont fait du laboratoire un lieu d'échange, d'écoute, de partage et de soutien.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales régions marocaines avec le pourcentage de production des agrumes.

Tableau 2 : Principales variétés d'agrumes marocaines.

Tableau 3 : Pays les plus demandeurs des agrumes marocaines.

Tableau 4 : Valeurs optimales des paramètres du Déverdisage.

Tableau 5 : Diamètre de la surface pourrie des fruits infectés avec la méthode expérimentale numéro 1 et celui des fruits infectés avec la méthode expérimentale numéro 2, après 5 jours d'incubation.

Tableau 6 : Diamètre de la surface pourrie des fruits infectés avec la méthode expérimentale numéro 3, et de ceux infectés avec la méthode expérimentale numéro 4, après 5 jours d'incubation.

Tableau 7 : Temps d'apparition de la pourriture (en jours) sur des oranges infectées avec trois volumes différents de suspensions de spores (10^6 spores/ml) de huit isolats de champignons après 5 jours d'incubation.

Tableau 8: Pourcentage de la surface pourrie des oranges de la variété « *Maroc late* » 5 jours après l'infection par différents volumes des suspensions de spores 10^6 spores/ml, de cinq isolats virulents

Tableau 9 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne (%ICM) de l'isolat *Penicillium digitatum* 2 (*Pd2*).

Tableau 10 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne (%ICM) de l'isolat *Penicillium italicum* 1 (*Pi1*).

Tableau 11 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne (%ICM) de l'isolat *Geotrichum candidum* (*Gc*).

Tableau 12 : Doses des agents antifongiques chimiques utilisées dans le traitement post-récolte des agrumes

Tableau 13 : CMI et CMF des différents agents antifongiques seuls ou associés au NPP sur *Geotrichum candidum*.

Tableau 14 : CMI et CMF des différents agents antifongiques seuls ou associés au NPP sur *Penicillium digitatum*

Tableau 15 : CMI et CMF des différents agents antifongiques seuls ou associés au NPP sur *Penicillium italicum*.

Tableau 16 : Effet de différents agents antifongiques utilisés à la (CMI/2) sur la germination des arthrospores de *Geotrichum candidum*, après 24heures d'incubation

Tableau 17 : Effet de différents agents antifongiques utilisés à leur CMI/2 sur la germination des spores de *Penicillium digitatum*, après 24heures d'incubation.

Tableau 18: Effet de différents agents antifongiques utilisés à leur CMI/2 sur la germination des spores de *Penicillium italicum*, après 24heures d'incubation.

Tableau 19 : Effet des agents antifongiques sur les arthrospores de *Geotrichum candidum*, après 24 heures d'incubation.

Tableau 20 : Effet des agents antifongiques sur les spores de *Penicillium digitatum*, après 24 heures d'incubation.

Tableau 21 : Effet des agents antifongiques sur les spores de *Penicillium italicum*, après 24 heures d'incubation.

Tableau 22: Effet protecteur des agents antifongiques contre la pourriture des clémentines de la variété « *Nour* » blessées expérimentalement (non inoculées), après 10 jours de stockage à 26°C.

Tableau 23 : Effet protecteur des différents agents antifongiques contre la pourriture des clémentines de la variété « *Nour* » blessées expérimentalement (non inoculées), après 4 semaines de stockage à 8°C.

Tableau 24 : Charge fongique des clémentines en fonction de leur position sur le clémentinier

Tableau 25 : Moyenne des scores de la charge fongique des clémentines trempées dans le NPP et des clémentines non trempées

Liste des figures

Figure 1: Evolution de la production mondiale d'agrumes entre 2015 et 2020 (en millions de tonnes)

Figure 2 : Production des agrumes au Maroc (en millions de tonnes) entre les années 2015 et 2020

Figure 3: Passage des palettes au Drencher.

Figure 4: Opération de lavage des fruits.

Figure 5: Calibrage des fruits.

Figure 6: Mandarine de la variété « *AFOURER* » infectée par *Penicillium digitatum*.

Figure 7: Mandarine de la variété « *AFOURER* » infectée par *Penicillium italicum*.

Figure 8 : Fruits infectés par *Geotrichum candidum*.

Figure 9 : Isolement des germes responsables de la pourriture des agrumes.

Figure 10 : Orange de la variété « *Maroc late* »

Figure 11: Technique d'infection des fruits par la Méthode expérimentale numéro 1

Figure 12 : Photos des champignons isolées à partir des oranges pourries.

Figure 13 : Pourcentage de pourriture dans le lot des fruits infectés avec la méthode expérimentale numéro 1, après 5 jours d'incubation.

Figure 14 : Pourcentage de pourriture dans le lot des fruits infectés avec la méthode expérimentale numéro 2, après 5 jours d'incubation.

Figure 15 : Pourcentage de pourriture dans le lot des fruits infectés avec la méthode expérimentale numéro 3, après 5 jours d'incubation

Figure 16 : Pourcentage de pourriture dans le lot des fruits infectés avec la méthode expérimentale numéro 4, après 5 jours d'incubation

Figure 17: Oranges après 5 jours d'inoculation par la suspension de spores l'isolat *Pd1* (10^6 spores/ml); A: Orange inoculée avec 250 μ l ; B: Orange inoculée avec 500 μ l.

Figure 18: Oranges après 5 jours d'inoculation par la suspension de spores de l'isolat *Pd2* (10^6 spores/ml) ; A: Orange inoculée avec 250 μ l ; B: Orange inoculée avec 500 μ l.

Figure 19: Oranges après 5 jours d'inoculation par la suspension de spores de l'isolat *Pi2* (10^6 spores/ml) ; A: Orange inoculée avec 250 μ l ; B: Orange inoculée avec 500 μ l.

Figure 20: Oranges après 5 jours d'inoculation par la suspension de spores de l'isolat *Pi1* (10^6 spores/ml) ; A: Orange inoculée avec 250 μ l ; B: Orange inoculée avec 500 μ l

Figure 21: Oranges après 5 jours d'inoculation par la suspension de spores de l'isolat *Gc* (10^6 spores/ml); A: Orange inoculée avec 250 μ l ; B: Orange inoculée avec 500 μ l.

Figure 22 : Effet préventif du thymol sur l'évolution du pourcentage de fruits pourris après inoculation avec 250µl de la suspension de spores de *Pd2*.

Figure 23 : Diamètre de la pourriture des fruits altérés après 7 jours d'incubation.

Figure 24 : Effet préventif du thymol sur l'évolution du pourcentage de fruits pourris après inoculation avec 250 µl de la suspension de spores de *Gc*.

Figure 25: Diamètre de la pourriture des fruits altérés, après 7 jours d'incubation.

Figure 26 : Oranges trempées dans l'eau seule, ou dans la solution de thymol à 0.5g/l, et inoculées avec 250 µl de la suspension de spores de la souche *Geotrichum candidum* (*Gc*) (10^6 spores/ml), après 7 jours d'incubation

Figure 27: Effet de thymol sur l'évolution du pourcentage de fruits pourris après inoculation avec 250µl d'un mélange des suspensions de spores des deux isolats *Pd 2+* *Gc* (10^6 spores / ml).

Figure 28 : Diamètre de la pourriture des fruits altérés, après 7 jours d'incubation.

Figure 29 : Germination de spores de *Penicillium digitatum* en présence de la CMI/2 des différents agents antifongiques

Figure 30 : Germination de spores de *Penicillium italicum* en présence de la CMI/2 des différents agents antifongiques

Figure 31 : Evolution de la pourriture des mandarines « *Afourer* » traitées aux différents agents antifongiques puis infectées par la suspension de spores de *Geotrichum candidum*, après 7 jours d'incubation à 26°C.

Figure 32 : Evolution de la pourriture des mandarine « *Afourer* » traitées aux différents agents antifongiques, puis infectées par la suspension de spores de *Penicillium digitatum*, après 7 jours d'incubation à 26°C.

Figure 33 : Mandarines traitées aux différents agents antifongiques, et infectées par les spores de *Penicillium dijitatum*, puis incubées à 26°C pendant 7 jours.

Figure 34 : Evolution de la pourriture des Mandarines « *Afourer* » traitées aux différents agents antifongiques puis infectées par la suspension de spores de *Penicillium italicum*, après 7 jours d'incubation à 26°C.

Figure 35: Mandarines lavées aux différents agents antifongiques, et infectées par les spores de *Penicillium italicum*, puis incubées à 26°C pendant 7 jours.

Figure 36: Clémentines lavées aux différents agents antifongiques puis blessées expérimentalement (non inoculées), et stockées à 26°C pendant 10 jours.

Figure 37 : Prélèvement de la charge fongique à la surface des fruits avec une tige-coton.

Figure 38 : Ensemencement de la tige-coton sur la surface gélosée de milieu PDA.

Figure 39 : Système de score fixé en fonction de la densité des thalles à la surface de la boîte de Petri.

Figure 40 : Evaluation de la charge fongique des clémentines durant les différentes étapes du processus de conditionnement utilisant les fongicides chimiques.

Figure 41: Boîtes de Petri représentant la charge fongique des fruits de la ferme de Marrakech avant et après trempage dans la solution du NPP.

Figure 42: Boîtes de Petri représentant la charge fongique des fruits de la ferme de Gharb avant et après trempage dans la solution du NPP.

Figure 43: Charge fongique des clémentines provenant des deux fermes durant les trois premières étapes du processus de conditionnement.

Figure 44: Charge fongique des clémentines des deux fermes durant les deux dernières étapes du processus de conditionnement.

Figure 45 : Evolution du pourcentage cumulé des clémentines pourries dans les trois sous-lots des deux fermes pendant quatre semaines de stockage à 25°C.

Figure 46 : Evolution du pourcentage cumulé des clémentines pourries dans les trois sous-lots des deux fermes pendant quatre semaines de stockage à 8°C.

Figure 47 : Evolution de la charge fongique de l'air ambiant de différentes zones de la station d'emballage avant et après traitement au NPP.

Figure 48: Evaluation de la charge fongique des clémentines de la variété « *Sidi aissa* » durant leur processus de conditionnement après la mise au point des cinq mesures correctives.

Liste des abréviations

CM : Composé Majoritaire

CMF : Concentration Minimale fongicide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

DMSO: diméthyl-sulfoxyde

DO : Densité optique

FC : Fongicide chimique

ha : hectare

HE : Huile Essentielle

ICM : Inhibition de la Croissance Mycélienne

MEA : Malt Extract Agar

PDA : Potato Dextrose Agar

°C : Degré Celsius

Résumé

L'objectif de cette étude était la mise au point d'une solution innovante à base de substances naturelles pour lutter contre les champignons pendant le traitement post-récolte des agrumes. Nous avons commencé cette étude par une évaluation *in vitro* en milieu gélosé et sur un modèle expérimental de fruits infectés. Cette évaluation a concerné le pouvoir antifongique de l'huile essentielle (HE) d'origan, de l'HE de clou de girofle et de leurs composés majoritaires (CM) ; le thymol, le carvacrol et l'eugénol, sur trois champignons isolés à partir de fruits d'oranges pourries spontanément (*Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* et *Geotrichum candidum*). Les résultats obtenus montrent que ces HE et ces CM possèdent une activité antifongique importante contre le développement de ces trois isolats de champignons. Sur la base de ces résultats nous avons mis au point une composition innovante contenant des HE et des composés majoritaires comme principes actifs. Des excipients naturels organiques et minéraux permettent une bonne stabilité des principes actifs, et une solubilité dans l'eau grâce à l'effet effervescent. Cette formulation nommée **Natural Plant Protector** « NPP » a été développée pour être utilisée comme traitement alternatif biologique pouvant remplacer les traitements chimiques des agrumes en post-récolte. L'activité antifongique du NPP a été comparée *in vitro* et sur fruits, avec celle de quatre fongicides chimiques habituellement utilisés dans les stations d'emballage (l'Imazalil, le thiabendazole, la guazatine et l'orthophenyl phénol ou OPP). Les résultats obtenus *in vitro* montrent que les trois isolats de champignons sont résistants aux fongicides chimiques et sensibles au NPP. A la concentration CMI/2, le NPP, l'Imazalil et l'OPP ont inhibé totalement la germination des spores. Les résultats obtenus montrent également que le NPP a provoqué une destruction totale des spores. Les résultats obtenus sur fruits montrent que le NPP seul est au moins aussi efficace que les autres traitements chimiques seuls ou associés au NPP. L'application du NPP pour le traitement de l'air, du matériel et des fruits dans la station d'emballage des agrumes destinés à l'export, a montré une efficacité importante dans la réduction de la pourriture des fruits au cours du stockage et du transport vers les pays demandeurs.

Cette étude montre que la composition innovante « NPP » que nous avons mise au point, est une alternative efficace et prometteuse pour contrôler la pourriture des agrumes en post-récolte.

Mots clés : Agrumes, Fongicides chimiques, Activité antifongique, Huile essentielle, Composé majoritaire, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Geotrichum candidum*.

Abstract

This study's objective was to develop an innovative solution based on natural substances to control fungi during post-harvest processing of citrus fruits. We started this study with an *in vitro* evaluation in agar medium and an experimental model of infected fruits. This evaluation concerned the antifungal activity of oregano and cloves essential oils and their main compounds (thymol, carvacrol and eugenol) against *Penicillium digitatum*, as well as against isolates of *Penicillium italicum* and *Geotrichum candidum*. These Fungi were isolated from spontaneously decayed Orange fruit. The results showed that the essential oils and their main components effectively inhibited the fungal growth of these three isolates of fungi. We have developed an innovative product composed of essential oils and main compounds as active ingredients based on the obtained results. Natural organic and mineral excipients provide good stability of the active ingredients and solubility in water due to the effervescent effect. This formulation, named **Natural Plant Protector** "NPP" was developed to be used as an alternative biological treatment that can replace citrus fruits' chemical treatments post-harvest. NPP's antifungal activity was compared *in vitro* and *in vivo*, with the antifungal activity of the most commonly used chemical antifungals in citrus packing houses (Imazalil, Thiabendazole, Guazatin and Orthophenyl phenol or OPP). The obtained results showed that the three isolates of fungi were more sensitive to the NPP than chemical fungicides. At MIC/2 concentration, NPP, Imazalil and OPP completely inhibited spore germination. The results obtained also showed that the NPP destroyed the spores. The *in vivo* test showed that NPP alone is at least as effective as the other chemical treatments alone or in combination with NPP. The NPP application for air, material and fruit treatment in the packing house of citrus fruit destined for export showed significant efficiency in reducing fruit rot during storage and transport to requesting countries.

This study demonstrated that NPP represents an effective and good promising alternative to control post-harvest citrus rot.

Keywords :

Citrus fruits, Chemical fungicides, Antifungal activity, Essential oil, Main compound, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Geotrichum candidum*.

Sommaire

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	1
I. Généralités sur les agrumes	2
II. Production des agrumes.....	3
III. Conditionnement des agrumes en post-récolte.....	7
IV. Les maladies post-récolte des agrumes	11
V. Traitements chimiques des champignons pathogènes des agrumes en post-récolte.....	14
VI. Alternatives à l'utilisation des fongicides chimiques pour la lutte contre les maladies post-récolte des agrumes.	16
VII. Utilisation des huiles essentielles pour la lutte contre les maladies post-récolte des agrumes.....	18
CHAPITRE I : Etude de l'activité fongicide des huiles essentielles d'origan et de girofle et de leurs composés majoritaires contre <i>Penicillium digitatum</i> , <i>Penicillium italicum</i> et <i>Geotrichum candidum</i>	21
Introduction	22
Matériel et méthodes	24
I. Isolement et identification des champignons responsables de la pourriture des agrumes	24
II. Préparation de la suspension de spores	25
III. Fruits utilisés	25
IV. Méthode de reproduction de la pourriture sur les fruits d'oranges.....	25
V. Test de virulence des isolats de champignons	27
VI. Action des huiles essentielles de girofle, d'origan, et de leurs composés majoritaires sur les trois isolats de champignons sélectionnés.....	28
VII. Evaluation de l'activité antifongique préventive du thymol sur des fruits infectés par <i>Penicillium digitatum</i> (Pd2) et <i>Geotrichum candidum</i> (Gc).	29
VIII. Etude statistique	30
Résultats	31
I. Isolement et identification des champignons responsables de la pourriture des agrumes.	31
II. Méthodes expérimentales de reproduction de la pourriture sur les oranges.....	32
III. Test de virulence des isolats obtenus.....	35

IV. Action des huiles essentielles de girofle, d'origan, et de leurs composés majoritaires sur les trois isolats sélectionnés	42
V. Evaluation sur fruit de l'activité antifongique préventive du thymol sur les champignons pathogènes responsables des maladies post-récolte des agrumes.....	45
1. Evaluation de l'activité antifongique préventive du thymol sur des oranges inoculées avec les spores de <i>Penicillium digitatum</i> 2 (<i>Pd2</i>).....	45
2. Evaluation de l'activité antifongique préventive du thymol sur des oranges inoculées avec les spores de <i>Geotrichum candidum</i> (<i>Gc</i>)	47
Discussion	51
Conclusion.....	58
CHAPITRE II : Mise au point de la composition innovante : Natural Plant Protector (NPP) pour combattre les champignons pathogènes des agrumes en post-récolte.....	59
Introduction	60
Matériel et méthodes	61
I. Champignons pathogènes.....	61
II. Agents antifongiques.....	61
III. Détermination de la CMI et de la CMF des différents agents antifongiques.	62
IV. Effet des agents antifongiques sur les spores des champignons.....	64
V.Evaluation de l'activité antifongique préventive des agents testés, sur des fruits infectés expérimentalement par la suspension de spores de <i>Penicillium sp</i> et de <i>Geotrichum candidum</i>	65
VI. Effet de la température sur l'efficacité des agents antifongiques testés sur des fruits blessés expérimentalement et non inoculés.	67
Résultats	69
I. Détermination de la CMI et de la CMF des différents agents antifongiques.	69
II. Effet des agents antifongiques sur les spores de champignons.	72
III. Evaluation de l'activité antifongique préventive des agents testés, sur des fruits infectés par les spores de <i>Penicillium sp.</i> et de <i>Geotrichum candidum</i>	78
IV. Effet de la température sur l'efficacité des agents antifongiques testés sur des fruits blessés expérimentalement et non inoculés.	83
Discussion	86

Conclusion.....	93
CHAPITRE III : Application du NPP sur l'air, le matériel et les fruits dans la station de traitement et d'emballage des fruits destinés à l'export	94
Introduction	95
Matériel et méthodes	96
I. Evaluation de la charge fongique des clémentines de la variété « <i>Sidi aissa</i> » selon leur position sur l'arbre	96
II. Evaluation de la charge fongique des clémentines de la variété « <i>Sidi aissa</i> » depuis la réception jusqu'au conditionnement.....	96
III. Evaluation de la charge fongique de l'air ambiant de la station d'emballage.	99
Résultats et discussion.....	100
I. Evaluation de la charge fongique à la surface des fruits au moment de la cueillette.	101
II. Evaluation de la charge fongique à la surface des clémentines de la variété « <i>Sidi aissa</i> » durant le processus du conditionnement.....	102
III. Evaluation de la charge fongique de l'air ambiant de la station d'emballage.	108
IV. Mise au point des mesures correctives dans la station d'emballage « <i>Delassus</i> ».....	109
V. Evaluation de la charge fongique des clémentines de la variété « <i>Sidi aissa</i> » après la mise au point des cinq mesures correctives.	124
Conclusion.....	127
Conclusion générale et perspectives.....	128
REFERENCES.....	131

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités sur les agrumes

1. Définition

Selon Benediste et Baches (2002), le terme « agrumes » recouvre principalement trois genres de la famille des *Rutacées* : les *Citrus*, les *Fortunella* et les *Poncirus*. On retrouve dans le genre *Citrus* la plupart des agrumes comme les oranges, les citrons, les mandarines, les clémentines, etc. Le genre *Fortunella* regroupe un ensemble d'espèces où l'on retrouve les *kumquats*. Enfin, le genre *Poncirus* est le moins connu car les fruits de ce genre ne sont pas comestibles. Les agrumes proviennent d'Asie où ils étaient cultivés il y a au moins 3000 ans. Leur implantation en Afrique du Nord, en Espagne, au Portugal et en Amérique font que ces fruits sont aujourd'hui consommés dans une très vaste majorité de pays à travers le monde.

2. Valeur nutritionnelle des agrumes

Les agrumes sont parmi les fruits les plus consommés dans le monde sous leur forme fraîche ou transformée, notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé, leurs grandes qualités nutritives et leurs activités anti-oxydante, anti-inflammatoire, anti-tumorale et anti-fongique (Ladaniya, 2008). Selon Jodhpur et coll. (2001), la consommation des fruits d'agrumes est inversement associée à plusieurs maladies. Knekt et coll. (2004) ont rapporté que la consommation des fruits d'agrumes réduit l'incidence de l'asthme. D'après Neve (2002), les agrumes sont capables de maintenir la structure cellulaire et d'éliminer les radicaux libres en inhibant les réactions de peroxydation des lipides grâce à leur activité anti-oxydante. De plus, la prévention de plusieurs maladies chroniques comme le cancer, le diabète et les maladies cardiovasculaires sont associées à cette activité (Yu et coll., 2005 ; Rajendran et coll., 2014). Selon Le Marchand et coll. (2000) et Rossi et coll. (2007), la consommation des fruits d'agrumes est inversement associée au développement des cancers de l'œsophage et du poumon. Les agrumes ont un rôle hydratant grâce à leur richesse en eau. Selon Lecerf (2014), les fruits d'agrumes contiennent environ 90% d'eau et un taux de glucides $\leq 10\%$. Ces glucides sont principalement le fructose (prédominant), le glucose et le saccharose.

Ces effets bénéfiques pour la santé sont attribués à la présence des composés bioactifs comme les composés poly-phénoliques, principalement les flavonoïdes (Rossa et coll., 2000). Plusieurs études ont rapporté l'importance des flavonoïdes des agrumes contre plusieurs types de cancers. En effet, l'héspéridine et la naringine sont des flavonoïdes qui ont montré une efficacité importante contre le cancer du colon, de la vessie, du sein et de l'intestin (Tanaka et coll., 1997 ; Yang et coll., 1997 ; Vanamala et coll., 2006). Ces deux flavonoïdes sont aussi caractérisés par des propriétés anti-inflammatoires, anti-allergiques et anti-âge (Kim et coll.,

2006). D'autres études ont rapporté une corrélation inverse entre la consommation des flavonoïdes et les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Engelhar et coll., 2002 ; Gao et coll., 2012).

Les agrumes sont une source riche en vitamines A, B1, B2, B3, B6, B9, E et C (Zhou, 2012). Parmi ces vitamines, les vitamines A, C et E sont caractérisées par une activité anti-oxydante importante. Grâce à cette activité, la vitamine A peut réagir avec l'oxygène singulet et les radicaux peroxyliques (Zou et coll., 2015). La vitamine C (acide ascorbique) est considérée comme l'anti-oxydant majeur des agrumes. Selon Amitava and Kimberly (2014), cette vitamine permet d'éliminer les radicaux libres et inhibe l'oxydation des lipoprotéines. D'après Myllyharju et Kivirikko (2004), la vitamine C est un cofacteur des hydroxylases qui catalysent les réactions de déméthylation des histones. D'autres études ont rapporté que la vitamine C est très efficace dans le contrôle des maladies cardiovasculaires (Lowe et coll., 2003). Selon Zou et coll. (2015), l'activité anti-oxydante de la vitamine E est capable de protéger les membranes cellulaires contre la peroxydation lipidique.

Les effets bénéfiques des fruits d'agrumes sont dus également à leur richesse en caroténoïdes (Craig, 1997) principalement la β -carotène qui joue le rôle de provitamine A et la β -cryptoxanthine qui s'est révélée efficace contre les maladies cardiovasculaires et contre le cancer de la prostate et du poumon (Yuan et coll., 2003 ; Dauchet et coll., 2004). Cette molécule a une activité anti-radicalaire qui permet de protéger les lipides membranaires contre l'oxydation (McNulty et coll., 2008). Enfin les agrumes sont une source riche en limonoïdes, en pectine et en éléments minéraux : calcium (Ca), phosphore (P), magnésium (Mg), potassium (K), sodium (Na), fer (Fe), manganèse (Mn), cuivre (Cu), zinc (Zn), molybdenum (Mo) et selenium (Se) (Zhou, 2012).

II. Production des agrumes

1. Au niveau mondial

Les agrumes comptent parmi les principales cultures fruitières dans le monde. Selon les données statistiques de département de l'Agriculture des Etats Unis (USDA, 2020) la production annuelle totale d'agrumes s'est élevée à 91.87 millions de tonnes en 2019/2020. Les oranges constituent la majeure partie de la production d'agrumes avec environ 46 millions de tonnes du total de la production, 31.5 millions de tonnes des mandarines, 7.55 millions de tonnes de citron et limette et 6.69 millions de tonnes de pamplemousse. L'amélioration de la production est principalement due à l'augmentation des superficies cultivées consacrées aux agrumes, au développement des technologies de manipulation, de

transport et de stockage des agrumes. **La figure 1** représente l'évolution de la production mondiale d'agrumes entre 2015 et 2020.

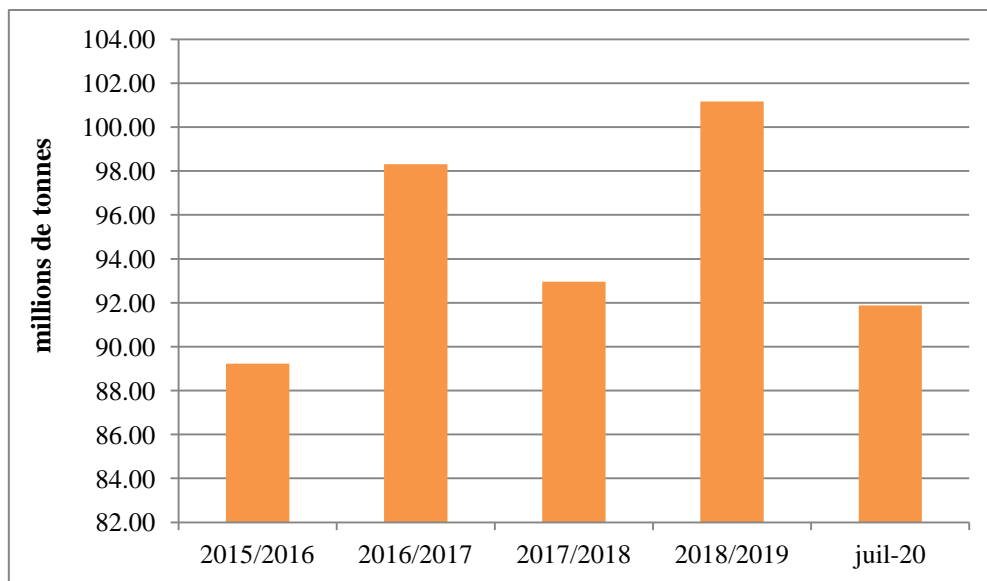


Figure 1: Evolution de la production mondiale d'agrumes entre 2015 et 2020 (en millions de tonnes) (Selon les données statistiques de département de l'Agriculture des Etats Unis)

Actuellement, le nombre de pays producteurs d'agrumes dans le monde augmente progressivement, et l'agrumiculture s'observe presque dans toutes les zones du globe, essentiellement dans les régions méditerranéennes et tropicales. La Chine, le Brésil, sont toujours en tête des producteurs. En 2019/2020, la Chine a produit environ 35.23 millions de tonnes, le Brésil 15.6 millions de tonnes (USDA, 2020).

2. Au niveau du Maroc

Selon EL AFFAS (2003), le Maroc défend sa position sur le marché mondial des agrumes. Il figure parmi les gros producteurs de la région méditerranéenne et occupe le quatrième rang parmi les exportateurs de la région. D'après la Fédération Interprofessionnelle Marocaine des Agrumes (Maroc Citrus), le Maroc produit 2.4 millions de tonnes chaque année dont 650.000 tonnes sont réservées à l'export. Cela représente une valeur de près de 3 milliards de dirhams. Le secteur contribue à la création de 32 millions de jours de travail par an. En tout, on compte 13.000 producteurs d'agrumes qui exploitent une superficie totale actuelle de 129243 ha. **La figure 2** montre l'évolution de la production des agrumes marocains entre 2015 et 2020.

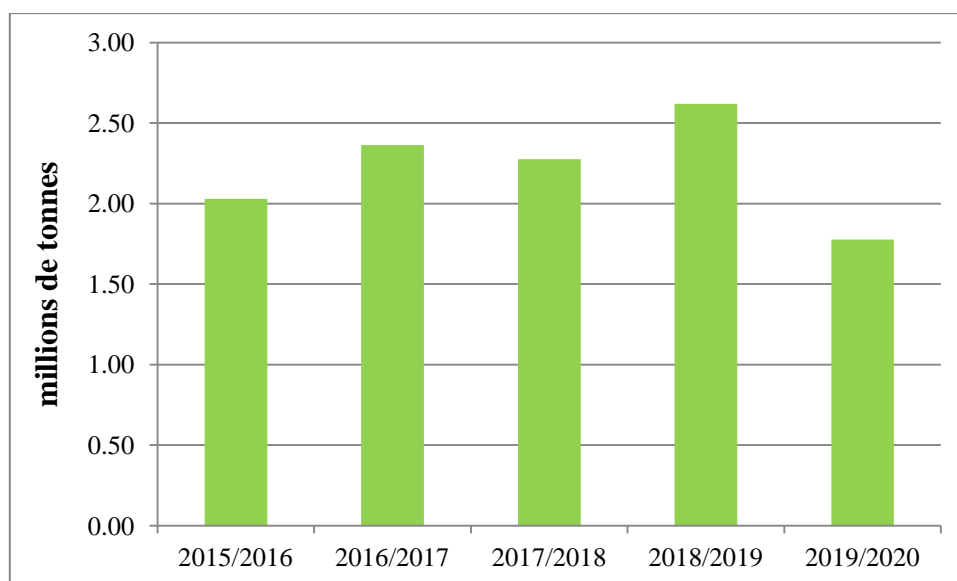


Figure 2: Production des agrumes au Maroc (en millions de tonnes) entre les années 2015 et 2020 (la Fédération Interprofessionnelle Marocaine des Agrumes (Maroc Citrus). Statistiques 2020)

La rentabilité des agrumes pour l'année 2019/2020 a été assez faible en comparaison avec la campagne 2018/2019. Selon la Fédération Interprofessionnelle Marocaine des Agrumes (Maroc Citrus), la production frôlerait les 2,6 millions de tonnes en 2018/2019, avec un volume d'environ 715450 tonnes désigné à l'exportation. La région du Souss-Massa-Draa vient au premier rang à l'échelle nationale en assurant environ 31 % de la production nationale (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Principales régions marocaines avec le pourcentage de production des agrumes (Selon la Fédération Interprofessionnelle Marocaine des Agrumes (Maroc Citrus))

Région	Pourcentage de production
Souss Massa	31%
Gharb	20%
Oriental	17%
Tadal	13%
Haouz	13%
Loukkos	2%
Autres régions	4%

Tableau 2 : Principales variétés d'agrumes marocaines (D'après la Fédération Interprofessionnelle Marocaine des Agrumes (Maroc Citrus))

Variété	Pourcentage de production
Clémentine	24%
Maroc Late	20%
Navel	19%
Oranges demi-saison	4%
Autres variétés.	4%

Sur les cinq dernières années, le volume moyen exporté s'établit à 591930 tonnes. Rapporté à la production globale, il représente 27%. La répartition de ces exportations par marché montre une concentration sur deux destinations : la Russie et l'Union Européen (UE) (*la Fédération Interprofessionnelle Marocaine des Agrumes (Maroc Citrus) statistique 2020*). Pour ainsi dire, les agrumes marocains intéressent toujours les marchés étrangers.

Tableau 3 : Pays les plus demandeurs des agrumes marocaines (D'après la Fédération Interprofessionnelle Marocaine des Agrumes (Maroc Citrus) statistique 2020)

Campagne	2014/15	2015/16	2016/17	2017/18	2018/19	Moyenne
Russie	214 100	200 850	225 450	223 000	284 000	229 480
U. Européenne	118 040	219 700	277 600	271 700	238 600	225 128
Canada	35 000	56 550	70 300	77 700	73 750	62 660
USA	11 400	32 500	45 900	68 300	56 100	42 840
Pays du Golfe	5 000	15 400	18 150	25 900	29 500	18 790
Autres marchés	1 660	6200	12 600	11 200	33 500	13 032
Total	385 200	531 200	650 000	677 800	715 450	591 930

Les exportations d'agrumes sont destinées principalement aux marchés de la Russie et de l'Union Européenne qui absorbent près de 80 % des quantités exportées. Le reste des marchés est représenté en grande partie par les pays de l'Amérique du Nord (Canada et USA) et les Pays du Golfe.

III. Conditionnement des agrumes en post-récolte

Après la récolte, les agrumes destinés à l'export subissent un ensemble des traitements dans un processus de conditionnement au niveau des stations d'emballage spécifiques. Ce processus de conditionnement évolue depuis que le Maroc commence à exporter ses agrumes et essaye d'être au niveau et à jour avec l'évolution des exigences du marché international. Et ce, par le renouvellement et le développement continu des équipements de conditionnement et du matériel de traitement et d'emballage. Le processus de conditionnement dans ces stations d'emballage est réalisé en différentes étapes, incluant l'usage de produits phytosanitaires afin de réduire la charge microbienne des fruits et de garantir leur qualité jusqu'à l'arrivée au consommateur. Les étapes ci-dessous décrivent le processus de conditionnement des agrumes au niveau de la station d'emballage « Delassus » (notre partenaire).

1. Réception

Après la récolte, les fruits d'agrumes arrivent à la station d'emballage dans des camions. Dès leur réception, les camions sont pesés sur un pont-basculé, puis les caisses sont déchargées et déposées avec leurs palettes. Après l'encerclement de ces dernières avec le feillard, on y

colle une étiquette qui contient les informations suivantes : la date de récolte, la référence du producteur, la variété, la date de réception et le tonnage net.

2. Le prétraitement au Drencher

Les fruits d'agrumes réceptionnés reçoivent un prétraitement. En effet les palettes des fruits sont douchées dans le Drencher afin de contrôler les principales pourritures de post-récolte des agrumes. L'application est réalisée à l'aide d'un Drencher à un seul compartiment (**Figure 3**). Celui-ci pulvérise les palettes par une bouillie qui est un mélange d'eau et de fongicides durant 30 à 40 secondes. Par un système de pompage, la bouillie utilisée est recyclée permettant ainsi de traiter plusieurs palettes.



Figure 3: Passage des palettes au Drencher

Les agrumes prétraités peuvent avoir une des deux destinations suivantes selon les exigences :

➤ La chambre de **Déverdissage** :

Les fruits d'agrumes des variétés précoces peuvent atteindre la maturité interne et un taux de sucre/acide acceptable sans pour autant avoir la maturité externe, ce qui les rend inacceptables par le consommateur qui associe d'habitude la couleur à la maturité. Le déverdissage s'effectue dans des chambres à atmosphère contrôlée, ce qui permet de manipuler les paramètres déterminants la réussite de l'opération (humidité relative, température, taux d'O₂, taux de CO₂, éthylène).

Tableau 4 : Valeurs optimales des paramètres du Déverdissage dans la station de conditionnement « Delassus »

Paramètre	Valeurs
Ethylène	2 à 5 ppm
Température	23 °C
Taux d'O ₂	28 %
Taux de CO ₂	< 0,3 % (1000 ppm)
Humidité relative	> 95 %

La durée du Déverdissement est en fonction de la coloration des fruits dans le verger. Les premiers fruits récoltés de coloration verte ont besoin de 120 heures pour atteindre la coloration spécifique. Les fruits ayant une coloration avancée par rapport à la coloration dominante sont mis près de la porte de la chambre pour faciliter leur évacuation.

➤ La chambre de stockage :

Le stockage des fruits se fait au niveau de l'aire de stockage 24 heures avant leur passage dans la chaîne de conditionnement, dans le but de préparer un stock de travail suffisant. Ce stock est de l'ordre de 150 tonnes/jour pour alimenter la chaîne de conditionnement selon les besoins, tout en empêchant la détérioration de la matière première.

3. Versement et pré-triage

Le versement des caisses est fait d'une façon automatique. L'opération du pré-triage consiste à enlever les fruits pourris, écrasés ou déformés. Les déchets sont collectés dans des poubelles en plastique et évacués ultérieurement. Puis, les fruits passent sur un éliminateur de fruits hors calibre qui est destiné à soustraire les fruits de petit calibre.

4. Le lavage

Cette opération est nécessaire pour éliminer la poussière et les saletés. Les fruits sont lavés avec de l'eau mélangée à un détergent puis rincés sur les brosses rotatives souples pour éviter les blessures (**figure 4**).



Figure 4: Opération de lavage des fruits

5. Le pré-séchage

Cette étape vise l'élimination de l'excès d'eau restant à la surface du fruit. Elle se déroule en deux étapes : le passage sous les ventilateurs et le passage des fruits dans un tunnel pourvu d'un courant d'air chaud à faible hygrométrie, pulsé dans le sens contraire à celui de la progression des fruits. La température à l'intérieur du tunnel est de 35 °C, la température des fruits à l'entrée est d'environ 14 °C et le temps de passage est de 45 secondes.

6. Le triage

Le triage se fait manuellement sur un tapis roulant. Le but de cette étape est d'éliminer les fruits sans pédoncule, sans coloration et ceux contenant des parasites (pou de Californie, cératite). Les fruits avec marbrures, blessures, boursouflures, gaufrages, et affaissement pédonculaire sont également écartés ainsi que ceux attaqués par la pourriture.

7. Le cirage

L'application de la cire est assurée à l'aide de gicleurs effectuant un mouvement de va et vient. La cire est aspirée par une pompe à partir d'un bac de 300 l où elle est mélangée continuellement. Dans le double objectif de protéger les fruits contre la pourriture et d'effectuer le cirage, un fongicide est incorporé à la cire.

8. Le séchage

Le séchage permet une meilleure adhésion de la couche de cire sur les fruits. Le processus se déroule dans un second tunnel, et est identique à celui du pré-séchage. La longueur du tunnel est de 5 m et sa température est comprise entre 50 et 55 °C.

9. Le calibrage

Le calibrage est assuré par une calibreuse mécanique à rouleaux basculants et réglables selon les différents calibres exportables. Cette calibreuse contient des caméras électroniques qui prennent plusieurs photos afin de contrôler le calibre et la couleur des fruits (**Figure 5**). Chaque calibre est réceptionné sur un tapis et transporté vers les tables d'emballage.



Figure 5: Calibrage des fruits

10. L'emballage

L'emballage consiste à mettre en caisse les fruits, selon une disposition bien déterminée afin de respecter le nombre, le calibre des fruits et le poids net par unité d'emballage.

11. La palettisation

C'est la formation des palettes pour le transport et l'exportation. Les caisses sont disposées de manière très ordonnée, tout en respectant leur nombre par palette. La hauteur des palettes

mentionnés sur le programme d'exportation doit être respectée, elle doit être inférieure à la hauteur des cales des navires de manière à faciliter la manutention.

12. L'étiquetage

Afin d'identifier le produit et d'assurer sa traçabilité lors de son circuit logistique, les palettes sont munies de plusieurs étiquettes contenant les informations suivantes : la référence du producteur, le nom de la station, le calibre et le nombre de fruits, et les traitements appliqués sur les fruits.

13. Le cerclage

Les palettes sont cerclées avec du filet et un feuillard pour être bien maintenues lors du stockage et du transport. Chaque palette est maintenue par 4 cornières pour les coins de la palette, 8 filets horizontalement, un filet pour le chapeau palette et 2 filets verticaux.

IV. Les maladies post-récolte des agrumes

L'agrumiculture constitue un secteur très important au Maroc. Elle joue un rôle de premier ordre dans l'économie nationale. Selon la Fédération Interprofessionnelle Marocaine des Agrumes (Maroc Citrus), le secteur d'agrumes offre environ 32 millions de jours de travail par an, et près de 3 Milliards de dirhams en devise. Les fruits d'agrumes sont altérés par des germes pathogènes qui provoquent des pertes économiques énormes. Selon Spadaro et Gullino (2004) ces pertes sont estimées à 25% dans les pays développés. Elles peuvent aller jusqu'à 50% ou plus dans les pays en voie développement dont le Maroc. Ces germes pathogènes sont essentiellement des champignons (Tripathi et Dubey, 2004). En effet, plusieurs champignons pathogènes sont capables de provoquer les pourritures des agrumes en post-récolte. Les plus connues sont *Penicillium digitatum*, l'agent causal de la pourriture verte, *Penicillium italicum*, l'agent causal de la pourriture bleue (Valero et Serrano, 2010) et *Geotrichum candidum*, l'agent causal de la pourriture amère des agrumes (Zheng et coll., 2005). Selon Holmes et coll. (1994), ces trois champignons sont responsables de 90% des dégâts. Ces champignons sont présents à la surface des fruits d'agrumes avant la récolte, et peuvent se développer à des niveaux importants si elles trouvent les conditions favorables après la récolte (Kanetis et coll., 2007). Ces germes sont adaptés aux conditions environnementales difficiles, comme la faible disponibilité des nutriments, les variations de température et aux pesticides (Lindow et Leveau, 2002). D'après Palou et coll. (2008), les blessures des fruits provoquées au moment de la récolte, au cours du transport, lors de manipulations dans la station d'emballage et au cours du stockage, constituent des portes qui facilitent la pénétration de ces germes à l'intérieur du fruit, provoquant ainsi différentes

pourritures. Baudoin et Eckert (1985) ont rapporté que la probabilité d'infection des fruits augmente avec l'augmentation du degré de maturité des fruits. Lors du développement des champignons pathogènes sur les fruits, ceux-ci produisent une quantité de spores suffisante pour contaminer l'atmosphère de la station d'emballage et les fruits blessés (Huang et coll., 1992).

1. Les *Penicillium*

P. digitatum et *P. italicum*, sont les deux agents pathogènes des maladies post-récolte les plus importantes et les plus rapportées au sein des agrumes (Ladaniya, 2008). Selon Elkhamass et coll. (1994) ces deux espèces de *Penicillium* sont responsables des pertes économiquement importantes au Maroc et dans le monde (Eckert et Eaks, 1989).

a. *Penicillium digitatum*

P. digitatum est un champignon ubiquiste qui attaque principalement les fruits d'agrumes et leur jus (Domsch et coll, 1980). La maladie des agrumes due à *P. digitatum* est dite « pourriture verte », c'est la plus connue de toute les maladies post-récolte des agrumes (Montesinos-Herrero et coll., 2009). Lesar (2013) a rapporté que 80 à 90% des pertes d'agrumes durant l'export sont causées par cette moisissure. Les premiers symptômes de la pourriture verte sont difficiles à distinguer de ceux de la pourriture bleue et de la pourriture amère. Au bout de 24 à 36 heures d'infection, une tache moue et humide d'un diamètre de 2 à 4 cm se forme sur les fruits. Ensuite, un mycélium blanc se développe, suivi par la sporulation qui s'exprime sous forme d'une masse poudreuse de couleur vert-olive (**Figure 6**).



Figure 6: Mandarine de la variété « AFOURER » infectée par *Penicillium digitatum*

Selon Brown et Eckert (1988), cette poussière de spores se disperse facilement si le fruit est déplacé, agité ou exposé à un courant d'air contaminant ainsi les fruits sains. Les conditions

nécessaires pour le développement de *P. digitatum* sont une température de 20 à 25°C et une humidité relative saturée.

b. Penicillium italicum

P. italicum est l'agent causal de la pourriture bleue des agrumes. Au cours du développement de *P. italicum*, l'épiderme du fruit atteint s'éclaircit, devient mou. Après quelques jours à une température de 24-25°C, un duvet mycélien blanc entourée par un halo apparaît et se couvre rapidement de spores bleues (**figure 7**). Ce mycélium croît dans tous les sens, il arrive jusqu'à la pulpe (Roger, 1953).



Figure 7: Mandarine de la variété « AFOURER » infectée par Penicillium italicum

L'installation de ces deux germes pathogènes se fait à travers des blessures au niveau de l'écorce des fruits, qui peuvent être provoquées dans le champ, dans la station d'emballage, au cours du stockage et au cours du transport (Palou et coll., 2008). Ces blessures sont le plus souvent des microfissures qui sont négligées au moment du triage, constituant ainsi des portes d'entrée des champignons. La présence des éléments nutritifs stimule la germination et la sporulation de ces champignons (Smilanick et coll., 2005). L'abondance des spores de ces deux germes dans la station d'emballage augmente le risque de la pourriture des fruits et aussi le risque d'apparition de souches résistantes aux traitements chimiques qui sont utilisés dans les stations d'emballage. Ces traitements chimiques deviennent alors inefficaces (Gardner et coll., 1986)

2. Geotrichum candidum

Geotrichum candidum est l'agent causal de la pourriture amère des agrumes. Ce champignon est très répandu dans plusieurs régions du monde, causant ainsi des pertes économiques importantes (Hershenhorn et coll., 1992). L'habitat naturel de *G. candidum* est le sol des agrumes. Selon Suprapta et coll. (1996), les arthrospores de *G. candidum* sont transférées du

sol à la surface des fruits par le vent. *G. candidum* attaque les fruits à travers des blessures qui peuvent être produites durant la récolte, durant le conditionnement ou durant le transport (Palou et coll., 2008). D'après Brown et Eckert (1988), lors du développement de ce champignon, il libère des enzymes pectinolytiques qui transforment les tissus des fruits en une masse molle avec une odeur amère. Cette odeur attire les insectes qui peuvent être des véhicules des arthrospores contaminant ainsi les fruits sains. Selon Plaza et coll. (2003), les conditions optimales pour la croissance de *G. candidum* sont une température de 25 à 30°C, et une humidité relative élevée.



Figure 8: Fruits infectés par Geotrichum candidum

V. Traitements chimiques des champignons pathogènes des agrumes en post-récolte

Les champignons pathogènes des agrumes provoquent des pertes économiques importantes. Pour lutter contre ces champignons, les fongicides chimiques les plus utilisés actuellement sont: l'Imazalil (IMZ), le Thiabendazole (TBZ), l'ortho- phényle sodium phénate (SOPP) , le fludioxonil (FLU), le bénomyl, et le pyriméthanil (Smilanick et coll., 2005; Palou et coll., 2008 ; Ladaniya , 2008). Cependant, ces fongicides chimiques ont des effets néfastes sur la santé des consommateurs et sur l'environnement (Palou et coll., 2008). De plus, l'utilisation répétée de ces fongicides chimiques aboutit au développement des populations fongiques multi- résistantes. Ceci complique la lutte contre la pourriture des fruits (Smilanick et coll., 2006a). En effet, des champignons résistants à l'IMZ, au TBZ et au SOPP ont été rapportés dans plusieurs unités de production des agrumes (Ma et Michailides, 2005; Kinay et coll., 2007; Sánchez-Torres et Tuset, 2011). D'autres travaux ont montré des isolats de *Penicillium sp* avec une double résistance au Thiabendazole et à l'Imazalil (Kinay et coll., 2007 ; Boubaker et coll., 2009), au Thiabendazole et à la guazatine (Wild, 1983) et une multi-résistance au thiabendazole, à l'Imazalil et à la guazatine (Erasmus et coll., 2015).

L'efficacité de ces fongicides chimiques dépend du germe pathogène. Les fongicides ne sont pas efficaces contre tous les germes pathogènes. Plusieurs antifongiques chimiques sont utilisés pour le contrôle de *Penicillium sp*, mais ils sont inefficaces contre *G. candidum* (Liu et coll., 2009). Mercier and Smilanick (2005) ont rapporté que *G. candidum* est non contrôlé par le thiabendazole, l'Imazalil et le benomyl. Le seul fongicide qui s'est avéré efficace contre *G. candidum* est la guazatine (Brown, 1988). Cependant, ce fongicide n'est plus autorisé dans plusieurs pays à cause des problèmes de résidus persistants sur les fruits.

1. L'Imazalil

L'Imazalil est utilisé pour le contrôle de la pourriture verte des agrumes causée par *P. digitatum* et la pourriture bleue causée par *P. italicum* (Valero et Serrano, 2010). Il est considéré comme étant le fongicide chimique le plus actif contre *Penicillium sp* (Njombolwana et coll., 2013a et b). Cependant, il est inefficace contre *G. Candidum* (Schirra et coll., 2000).

L'Imazalil inhibe la synthèse du cytochrome P450 qui est l'enzyme qui catalyse la méthylation du lanostérol. Ceci aboutit à l'accumulation des précurseurs du stérol et par conséquent, la diminution de l'ergostérol qui est un composant principal des membranes des cellules fongiques (Kerkenaar et coll., 1986). Cette teneur anormale en précurseurs de stérol provoque une hyper-fluidité amenant à un changement de la perméabilité membranaire et des activités enzymatiques liées à la membrane (Kato, 1986). Le développement de la résistance chez la population fongique de *Penicillium sp*, est associé à l'altération des régions régulatrices de la synthèse du Cytochrome P450 (Hamamoto et coll., 2000). La résistance à l'Imazalil a été démontrée 6 ans après sa mise sur le marché des antifongiques utilisés en post-récolte des agrumes (Harding, 1972). Des études plus récentes ont rapporté la résistance à l'Imazalil (Ma et Michailides, 2005; Mavroei et Shaw, 2005)

2. Le Thiabendazole

Le Thiabendazole est un fongicide chimique de la famille des benzimidazoles. Il a été développé en 1971 (Dodd et coll., 2010). Cet antifongique est utilisé pour contrôler les pourritures à *Penicillium sp* (Schirra et coll., 2008). Il est efficace contre les champignons *Diplodia* et *Phomopsis* (Brown et Chambers, 1996), et inefficace contre *Geotrichum Candidum* et *Alternaria* (Barkai-Golan, 2001). Le Thiabendazole agit au niveau de la β -tubuline. Il inhibe la formation des microtubules et la division cellulaire pendant la mitose (Baraldi et coll., 2003). Le développement de la résistance chez la population fongique est associé à une mutation au niveau du gène β -tubuline (Baraldi et coll., 2003). La résistance au

Thiabendazole a été rapportée 2 ans après son introduction dans le marché des antifongiques utilisés en post-récolte (Eckert, 1990). Des études plus récentes ont confirmé le développement de la résistance chez la population fongique vis-à-vis du Thiabendazole (Sholberg et coll., 2005; Schmidt et coll., 2006; Kinay et coll., 2007; Cabañas et coll., 2009; Sánchez-Torres et Tuset, 2011).

3. La Guazatine

La Guazatine est un antifongique chimique développé en 1981 (Rippon et Morris, 1981). Cet antifongique est utilisé pour le contrôle de *G. Candidum*. En effet, c'est le seul fongicide chimique qui permet de contrôler ce champignon. Toutefois, ce fongicide est interdit dans plusieurs pays (Brown, 1988) en raison des résidus laissés sur le fruit (McKay et coll., 2012). La résistance à la guazatine a été rapportée par plusieurs études (Kuramoto et Yamada, 1975; Wild, 1983).

4. L'Orthophényl phénol (OPP) et le sodium ortho- phényle phénate (SOPP)

L'OPP et son sel SOPP appartenant à la famille des phénols et dérivés, sont des antifongiques chimiques utilisés pour le contrôle de *G. Candidum* (Cunningham, 2007 ; Kwok et Silva, 2013). La résistance au SOPP a été rapportée 50 ans après son introduction dans le marché des antifongiques utilisés en post-récolte (Harding, 1962). Des études récentes ont confirmé le développement de cette résistance vis-à-vis de l'OPP et du SOPP (Brown, 1979). En raison de la résistance, l'utilisation de ces deux agents reste limitée. En outre, l'OPP et le SOPP ne sont pas utilisés à cause du fait qu'ils provoquent des dommages aux fruits, altérant ainsi leur qualité et les rendant impropres à la vente (Eckert et Eaks, 1989 ; Ladaniya, 2008).

L'utilisation des fongicides chimiques présente donc plusieurs inconvénients pour la santé du consommateur et pour l'environnement, d'où la nécessité de rechercher une alternative efficace pour la lutte contre les maladies cryptogamiques.

VI. Alternatives à l'utilisation des fongicides chimiques pour la lutte contre les maladies post-récolte des agrumes

Le problème de la toxicité causée par les fongicides chimiques, et du développement de la résistance chez les champignons pathogènes, sont des raisons qui ont poussé les professionnels à la recherche d'autres approches respectueuses de la santé du consommateur et de l'environnement comme alternatives aux fongicides de synthèse.

Parmi les alternatives proposées, on trouve l'utilisation des sels organiques et inorganiques pour le contrôle des pourritures des agrumes en post-récolte. Ces composés sont utilisés comme des additifs dans l'industrie alimentaire pour la conservation des aliments (Gennaro,

1990). Selon Deliopoulos et coll. (2010), ces composés ont un large spectre antimicrobien, et une faible toxicité. D'après Mecteau et coll. (2002), ces sels sont efficaces contre diverses maladies des végétaux. Le sorbate de potassium a été rapporté comme un agent efficace pour le contrôle des maladies des agrumes en post-récolte, ayant un faible impact négatif sur la santé du consommateur et sur l'environnement (Palou et coll., 2002). Une étude menée par Smilanick et coll. (2008) a montré que la pourriture verte causée par une souche de *P. digitatum* résistante à l'Imazalil ou au thiabendazole, est efficacement contrôlée avec le sorbate de potassium. Cette même étude a montré que le sorbate de potassium réduit la pourriture amère sur des fruits inoculés expérimentalement par les spores de *G. candidum*. Wild (1987) a rapporté que le sorbate de potassium contrôle efficacement les pourritures verte et amère des agrumes. Le bicarbonate de sodium et le carbonate de sodium ont montré une efficacité importante dans le contrôle des pourritures verte, bleue et amère des agrumes (Smilanick et coll., 1999 ; Palou et coll., 2002). Selon Montesinos-Herrero et Palou (2016), le benzoate de sodium a montré une efficacité contre les pourritures verte et bleue des agrumes. De même, le silicate de potassium a été efficace contre ces pourritures (Moscoso-Ramírez et Palou, 2014). D'autres sels comme l'acide borique et le chlorure de calcium sont efficaces contre la pourriture des agrumes en post-récolte (Askarne et coll., 2011). Ces sels peuvent être appliqués seuls ou en association avec des faibles doses des fongicides chimiques. En effet, la combinaison de l'Imazalil, du thiabendazole, du SOPP et du pyriméthanyl avec le bicarbonate de sodium est capable d'améliorer leur efficacité (Smilanick et coll., 2005, 2006a ; Erasmus et coll., 2011). De même, l'application combinée du sorbate de potassium avec les fongicides chimiques (thiabendazol, Imazalil, pyriméthanyl, fludioxonil) améliore l'efficacité de ces derniers contre *Penicillium sp* (Palou et coll., 2002 ; Smilanick et coll., 2008).

L'utilisation des antagonistes microbiens (bactéries, levures ou moisissures) est une autre approche qui gagne de plus en plus la confiance des consommateurs.

En effet, plusieurs études sont focalisées sur cette approche (Cañamás et coll., 2008; Taqarort et coll., 2008 ; Leelasuphakul et coll., 2008). Ces microorganismes sont capables de combattre les champignons pathogènes, en inhibant leur développement et leur croissance (Wilson et Wisniewski, 1989). Généralement, ces microorganismes antagonistes sont des épiphytes qui existent naturellement à la surface des fruits (Osman et coll., 2011). Ces antagonismes peuvent être des bactéries, c'est le cas de *Bacillus subtilis* qui a montré une efficacité dans le contrôle de la pourriture verte des agrumes (Leelasuphakul et coll., 2008). Singh et Deverall (1984), ont rapporté que les métabolites extracellulaires de la bactérie *Bacillus subtilis* inhibent la croissance de *P. italicum* et *G. candidum*. *Serratia plymuthica* est

une bactérie qui a été décrite comme un agent efficace pour le contrôle de la pourriture verte des agrumes (Meziane et coll., 2006). *Pseudomonas syringae* et *Pseudomonas fluorescens* ont montré une efficacité importante pour le contrôle de *P. digitatum* (Smilanick et Denis-Arrue, 1992). Actuellement, un produit à base de *Pseudomonas syringae* est déjà commercialisé : « Biosave ».

Ces germes antagonistes peuvent être également des levures, c'est le cas de *Candida oleophila* qui s'est révélée efficace pour le contrôle des pathogènes des agrumes en post-récolte (Droby et coll., 1998). Selon Arras et coll. (1998), la levure *Pichia guilliermondii* a un effet important contre *P. italicum*. Taqarort et coll. (2008) ont rapporté que *P. digitatum* est efficacement inhibé par la levure *Pichia anomala*. Actuellement un produit à base de *Candida oleophila* est déjà commercialisé : « Aspir ». Certaines moisissures sont également des antagonistes microbiens. En effet, selon Mercier et Smilanick. (2005) la moisissure *Muscodora albus* est utilisée comme un biofumigant pour le contrôle des pourritures des agrumes en post-récolte.

Les microorganismes antagonistes inhibent le développement des germes pathogènes par un ensemble de mécanismes. Parmi ces mécanismes, on trouve l'antibiose. En effet, la production d'antibiotiques par les microorganismes antagonistes, est l'un des principaux modes d'action contre les germes pathogènes (Bull et coll., 1998). La concurrence entre les microorganismes antagonistes et les germes pathogènes pour les nutriments et l'espace, est un mécanisme impliqué dans la lutte biologique (Arras et coll., 1998). En effet, les microorganismes antagonistes surtout les levures, colonisent la surface des agrumes rapidement et épuisent les éléments nutritifs, limitant ainsi la disponibilité de ces éléments pour les germes pathogènes.

Un autre mécanisme peut être utilisé dans la lutte biologique, c'est le parasitisme direct. Certains microorganismes antagonistes attaquent directement les germes pathogènes par des toxines mortelles et des enzymes lytiques qui les tuent (Talibi et coll., 2014).

VII. Utilisation des huiles essentielles (HE) pour la lutte contre les maladies post-récolte des agrumes

1. Définition des HE

Selon l'association française de Normalisation (AFNOR NF T 75-006, 1986), on appelle huile essentielle (HE) (ou parfois essence végétale) un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydrodistillation. L'HE est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques.

Selon Burt (2004), les huiles essentielles sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatiles, extraites à partir des plantes. Elles sont obtenues à partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs, de brindilles, d'herbes, d'écorces, de bois, de racines ou de fruits. Leur composition varie souvent, en fonction des espèces végétales (Mishra et Dubey, 1990). La diversité moléculaire des composés qu'elles contiennent leur confère des rôles et des propriétés biologiques très variés.

2. Activités antimicrobiennes des huiles essentielles (HE)

Les huiles essentielles sont également connues par leur activité antimicrobienne. En effet, leur spectre d'action est très étendu. Une étude menée par Murbach Teles Andrade et coll. (2014) sur l'activité antibactérienne de 27 huiles essentielles contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, a montré que *Staphylococcus aureus* est très sensible vis-à-vis des huiles essentielles de poivron noir et de l'arbre de thé. L'HE de clou de girofle est très efficace contre *Escherichia coli*. Cette même étude a montré une forte activité antibactérienne de l'HE de clou de girofle sur *Pseudomonas aeruginosa*. Bagamboula et coll. (2004) ont montré un effet inhibiteur du carvacrol (le composé majoritaire des HE de thym et d'origan) sur deux espèces de *Shigella*. Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif (Burt, 2004).

Les huiles essentielles agissent également contre les champignons. De nombreuses huiles essentielles, incluant les HE de thym, de citronnelle, de cannelle et de l'arbre à thé sont efficaces contre les champignons pathogènes (Burt, 2004). Les travaux réalisés dans notre laboratoire ont montré une activité fongicide *in vitro* de l'eugénol (le composé majoritaire de l'HE de clou de girofle) et du thymol (le composé majoritaire de l'HE de thym et d'origan) sur *Saccharomyces cerevisiae* (Bennis et coll., 2004 a et b). Des études réalisées par Chami et coll. (2004 a et b, 2005a et b) ont montré *in vitro* et *in vivo* l'activité fongicide de l'eugénol et du carvacrol sur la levure *Candida albicans*. Une étude menée par Bouddine et coll. (2012) a montré que des isolats de champignons du genre *Mucor*, *Aspergillus* et *Fusarium* étaient sensibles au thymol et à l'HE d'origan. Bisht et coll. (2011) ont montré que les HE d'acore (*Acorus calamus*), d'origan et de cannelle ont un effet inhibiteur sur la croissance d'*Aspergillus flavus* et d'*Aspergillus niger*.

Certaines HE agissent contre les parasites, l'HE de clou de girofle, de thym et d'armoise sont efficaces contre les ookystes d'*Eimeria* (Remmal et coll., 2011). Achahbar (2011) a montré l'efficacité d'un mélange d'HE de girofle, de thym et d'armoise ainsi que du thymol et de l'eugénol dans le traitement préventif et curatif de la coccidiose causée par le genre *Eimeria*

chez le poulet de chair. Une forte activité antiparasitaire de l'HE d'*Artemisia herba-alba* sur *Leishmania tropica* et *Leishmania major* a été montrée par Hatimi et coll. (2001).

Grâce à l'activité antifongique des huiles essentielles et leur biodégradabilité, plusieurs recherches sont orientés vers l'étude de ces composés naturels et leur utilisation comme des alternatives aux fongicides chimiques pour la lutte contre la pourriture des fruits et légumes, comme la tomate (Soylu et coll., 2010), les myrtilles (Mehra et coll., 2013), la fraise (Shao et coll., 2013a), l'avocat (Sellamuthu et coll., 2013) et les agrumes (Du Plooy et coll., 2009 ; Fan et coll., 2014). Plusieurs études ont montré une efficacité dans le contrôle des pourritures des agrumes (Vitoratos et coll., 2013). L'HE de thym a montré une efficacité importante contre le champignon *G. candidum* (Liu et coll., 2009), *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer*, et *Alternaria alternata* (Plotto et coll., 2002). L'HE de citron a montré une efficacité contre la germination et la sporulation de *P. digitatum* (Klieber et coll., 2002). D'autres HE incluant l'origan, le thym et le citron ont montré une efficacité importante *in vitro* et *in vivo* contre *P. digitatum*, *P. italicum* et *Botrytis cinerea* (Vitoratos et coll., 2013).

VIII. L'objectif de ce travail de thèse

Le but de ce travail de thèse est l'évaluation de l'efficacité antifongique d'une solution innovante, à base d'huiles essentielles et leurs composés majoritaires contre les champignons responsables des maladies post-récolte des agrumes: *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* et *Geotrichum candidum*. Cette solution innovante représente une alternative aux fongicides chimiques. Pour atteindre cet objectif les points suivants ont été traités

- ✓ Une étude *in vitro* et sur fruit de l'activité fongicide des huiles essentielles d'origan et de girofle et de leurs composés majoritaires sur les trois types de champignons ; *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* et *Geotrichum candidum*.
- ✓ Une étude expérimentale comparative de l'action antifongique d'une solution innovante nommée NPP et des fongicides chimiques habituellement utilisés dans les stations de conditionnement des agrumes.
- ✓ Une évaluation de l'efficacité de l'application du NPP à grande échelle : au niveau de la station de conditionnement des agrumes Delassus Maroc

CHAPITRE I

Etude de l'activité fongicide des huiles essentielles d'origan et de girofle et de leurs composés majoritaires contre *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* et *Geotrichum candidum*

Etude in vitro en milieu gélosé et essais sur un modèle expérimental de fruits infectés

Introduction

L'agrumiculture est classée parmi les principales cultures fruitières dans le monde entier. Cette culture constitue l'un des secteurs les plus importants de l'économie Marocaine. En effet, le Maroc est producteur et exportateur d'agrumes. D'après la Fédération Interprofessionnelle Marocaine des Agrumes (Maroc Citrus. 2020), la culture nationale des agrumes couvre une superficie totale de 129243 ha, avec une production d'environ 2.4 millions de tonnes chaque année, et une exportation d'environ 650.000 tonnes.

Les agrumes ont une valeur nutritionnelle importante due à leur richesse en éléments nutritifs, notamment les vitamines C, A et E, les éléments minéraux et la pectine (Gorinstein et coll., 2001). Ceci représente une cible pour les germes pathogènes. Lorsque les agrumes sont attaqués par ces germes, ils provoquent des pertes économiques énormes. Selon Spadaro et Gullino, (2004) ces pertes représentent entre 25% dans les pays développées et 50%, ou plus de la récolte dans les pays en voie développement dont le Maroc.

Comme nous l'avons signalé dans l'introduction générale, les champignons pathogènes qui attaquent les agrumes en post-récolte sont principalement : *Penicillium digitatum*, responsable de la pourriture verte, *Penicillium italicum*, agent causal de la pourriture bleue des agrumes (Valero et Serrano, 2010) et *Geotrichum candidum*, l'agent causal de la pourriture amère (Zheng et coll., 2005). En effet, plus de 90% des pertes en post-récolte sont dues à ces trois types de champignons (Holmes et coll., 1994).

Pour la lutte contre les maladies des agrumes en post-récolte, les producteurs et les exportateurs utilisent le plus souvent des fongicides de nature chimique : l'Imazalil (IMZ) , le Thiabendazole (TBZ) , l'ortho- phényle sodium phénate (SOPP) , le fludioxonil (FLU) , le bénomyl, le pyriméthanyl ou différents mélanges de ces composés (Smilanick et coll.,2005 ; Ladaniya, 2008). Cependant, ces fongicides chimiques ont des effets néfastes sur la santé des consommateurs et sur l'environnement (Palou et coll., 2008). En outre, l'utilisation répétée de ces fongicides chimiques aboutit au développement des populations fongiques multi-résistantes, ce qui complique la lutte contre les pourritures des fruits. De plus, le spectre d'action de ces fongicides chimiques est limité. En effet, l'IMZ et le TBZ ne sont pas efficaces sur la pourriture amère causée par *Geotrichum candidum* (Smilanick et coll., 2005).

Dans ce contexte, plusieurs approches biologiques prometteuses et respectueuses de l'environnement et de la santé du consommateur ont été proposées comme alternatives aux fongicides chimiques pour lutter contre les maladies des agrumes en post-récolte. En effet, plusieurs travaux ont porté sur la recherche de microorganismes antagonistes (Cañamás et coll., 2008; Taqarort et coll., 2008), et les sels organiques (Palou et coll., 2002) (voir introduction bibliographique). D'autres approches proposent des méthodes de contrôle de pourriture des agrumes basées sur l'utilisation de certaines substances naturelles. Plusieurs études montrent l'activité antifongique de certains extraits de plantes médicinales contre *Geotrichum candidum* (Ameziane et coll., 2007 ; Talibi et coll., 2012a), et contre *Penicillium sp* (Gatto et coll., 2011 ; Askarne et coll., 2011) et les effets antifongiques des huiles essentielles des plantes contre les pathogènes des agrumes (Badawy et coll., 2011 ; Fan et coll., 2014.)

L'objectif du présent chapitre est l'évaluation *in vitro* de l'activité antifongique de deux HE (l'HE d'origan et l'HE de clou de girofle) et de trois composés majoritaires d'huiles essentielles (le thymol, le carvacrol et l'eugénol) sur les champignons responsables des maladies post-récolte des agrumes, et l'évaluation de l'activité antifongique du thymol sur des fruits d'agrumes infectés expérimentalement selon une méthode expérimentale d'infection améliorée que nous avons mise au point.

Matériel et méthodes

I. Isolement et identification des champignons responsables de la pourriture des agrumes

1. Isolement des champignons

A partir de plusieurs oranges pourries spontanément, 1cm² de surface couverte de champignons est coupé, puis mis dans un tube Eppendorf contenant 1ml de serum physiologique (NaCl 9‰) stérile (SPS). A partir de cette suspension mère, une série de dilutions allant de 10⁻¹ à 10⁻¹⁴ est préparée. 100 µl de chaque dilution sont ensemencés par étalement dans des boîtes de Petri contenant environ 20 ml de milieu gélosé (Sabouraud au chloramphénicol à 0.5g/l). Les boîtes sont ensuite incubées à une température de 26°C pendant 7 jours.

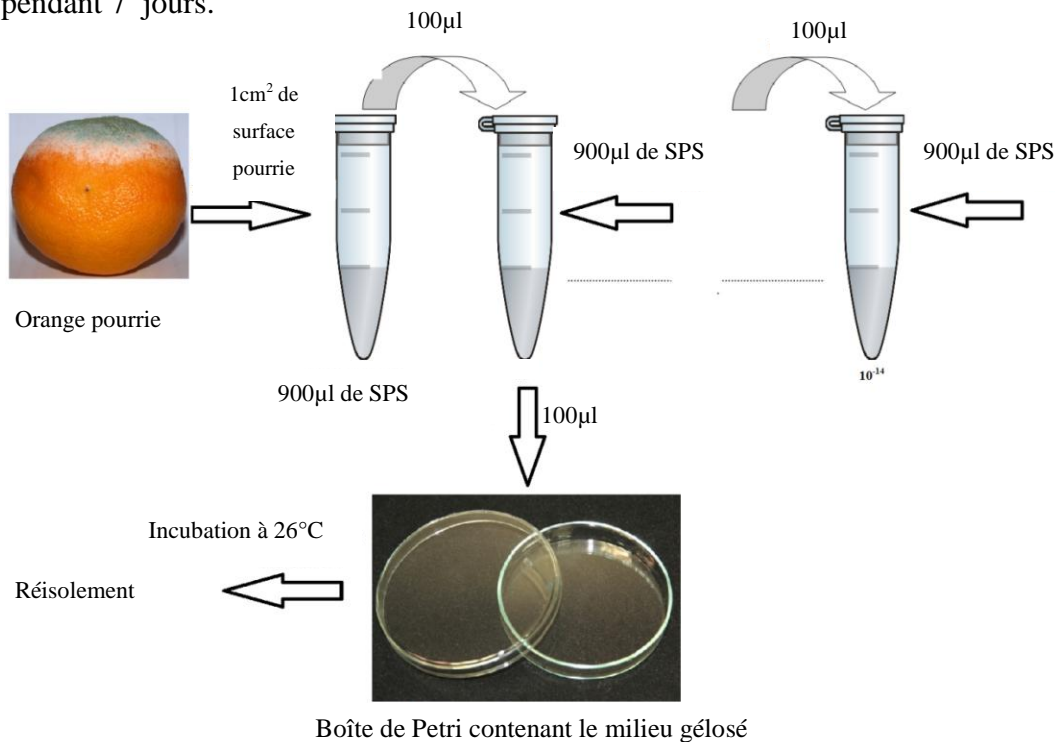


Figure 9 : Isolement des germes responsables de la pourriture des agrumes

2. Purification et identification préliminaire des isolats responsables de la pourriture des agrumes

Les différents isolats de champignons développés sur les boîtes de Petri ont été repiqués sur les milieux : Malt Extract Agar (MEA) et Potato Dextrose Agar (PDA) stériles pour les maintenir en culture pure.

L'identification préliminaire des champignons a tenu compte des caractères morphologiques macroscopiques qui sont le diamètre et l'aspect des thalles sur les différents milieux de culture (couleur, texture, revers, topographie), les caractères morphologiques microscopiques

(structure du mycélium, forme et taille des conidies) et la capacité de croissance aux différentes températures d'incubation (Pitt et Hocking, 2009).

II. Préparation de la suspension de spores

Une fois la sporulation bien développée (sept jours sur milieu gélosé), des spores sont détachées à l'aide d'une anse stérile, puis transférées dans un tube contenant du serum physiologique stérile (NaCl 9‰). Le nombre de spores dans la suspension ainsi obtenue est déterminé à l'aide d'une cellule de Malassez, puis réduit par dilution de telle sorte que l'inoculum utilisé soit de l'ordre de 10^6 spores/ml.

III. Fruits utilisés

Les fruits utilisés dans ce travail sont fournis par la société Dellassus-Casablanca. Ils appartiennent à la variété Maroc-Late. Ils sont cueillis directement sur l'arbre sans traitement préalable.



Figure 10 : Orange de la variété « Maroc Late »

IV. Méthode de reproduction de la pourriture sur les fruits d'oranges

Pour reproduire expérimentalement la pourriture sur les fruits d'oranges, nous avons mis au point une méthode expérimentale. Cette méthode consiste à injecter les fruits avec une suspension de spores de la souche étudiée, juste sous le flavedo à l'aide d'une seringue à insuline équipée d'une aiguille très fine (30 gauges), inclinée de façon tangentielle à la surface du flavedo.

Une comparaison de cette méthode (Méthode expérimentale numéro 1) avec trois autres méthodes existantes (Méthode expérimentale numéro 2, Méthode expérimentale numéro 3 et Méthode expérimentale numéro 4) a été réalisée.

La méthode expérimentale numéro 2 : Elle consiste à faire des trous (1 mm de largeur, 2mm de longueur) qui traversent le flavedo et l'albédo et arrivent jusqu'à la pulpe des fruits,

puis à inoculer ces trous avec la suspension de spores de la souche étudiée (Lopez-Reyes et coll., 2010).

La méthode expérimentale numéro 3 : Elle consiste à faire des trous (1 mm de largeur, 2mm de longueur) qui traversent le flavedo et l'albédo et arrivent jusqu'à la pulpe des fruits, puis à tremper les fruits dans la suspension de spores de la souche étudiée (Schirra et coll., 2008).

La méthode expérimentale numéro 4 : Elle consiste à tremper une tige métallique stérile (1 mm de largeur, 2mm de longueur) dans la suspension de spore de la souche étudiée. Ensuite, utiliser cette tige pour faire un seul trou au niveau équatorial des fruits. (Eckert et Brown, 1986)

Afin de comparer la reproductibilité des quatre méthodes expérimentales, une suspension de spores de la souche *Penicillium italicum* PI75 a été préparée (10^6 spores/ml). Cette souche a été isolée, identifiée et stockée auparavant par le laboratoire des plantes aromatiques de la faculté des sciences Dhar Mehraz. Le test suivant a été réalisé :

Quarante-huit heures après la cueillette des oranges de la variété « Maroc-Late », ces dernières ont été lavées à l'eau stérile, puis séchées à l'air libre. Le site d'infection a été marqué au niveau équatorial de chaque fruit. Ensuite, les fruits ont été répartis en quatre lots :

- Lot 1 « méthode expérimentale numéro 1 » : 30 fruits ont été utilisés. 10 fruits ont été injectés par les concentrations 50, 100 ou 200 μ l de la suspension de spores (10^6 spores/ml) de la souche PI75. L'injection a été réalisée au niveau du site marqué sur chaque fruit, juste sous le flavedo à l'aide d'une seringue à insuline équipée d'une aiguille très fine (30 gauges), inclinée de façon tangentielle à la surface du flavedo. 30 autres fruits témoins (témoin 1) ont été utilisés et injectés par l'eau distillée stérile.
- Lot 2 « méthode expérimentale numéro 2 » : 30 fruits ont été utilisés. Un trou (diamètre 1mm + profondeur 2mm) qui traverse le flavedo et l'albédo, et arrive jusqu'à la pulpe, a été effectué au niveau du site d'infection marqué sur chaque fruit. Ensuite, les trous de dix fruits ont été inoculés avec les concentrations 50, 100 ou 200 μ l de la suspension de spores (10^6 spores/ml) de la souche PI75, à l'aide d'une micropipette. 30 autres fruits témoins (témoin 2) on été utilisés et inoculés avec l'eau distillée stérile.
- Lot 3 « Méthode expérimentale numéro 3 » : 30 fruits ont été utilisés. Un trou (diamètre 1mm + profondeur 2mm) qui traverse le flavedo et l'albédo et qui arrive jusqu'à la pulpe, a été effectué au niveau du site d'infection marqué sur chaque fruit. Ensuite, tous les dix fruits ont été trempés dans la suspension de spore (10^6 spores/ml) de la souche PI75,

pendant 2, 5 ou 10 seconde. 30 autres fruits témoins perforés de la même façon ont été utilisés (témoin 3) et trempés dans l'eau distillée stérile.

- Lot 4 « Méthode expérimentale numéro 4 » : Là aussi, 30 fruits ont été utilisés. Tous les dix fruits ont été perforés à l'aide d'une tige métallique (diamètre 1mm + profondeur 2mm) trempée dans la suspension de spores (10^6 spores/ml) de la souche PI75 pendant une durée de 2, 5 ou 10 secondes. 30 autres fruits témoins (témoin 4) ont été utilisés et perforés à l'aide d'une tige métallique trempée dans l'eau distillée stérile.

Les fruits de chaque lot, sont ensuite incubés à la température ambiante ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) dans des boîtes hermétiques transparentes, saturées en humidité. Le pourcentage des fruits pourris et le diamètre des zones altérées au niveau de chaque site d'infection, ont été déterminés après cinq jours d'incubation. L'expérience est répétée deux fois.



Figure 11: Technique d'infection des fruits par la Méthode expérimentale numéro 1

V. Test de virulence des isolats de champignons obtenus à partir de la première méthode d'infection expérimentale

A partir des oranges pourries spontanément, nous avons obtenu un seul isolat de *Geotrichum candidum* (nommé *Gc*) et sept isolats du genre *Penicillium*, dont deux de l'espèce *Penicillium digitatum* (nommées *Pd1* et *Pd2*), deux autres de l'espèce *Penicillium italicum* nommées (*Pi1* et *Pi2*) et trois autres isolats de ce genre dont nous n'avons pas pu identifier l'espèce (nommés *Psp1*, *Psp2* et *Psp3*).

Vu le nombre d'isolats obtenus, nous avons décidé de classer ces 8 isolats par ordre de virulence. Pour cela, une suspension de spores de 10^6 spores/ml a été préparée pour chacun des huit isolats obtenus. Chaque suspension de spores sera utilisée pour l'infection des fruits, en utilisant la méthode expérimentale que nous avons mise au point (Méthode expérimentale numéro1).

Quarante-huit heures après la cueillette des oranges de la variété « Maroc-Late », ces dernières ont été lavées à l'eau distillée stérile, puis séchées à l'air libre. Ensuite, ces fruits ont été répartis en quatre lots en utilisant les suspensions des spores des sept isolats du genre *Penicillium* (*Pd1*, *Pd2*, *Pi1*, *Pi2*, *Psp1*, *Psp2*, et *Psp3*) et d'un isolat du genre *Geotrichum candidum* (*Gc*) :

Lot 1 : 8 boîtes contenant chacune 5 fruits infectés avec un inoculum de 100 µl de la suspension des spores (10^6 spores/ml) de chacun des huit isolats.

Lot 2 : 8 boîtes contenant chacune 5 fruits infectés avec un inoculum de 250 µl de la suspension des spores (10^6 spores/ml) de chacun des huit isolats.

Lot 3 : 8 boîtes contenant chacune 5 fruits infectés avec un inoculum de 500 µl de la suspension des spores (10^6 spores/ml) de chacun des huit isolats.

Lot 4 (témoin) : 3 boîtes contenant chacune 5 fruits auxquels un volume de 100, 200 ou 500 µl d'eau distillée stérile a été injecté de la même manière que pour les infections avec les spores.

L'infection a été réalisée au niveau de deux sites d'infection diamétralement opposés et marqués au niveau équatorial du fruit.

Les boîtes transparentes utilisées sont fermées hermétiquement, saturées en humidité, et incubées à $20 \pm 2^\circ\text{C}$. La virulence des isolats est estimée en fonction du temps nécessaire pour l'apparition des altérations, et par le pourcentage de la surface pourrie par rapport à la surface totale des fruits durant 5 jours d'incubation. L'expérience a été répétée trois fois.

Le pourcentage de la surface pourrie a été calculé selon la formule suivante :

Le pourcentage de la surface pourrie (%) = (Surface pourrie sur le fruit / Surface totale du fruit) x 100.

VI. Action des huiles essentielles de girofle, d'origan, et de leurs composés majoritaires sur les trois isolats de champignons sélectionnés

En se basant sur les résultats du test précédant, trois isolats ont été sélectionnés, pour étudier leur sensibilité vis-à-vis de deux huiles essentielles (HE) et de leurs composés majoritaires (CM).

Les trois isolats retenus sont :

Un isolat de l'espèce *Penicillium digitatum* : *Pd 2*

Un isolat de l'espèce *Penicillium italicum* : *Pi 1*

Un isolat de l'espèce *Geotrichum candidum* : *Gc*

Les HE que nous avons utilisées dans ce travail sont :

- ✓ L'HE d'origan (*Origanum compactum*) qui contient 30.5% de carvacrol et 27.5% de thymol.
- ✓ L'HE de girofle (*Eugenia caryophyllata*) avec 90% d'eugénol.

Les HE d'origan et de girofle ont été fournis par la société « menthol india ».

Les composés majoritaires que nous avons utilisés dans ce travail sont : le thymol, le carvacrol et l'eugénol. Ces CM ont été fournis par Fluka (Steinheim, Allemagne).

Du fait de la non miscibilité des HE et de leurs CM à l'eau et donc au milieu de culture, la mise en émulsion a été facilitée par l'utilisation d'une solution d'agar à 0,2 %. Les solutions mères sont préparées au 1/10^{ème}, selon la méthode rapportée par Remmal et coll. (1993).

Dans des flacons contenant 20 ml du milieu Sabouraud stérile et refroidi à 45°C, différents volumes de la solution mère (1/10) des HE/CM sont ajoutés, permettant d'obtenir les concentrations finales suivantes de : 0 g/l (témoin) ; 0.125g/l ; 0.25g/l ; 0.5g/l ; 1g/l ; 2g/l ; 4g/l. Le contenu des flacons est ensuite coulé aseptiquement dans des boîtes de Petri (9,5 x 1.6 cm) et est laissé refroidir à la température ambiante jusqu'à gélification du milieu, puis les boîtes sont stockées à 4°C pendant 24h. Pour estimer l'action antifongique du milieu contenu dans ces boîtes, une goutte de 10µl d'une suspension mère de 10⁶ spores/ml de chacune des trois isolats (*Pi 1*, *Pd 2*, *Gc*) est déposée à la surface du milieu gélosé. Après absorption de la goutte déposée par le milieu, les boîtes sont incubées à 26°C pendant 7 jours. L'essai est réalisé en triplicate. La vitesse de croissance des trois isolats est suivie quotidiennement en mesurant le diamètre de la masse fongique. L'activité antifongique des HE et des CM utilisés a été exprimée par le pourcentage de l'inhibition de la croissance mycélienne calculé selon la formule suivante :

% de l'inhibition de la croissance mycélienne (% ICM) = [(Diamètre du mycélium témoin – Diamètre du mycélium traité) / Diamètre du mycélium témoin] x 100.

VII. Evaluation de l'activité antifongique préventive du thymol sur des fruits infectés par *Penicillium digitatum* (*Pd2*) et *Geotrichum candidum* (*Gc*)

En se basant sur les résultats obtenus *in vitro*, le thymol a été sélectionné pour ce test. En utilisant la méthode expérimentale d'infection des fruits que nous avons développée dans notre laboratoire, l'action préventive de ce composé majoritaire sur des fruits d'oranges de la variété « Maroc-Late » a été testée.

1. Isolats de champignons utilisés

En se basant sur les résultats du test *in vitro* et de l'évaluation de la virulence, deux isolats différents ont été sélectionnés pour l'infection des fruits. Le premier isolat de *Penicillium digitatum* (*Pd 2*) et le deuxième isolat de *Geotrichum candidum* (*Gc*). Les suspensions de spores de ces deux isolats ont été préparées.

2. Protocole expérimental

Vingt-quatre heures après leur cueillette, les fruits sont lavés à l'eau distillée stérile (seuls les fruits sains qui ne présentent pas de blessures ont été utilisés), ensuite trois lots de fruits ont été préparés :

Lot 1 : 30 fruits trempés dans la solution à 0.5g de thymol / l d'eau.

Lot 2 : 30 fruits trempés dans la solution de 1g de thymol / l d'eau.

Lot 3 (témoin) : 30 fruits trempés dans l'eau.

Après 5 minutes de trempage, les fruits de chaque lot sont séchés à l'air libre (pendant 2 heures) et répartis en 3 boîtes:

Boîte 1 : 10 fruits infectés par 250 µl de la suspension de spores de l'isolat *Pd 2* (10^6 spores / ml)

Boîte 2 : 10 fruits infectés par 250 µl de la suspension de spores de l'isolat *Gc* (10^6 spores / ml)

Boîte 3 : 10 fruits infectés par 250 µl du mélange des suspensions de spores des deux isolats *Pd 2+Gc* (10^6 spores / ml)

L'injection a été réalisée au niveau de deux sites d'infection diamétralement opposés et marqués au niveau équatorial du fruit, en utilisant la méthode expérimentale numéro 1.

Les boîtes transparentes sont fermées hermétiquement, saturées en humidité, et incubées à la température ambiante de $22\pm 2^\circ\text{C}$. Le pourcentage des fruits pourris et le diamètre des zones altérées au niveau de chaque site d'infection, ont été déterminés pour chaque boîte, durant les sept jours d'incubation. L'expérience a été répétée deux fois.

VIII. Etude statistique

Les résultats sont exprimés par la moyenne et l'écart type. La significativité des résultats a été vérifiée par l'utilisation du logiciel IBM SPSS Statistics software, version 21, par le test de student à $P < 0.05$ (pour la comparaison de deux moyennes), ou par le test de l'analyse de variance (ANOVA) en utilisant le test de comparaison least significant difference (LSD) à $P < 0.05$ (pour les comparaisons multiples).

Résultats

I. Isolement et identification des champignons responsables de la pourriture des agrumes

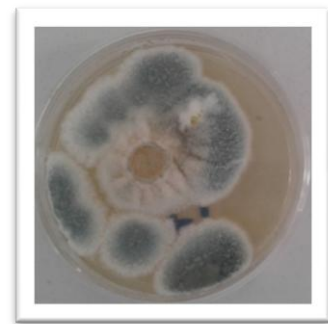
Au total, 12 isolats de champignons différents ont été obtenus, après une identification préliminaire macroscopique basée sur le diamètre et l'aspect des thalles sur différents milieux de culture, la taille et la forme des conidies au microscope optique, ainsi que sur la capacité de croissance aux différentes températures d'incubation (Pitt et Hocking, 2009). Un isolat parmi les 12 s'est révélé correspondre à une souche de *Geotrichum candidum*, sept isolats se sont révélés appartenant au genre *Penicillium*. Parmi ces sept isolats, deux appartiennent à l'espèce *Penicillium digitatum*, et deux autres à *Penicillium italicum*. Quatre autres isolats de champignons n'appartenant ni au genre *Geotrichum*, ni au genre *Penicillium* n'ont pas été identifiés.



Penicillium sp(Psp1)



Penicillium sp(Psp2)



Penicillium sp(Psp3)



Geotrichum candidum (Gc)



Penicillium digitatum(Pd1)



Penicillium digitatum(Pd2)

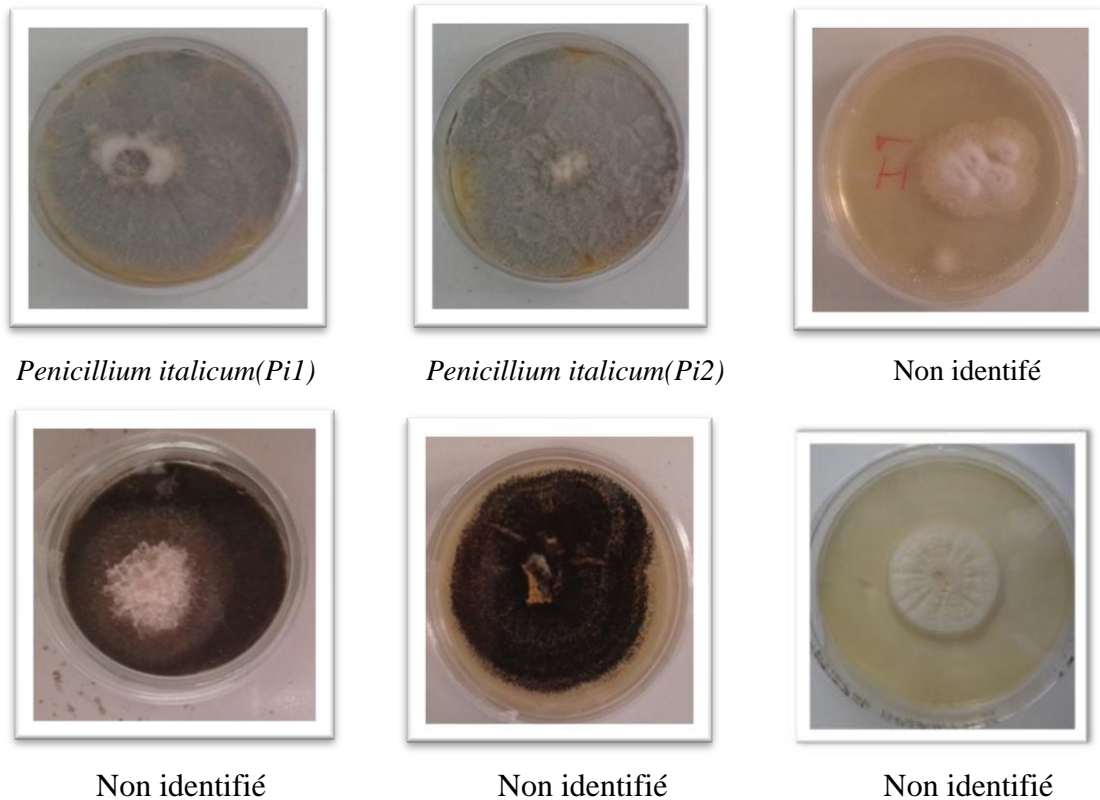


Figure 12 : Photos des champignons isolées à partir des oranges pourries

II. Méthodes expérimentales de reproduction de la pourriture sur les oranges

L'étude comparative de notre méthode expérimentale de reproduction de la pourriture des fruits d'oranges, avec trois autres méthodes existantes dans la bibliographie (Eckert et Brown, 1986; Schirra et coll., 2008; Lopez-Reyes et coll., 2010) a été évaluée en fonction du pourcentage de pourriture et du diamètre de la surface pourrie pour chaque méthode expérimentale.

1. Pourcentage de pourriture des fruits en fonction de la méthode expérimentale utilisée

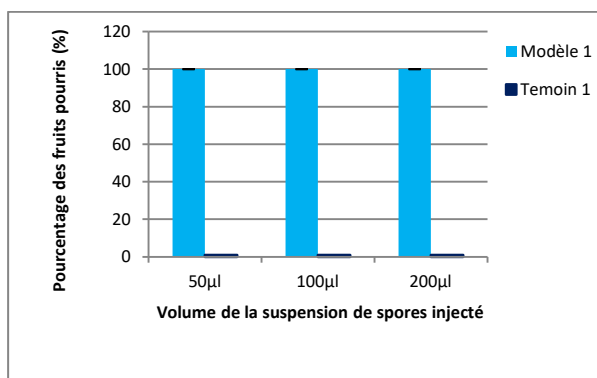


Figure 13 : Pourcentage de pourriture dans le lot des fruits infectés avec la méthode expérimentale numéro 1, après 5 jours d'incubation

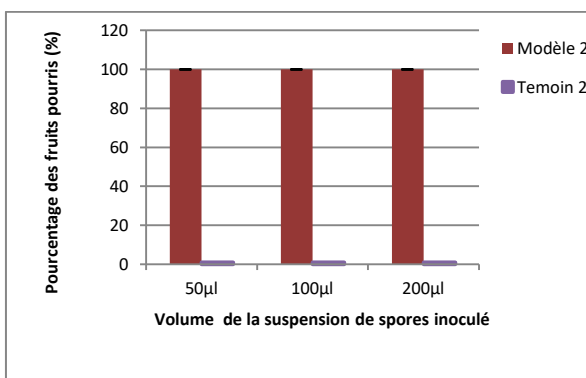


Figure 14 : Pourcentage de pourriture dans le lot des fruits infectés avec la méthode expérimentale numéro 2, après 5 jours d'incubation

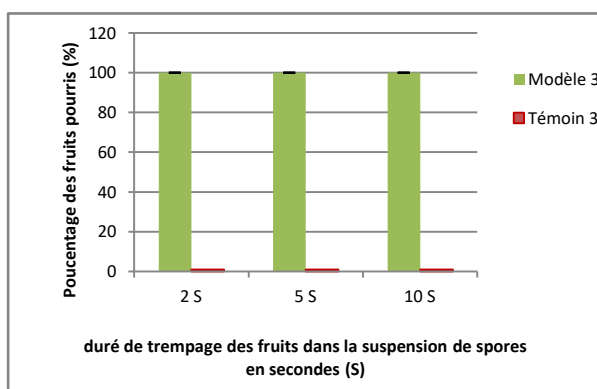


Figure 15 : Pourcentage de pourriture dans le lot des fruits infectés avec la méthode expérimentale numéro 3, après 5 jours d'incubation

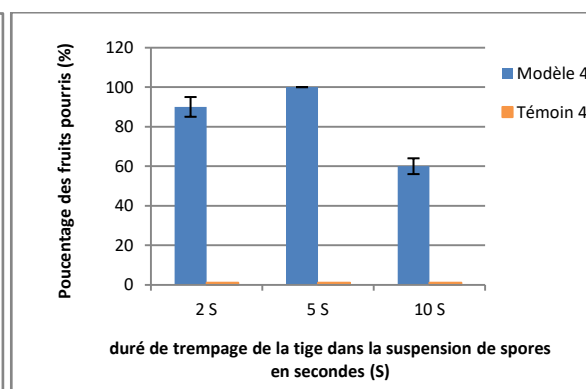


Figure 16 : Pourcentage de pourriture dans le lot des fruits infectés avec la méthode expérimentale numéro 4, après 5 jours d'incubation

Les figures 13, 14 et 15 résument les résultats du pourcentage de pourriture dans les lots des fruits infectés en utilisant la méthode expérimentale numéro 1, la méthode expérimentale numéro 2 et la méthode expérimentale numéro 3. Les résultats obtenus montrent que 100% de pourriture des fruits ont été obtenus avec les 3 méthodes utilisées après 5 jours d'incubation. Pour les fruits témoins, aucune altération n'a été observée.

La figure 16 montre les résultats du pourcentage de la pourriture dans le lot des fruits infectés avec la méthode expérimentale numéro 4. Les fruits ont été infectés à l'aide de tige métallique préalablement trempée pendant 2, 5, ou 10 secondes dans la suspension de spores

de la souche PI75. Les résultats obtenus montrent que tous les fruits infectés avec la tige trempée pendant 5 secondes sont pourris. 90% des fruits infectés avec la tige trempée pendant 2 secondes sont également pourris, et uniquement 60% des fruits infectés avec la tige trempée pendant 10 secondes sont pourris. Pour les fruits témoins, aucune altération n'a été observée.

2. Diamètre de la surface pourrie des fruits, selon la méthode d'infection expérimentale utilisée

Tableau 5 : Diamètre de la surface pourrie des fruits infectés avec la méthode expérimentale numéro 1 et celui des fruits infectés avec la méthode expérimentale numéro 2, après 5 jours d'incubation

Diamètre de la pourriture des fruits pourris en cm			
	50µl	100µl	200µl
Méthode 1	0,98±0,1 ^a	1,44±0,2 ^b	2,06±0,08 ^c
Méthode 2	1,88±0,3 ^b	1,66±0,15 ^b	1,68±0,4 ^b

Les valeurs présentées sont la moyenne de deux répétitions (n=2) ± SD, les valeurs suivies par les lettres a, b et c sont significativement différentes les unes par rapport aux autres à p<0,05.

Les résultats **du tableau 5** montrent que le diamètre de la surface pourrie des fruits infectés avec la méthode expérimentale numéro 1 augmente d'une façon significative avec l'augmentation du volume injecté. Ceci montre que dans cette méthode, l'ampleur de la pourriture est proportionnelle à la taille de l'inoculum injecté.

Les résultats **du tableau 5** montrent aussi qu'il n'y a pas de différence significative dans le diamètre de la surface pourrie entre les fruits inoculés avec les trois volumes de la suspension de spores de la souche PI75 en utilisant la méthode expérimentale numéro 2. Ceci montre que dans cette méthode, il n'y a aucune proportionnalité entre l'ampleur de la pourriture et la taille de l'inoculum utilisé.

Tableau 6 : Diamètre de la surface pourrie des fruits infectés avec la méthode expérimentale numéro 3, et de ceux infectés avec la méthode expérimentale numéro 4, après 5 jours d'incubation

Diamètre de la pourriture des fruits pourris en cm			
	2 s	5 s	10 s
Méthode 3	2,77±0,3 ^c	2,8±0,2 ^c	2,32±0,5 ^c
Méthode 4	0,9±0,4 ^a	1±0,2 ^a	1,2±0,2 ^a

Les valeurs présentées sont la moyenne de deux répétitions (n=2) ± SD, les valeurs suivies par des lettres a, b et c sont significativement différentes les une par rapport aux autres à p<0,05. Les résultats **du tableau 6** montrent qu'avec la méthode numéro 3, il n'y a pas de proportionnalité entre l'ampleur de la pourriture et la durée du trempage des fruits dans la suspension de spores. Ces résultats montrent aussi qu'avec la méthode numéro 4, il n'y a pas de proportionnalité entre l'ampleur de la pourriture et la durée de trempage des tiges dans la suspension de spores.

III. Test de virulence des isolats obtenus

Sur la base des résultats du test précédent, la méthode d'infection expérimentale numéro 1 a été retenue pour l'étude de la virulence des différents isolats de champignons du genre *Penicillium* (sept isolats) et du genre *Geotrichum* (une seul isolat) isolés et identifiés dans le début de cette étude.

Le tableau 7 montre le temps d'apparition de la pourriture sur des fruits d'oranges de la variété « *Maroc Late* », infectés par 100 µl, 250 µl et 500 µl de suspensions de spores des sept isolats du genre *Penicillium* et d'un isolat de *Geotrichum candidum*.

Tableau 7 : Temps d'apparition de la pourriture (en jours) sur des oranges infectées avec trois volumes différents de suspensions de spores (10^6 spores/ml) de huit isolats de champignons après 5 jours d'incubation

	Temps d'incubation en jours	1 jour	2 jours	3 jours	4 jours	5 jours
	Volume injecté					
Témoin	100 µl	-	-	-	-	-
	250 µl	-	-	-	-	-
	500 µl	-	-	-	-	-
Pd1	100 µl	-	-	-	-	-
	250 µl	-	-	-	+	++
	500 µl	-	+	+	++	+++
Pd2	100 µl	-	-	-	-	-
	250 µl	-	-	+	++	+++
	500 µl	-	+	++	+++	++++
Pi1	100 µl	-	-	-	-	-
	250 µl	-	-	-	-	+
	500 µl	-	-	+	++	+++
Pi2	100 µl	-	-	-	-	-
	250 µl	-	-	-	-	+
	500 µl	-	-	-	+	++
Psp1	100 µl	-	-	-	-	-
	250 µl	-	-	-	-	-
	500 µl	-	-	-	-	-
Psp2	100 µl	-	-	-	-	-
	250 µl	-	-	-	-	-
	500 µl	-	-	-	-	-
Psp3	100 µl	-	-	-	-	-
	250 µl	-	-	-	-	-
	500 µl	-	-	-	-	-
Gc	100µl	-	-	-	-	-
	250 µl	-	-	-	+	++
	500 µl	-	-	+	++	+++

+ : apparition de la pourriture ; - : absence de pourriture

++, +++, +++++ : pourriture de plus en plus développée.

Les résultats obtenus montrent que :

Pour les fruits témoins, aucune altération n'a été observée sur les fruits injectés par les trois volumes d'eau distillée stérile : 100 µl, 250 µl, 500 µl, après cinq jours d'incubation.

Pour les isolats de *Penicillium* et de *Geotrichum*, l'injection d'un volume de 100 µl de la suspension de 10⁶ spores/ml, ne provoque aucune altération sur les fruits après cinq jours d'incubation.

Les trois isolats de genre *Penicillium* (*Psp1*, *Psp2* et *Psp3*) ne provoquent pas d'altération des fruits aux différents volumes injectés durant les cinq jours d'incubation. Ces isolats sont considérés non virulents. Par conséquent, ils ne seront pas utilisés pour la suite des expérimentations.

Les deux isolats de *P. italicum* (*Pi1* et *Pi2*), les deux isolats de *P. digitatum* (*Pd1* et *Pd2*) et l'isolat de *G. candidum* (*Gc*) ont provoqué une altération des fruits durant les cinq jours d'incubation, à partir de l'injection d'un volume de 250 µl de la suspension de spores. Pour ces isolats, plus la taille de l'inoculum utilisée est grande, plus l'apparition de la pourriture est précoce.

Pour les deux isolats de l'espèce *Penicillium digitatum* (*Pd1* et *Pd2*), la pourriture des fruits apparaît après le 2^{ème} jour d'incubation, lorsque le volume de la suspension de spores injecté est de 500 µl.

Avec l'injection d'un volume de 250 µl de la suspension de spores de chacun des deux isolats de *Penicillium digitatum*, la pourriture des fruits commence apparaître à partir du 4^{ème} jour d'incubation pour l'isolat *Pd1*, et à partir du 3^{ème} jour d'incubation pour l'isolat *Pd2*.

La pourriture des fruits infectés avec 500 µl de la suspension de spores de l'isolat *Pi1*, commence à partir du 3^{ème} jour d'incubation, et à partir du 4^{ème} jour d'incubation après l'injection du même volume de la suspension de spores de l'isolat *Pi2*.

Dans le cas d'injection d'un volume de 250 µl de la suspension de spores de chacun des isolats de *Penicillium italicum*, la pourriture apparaît à partir du 5^{ème} jour d'incubation pour les deux isolats. La suspension de spores de l'isolat *Gc*, provoque la pourriture des fruits à partir du 3^{ème} jour d'incubation lorsque le volume injecté est de 500 µl, et à partir du 4^{ème} jour d'incubation lorsque le volume injecté est de 250 µl.

Les cinq isolats (*Pi1*, *Pi2*, *Pd1*, *Pd2*, *Gc*) les plus virulents ont été retenus. Les résultats du pourcentage de la surface pourrie (par rapport à la surface totale) sur les fruits inoculés par les spores de chacun des cinq isolats, après 5 jours d'incubation, sont présentés sur **le tableau 8**

Tableau 8: Pourcentage de la surface pourrie des oranges de la variété « Maroc Late » 5 jours après l'infection par différents volumes des suspensions de spores 10^6 spores/ml, de cinq isolats virulents

Isolats de champignons	Volume de la suspension de spores injecté (10^6 spores/ml)	
	250 μ l	500 μ l
Pourcentage de la surface pourrie (%) par rapport à la surface totale du fruit		
<i>Pd1</i>	16,03 \pm 2,03 ^m	31,1 \pm 1,9 ^{mn}
<i>Pd2</i>	29,5 \pm 2,7 ^{mn}	51,28 \pm 4,02 ^{AA}
<i>Pi1</i>	10,44 \pm 0,7 ^{cc}	21,74 \pm 1,01 ^{hh}
<i>Pi2</i>	7,84 \pm 1,2 ^{cc}	17 \pm 3,2 ^m
<i>Gc</i>	4,23 \pm 1,7 ^{kk}	16,16 \pm 1,8 ^m

Les valeurs présentées sont la moyenne de deux répétitions ($n=2$) \pm SD, les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes les unes par rapport aux autres à $p<0,05$.

Les résultats obtenus montrent que pour les cinq isolats de champignons, le pourcentage de la surface pourrie, augmente avec l'augmentation de la taille de l'inoculum injecté. En effet, l'injection d'un volume de 500 μ l de la suspension de spores, provoque une pourriture des fruits avec un pourcentage de surface pourrie significativement plus important ($p<0.05$), que celui provoqué lors de l'infection des fruits avec un volume de 250 μ l seulement.

Aux deux volumes utilisés (250 μ l et 500 μ l), les suspensions de spores des deux isolats de *Penicillium digitatum*, provoquent une pourriture des fruits significativement plus importante que celle provoquée par les suspensions de spores des isolats de *Pi1*, de *Pi2* et de *Gc*.

Un pourcentage de la surface pourrie (de 29.5% \pm 2.7) sur les fruits infectés par 250 μ l de la suspension de spores de l'isolat *Pd2*, est significativement supérieur à celui de la surface pourrie des fruits infectés par le même volume de la suspension de spores de *Pd1* (16.03% \pm 2.03).

Le pourcentage de surface pourrie sur les fruits infectés par 500 μ l de la suspension de spores de *Pd2* est de 51.28% \pm 4.02. Ce pourcentage est significativement supérieur ($p<0.05$) à celui

de la surface pourrie sur les fruits infectés avec le même volume de la suspension de spores de *Pd1*.

Ces résultats montrent aussi qu'il n'y a pas de différence significative, entre les pourcentages des surfaces pourries, sur les fruits infectés avec 250 µl de la suspension de spores de *Pi1* (10.44%±0.7), et sur les fruits infectés avec le même volume de la suspension de spores de *Pi2*. Cependant, l'infection des fruits avec 500 µl de la suspension de spores de *Pi1*, provoque une pourriture importante (de 21.74%±1.01), significativement supérieure à celle des fruits infectés avec le même volume de la suspension de spores de *Pi2* (17%±3.2).

La pourriture des fruits infectés avec 500 µl de la suspension de spores de *Gc* (un pourcentage de 16.16%±1.8 de surface pourrie) est comparable (pas de différence significative) à celle des fruits infectés avec le même volume de la suspension de spores de *Pi2* (17%±3.2 de surface pourrie).

L'injection de 250 µl de la suspension de spores de *Gc*, donne une pourriture des fruits significativement moins importante (4.23%±1.7 de surface pourrie), que celle des isolats de *Penicillium digitatum*, et des isolats de *Penicillium italicum*.

Les tableaux 7 et 8 montrent donc que :

- l'isolat *Pd2* est significativement ($p < 0.05$) le plus virulent des cinq isolats étudiés.
- l'isolat *Pi1* est significativement ($p < 0.05$) plus virulent que l'isolat *Pi2*.
- l'isolat *Gc* est moyennement virulent, et c'est le seul isolat de *Geotrichum candidum* que nous avons isolé et identifié dans ce travail. Ceci justifie le choix de ces trois isolats dans l'expérience qui va suivre.

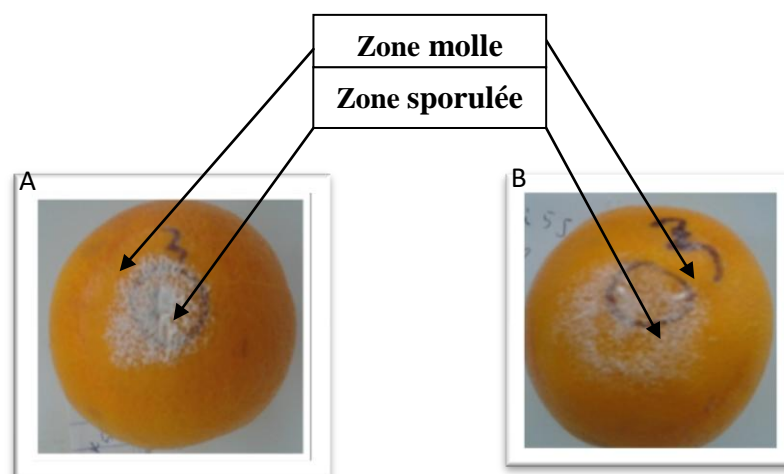


Figure 17: Oranges après 5 jours d'inoculation par la suspension de spores de l'isolat *Pd1* (10^6 spores/ml); A: Orange inoculée avec 250 µl ; B: Orange inoculée avec 500 µl.

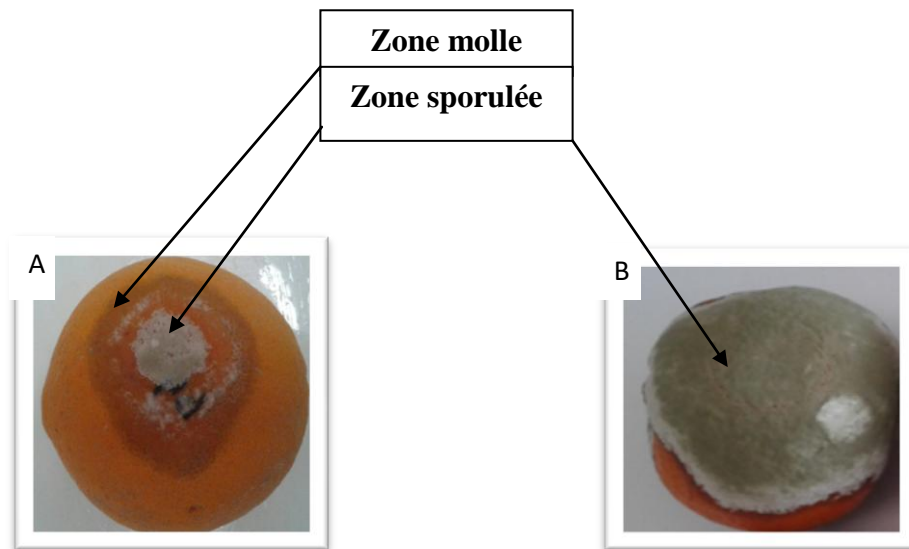


Figure 18: Oranges après 5 jours d'inoculation par la suspension de spores de l'isolat Pd2 (10^6 spores/ml) ; A: Orange inoculée avec 250 μ l ; B: Orange inoculée avec 500 μ l.

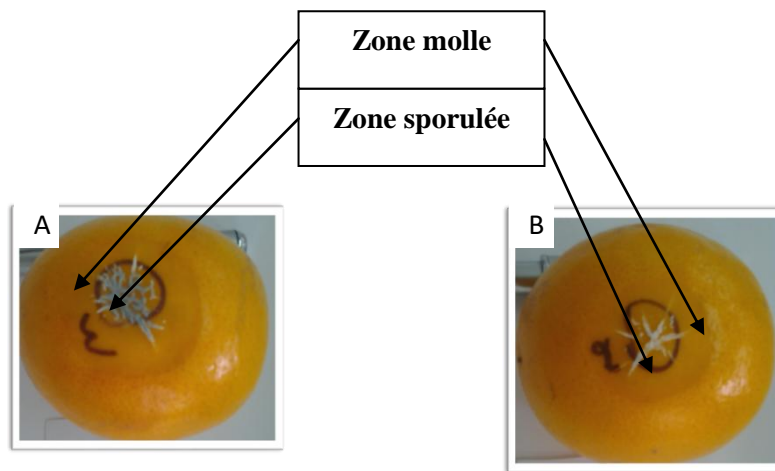


Figure 19: Oranges après 5 jours d'inoculation par la suspension de spores de l'isolat Pi2 (10^6 spores/ml) ; A: Orange inoculée avec 250 μ l ; B: Orange inoculée avec 500 μ l.

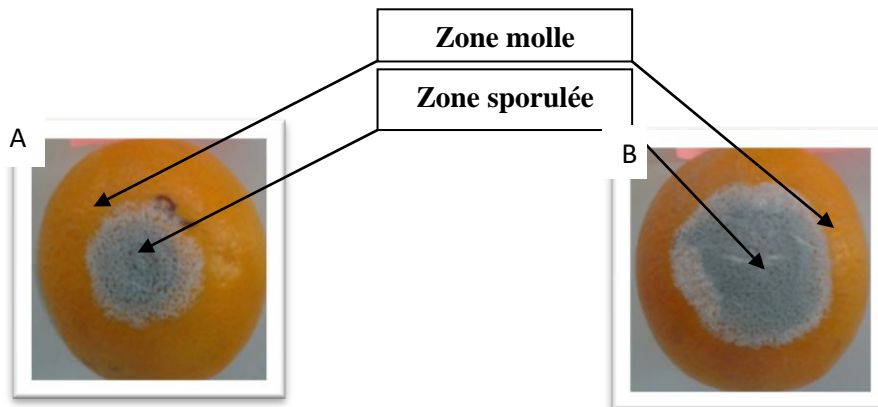


Figure 20: Oranges après 5 jours d'inoculation par la suspension de spores de l'isolat Pi1 (10^6 spores/ml) ; A: Orange inoculée avec 250 μ l ; B: Orange inoculée avec 500 μ l

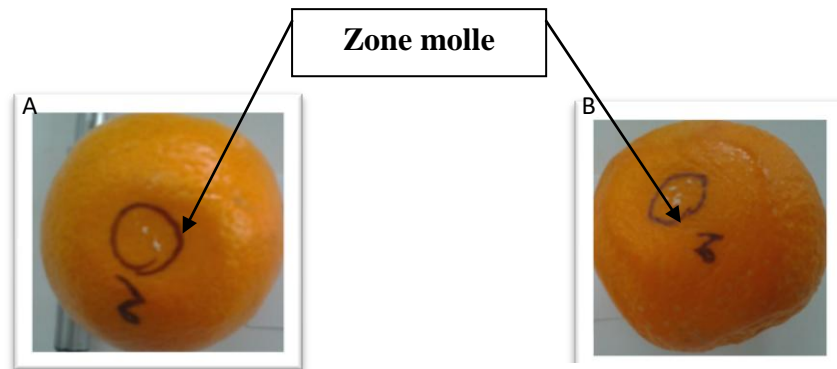


Figure 21: Oranges après 5 jours d'inoculation par la suspension de spores de l'isolat Gc (10^6 spores/ml); A: Orange inoculée avec 250 μ l ; B: Orange inoculée avec 500 μ l.

IV. Action des huiles essentielles de girofle, d'origan, et de leurs composés majoritaires sur les trois isolats sélectionnés

1. *Penicillium digitatum* : Pd2

Le tableau 9 montre les résultats du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne (%ICM) de l'isolat Pd2 en présence de différentes huiles essentielles et composés majoritaires.

Tableau 9 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne (%ICM) de l'isolat *Penicillium digitatum* 2 (Pd2)

Huile essentielle/Composé Majoritaire	Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne (%)			
	Témoin	0,125g/l	0,25g/l*	0,5g/l*
Thymol	0± 0 ^a	73,12± 0.5 ^b	100±0 ^f	100±0 ^f
Carvacrol	0± 0 ^a	69,30± 1.5 ^c	100±0 ^f	100±0 ^f
Eugénol	0± 0 ^a	34,21± 0,1 ^d	66,66± 0.3 ^c	100±0 ^f
HE d'origan	0± 0 ^a	61,4± 1.1 ^e	65,78± 0,2 ^c	100±0 ^f
HE de girofle	0± 0 ^a	32,45± 1.8 ^d	61,4± 0,1 ^e	100±0 ^f

Les valeurs présentées sont la moyenne de trois répétitions ($n=3$) ± SD. Les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes les unes par rapport aux autres à $p<0,05$.

***Dans nos conditions expérimentales $Y < CMI \leq X$ signifie que la CMI = X**

Les résultats montrent que le thymol et le carvacrol possèdent une concentration minimale inhibitrice (inhibition 100% = CMI) de 0.25g/l. L'eugénol, l'origan et le clou de girofle possèdent une CMI de 0.5g/l. Le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne, varie en fonction des HE et des CM, et augmente avec l'augmentation de la concentration utilisée. Concernant les composés majoritaires, le thymol semble être l'agent antifongique le plus actif sur Pd2. En effet, à la concentration de 0.125g/l, la croissance mycélienne est inhibée avec un pourcentage de 73.12%±0.05. Cette inhibition est significativement plus faible ($p<0.05$) en présence de la même concentration de carvacrol (69.30%±0.015). L'eugénol est le composé majoritaire le moins actif avec un pourcentage d'inhibition de 34,21%± 0,1.

Pour les huiles essentielles, l'HE d'origan est la plus inhibitrice de Pd2, avec un pourcentage de 61.4%±0.01 et de 65,78%±0.02 aux concentrations respectives de 0.125g/l et de 0.25g/l.

L'HE de clou de girofle s'est révélée moins active avec une inhibition de la croissance mycélienne de $32,45\% \pm 0,018$ et de $61,4\% \pm 0,1$ aux concentrations respectives de 0.125g/l et de 0.25g/l .

2. *Penicillium italicum* : Pi1

Les résultats des pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne de Pi1 sont présentés sur le **tableau 10**.

Tableau 10 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne (%ICM) de l'isolat *Penicillium italicum* 1 (Pi1)

Huile essentielle/Composé Majoritaire	Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne (%)			
	Témoin	0,125g/l	0,25g/l*	0,5g/l*
Thymol	0± 0 ^a	76,67± 3,8 ^o	100±0 ^f	100±0 ^f
Carvacrol	0± 0 ^a	52,38± 1,6 ^k	100±0 ^f	100±0 ^f
Eugénol	0± 0 ^a	10,59± 1.2 ^t	19,33± 0,1 ^u	100±0 ^f
HE d'origan	0± 0 ^a	29,04± 1.3 ^h	59,18± 1.9 ^k	100±0 ^f
HE de girofle	0± 0 ^a	8,64± 0,3 ^t	22,25± 0,6 ^u	100±0 ^f

Les valeurs présentées sont la moyenne de trois répétitions (n=3) ± SD (les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes les une par rapport aux autres à $p < 0,05$).

***Dans nos conditions expérimentales $Y < \text{CMI} \leq X$ signifie que la CMI= X**

Ces résultats montrent que le thymol et le carvacrol ont la même CMI (0.25g/l). La CMI de l'eugénol est de 0.5g/l. Les HE d'origan et de clou de girofle, ont la même CMI (0.5g/l).

Les HE et les CM utilisés, témoignent d'une activité antifongique intéressante, avec un pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne allant de $8.64\% \pm 0.03$, jusqu'à 100%. Pour les CM, l'activité la plus importante a été constatée avec le thymol, dont le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne est de $76.67\% \pm 0.03$ à la concentration de 0.125g/l , suivi par le carvacrol avec un pourcentage d'inhibition de $52.38\% \pm 0.016$ à la même concentration. L'eugénol a montré une faible activité avec un pourcentage d'inhibition de $10,59 \pm 0,12$ seulement.

Concernant les HE, l'HE de clou de girofle semble significativement la moins active sur *Pil*, avec des pourcentages d'inhibition de $8,64\% \pm 0,03$ et de $22,25\% \pm 0,06$ aux concentrations respectives de 0.125g/l et de 0.25g/l. L'HE d'origan inhibe la croissance de l'isolat *Pil* avec un pourcentage de $29,04\% \pm 0,013$ et de $59,18\% \pm 0,019$ aux concentrations respectives de 0.125g/l et de 0.25g/l.

3. *Geotrichum candidum* : Gc

Le **tableau 11** présente le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de *Gc*, en présence de différentes concentrations d'HE et de CM.

Tableau 11 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne (%ICM) de l'isolat *Geotrichum candidum* (Gc)

Huile essentielle/Composé Majoritaire	Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne (%)			
	Témoin	0,125g/l	0,25g/l*	0,5g/l*
Thymol	0± 0 ^a	83,08± 1.5 ^r	100±0 ^f	100±0 ^f
Carvacrol	0± 0 ^a	75± 2 ^r	82±0,6 ^r	100±0 ^f
Eugénol	0± 0 ^a	21,96± 1 ^p	75± 0,3 ^r	100±0 ^f
EH d'origan	0± 0 ^a	74± 1.3 ^r	77,09± 0.2 ^r	100±0 ^f
EH de girofle	0± 0 ^a	10,94± 1.8 ^g	65± 1 ⁿ	100±0 ^f

Les valeurs présentées sont la moyenne de trois répétitions (n=3) ± SD (les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes les une par rapport aux autres à $p < 0,05$).

***Dans nos conditions expérimentales $Y < CMI \leq X$ signifie que la CMI= X**

Les résultats montrent que le thymol possède la CMI la plus faible (0.25g/l), suivi par le carvacrol et l'eugénol avec une CMI de 0.5g/l. Concernant les HE utilisées dans ce travail, elles possèdent la même CMI (0.5g/l).

Le thymol possède une activité antifongique significativement plus forte, avec un pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de $83,08\% \pm 0,015$, suivi par le carvacrol avec un pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de $75\% \pm 0,02$ à la même concentration. L'eugénol possède une activité antifongique significativement plus faible.

L'HE d'origan est significativement la plus active sur *Gc* que celle du clou de girofle.

Les résultats **des tableaux 9, 10 et 11** montrent que le thymol est l'agent antifongique le plus actif sur les trois isolats étudiés (*Pd2*, *Pil* et *Gc*) en comparaison avec les huiles essentielles et les composés majoritaires testés, justifiant ainsi le choix de ce composé dans la suite de notre travail.

V. Evaluation sur fruit de l'activité antifongique préventive du thymol sur les champignons pathogènes responsables des maladies post-récolte des agrumes

Dans cette partie du travail, un test sur fruits a été réalisé, afin d'évaluer l'activité antifongique du thymol, sur un isolat de chaque genre de champignon que nous avons isolé et identifié. Les isolats virulents que nous avons choisis sont :

- Un isolat du genre *Penicillium* : *Penicillium digitatum 2 (Pd2)*.
- Un isolat du genre *Geotrichum* : *Geotrichum candidum (Gc)*.

Les oranges ont été trempées dans des solutions de thymol aux différentes concentrations (0, 0.5 et 1g/l d'eau) pendant 5 min. Ensuite, les fruits sont séchés à l'air libre. Après 2h de séchage, ces derniers ont été inoculés avec 250µl de la suspension de spores de *Pd2*, de *Gc*, ou du mélange des deux suspensions de spores (*Pd2*+ *Gc*).

La souche *Pd2* a été choisie sur la base du test de virulence qui a montré que cet isolat possède une virulence significativement plus forte, par rapport aux autres isolats du genre *Penicillium*.

La souche *Gc* a été choisie puisqu'il s'agit du seul isolat virulent de ce genre que nous avons pu isoler et identifier dans ce travail. Le thymol a été choisi sur la base du test *in vitro*, qui a montré une activité antifongique significativement plus forte, en comparaison avec les autres HE et CM utilisés. L'infection des fruits avec un inoculum de 250µl, a été choisie afin d'obtenir un développement lent de la pourriture qui permet de suivre le développement de la pourriture sur fruits pendant sept jours d'incubation.

1. Evaluation de l'activité antifongique préventive du thymol sur des oranges inoculées avec les spores de *Penicillium digitatum 2 (Pd2)*

La figure 22 présente l'effet préventif du thymol sur l'évolution de la pourriture des oranges inoculées avec les spores de *Pd2*.

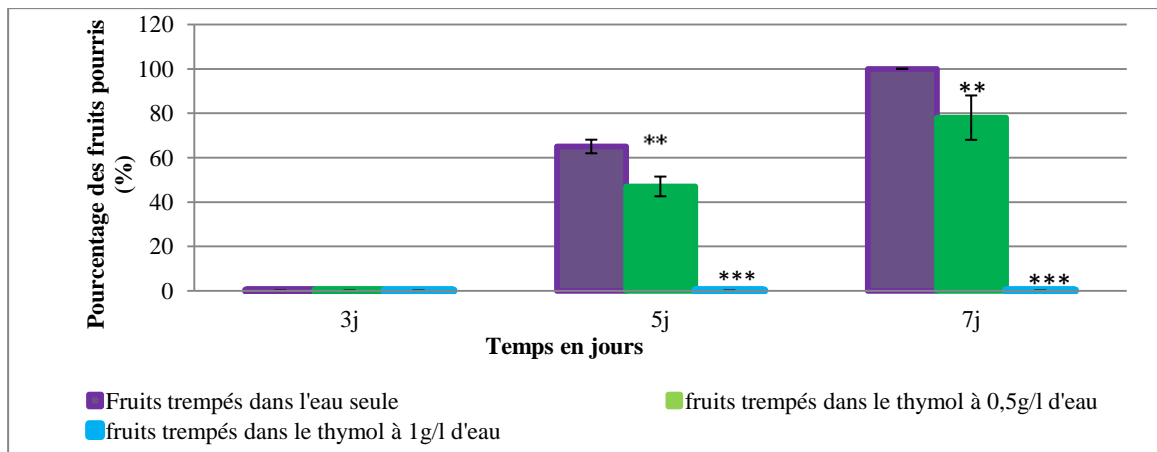


Figure 22 : Effet préventif du thymol sur l'évolution du pourcentage de fruits pourris après inoculation avec 250 μ l de la suspension de spores de Pd2

** : $p < 0.01$: Différence très significative en comparaison avec le lot des fruits trempés dans l'eau seule

*** : $p < 0.001$: Différence hautement significative en comparaison avec le lot des fruits trempés dans l'eau seule

Les résultats obtenus montrent que pour les fruits trempés dans le thymol à 1g/l d'eau, aucune pourriture n'a été détectée durant les sept jours d'incubation. Ces résultats montrent aussi que le trempage des fruits dans le thymol à la concentration de 0.5g /l d'eau, réduit d'une façon très significative le pourcentage de la pourriture. En effet, après cinq jours d'incubation, la pourriture attaque 60% des fruits trempés dans l'eau seule, et uniquement 40% des fruits trempés dans le thymol à 0.5g /l. Après sept jours d'incubation, la pourriture attaque la totalité des fruits traités à l'eau seule (100%), alors que 20% des fruits traités à 0.5g de thymol /l d'eau sont restés intacts.

Après 7 jours d'incubation, les diamètres des zones altérées sur les fruits pourris ont été notés. **La figure 23** représente l'effet du thymol sur le diamètre de la pourriture des fruits altérés après 7 jours d'incubation.

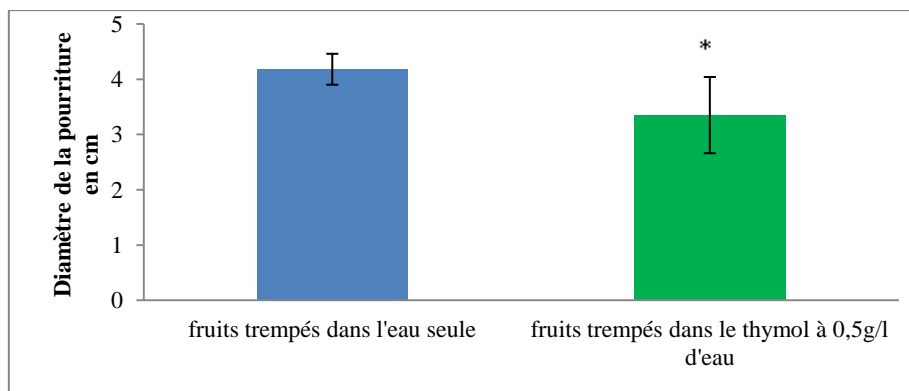


Figure 23 : Diamètre de la pourriture des fruits altérés après 7 jours d'incubation

* : $p < 0.05$ / Différence significative en comparaison avec le lot des fruits trempés dans l'eau seule.

Les résultats obtenus montrent que le trempage des fruits dans 0.5g de thymol/l d'eau, diminue d'une façon significative le diamètre de la pourriture des fruits ($p < 0.05$).

2. Evaluation de l'activité antifongique préventive du thymol sur des oranges inoculées avec les spores de *Geotrichum candidum* (Gc)

La figure 24 présente l'effet préventif du thymol sur l'évolution de la pourriture des oranges inoculées avec 250 μ l de la suspension de spores de Gc.

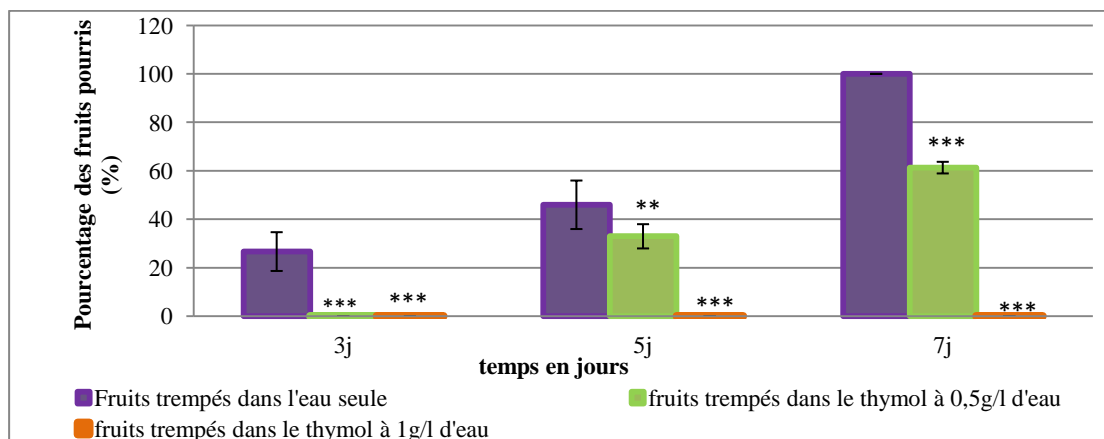


Figure 24 : Effet préventif du thymol sur l'évolution du pourcentage de fruits pourris après inoculation avec 250 μ l de la suspension de spores de Gc

** : $p < 0.01$: Différence très significative en comparaison avec le lot des fruits trempés dans l'eau seule

*** : $p < 0.001$: Différence hautement significative en comparaison avec le lot des fruits trempés dans l'eau seule.

Les résultats obtenus montrent que les fruits trempés dans le thymol à 1g /l d'eau, ne montrent aucune pourriture durant les 7 jours d'incubation. Ces résultats montrent aussi que le trempage des fruits dans la solution de thymol à 0.5g/l, retarde significativement l'apparition de la pourriture d'une part, et diminue d'une façon très significative le pourcentage des fruits pourris d'autre part. En effet, la pourriture commence après trois jours d'incubation, sur les fruits traités à l'eau seule, et cinq jours après l'incubation des fruits traités au thymol à la concentration de 0.5 g/l d'eau. Après sept jours d'incubation, la pourriture attaque la totalité des fruits trempés dans l'eau seule (100%) et 40% des fruits trempés dans la solution de thymol à la concentration de 0.5g /l sont restés sains.

Après 7 jours d'incubation, les diamètres des zones altérées sur les fruits pourris ont été notés. **Les figures 25 et 26** représentent l'effet du thymol sur le diamètre de la pourriture des fruits altérés après 7 jours d'incubation.

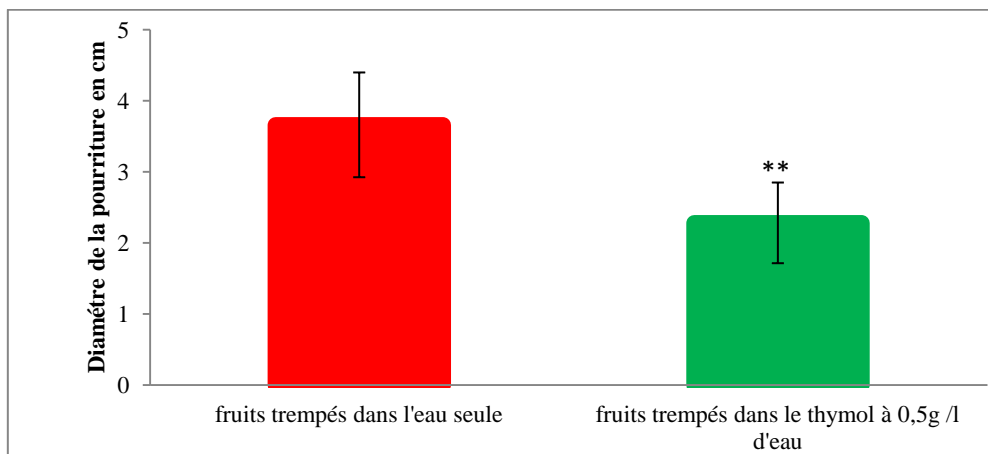


Figure 25 : Diamètre de la pourriture des fruits altérés, après 7 jours d'incubation

** : $p < 0.01$: Différence très significative en comparaison avec le lot des fruits trempés dans l'eau seule.

Les résultats obtenus montrent que le trempage des fruits dans le thymol à 0.5g/l d'eau pendant 5 min, réduit d'une façon très significative ($p < 0.05$) le diamètre de la pourriture.

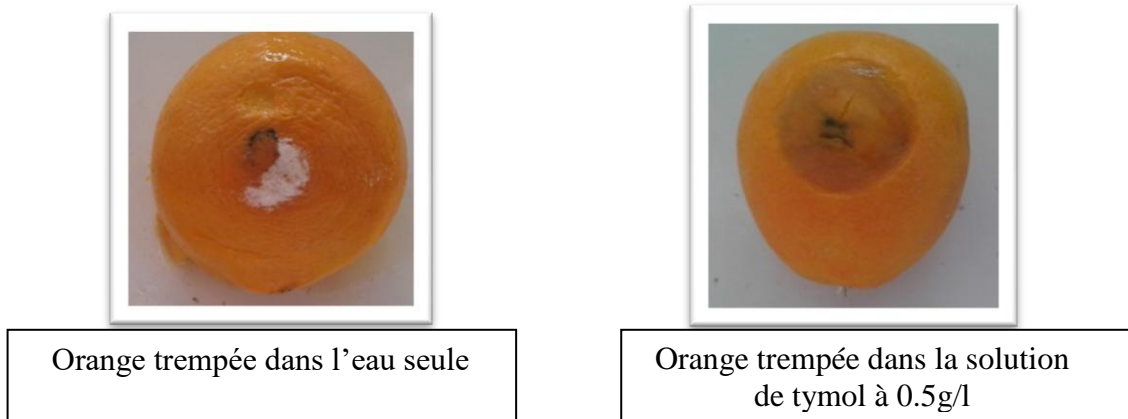


Figure 26 : Oranges trempées dans l'eau seule, ou dans la solution de thymol à 0.5g/l, ensuite inoculées avec 250 µl de la suspension de spores de la souche *Geotrichum candidum* (Gc) (10^6 spores/ml), après 7 jours d'incubation

3. Evaluation de l'activité antifongique préventive du thymol sur des oranges inoculées par le mélange des spores des deux isolats (*Penicillium digitatum* et *Geotrichum candidum*) (Pd 2+Gc) (10^6 spores / ml)

La figure 27 présente l'effet préventif du thymol sur l'évolution de la pourriture des oranges inoculées avec 250 µl d'un mélange de spores des deux isolats Pd2 et Gc.

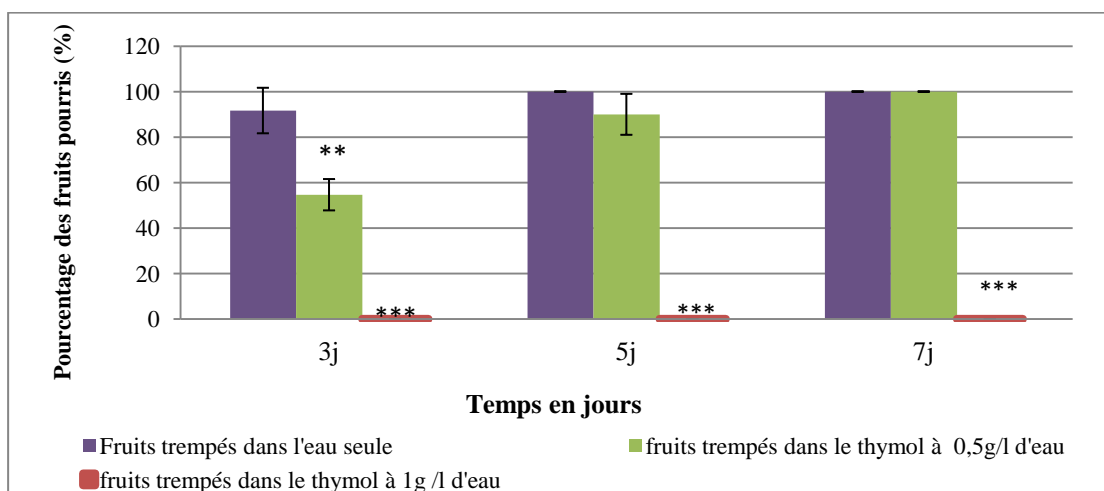


Figure 27: Effet de thymol sur l'évolution du pourcentage de fruits pourris après inoculation avec 250µl d'un mélange des suspensions de spores des deux isolats Pd2+ Gc (10^6 spores / ml)

** : $p < 0.01$: Différence très significative en comparaison avec le lot des fruits trempés dans l'eau seule.

*** : $p < 0.001$: Différence hautement significative en comparaison avec le lot des fruits trempés dans l'eau seule.

Les résultats obtenus montrent qu'il ya une synergie de virulence entre les deux isolats lorsqu'ils sont utilisés en association. Ces résultats montrent aussi que sur les fruits trempés dans la solution de thymol à la concentration de 1g/l d'eau, aucune pourriture n'a été remarquée. Le traitement des fruits au thymol à la concentration de 0.5g/l d'eau, réduit significativement la pourriture après les trois premiers jours d'incubation.

Les résultats des diamètres des zones altérées sur les fruits pourris après 7 jours d'incubation sont montrés sur **la figure 28**.

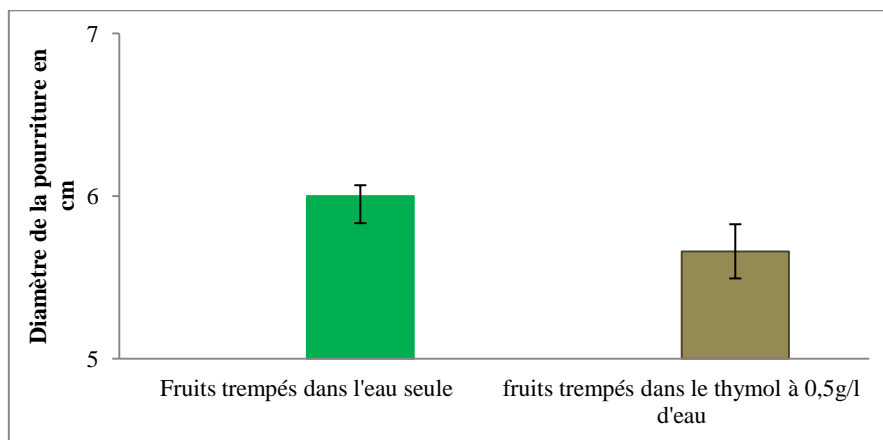


Figure 28 : Diamètre de la pourriture des fruits altérés, après 7 jours d'incubation

Les résultats obtenus montrent, qu'il n'ya pas de différences significative entre le diamètre de pourriture sur les fruits trempés dans la solution de thymol à la concentration de 0.5g/l d'eau et sur les fruits témoins (trempés dans l'eau seule).

DISCUSSION

Le Maroc compte parmi les plus grands pays producteurs et exportateurs d'agrumes dans le monde. Cette production est en progression positive chaque année. Cependant, les marchés internationaux les plus demandeurs d'oranges et de clémentines Marocaines sont devenus la Russie, le Canada, et d'autres pays assez lointains. Cette longue distance pose le problème de pourriture des fruits provoquée par les champignons lors du transport maritime qui peut atteindre plusieurs semaines.

Pour lutter contre le problème de champignons, certains agents antifongiques étaient et continuent à être utilisés. Parmi ces derniers on peut citer par exemple : l'Imazalil ; le Thiabendazole ; le bénomyl ; la guazatine ; l'ortho-phenylphenol (OPP) ; le sodium ortho-phenylphenate (SOPP) ; et le pyrimethanil (Smilanick et coll., 2005; Palou et coll., 2008 ; Ladaniya, 2008). Ces agents antifongiques sont aujourd'hui, soit interdits, soit en cours d'interdiction pour des raisons de risque de toxicité pour le consommateur et pour l'environnement (Gupta et coll., 2010). Il faut ajouter à cela que même aux doses autorisées de ces fongicides, il y a apparition de champignons multi-résistantes (Palou et coll., 2008).

Des entreprises marocaines spécialisées dans la production, l'emballage et l'export des agrumes ont sollicité notre laboratoire pour la mise au point de solutions alternatives, plus efficaces que les agents antifongiques chimiques, dépourvues de toxicité, et ne présentant pas de risque de résistance.

Suite à cela, nous avons effectué une veille technologique sur le problème des champignons des agrumes, et sur les solutions proposées. Cette veille technologique nous a permis de comprendre que les alternatives proposées actuellement sont principalement : la lutte biologique (Taqaourt et coll., 2008), les sels organiques (El-Mougy et coll., 2008 ; D'Aquino et coll., 2013), et les extraits de plantes (Talibi et coll., 2014). Ces alternatives proposées sont d'une efficacité assez limitée, et leur prix est trop élevé par rapport aux traitements chimiques (Plaza et coll., 2004). Ceci représente un obstacle à leur adoption par les producteurs Marocains.

Nous nous sommes donc retrouvés devant le défi de développer un produit Marocain à base de substances naturelles ayant une forte activité antifongique et à un prix acceptable.

Nous nous sommes alors basé sur l'expérience de notre laboratoire dans le domaine de l'étude de l'activité antifongique des HE, et de leurs CM (Bennis et coll., 2004a ; Chami et coll., 2005 ; Bouddine et coll., 2012)

La stratégie que nous avons décidé d'adopter est la suivante :

- 1) Isoler des champignons virulents responsables de la pourriture des fruits.

- 2) Mettre au point une méthode d'infection expérimentale reproductible et fiable qui nous permet de reproduire la pourriture des fruits. Ensuite, classer les souches isolées et identifiées selon leur degré de virulence, en utilisant la méthode d'infection expérimentale mise au point.
- 3) Tester *in vitro* la sensibilité des isolats des genres *Penicillium* et *Geotrichum* aux différentes HE et CM qui ont déjà donné de bons résultats comme agents antifongiques.
- 4) Faire des essais sur fruits afin de tester l'efficacité des HE et des CM, qui se sont montrés les plus efficaces *in vitro*, en utilisant la méthode d'infection expérimentale mise au point.

Isolement et identification des germes

Dans cette expérience, nous avons obtenu 12 isolats de champignons à partir des oranges pourries spontanément, avec une dominance des moisissures du genre *Penicillium*. En effet, 7 isolats se sont révélés appartenant au genre *Penicillium*. Parmi ces 7 isolats, 2 appartiennent à l'espèce *Penicillium digitatum*, et deux autres à l'espèce *Penicillium italicum*. Un seul isolat s'est révélé correspondre à l'espèce *Geotrichum candidum*. 4 autres isolats de champignons n'appartenant ni au genre *Geotrichum* ni au genre *Penicillium* n'ont pas été identifiés. Ces résultats montrent que la pourriture des fruits d'oranges est causée principalement par des moisissures du genre *Penicillium*. En effet, *Penicillium digitatum*, l'agent causal de la pourriture verte et *Penicillium italicum*, l'agent causal de la pourriture bleue sont les deux agents pathogènes les plus connus dans les maladies des agrumes en post-récolte, suivis par *Geotrichum candidum*, l'agent causal de la pourriture amère (Palou et coll., 2002; Zheng et coll., 2005). D'autres études ont rapporté également que *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, et *Geotrichum candidum* sont les trois agents pathogènes les plus répandus dans l'infection des agrumes en post-récolte (Dewa et coll., 1997 ; Holmes et Eckert., 1999). Ces germes pathogènes peuvent attaquer les fruits d'agrumes dans le champ, dans la station d'emballage, au cours du stockage et au cours du transport (Palou et coll., 2008), provoquant ainsi des pertes économiques importantes. Ces pertes économiques sont plus importantes durant le transport vers les pays demandeurs (Fernandez-Cruz et coll., 2010). Holmes et coll. (1994) ont rapporté que plus de 90% des dégâts sur les fruits d'agrumes en post-récolte sont dus principalement à ces trois champignons.

Méthodes expérimentales de reproduction de la pourriture sur les fruits d'oranges

Plusieurs études ont décrit des méthodes expérimentales permettant la reproduction de la pourriture des écorces d'agrumes (Eckert et Brown, 1986 ; Schirra et coll., 2008 ; Lopez-Reyes et coll., 2010)

La méthode expérimentale numéro 2 : Cette méthode a été décrite par Lopez-Reyes et coll. (2010). Elle consiste à faire des trous (1 mm de largeur, 2mm de profondeur) traversant le flavedo et l'albédo, et arrivent jusqu'à la pulpe des fruits, puis inoculer ces trous avec la suspension de spores de la souche étudiée.

La méthode expérimentale numéro 3 : Cette méthode a été décrite par Schirra et coll. (2008). Elle consiste à faire des trous (1 mm de largeur, 2mm de profondeur) traversant le flavedo et l'albédo, et arrivent jusqu'à la pulpe des fruits, puis à tremper les fruits dans la suspension de spores de la souche étudiée.

La méthode expérimentale numéro 4 : Cette méthode a été décrite par Eckert et Brown (1986). Elle consiste à tremper une tige métallique stérile (1 mm de largeur, 2mm de profondeur) dans la suspension de spores de la souche étudiée, et à faire un seul trou au niveau équatorial des fruits avec cette tige.

Nous avons essayé d'utiliser ces mêmes méthodes afin de reproduire la pourriture sur des fruits d'orange « Maroc-Late ». Les résultats obtenus n'étaient pas convaincants, du fait qu'un pourcentage de 10 à 40% de blessures contenant les spores n'ont pas développé de pourriture (surtout pour la méthode 4) (**figure 16**). De plus, deux blessures identiques inoculées avec un nombre de spores différent, donnaient des pourritures d'ampleurs égales (c'est le cas des méthodes 2, 3 et 4) (**Tableau 5 et 6**).

Nous étions donc dans l'obligation d'optimiser les méthodes existantes afin de mettre au point une méthode standardisée permettant d'obtenir 100% de reproduction de la pourriture avec une ampleur proportionnelle à la taille de l'inoculum de spores déposé. Après plusieurs tentatives, nous sommes parvenus à la méthode d'infection expérimentale (que nous appellerons méthode expérimentale numéro1) qui consiste à inoculer un volume de la suspension de spores (50-500 μ l) contenant environ 10^6 spores /ml. Cette inoculation est effectuée grâce à une seringue équipée d'une aiguille très fine (30 gauges) immédiatement sous la couche superficielle de l'écorce appelée flavedo. Cette méthode nous a permis d'obtenir des résultats reproductibles à 100% (**figure 13**) avec une ampleur de la pourriture proportionnelle à la taille de l'inoculum de spores injectées (**Tableau 5**).

Test de virulence des isolats obtenus

Puisque le but du travail était de faire des tests de l'efficacité des HE et de leurs CM pour la protection des fruits contre la pourriture, et vu le nombre important d'isolats obtenus, nous avons effectué un test de virulence sur plusieurs isolats de *Penicillium sp* (7 isolats) et de *Geotrichum* (1 isolats) afin de sélectionner les isolats les plus virulents.

Les résultats obtenus nous ont permis de classer les isolats du plus virulent (qui provoque une pourriture précoce qui évolue rapidement avec un pourcentage de surface pourrie élevé après 5 jours d'incubation), au moins virulent (qui ne donne pas de pourriture ou qui donne une pourriture très tardive et très lente avec une petite surface pourrie après 5 jours d'incubation) (**Tableau 7 et 8**). L'isolat *Pd2* s'est avéré significativement ($p < 0.05$) le plus virulent parmi les sept isolats du genre *Penicillium* étudiés. L'isolat *Pi1* s'est montré significativement ($p < 0.05$) plus virulent que *Pi2*. *Gc*, moyennement virulent, a été le seul isolat de *Geotrichum candidum* que nous avons obtenu dans ce travail. Suite à ce classement, nous avons retenu les isolats de *Penicillium* les plus virulents (*Pd2 et Pi1*), et l'isolat de *Geotrichum candidum* (*Gc*) pour évaluer l'activité antifongique des HE et de leurs CM *in vitro* et sur fruits.

Évaluation *in vitro* de l'activité antifongique des HE de girofle, d'origan et de leurs composés majoritaires sur les isolats sélectionnés

De nombreux travaux ont montré l'effet antifongique des huiles essentielles et de leurs composés majoritaires « *in vitro* » (Chami et coll., 2004a., 2005a et b ; Pinto et coll., 2006 ; Khan et coll., 2010 ; Bouddine et coll., 2012).

Dans le présent travail, nous avons évalué l'activité antifongique de l'huile essentielle d'origan, de girofle et de leurs composés majoritaires : le thymol, le carvacrol et l'eugénol *in vitro* sur trois isolats de champignons (*Pd2, Pi1 et Gc*) obtenus à partir des oranges pourris spontanément. Notre laboratoire a déjà montré que la méthode la plus fiable sur le plan qualitatif et quantitatif, pour évaluer l'action des HE et des CM sur les champignons était la méthode de contact direct (Bouddine et coll., 2012). L'utilisation de cette méthode sur les deux isolats de *Penicillium sp* (*Pd2 et Pi1*) et l'isolat de *G.candidum* (*Gc*) sélectionnés a donné des résultats qui montrent que ces champignons sont sensibles aux deux HE et aux trois CM, à des concentrations assez faibles (0,25g/l_ 0,5g/l) (**tableaux 9, 10 et 11**).

Les résultats obtenus montrent également que le thymol est l'agent antifongique le plus actif sur les trois isolats avec la CMI la plus faible (0.25g/l), suivi par le carvacrol avec une CMI qui varie entre 0.25g/l et 0.5g/l. L'eugénol et les HE d'origan et de girofle se sont avérés significativement moins efficaces sur les trois isolats, avec une CMI de 0.5g/l. Ces différences de valeurs des CMI peuvent s'expliquer par la sensibilité des isolats vis-à-vis des agents

testés. Ces CMI sont comparables à celles déjà obtenues dans notre laboratoire avec les moisissures (Bouddine et coll., 2012), et avec les levures (Bennis et coll., 2004a ; Chami et coll., 2005). D'autres travaux ont montré que le thymol est plus actif sur *Aspergillus niger* que le carvacrol (Giweli et coll., 2012 ; Bouddine et coll., 2012). D'autres travaux ont rapporté que le thymol, le carvacrol, le géraniol et l'eugénol sont des agents actifs contre les trois champignons pathogènes des agrumes (Pérez-Alfonso et coll., 2012; Regnier et coll., 2014; Tao et coll., 2014; Castillo et coll., 2014). Camele et coll. (2012) ont rapporté que 150 ppm de thymol et 250 ppm de carvacrol inhibent la croissance de *Botrytis cinerea* qui est la moisissure qui cause la pourriture grise des fruits et légumes. Si les CMI reflètent une action d'inhibition totale de croissance, il ne faut pas pour autant perdre de vue l'action d'inhibition partielle qui apparaît à travers les résultats obtenus (**tableaux 9, 10 et 11**). En effet, ces résultats montrent que, même à des concentrations infra-inhibitrices, les HE et leurs CM exercent une action antifongique qui consiste à retarder l'apparition des mycéliums, ou leur croissance et même leur sporulation.

D'autres études ont montré l'activité de différentes huiles essentielles et composés majoritaires *in vitro* sur *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* et *Geotrichum candidum*. Vitoratos et coll. (2013) ont montré l'activité antifongique de l'huile essentielle d'origan, de thym et de citron contre *P. digitatum* et *P. italicum*. Zhou et coll (2014) ont rapporté une forte activité antifongique de l'huile essentielle de citron contre *G. candidum*. Les huiles essentielles de thym et de citron ont montré une activité antifongique importante contre *P. digitatum*, *P. italicum* et *G. candidum* (Yahyazadeh et coll., 2008; Liu et coll., 2009 ; Badawy et coll., 2011 ; Fatemi et coll., 2011 ; Boubaker et coll., 2016).

Une étude *in vitro* sur *P. digitatum* et *P. italicum* menée par Pérez-Alfonso et coll. (2012) a montré que le thymol et le carvacrol ont une CMI > 0.5g/l contre *P. digitatum*. Cette même étude a montré que les CMI respectives du thymol et du carvacrol contre *P. italicum* sont de 0.25g/l et de 0.5g/l. Une autre étude *in vitro* sur *G. candidum* menée par Regnier et coll. (2014) a montré que le thymol a une CMI de 0.5g/l et l'HE de clou de girofle a une CMI > 0.5g/l. Ces valeurs de CMI sont supérieures aux valeurs que nous avons obtenue dans notre étude. Ceci peut s'expliquer par le fait que le thymol, le carvacrol et l'HE de clou de girofle avaient été dispersés par ces chercheurs dans le triton-X 100 qui inhibe leur activité antimicrobienne. En effet notre laboratoire a déjà démontré que l'utilisation des détergents comme le triton-X 100 et le Tween 80 ou des solvants comme l'éthanol et le diméthylsulfoxyde (DMSO) pour la dispersion des HE ou des CM, inhibe leur activité antimicrobienne (Remmal et coll.,1993 a et b). Dans notre étude les HE et les CM testés ont

été dispersés en utilisant une méthode améliorée et standardisée dans notre laboratoire qui consiste à l'utilisation de l'agar à 0,2% comme agent de dispersion. Cette méthode permet d'obtenir une dispersion stable et homogène avec les HE et les CM.

La comparaison entre l'HE d'origan et l'HE de clou de girofle montre que l'HE d'origan est plus active sur les trois isolats de champignons étudiés (*Pd2*, *Pil* et *Gc*) par rapport à l'HE du clou de girofle. Ceci s'explique par la teneur de l'HE d'origan en carvacrol (30.5%) et en thymol (27.5%) qui sont deux agents ayant une forte activité antifongique.

Manohar et coll. (2001) ont montré que l'HE d'origan possède un large spectre d'activité antimicrobienne *in vitro* attribué à la grande proportion en dérivés phénoliques qu'elle contient tels le carvacrol et le thymol.

Nos résultats montrent aussi que les composés majoritaires sont plus efficaces que l'HE entière. Des résultats similaires ont été rapportés par d'autres études (Lambert et coll., 2001 ; Bouddine et coll., 2012). Ces résultats sont contradictoires avec d'autres études qui ont rapporté que l'activité antimicrobienne des HE est supérieure à celle de ses CM testés séparément (Lahlou, 2004).

Les résultats obtenus *in vitro* nous ont alors encouragés à faire des essais sur les fruits, en utilisant l'isolat de l'espèce *P. digitatum* (*Pd2*) et l'isolat de l'espèce *G. candidum* (*Gc*)

Evaluation de l'activité antifongique du thymol sur les champignons pathogènes des agrumes sur fruits

Plusieurs travaux ont rapporté l'activité antifongique de certaines huiles essentielles et de leurs composés majoritaires « *in vivo* », sur les champignons pathogènes en post-récolte (Ameziane et coll., 2007; Helal et coll., 2007; Nikos et Costas, 2007; Nurhayat et coll., 2007; Thierry et coll., 2008). D'autres travaux ont rapporté l'efficacité et la possibilité d'application des huiles essentielles pour le contrôle des maladies post-récolte des fruits (Burt, 2004; Tripathi et Dubey, 2004) et des agrumes en particulier (Plaza et coll., 2004; Du Plooy et coll., 2009).

Dans le présent travail, nous avons effectué un test de l'activité antifongique du thymol en préventif sur fruits. Pour cela, des oranges de la variété « Maroc-Late » ont été trempés dans une solution de thymol à des concentrations de 2 x la CMI et 4 x la CMI pendant 5 min. Ensuite, nous avons utilisé notre méthode d'infection expérimentale, en injectant aux fruits un inoculum de 250 µl (10^6 spores/ml) de la suspension de spores des isolats *Pd2* ou *Gc* ou de mélange des deux suspensions. L'isolat de *P. digitatum* (*Pd2*) a été choisi sur la base du test de virulence, qui a montré que cet isolat possède une virulence significativement plus forte, par rapport aux autres isolats du genre *Penicillium*. L'isolat de *G. candidum* (*Gc*) a été choisi

puisque c'est le seul isolat virulent de ce genre que nous avons isolé et identifié dans ce travail. Le thymol a été choisi sur la base du test *in vitro*, qui a montré une activité antifongique significativement plus forte, en comparaison avec les autres HE et les CM utilisés. La taille de l'inoculum de 250 µl a été choisie car elle donne un développement de la pourriture qui n'est pas trop rapide ni trop lent, et qui se rapproche du délai estimé par l'apparition de la pourriture dans la réalité. Dans ces conditions expérimentales, après sept jours d'incubation des fruits inoculés par les spores de chaque isolat seul, les résultats montrent une réduction dans le pourcentage des fruits pourris avec un ralentissement significatif de l'apparition et du développement de la pourriture pour la concentration de 2 x la CMI (0.5g/l) et une quasi absence de pourriture pour la concentration 4 x la CMI (1g/l) (**figures 22, 23, 24 et 25**). Des résultats similaires ont été obtenus par Pérez-Alfonso et coll. (2012). Ces auteurs rapportent que le thymol et le carvacrol à des concentrations respectives de 0.25g/l et 0.5g/l, inhibaient le développement de la pourriture des fruits inoculés expérimentalement par les spores de *P. digitatum*. Liu et coll. (2009) ont rapporté qu'une concentration de 3,2g/l de l'HE de thym réduisait l'incidence de la pourriture des fruits inoculés expérimentalement avec la suspension de spores de *G. candidum* d'environ 82%. Selon Vitoratos et coll (2013), les HE d'origan, de thym et de citron ont montré une activité antifongique intéressante « *in vivo* » contre *P. digitatum* et *P. italicum*.

Les résultats obtenus montrent aussi qu'après sept jours d'incubation des fruits inoculés avec 250 µl du mélange des deux isolats : *P. digitatum* mélangé à l'isolat de *G. candidum* (*Pd2+Gc*), une quasi absence de pourriture pour la concentration 4xCMI a été notée (**figures 27 et 28**). Cependant, la concentration 2 x CMI (0,5g/l) ne montre pas de réduction significative dans le pourcentage des fruits pourris ni un ralentissement significatif de l'apparition et du développement de la pourriture après 7 jours d'incubation. Ceci signifie que les deux isolats *P. digitatum* et *G. candidum* possèdent une synergie dans la provocation de la pourriture de fruits. Des résultats similaires ont été rapportés par Morris (1982) qui a montré que l'inoculation des fruits d'agrumes avec le mélange de spores de *G. candidum* et de *P. digitatum* augmente le taux de pourriture des fruits. Ceci peut être expliqué par la forte production des enzymes de macération par la combinaison des deux champignons. Ces enzymes dégradent les tissus végétaux des fruits favorisant ainsi la disponibilité des éléments nutritifs nécessaires pour le développement fongique (Morris, 1982). L'association des spores des deux champignons augmente encore plus la concentration de ces enzymes ce qui accélère le développement fongique sur le fruit. Les résultats que nous avons obtenus montrent que la concentration 4x la CMI (1g/l) de thymol permet une protection totale contre la pourriture

(0% de pourriture) des fruits inoculés avec 250 µl du mélange des deux isolats (*Pd2+Gc*) (**figures 27 et 28**).

Ces résultats nous semblent prometteurs pour le développement d'un produit jouissant de la stabilité et de l'efficacité nécessaires pour être utilisable au niveau des stations d'emballage en remplacement des traitements chimiques.

Conclusion

Dans cette partie de travail nous avons étudié l'activité antifongique des huiles essentielles d'origan et de clou de girofle et de leurs composés majoritaires sur des souches virulentes de *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* et *Geotrichum candidum in vitro* et sur fruits.

Les résultats obtenus *in vitro* montrent que les huiles essentielles et leurs composés majoritaires possèdent une forte activité antifongique contre les trois isolats de champignons avec une supériorité d'action remarquable pour le thymol qui a montré un pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne plus élevé à des faibles concentrations.

L'étude sur le fruit a porté sur l'amélioration de la méthode expérimentale habituellement utilisée. Les résultats obtenus montrent que cette amélioration permet d'obtenir une meilleure fiabilité et une grande reproductibilité. Sur la base de cette méthode expérimentale nous avons montré que le traitement par le thymol permet de ralentir le développement de la pourriture et même de l'inhiber complètement en fonction des concentrations utilisées. Nous avons montré également que *P. digitatum* et *Geotrichum candidum* possèdent une synergie dans la provocation de la pourriture de fruits. Ce travail nous aura permis d'aboutir à des résultats encourageants ayant pour perspective la mise au point d'un traitement efficace et sans toxicité pour prévenir la pourriture des agrumes.

CHAPITRE II

Mise au point de la composition innovante : Natural Plant Protector (NPP) pour combattre les champignons pathogènes des agrumes en poste récolte.

Etude expérimentale comparative entre le NPP et les fongicides chimiques habituellement utilisés

Introduction

Les fruits d'agrumes sont susceptibles d'être altérés par la pourriture à cause des champignons pathogènes qui attaquent les fruits à travers des blessures provoquées au cours de la récolte, dans la station de conditionnement, durant le stockage et le transport vers les pays demandeurs (Palou et coll., 2008). Ces champignons pathogènes sont principalement : *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* et *Geotrichum candidum*. Ces pertes économiques énormes provoquées par la pourriture peuvent aller jusqu'à 50% (Spadaro et Gullino, 2004).

L'utilisation répétée des fongicides chimiques aboutit au développement de la résistance dans la population fongique pathogène d'agrumes, ce qui complique la lutte contre la pourriture des fruits (Smilanick et coll., 2006b). En effet, des résistances à l'Imazalil (IMZ), au Thiabendazole (TBZ) et au sodium o-phenylphenate (SOPP) ont été rapportées dans plusieurs unités de production des agrumes (Kinay et coll., 2007; Cabañas et coll., 2009; Sánchez-Torres et Tuset, 2011), d'où la nécessité de développer des alternatives efficaces, respectueuses de l'environnement et répondant aux exigences du consommateur, en remplacement des fongicides chimiques.

Dans la première partie de ce travail, nous avons montré l'activité antifongique de plusieurs HE et de leurs CM *in vitro* et sur fruit en utilisant trois champignons responsables des maladies post-récolte des agrumes : *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum* et *Geotrichum candidum*. Sur la base des résultats obtenus, nous avons mis au point une composition innovante contenant des huiles essentielles et des composés majoritaires comme principes actifs, en plus des excipients naturels organiques et minéraux permettant une bonne stabilité des principes actifs, et une solubilité dans l'eau grâce à l'effet effervescent. Cette formulation nommée **Natural Plant Protector (NPP)** a été développée pour être utilisée comme traitement alternatif naturel pouvant remplacer les traitements chimiques des agrumes en post-récolte dans les stations d'emballage.

Dans le présent chapitre nous avons comparé:

- ✓ l'activité antifongique du NPP et des agents antifongiques chimiques *in vitro* sur trois champignons responsables des maladies des agrumes en post-récolte (*Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum* et *Geotrichum candidum*);
- ✓ l'effet inhibiteur du NPP et des agents antifongiques chimiques sur la germination des spores des trois espèces de champignons;
- ✓ l'effet sporicide du NPP et des agents antifongiques chimiques sur les spores des trois espèces de champignons;
- ✓ l'action anti-pourriture du NPP et des agents antifongiques chimiques sur fruits.

Matériel et méthodes

I. Champignons pathogènes

Les champignons pathogènes utilisés dans cette étude sont :

Penicillium digitatum, *Penicillium italicum* et *Geotrichum candidum*.

Les trois isolats de champignons ont été obtenus à partir de fruits pourris présentant les signes caractéristiques de chacune des pourritures étudiées. L'isolement a été effectué sur milieux Potato Dextrose Agar (PDA) et Malt Extract Agar (MEA). L'identification s'est basée sur les caractères morphologiques macroscopiques (diamètre et aspect des thalles sur les deux milieux de culture, couleur, texture, couleur du revers, topographie), les caractères morphologiques microscopiques (structure du mycélium, forme et taille des spores) et la capacité de croissance aux différentes températures d'incubation (Pitt et Hocking, 2009).

Les suspensions de spores des trois isolats ont été préparées à partir de cultures de 7 jours d'incubation en milieu gélosé. Les spores de chacun des trois isolats sont détachées à partir du thalle à l'aide d'une anse stérile, puis transférées dans un tube contenant du NaCl 0.9 % stérile. Le nombre de spores dans la suspension ainsi obtenue est déterminé à l'aide d'une cellule de Malassez. Des dilutions successives au 1/10^{ème} ont été utilisées pour obtenir un inoculum de l'ordre de 10⁶ spores/ml.

II. Agents antifongiques

Les agents antifongiques chimiques utilisés dans cette étude ont été fournis par la société Agripharma (Casablanca). Ces agents antifongiques sont:

- ✓ la guazatine (KENOPEL20[®], fabriqué par SAOAS) : antifongique chimique de la famille des guanidines actif sur les champignons pathogènes des agrumes, en particulier *Penicillium sp* et *Geotrichum candidum* ;
- ✓ l'orthophenyl phénol (OPP) (DECCO OPP20[®], fabriqué par DECCO) : antifongique chimique de la famille des phénols et dérivés, utilisé contre *Geotrichum candidum*, *Penicilliumsp*, et *Rhizopus* ;
- ✓ l'Imazalil (FUNGAFLOR 75 SP[®]. fabriqué par JANSSEN PMP) : antifongique chimique de la famille des imidazoles, utilisé pour contrôler les pourritures à *Penicillium sp* ;
- ✓ le Thiabendazole (TECTO 500SC[®], fabriqué par SYNGENTA) : antifongique chimique de la famille des benzimidazoles, utilisé pour le contrôle des pourritures à *Penicillium sp*.

L'agent antifongique naturel NPP (Natural Plant Protector® fabriqué par LIAV): agent antifongique naturel, actif sur les champignons pathogènes des agrumes en post-récolte, développé au sein de notre laboratoire.

Ces cinq agents antifongiques sont soit mélangés à la bouillie de lavage des fruits à la réception dans la station d'emballage (Drencher), soit mélangés avec la cire servant à enrober et à faire briller les fruits à la fin du procédé de traitement des fruits avant leur emballage. Les agents chimiques sont utilisés aux doses autorisées par l'office National de Sécurité Sanitaire des produits Alimentaires (ONSSA). Ces doses sont indiquées sur **le tableau 12**.

Tableau 12 : Doses des agents antifongiques chimiques utilisées dans le traitement post-récolte des agrumes

	Imazalil	Thiabendazole	Orthophenyl phénole (OPP)	Guazatine
Doses autorisées dans le « Drencher »	0.5g/l	3.75g/l	1,5 g/l	1g/l

L'agent antifongique naturel NPP est utilisé à une dose de **3g/l** dans le Drencher et **5g/l** dans le cirage.

III. Détermination de la CMI et de la CMF des différents agents antifongiques

1. Détermination de la CMI et de la CMF du NPP, de l'OPP et de la guazatine sur *Geotrichum candidum*

Les CMI des trois produits testés séparément ont été déterminées par la méthode de macrodilution. Le milieu à l'extrait de malt (EM) liquide stérile a été distribué dans une série de tubes à hémolyse. Ensuite, des concentrations croissantes des différents produits testés sont distribuées dans les tubes en triplicate. Les concentrations testées pour l'OPP sont les suivantes : 0 ; 0,188 ; 0,375 ; 0,75 ; 1,5 ; 3g/l. Les concentrations testées pour la guazatine sont : 0 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 g/l, et les concentrations testées pour le NPP sont : 0 ; 0,188 ; 0,375 ; 0,75 ; 1,5 ; 3 ; 5 g/l. La concentration finale dans chaque tube est calculée pour un volume final de 5 ml.

Tous les tubes sont inoculés avec 100µl de la suspension de spores (10^6 spore/ml) de *G. candidum* (à l'exception du témoin négatif) et incubés à 26°C sous une faible agitation pendant 7 jours.

La CMI est la plus faible concentration du produit testé pour laquelle aucune croissance visible n'a été observée dans le milieu liquide. La détermination de la CMI a été confirmée par la mesure de la densité optique à 600 nm.

La CMF a été déterminée à partir des tubes où nous n'avons pas observé de croissance. A partir de ces tubes, 100 µl sont aseptiquement prélevés et transférés dans des tubes contenant 5 ml du bouillon EM, les tubes sont incubés sous une faible agitation à 26°C pendant 7 jours. La CMF est considérée comme étant la plus faible concentration de l'agent antifongique pour laquelle nous n'avons pas observé de croissance fongique en comparaison avec le tube témoin. Les résultats sont confirmés par la mesure de la DO à 600 nm.

2. Détermination de la CMI et de la CMF de l'OPP ou de la guazatine associés au NPP

Après la détermination des CMI et des CMF de chaque agent testé séparément, la concentration minimale inhibitrice (CMI) du NPP a été associée à l'OPP aux différentes concentrations : 0,188 ; 0,375 ; 0,75 ; 1,5 ; 3 g/l, ou à la guazatine aux concentrations suivantes : 0,125 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2 g/l. Le protocole de la détermination de la CMI et la CMF a été réalisé comme décrit précédemment.

3. Détermination de la CMI et la CMF du NPP, de l'Imazalil et du Thiabendazole sur chacun des deux isolats : *Penicillium digitatum* et *Penicillium italicum*

Les CMI des trois produits testés séparément ont été déterminées par la méthode de macrodilution. En utilisant une série de tubes à hémolyse contenant chacun le bouillon à l'extrait de malte stérile. Ensuite, des concentrations croissantes des différents produits testés sont distribuées dans les tubes en triplicate. Les concentrations testées pour l'Imazalil sont : 0 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,5 ; 0,8 g/l. Les concentrations de Thiabendazole testées sont : 0 ; 0,375 ; 0,75 ; 1,5 ; 3,75 ; 6 g/l. Pour le NPP, les concentrations utilisées sont: 0 ; 0,188 ; 0,375 ; 0,75 ; 1,5 ; 3 ; 5 g/l. La concentration finale dans chaque tube est calculée pour un volume final de 5 ml.

100 µl de la suspension de spores à 10^6 spores/ml de *P. italicum* ou *P. digitatum* ont été transférés aseptiquement dans tous les tubes préparés à l'exception du témoin négatif. Ces tubes sont incubés à 26°C sous une faible agitation pendant 7 jours. Les CMI et les CMF ont été déterminées comme décrit précédemment.

4. Détermination de la CMI et de la CMF de l'Imazalil ou du Thiabendazole associés au NPP sur chacun des deux isolats : *P. digitatum* et *P. italicum*

Après avoir déterminé les CMI et les CMF de chaque agent antifongique séparément, la moitié de la valeur de la CMI (CMI/2) du NPP a été associée à l'Imazalil aux concentrations suivantes : 0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,5 ; 0,8 g/l, ou au Thiabendazole aux différentes concentrations

0.375 ; 0.75 ; 1.5 ; 3.75 ; 6 g/l. Les CMI et les CMF de ces associations ont été déterminées en utilisant la méthode de macrodillution décrite précédemment.

IV. Effet des agents antifongiques sur les spores des champignons

1. Effet des agents antifongiques sur la germination des spores des champignons

Des concentrations équivalentes à la moitié des CMI (CMI/2) de l'OPP, de la guazatine, et du NPP ont été choisies pour évaluer leur effet sur la germination des arthrospores de *G. candidum*. La moitié des CMI (CMI/2) de l'Imazalil, du thiabendazole, et du NPP ont été retenues pour évaluer leur effet sur la germination des spores de chacun des deux isolats de *Penicillium sp* (*P. digitatum* et *Penicillium italicum*)

Le bouillon à l'extrait de malt liquide stérile a été distribué dans une première série de tubes Eppendorf, et différents volumes de chacun des trois agents antifongiques : OPP, guazatine et NPP sont ajoutés en triplicate, permettant d'obtenir les concentrations finales suivantes : 0 et CMI/2 dans un volume final de 1ml. Deux autres séries de tubes Eppendorf contenant le même bouillon stérile ont été préparées, et différents volumes de chacun des trois agents antifongiques : Imazalil, Thiabendazole et NPP sont ajoutés en triplicate, permettant d'obtenir les concentrations finales suivantes : 0 et CMI/2 dans un volume final de 1ml.

La première série de tubes Eppendorf a été inoculée avec 100 µl de la suspension des arthrospores (10^6 spores/ml) de *Geotrichum candidum*. Les deux autres séries des tubes ont été inoculées avec 100 µl de la suspension de spores (10^6 spores/ml) de *P. digitatum* ou *Penicillium italicum*. Des témoins négatifs contenant le bouillon extrait de malte stérile seul ont été préparés.

Après 24heures d'incubation à 26°C sous une faible agitation, le nombre de spores germées dans chaque tube a été compté, en utilisant une cellule de Malassez sous le grossissement x40 équipé d'un micromètre. Le pourcentage des spores germées est calculé en utilisant la formule suivante :

% de spores germées = (Nombre de spores germées en présence du traitement / Nombre de spores germés dans le témoin sans traitement) x 100.

Une spore est considérée comme étant germée lorsque la longueur de son tube germinatif est supérieure au diamètre d'une spore normale (Suprapta et coll., 1997).

2. Effet sporicide des agents antifongiques sur les spores des champignons

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI), et la moitié des CMI (CMI/2) de l'OPP, du guazatine, et du NPP ont été choisies, pour évaluer leur effet sur les arthrospores de *Geotrichum candidum*. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI), et la moitié des CMI

(CMI/2) de l'Imazalil, du thiabendazole, et du NPP ont été sélectionnées, afin d'évaluer leur effet sur les spores de chacun des deux isolats de *Penicillium sp* (*P. digitatum* et *Penicillium italicum*)

Une première série de tube Eppendorf contenant la solution de NaCl 0.9 % stérile a été préparée, et différents volumes de chacun des trois agents antifongiques (OPP, guazatine et NPP) sont ajoutés en triplicate, permettant d'obtenir les concentrations finales suivantes : 0, CMI et CMI/2 dans un volume final de 1ml. Deux autres séries de tubes Eppendorf contenant NaCl 0.9 % stérile ont été préparées et différents volumes de chacun des trois agents antifongiques (Imazalil, Thiabendazole et NPP) sont ajoutés en triplicate, permettant d'obtenir les concentrations finales suivantes : 0, CMI et CMI/2 dans un volume final de 1ml.

La première série de tubes Eppendorf a été inoculée avec 100µl de la suspension des arthrospores à raison de 10⁶ arthrospores/ml de *Geotrichum candidum*. Les deux autres séries de tubes Eppendorf ont été inocuées avec 100 µl de la suspension des spores (10⁶ spores/ml) de *P. digitatum* ou de *Penicillium italicum*. Des témoins négatifs contenant NaCl 0.9 % stérile seul ont été préparés.

Après 24 heures d'incubation à 26°C sous une faible agitation, le nombre de spores dans chaque tube a été compté, en utilisant une cellule de Malassez, et le pourcentage des spores endommagées (détruites) est calculé en utilisant la formule suivante :

% de spores endommagées = [(Nombre de spores non traitées (témoin) – Nombre de spores traitées) / Nombre de spores non traitées (témoin) x 100

V. Evaluation de l'activité antifongique préventive des agents testés, sur des fruits infectés expérimentalement par la suspension de spores de *Penicillium sp* et de *Geotrichum candidum*

1. Fruits utilisés

Des mandarines de la variété *Afourer* ont été utilisées, fournis par la société Dellassus-Casablanca. Elles ont été cueillies directement sur l'arbre sans traitement préalable.

2. Activité antifongique préventive du NPP, de l'OPP ou de la guazatine seuls ou associés au NPP, sur des fruits infectés expérimentalement par la suspension de spores de *Geotrichum candidum*

48 heures après la cueillette des mandarines de la variété «*Afourer*», ces dernières ont été lavées à l'eau distillée stérile, puis séchées à l'air libre. Ensuite, ces fruits ont été répartis en six lots de 10 mandarines:

Lot 1 : 10 fruits lavés à la bouillie du guazatine à la concentration de 1g/l d'eau.

Lots 2 : 10 fruits lavés à la bouillie du NPP à la concentration de 3g/l d'eau.

Lot 3 : 10 fruits lavés à la bouillie de l'OPP à la concentration de 1.5g/l d'eau.

Lot 4 : 10 fruits lavés à une bouillie contenant le mélange de 3g de NPP+1.5g d'OPP/l d'eau.

Lot 5 : 10 fruits lavés à une bouillie contenant le mélange de 3g de NPP +1g de guazatine /l d'eau.

Lot 6 (témoin) : 10 fruits lavés à l'eau distillée stérile seule.

- Le lavage a été réalisé à l'aide d'un arrosoir qui permet de laver les fruits d'une façon comparable à celle du Drencher dans la station d'emballage.

Après 2 heures de séchage à l'air libre, les fruits de chaque lot ont été infectés par l'injection d'un volume de 100 µl de la suspension de spore de *G. candidum* (10^6 spores /ml) en utilisant la méthode expérimentale d'infection des fruits développée dans le chapitre précédent. Le point d'injection est marqué par un rond tracé au marqueur indélébile. Les fruits ont été ensuite incubés dans des boîtes en plastique fermées hermétiquement, et saturées en humidité à la température de 26°C. L'expérience a été répétée deux fois.

Un suivi quotidien des six lots a été effectué, et le pourcentage de la surface pourrie des fruits de chaque lot a été noté par la mesure du diamètre de la pourriture au niveau des points d'injection.

3. Activité antifongique préventive du NPP, de l'Imazalil ou du Thiabendazole seuls ou associés au NPP, sur des fruits infectés expérimentalement par la suspension de spores de *Penicillium digitatum* ou *Penicillium italicum*

48 heures après la cueillette des mandarines de la variété «*Afourer*», ces dernières ont été lavées à l'eau distillée stérile, puis séchées à l'air libre. Ensuite, ces fruits ont été répartis en six lots de 10 mandarines:

Lot 1 : 10 fruits lavés à la bouillie de l'Imazalil à la concentration de 0.5g/l d'eau.

Lots 2 : 10 fruits lavés à la bouillie du NPP à la concentration de 3g/l d'eau.

Lot 3 : 10 fruits lavés à la bouillie du Thiabendazole à la concentration de 3.75g/l d'eau.

Lot 4 : 10 fruits lavés à une bouillie contenant le mélange de 3g de NPP + 0.5g d'Imazalil/l d'eau.

Lot 5 : 10 fruits, ont été lavés à une bouillie contenant le mélange de 3g de NPP + 3.75g de Thiabendazole /l d'eau.

Lot 6 (témoin): 10 fruits lavés à l'eau distillée stérile seule.

Après 2 heures de séchage à l'air libre, les fruits de chaque lot ont été infectés par l'injection de 100 µl de la suspension de spores de *P. digitatum* ou *P. italicum* (10^6 spores/ml), en utilisant le modèle expérimental d'infection des fruits que nous avons développé (chapitre I). Les fruits sont ensuite incubés comme décrit précédemment. L'expérience a été répétée deux

fois. Un suivi quotidien des six lots a été effectué et le pourcentage de la surface pourrie des fruits de chaque lot a été noté.

VI. Effet de la température sur l'efficacité des agents antifongiques testés sur des fruits blessés expérimentalement et non inoculés

Cette partie consiste à étudier la capacité des différents agents antifongiques à protéger les clémentines de la variété « *Nour* » (blessées expérimentalement et non inoculées) contre la pourriture, dans deux conditions de stockage différentes.

Quarante-huit heures après la cueillette, des clémentines de la variété « *Nour* » ont été lavées à l'eau distillée stérile, puis séchées à l'air libre. Ensuite, ces fruits ont été répartis en six lots de 20 clémentines:

Lot 1 : 20 fruits lavés à la bouillie du guazatine (KENOPEL 20, 20%) à la concentration de 1g/l d'eau.

Lots 2 : 20 fruits lavés à la bouillie du NPP à la concentration de 3g/l d'eau.

Lot 3 : 20 fruits lavés à la bouillie de l'OPP (DECCO OPP20 20%) à la concentration de 1.5g/l.

Lot 4 : 20 fruits lavés à la bouillie de l'Imazalil (FUNGAFLOR 75 SP) à la concentration de 0.5g/l d'eau.

Lot 5 : 20 fruits lavés à la bouillie du thiabendazole, (TECTO 500SC) à la concentration de 3.75g/l d'eau.

Lot 6 (témoin): contient 20 fruits lavés à l'eau distillée stérile seule.

- Le lavage a été réalisé à l'aide d'un arrosoir qui permet de laver les fruits d'une façon comparable à celle du Drencher dans la station d'emballage.

Après 2 heures de séchage des fruits à l'air libre, deux trous (diamètre 1mm + profondeur 2mm) diamétralement opposés traversant le flavedo et l'albédo, et arrivant jusqu'à la pulpe, ont été effectués sur chaque fruit. Ensuite chaque lot a été réparti en deux boîtes de 10 fruits, fermées hermétiquement est saturées en humidité. Une boîte a été placée à la température de 26 °C, et l'autre a été placée à la température de 8°C. L'expérience a été répétée deux fois.

Un suivi quotidien des boîtes a été effectué et le pourcentage des fruits sains a été noté au bout de 10 jours d'incubation pour les fruits incubés à 26°C, et après quatre semaines d'incubation pour les fruits incubés à 8°C.

% de fruits sains = (Nombre de fruits pourris dans le lot témoin – Nombre de fruits pourris dans le lot traité) / Nombre de fruits pourris dans le lot témoin x 100.

VII. Etudes statistiques

Les résultats sont exprimés par la moyenne et l'écart type. La significativité des résultats a été vérifiée par l'utilisation du logiciel IBM SPSS Statistics software, version 21, par le test de l'analyse de variance (ANOVA) en utilisant le test de comparaison least significant difference (LSD) à $P < 0.05$.

Résultats

I. Détermination de la CMI et de la CMF des différents agents antifongiques

1. Détermination de la CMI et la CMF du NPP, de l'OPP ou de la Guazatine seuls ou associés au NPP, sur *Geotrichum candidum*

Les valeurs de CMI et de CMF des différents agents antifongiques seuls ou associés au NPP, sur *G. candidum* sont montrées sur le **tableau 13**

Tableau 13 : CMI et CMF des différents agents antifongiques seuls ou associés au NPP sur *G. candidum*

		CMI	CMF
Antifongiques seuls	NPP	1.5g/l	1.5g/l
	OPP	0.75g/l	1.5g/l
	Guazatine	0.5g/l	1g/l
Antifongiques associés au NPP	OPP (0,188; 0.375; 0.75; 1.5 ou 3g/l) +NPP (1.5g/l)	3g/l	3g/l
	Guazatine (0.125; 0.25 ; 0.5 ; 1 ou 2 g/l) + NPP (1.5g/l)	0.5g/l	1g/l

Les résultats obtenus montrent que les différents agents utilisés possèdent une activité antifongique intéressante lorsqu'ils sont testés seuls. Le NPP a montré une activité antifongique avec une CMI= la CMF de 1.5g/l, l'équivalent de la moitié (1/2) de la dose préconisée par le fabricant (LIAV) pour le lavage des fruits en Drencher. La guazatine possède une CMI de 0.5g/l et une CMF de 1g/l. Cette valeur correspond à la dose maximale autorisée par l'office National de Sécurité Sanitaire des produits Alimentaires (ONSSA) en Drencher. L'OPP a montré une CMI de 0.75g/l et une CMF de 1.5g/l correspondant à la dose maximale autorisée en Drencher (ONSSA. 2020).

Les résultats montrent aussi que la combinaison de 0,188; 0.375 ; 0.75 ; 1.5 ou 3g/l d'OPP à 1.5g/l de NPP a diminué l'activité antifongique de l'OPP. En effet, la CMI de cette combinaison est de 3g/l, quatre fois supérieure à la CMI de l'OPP seul, aussi la CMF de l'OPP combiné au NPP est de 3g/l, donc deux fois supérieure à la CMF de l'OPP seul.

En revanche, la combinaison de la guazatine aux concentrations de 0.125 ; 0.25 ; 0.5 ; 1 ou 2 g/l à 1.5g/l de NPP n'a pas influencé son activité antifongique, car les valeurs de CMI et de CMF de cette association sont les mêmes que celles de la guazatine seule.

2. Détermination de la CMI et la CMF du NPP, de l'Imazalil ou du Thiabendazole seuls ou associés au NPP sur *Penicillium digitatum*

Les résultats présentés sur le **tableau 14** montrent une activité antifongique intéressante des trois agents sur *P. digitatum*.

Tableau 14 : CMI et CMF des différents agents antifongiques seuls ou associés au NPP sur *P. digitatum*

		CMI	CMF
Antifongiques seuls	NPP	0.375g/l	0.75g/l
	Imazalil	0.5g/l	0.5g/l
	Thiabendazole	1.5g/l	>3.75g/l
Antifongiques associés au NPP	Imazalil (0.05; 0.1; 0.2; 0.5 ou 0.8 g/l) +NPP (0.188g/l)	0.05g/l	0.1g/l
	Thiabendazole (0.375; 0.75; 1.5; 3.75 ou 6 g/l) +NPP (0.188g/l)	0.75g/l	1.5g/l

Le NPP montre une CMI de 0.375g/l et une CMF de 0.75g/l. Cette valeur de CMF est équivalente au quart de la dose préconisée par le fabricant (LIAV) pour le lavage des fruits en Drencher. L'Imazalil présente une CMI = CMF de 0.5g/l. Cette valeur correspond à la dose maximale autorisée pour le lavage des fruits en Drencher (ONSSA. 2020). Le thiabendazole montre une CMI de 1.5g/l et une CMF >3.75g/l correspond à la dose maximale autorisée (ONSSA. 2020)

Les résultats de l'association des deux agents antifongiques chimiques au NPP montrent que la combinaison de 0.05 ; 0.1 ; 0.2 ; 0.5 ou 0.8 g/l d'Imazalil à 0.188g/l de NPP (CMI/2 de NPP) a montré une activité antifongique plus importante que l'Imazalil seul. En effet, cette

combinaison a donné une CMI de 0.05g/l, dix fois inférieure à la CMI de l'Imazalil utilisé seul. La CMF de cette association (0.1g/l) est cinq fois inférieure à la CMF de l'Imazalil utilisé seul. L'association de 0.375 ; 0.75 ; 1.5 ; 3.75 ou 6g/l du Thiabendazole à 0.188g/l de NPP, a montré un bon effet antifongique, avec une CMI de 0.75g/l contre 3g/l lorsque le Thiabendazole est utilisé seul, et une CMF de 1.5g/l, inférieure à la CMF de Thiabendazole utilisé seul (qui dépasse 3.75g/l).

3. Détermination de la CMI et la CMF du NPP, de l'Imazalil ou du Thiabendazole seuls ou associés au NPP, sur *Penicillium italicum*

Le tableau 15 montre que le NPP présente une CMI de 1.5g/l et une CMF de 3g/l qui est la même valeur que la dose préconisée par le fabricant (LIAV) pour le lavage des fruits en Drencher. Pour l'Imazalil, il présente une CMI = CMF de 0.8g/l. Cette valeur correspond à un virgule six fois la dose autorisée pour le lavage des fruits en Drencher (ONSSA. 2020). Le Thiabendazole présente une CMI = CMF de 3.75g/l, cette valeur est équivalente à la dose maximale fixée pour le lavage des fruits en Drencher (ONSSA 2020).

Tableau 15 : CMI et CMF des différents agents antifongiques seuls ou associés au NPP sur *P. italicum*

		CMI	CMF
Antifongiques seuls	NPP	1.5g/l	3g/l
	Imazalil	0.8g/l	0.8g/l
	Thiabendazole	3.75g/l	3.75g/l
Antifongiques associés au NPP	Imazalil (0.05 ; 0.1; 0.2 ; 0.4 ou 0.8g/l) + NPP (0.75g/l)	0.1g/l	0.2g/l
	Thiabendazole (0.375 ; 0.75 ; 1.5 ; 3 ou 6 g/l) + NPP (0.75g/l)	0.75g/l	0.75g/l

Les résultats de l'association des deux antifongiques chimiques au NPP montrent que la combinaison de 0.05 ; 0.1 ; 0.2 ; 0.5 ou 0.8 g/l d'Imazalil à 0.75g/l de NPP (CMI/2 de NPP) améliore son activité antifongique et fait baisser la CMI à 0.1g/l, donc huit fois moins que la CMI de l'Imazalil utilisé seul. La CMF de cette association est de 0.2g/l, donc quatre fois inférieure à la CMI de l'Imazalil seul. Une amélioration de l'activité antifongique du Thiabendazole à été également notée après sa combinaison (aux différentes concentrations :

0.375 ; 0.75 ; 1.5 ; 3.75 ou 6 g/l) à 0.75g/l de NPP. En effet, la CMI et la CMF du Thiabendazole associé au NPP sont de 0.75g/l, donc cinq fois inférieure à la CMI et la CMF du Thiabendazole utilisé seul.

II. Effet des agents antifongiques sur les spores de champignons

1. Effet des agents antifongiques sur la germination des spores de champignons

a. Effet de l'OPP, de guazatine et du NPP sur la germination des arthrospores de *Geotrichum candidum*

Les résultats du pourcentage de germination des arthrospores de *Geotrichum candidum* après évaluation de la longueur du tube germinatif, en présence d'une concentration infra inhibitrice (CMI/2) de trois agents antifongiques différents, sont présentés sur le **tableau 16**.

Tableau 16 : Effet de différents agents antifongiques utilisés à la moitié de la CMI sur la germination des arthrospores de *Geotrichum candidum*, après 24heures d'incubation

	Pourcentage de germination (%)	Longueur de tube germinatif (μm)
Témoin	100 \pm 0 ^a	117,33 \pm 0.5
NPP (CMI/2)	0 \pm 0 ^b	0 \pm 0
OPP (CMI/2)	0 \pm 0 ^b	0 \pm 0
Guazatine (CMI/2)	25,39 \pm 7,6 ^c	95 \pm 8

Les valeurs présentées sont les moyennes de trois répétitions (n=3) \pm SD (les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes les unes par rapport aux autres à p<0,05).

Les résultats obtenus montrent que les trois agents antifongiques possèdent un effet inhibiteur significative sur la germination des arthrospores de *Geotrichum candidum* par rapport au témoin non traité (p<0.05). Cet effet est variable selon l'agent utilisé.

Le NPP et l'OPP ont montré une inhibition totale de la germination après 24 heures d'incubation.

La guazatine montre un effet inhibiteur significativement moins important sur la germination des arthrospores. En effet, un pourcentage de $25.39\% \pm 7.6\%$ des spores ont germé avec un tube germinatif d'une longueur de $95 \pm 8 \mu\text{m}$.

*b. Effet du NPP, de l'Imazalil et du Thiabendazole sur la germination des spores de *Penicillium digitatum**

Tableau 17 : Effet de différents agents antifongiques utilisés à leur CMI/2 sur la germination des spores de *Penicillium digitatum*, après 24 heures d'incubation

	Pourcentage de germination (%)	Longueur de tube germinatif (μm)
Témoin	$100 \pm 0^{\text{a}}$	122 ± 1.15
NPP (CMI/2)	$0 \pm 0^{\text{b}}$	0 ± 0
Imazalil (CMI/2)	$30,76 \pm 3,55^{\text{ab}}$	$15 \pm 2,18$
Thiabendazole (CMI/2)	$78,1 \pm 6,55^{\text{cd}}$	$67,64 \pm 9,23$

Les valeurs présentées sont les moyennes de trois répétitions ($n=3$) \pm SD (les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes les unes par rapport aux autres à $p < 0,05$).

Les résultats du tableau 17 montrent que le NPP possède un effet inhibiteur sur la germination des spores nettement meilleur par rapport aux deux autres antifongiques chimiques. Cette inhibition est totale après 24 heures d'incubation.

Pour l'Imazalil, un pourcentage de 30.76% des spores ont germé avec un tube germinatif d'une longueur de $15 \pm 2.18 \mu\text{m}$.

Le thiabendazole, quant à lui, présente un plus faible effet sur la germination des spores de *P. digitatum* puisque $78.1\% \pm 6.55$ des spores ont germé avec un tube germinatif de $67.64 \pm 9.23 \mu\text{m}$ de longueur après 24 heures d'incubation.

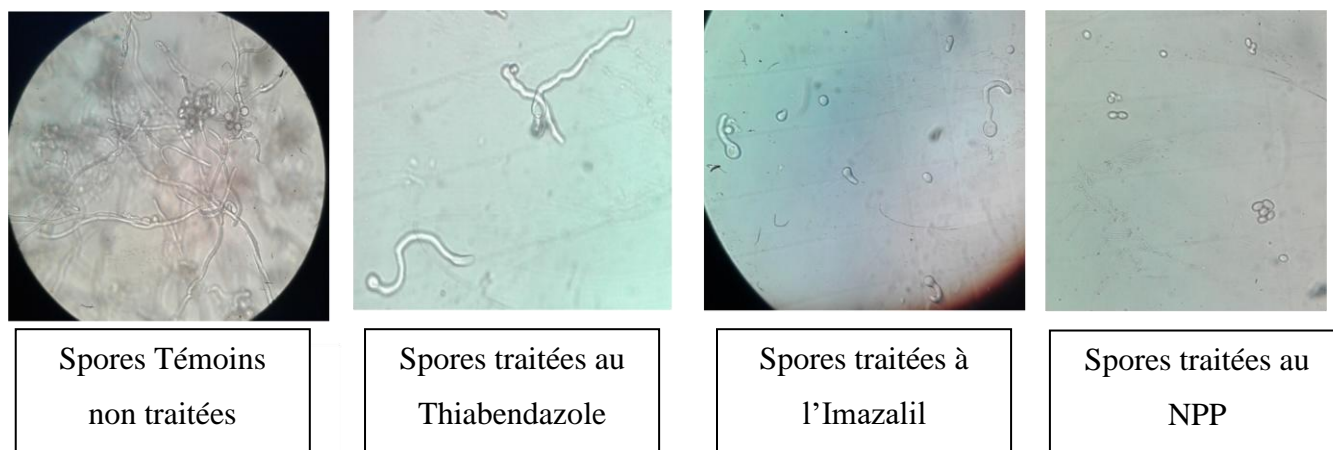


Figure 29 : Germination de spores de *Penicillium digitatum* en présence de la CMI/2 des différents agents antifongiques

c. Effet du NPP, de l'Imazalil et du Thiabendazole sur la germination des spores de Penicillium italicum

Tableau 18 : Effet de différents agents antifongiques utilisés à leur CMI/2 sur la germination des spores de *Penicillium italicum*, après 24heures d'incubation

	Pourcentage de germination (%)	Longueur de tube germinatif (µm)
Témoin	100 ± 0 ^a	122±1.26
NPP (CMI/2)	0 ± 0 ^b	0 ± 0
Imazalil (CMI/2)	0 ± 0 ^b	0 ± 0
Thiabendazole (CMI/2)	54,68 ± 9,7 ^c	46,84 ± 5,4

Les valeurs présentées sont les moyennes de trois répétitions (n=3) ± SD, les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes les unes par rapport aux autres à p<0,05.

Les résultats **du tableau 18** montrent une inhibition totale de la germination des spores en présence de la moitié de la CMI (CMI/2) du NPP et de l'Imazalil. Le Thiabendazole possède un effet significativement plus faible, avec un pourcentage de $54.68 \pm 9.7\%$ des spores germées avec un tube germinatif de $46.84 \pm 5.4 \mu\text{m}$ de longueur.

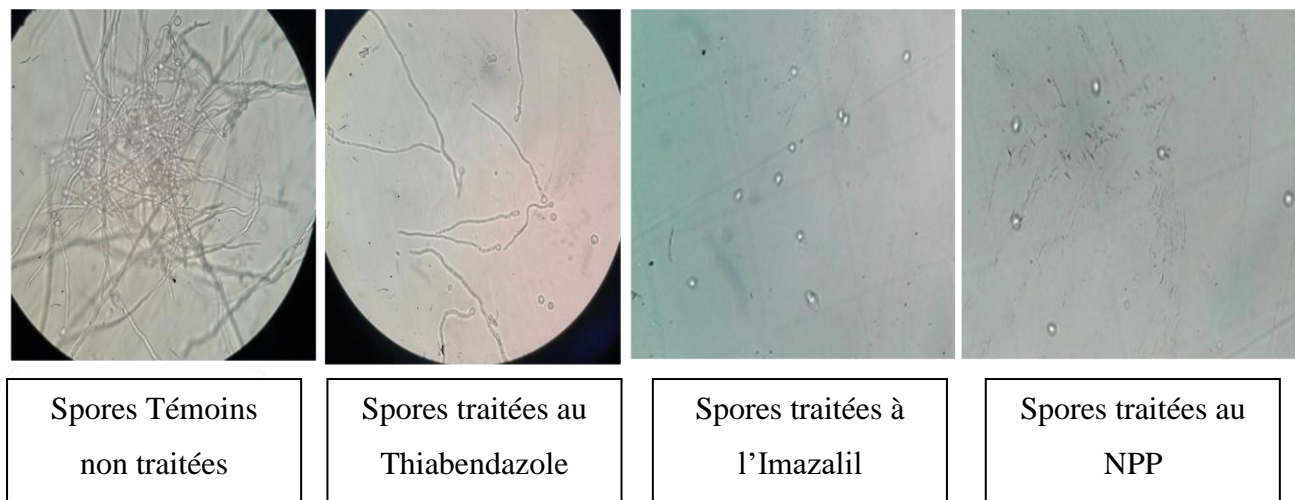


Figure 30 : Germination de spores de *Penicillium italicum* en présence de la CMI/2 des différents agents antifongiques

2. Effet des agents antifongiques sur les spores de champignons

a. Effet du NPP, de l'OPP et de la Guazatine sur les arthrospores de *Geotrichum candidum*

Les résultats du pourcentage de destruction des arthrospores de *G. candidum* en présence des trois agents antifongiques sont présentés dans **le tableau 19**.

Tableau 19 : Effet des agents antifongiques sur les arthrospores de *Geotrichum candidum*, après 24 heures d'incubation

	Pourcentage des spores endommagées	
	CMI/2	CMI
Témoin non traité	0 ± 0^a	
NPP	$73,91 \pm 4,6^{ac}$	$90,13 \pm 3,3^{cd}$
OPP	$37,8 \pm 3,4^c$	$52,17 \pm 4,2^d$
Guazatine	$23,8 \pm 0,5^b$	$53,33 \pm 3,3^d$

Les valeurs présentées sont les moyennes de trois répétitions (n=3) ± SD (les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes les unes par rapport aux autres à p<0,05).

Les résultats montrent que les trois agents présentent un effet sporicide sur les arthrospores de *G. candidum* par rapport au témoin.

A la moitié de la CMI (CMI/2), le NPP présente le pourcentage de destruction le plus important (73.91% ± 4.6), suivi par l'OPP avec un pourcentage de 37.8% ± 3.4. La guazatine montre un effet sporicide significativement plus faible au CMI/2, avec un pourcentage de destruction de 23.8% ± 0.5.

A la concentration minimale inhibitrice (CMI) le NPP montre un effet significativement plus important (p<0.05) avec un pourcentage de destruction de 90,13%±3,3. L'OPP et la guazatine montrent un effet sporicide moins important sur les arthrospores de *G. candidum* avec des pourcentages des spores endommagées respectifs de 52.17% ± 4.2 et de 53,33% ± 3,3.

b. Effet du NPP, de l'Imazalil et du Thiabendazole sur les spores de *Penicillium digitatum*

Le tableau 20 résume les résultats du pourcentage de destruction des spores de *P. digitatum*, en présence de différents agents antifongiques.

Tableau 20 : Effet des agents antifongiques sur les spores de *Penicillium digitatum*, après 24 heures d'incubation

	Pourcentage des spores endommagées %	
	CMI/2	CMI
Témoin non traité	0±0 ^a	
NPP	47,55±9,2 ^b	72,22±0,2 ^{ab}
Imazalil	48,41±2,7 ^b	62,66±8,8 ^{ac}
Thiabendazole	48,62±6,8 ^b	72,22±6,6 ^{ab}

Les valeurs présentées sont les moyennes de trois répétitions (n=3) ± SD (les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes les unes par rapport aux autres à p<0,05).

Les résultats montrent que les trois agents présentent un effet sporicide significativement important sur les spores de *P. digitatum* par rapport au témoin.

A la moitié de la CMI (CMI/2), les trois agents antifongiques montrent un effet sporicide significativement comparable sur les spores de *P. digitatum*.

En présence de la concentration minimale inhibitrice (CMI) du NPP et du thiabendazole, 72,22% des spores sont endommagées. Ce pourcentage est significativement supérieur (p<0.05) au pourcentage de destruction en présence de la CMI de l'Imazalil (62,66% ±8,8).

*c. Effet du NPP, de l'Imazalil et du Thiabendazole sur les spores de *Penicillium italicum**

Le tableau 21 résume les résultats du pourcentage de destruction des spores de *P.italicum*, en présence de différents agents antifongiques.

Tableau 21 : Effet des agents antifongiques sur les spores de *Penicillium italicum*, après 24 heures d'incubation

Pourcentage des spores endommagées %		
	CMI/2	CMI
Témoin non traité		0±0 ^a
NPP	72,97±4,5 ^{ae}	100 ± 0 ^{ed}
Imazalil	39,18±2,44 ^e	59,45±7,4 ^d
Thiabendazole	43,25±5,9 ^e	47,32±7,6 ^e

Les valeurs présentées sont les moyennes de trois répétitions (n=3) ± SD (les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes les unes par rapport aux autres à p<0,05).

Les résultats obtenus montrent que les trois agents présentent un effet sporicide significativement important sur les spores de *P. italicum* par rapport au témoin.

A la moitié de la CMI (CMI/2), aucune différence significative n'a été observée entre l'effet sporicide de l'Imazalil et celui du thiabendazole, avec des pourcentages de destruction de spores respectifs de 39,18% \pm 2,44 et de 43,25 % \pm 5,9. Ces pourcentages sont significativement inférieurs ($p < 0.05$) au pourcentage de destruction en présence de la CMI/2 du NPP (72,97% \pm 4,5).

A la concentration minimale inhibitrice (CMI) l'Imazalil présente un effet sporicide avec un pourcentage de destruction de 59,45% \pm 7.4. Ce pourcentage est significativement supérieur ($p < 0.05$) au pourcentage de destruction des spores en présence de la CMI du Thiabendazole (47,32% \pm 7,6). A sa CMI, le NPP provoque une destruction totale des spores.

III. Evaluation de l'activité antifongique préventive des agents testés, sur des fruits infectés par les spores de *Penicillium sp* et de *Geotrichum candidum*

1. Activité antifongique préventive du NPP, de l'OPP ou du guazatine seuls ou associés au NPP, sur des fruits infectés expérimentalement par la suspension de spores de *Geotrichum candidum*

La figure 31 montre les résultats du pourcentage de surface pourrie sur les mandarines de la variété « *Afourer* », préalablement traitées à l'un des 3 différents agents antifongiques seuls ou combinés au NPP, et inoculées par 100 μ l de la suspension de spores de *G.candidum*.

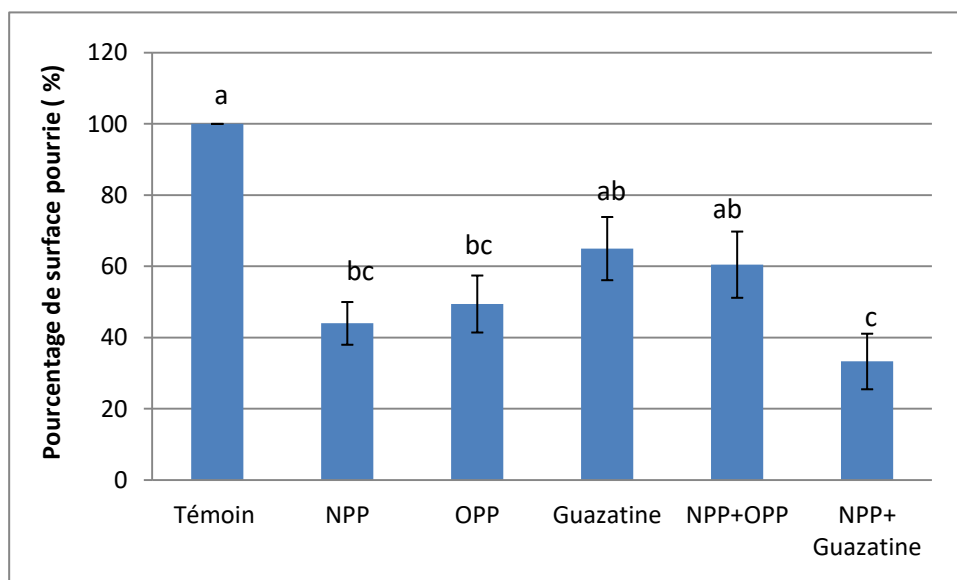


Figure 31 : Evolution de la pourriture des mandarines « *Afourer* » traitées aux différents agents antifongiques puis infectées par la suspension de spores de *Geotrichum candidum*, après 7 jours d'incubation à 26°C (la différence

significative ($p < 0.05$) entre les moyennes des pourcentages des surfaces pourries des différents lots est indiquée par des lettres différentes sur les histogrammes)

Après 7 jours d'incubation, les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les fruits lavés au NPP, et les fruits lavés à l'OPP concernant la surface attaquée par la pourriture, leurs pourcentages de surfaces pourries respectifs sont de 44% et de 48.4%. Les fruits lavés à la guazatine montrent une surface pourrie significativement plus grande (65%). Les résultats montrent aussi que l'association de l'OPP au NPP diminue significativement ($p < 0.05$) leur activité antifongique. En effet, cette combinaison donne 60% de surface pourrie, contre 48,4% dans le cas de l'OPP seul et 44% dans le cas de NPP seul. Par contre, l'association de la guazatine au NPP améliore significativement leur activité antifongique. Cette combinaison ne donne que 34,3% de surface pourrie contre 65 % pour la guazatine seule et 44% pour le NPP seul.

2. Activité antifongique préventive du NPP seul, de l'Imazalil ou du Thiabendazole seuls ou associés au NPP, sur des fruits infectés expérimentalement par la suspension de spores de *Penicillium digitatum*

La figure 32 montre les résultats du pourcentage de surface pourrie sur les mandarines de la variété « *Afourer* » préalablement traitées à l'un des 3 différents agents antifongiques seuls ou combinés au NPP, et inoculées par 100 μ l de la suspension de spores de *P. digitatum*.

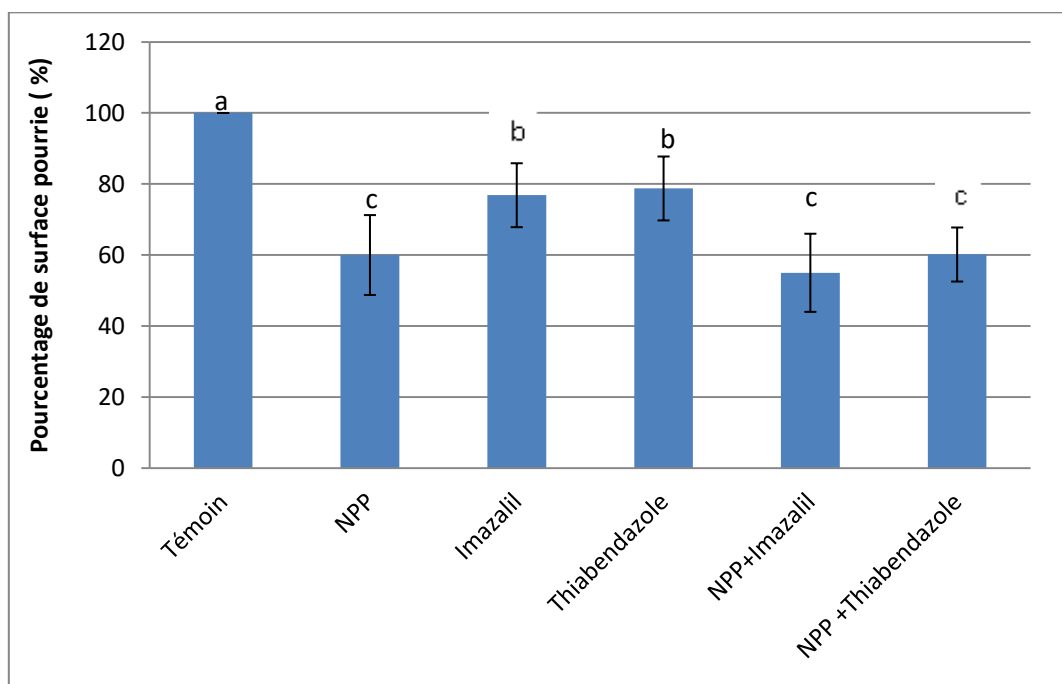


Figure 32 : Evolution de la pourriture des mandarine « Afourer » traitées aux différents agents antifongiques, puis infectées par la suspension de spores de *Penicillium digitatum*, après 7 jours d'incubation à 26°C (la différence significative ($p < 0.05$) entre les moyennes des pourcentages des surfaces pourries des différents lots est indiquée par des lettres différentes sur les histogrammes)

Ces résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les pourcentages des surfaces attaquées par la pourriture sur les fruits traités à l'Imazalil, et ceux traités au thiabendazole. Ces pourcentages respectifs sont de 76.8% et de 78.75%. Une réduction significative ($p < 0.05$) du pourcentage de surface pourrie a été notée sur les fruits traités au NPP (60% de la surface pourrie) par rapport aux fruits traités à l'Imazalil et au thiabendazole. Les résultats montrent aussi que l'association de l'Imazalil ou du Thiabendazole au NPP augmente significativement l'activité antifongique des deux fongicides chimiques. Cependant, cette association n'apporte pas d'effet bénéfique significatif à celui obtenu avec le NPP seul.



Mandarines lavées à l'eau seule



Mandarines lavées au thiabendazole



Mandarines lavées à l'Imazalil



Mandarines lavées au NPP

Figure 33 : Mandarines traitées aux différents agents antifongiques et infectées par les spores de *Penicillium digitatum*, puis incubées à 26°C pendant 7 jours

3. Activité antifongique préventive du NPP, de l'Imazalil ou du Thiabendazole seuls ou associés au NPP, sur des fruits infectés expérimentalement par la suspension de spores de *Penicillium italicum*

La figure 34 montre les pourcentages de surface pourrie sur des mandarines de la variété « Afourer », préalablement traitées à l'un ou l'autre des différents agents antifongiques seuls ou combinés au NPP, et inoculées ensuite par 100µl de la suspension de spores de *Penicillium italicum*.

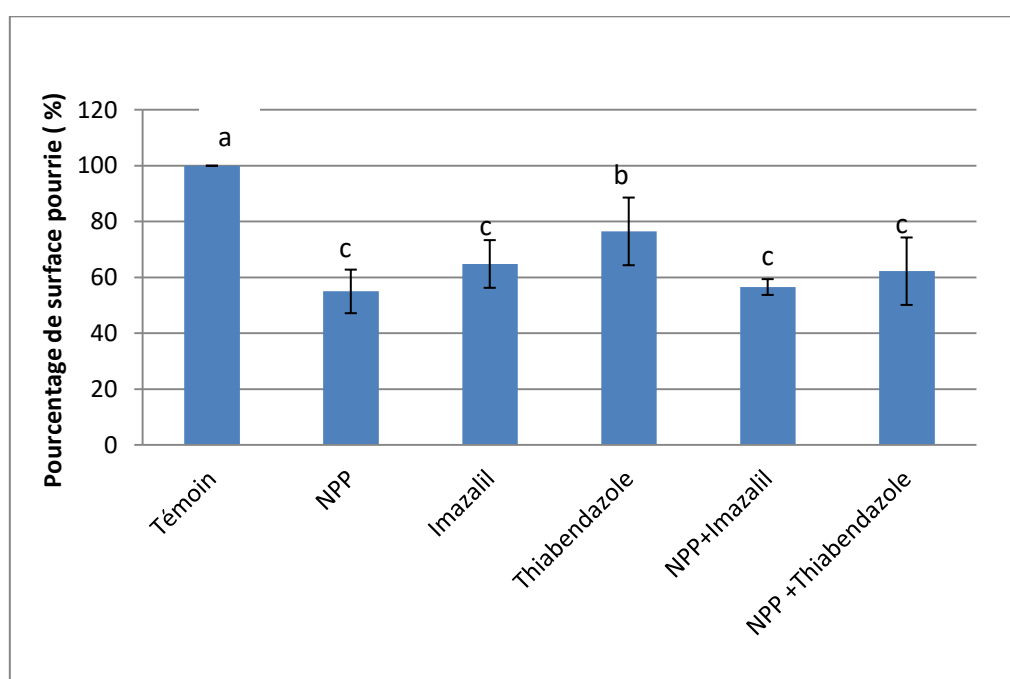


Figure 34 : Evolution de la pourriture des Mandarines « Afourer » traitées aux différents agents antifongiques puis infectées par la suspension de spores de *Penicillium italicum*, après 7 jours d'incubation à 26°C. (la différence significative ($p < 0.05$) entre les moyennes des pourcentages des surfaces pourries des différents lots est indiquée par des lettres différentes sur les histogramme)

Après 7 jours d'incubation les résultats obtenus montrent que le traitement aux différents agents antifongiques réduit significativement ($p < 0.05$) la surface de la pourriture des mandarines par rapport aux mandarines témoins traitées à l'eau distillée seule.

Les résultats montrent aussi qu'il n'y a pas de différence significative entre les pourcentages de surfaces attaquées par la pourriture sur les fruits traités au NPP, et ceux traités à l'Imazalil.

Ces pourcentages respectifs sont 55.03% et 62.85%. Le Thiabendazole est significativement ($p < 0.05$) moins efficace sur la pourriture des fruits par rapport aux autres agents antifongiques. En effet, un pourcentage de 76.51% de la surface des fruits traités au Thiabendazole à été notée. Les résultats montrent aussi que l'association du Thiabendazole au NPP améliore l'activité antifongique de Thiabendazole et n'apporte pas d'effet bénéfique significatif à l'activité antifongique du NPP seul. L'association de l'Imazalil au NPP n'apporte pas non plus d'effet bénéfique supplémentaire à celui du NPP seul ou à celui de l'Imazalil seul.

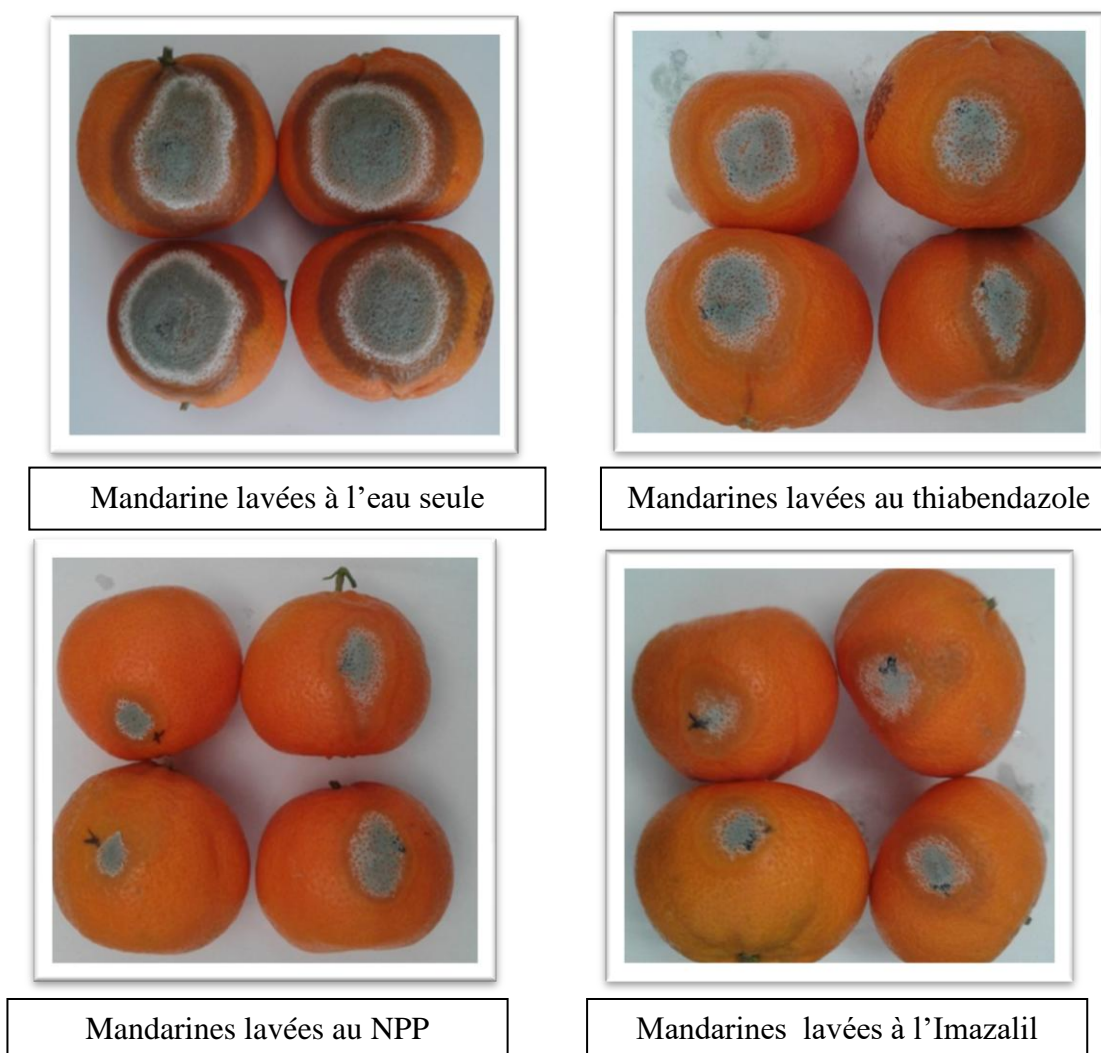


Figure 35: Mandarines lavées aux différents agents antifongiques, et infectées par les spores de *Penicillium italicum*, puis incubées à 26°C pendant 7 jours

IV. Effet de la température sur l'efficacité des agents antifongiques testés sur des fruits blessés expérimentalement et non inoculés

1. Evaluation de l'effet protecteur des agents antifongiques sur des fruits stockés à 26°C

Le tableau 22 montre les résultats du pourcentage des clémentines saines traitées préalablement aux différents agents antifongiques, puis blessées expérimentalement.

Tableau 22: Effet protecteur des agents antifongiques contre la pourriture des clémentines de la variété « Nour » blessées expérimentalement (non inoculées), après 10 jours de stockage à 26°C

Pourcentage des fruits sains (%)	
Témoin	0±0 ^a
NPP	41.18±3,9 ^{ab}
Imazalil	41.2±3,02 ^{ab}
Thiabendazole	3.93±0.93 ^a
OPP	13.89±3,7 ^b
Guazatine	5.34±0.2 ^a

Les valeurs présentées sont les moyennes de deux répétitions (n=2) ± SD (les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes les unes par rapport aux autres à p<0,05)

Après 10 jours d'incubation à 26°C, les résultats obtenus montrent que les agents antifongiques possèdent un effet protecteur contre la pourriture des clémentines. Cet effet diffère selon l'agent utilisé. Le NPP et l'Imazalil montrent un effet protecteur significativement meilleur contre la pourriture des clémentines, avec des pourcentages des fruits sains d'environ 41% (59% des clémentines ont montré une pourriture). Le traitement à l'OPP ne permet de conserver que 13.89% des fruits contre la pourriture après 10 jours de stockage à 26°C. Le Thiabendazole et la guazatine ne permettent pas de protéger les clémentines contre la pourriture.



Clémentines lavées à l'eau seule



Clémentines lavées au thiabendazole



Clémentines lavées à l'Imazalil



Clémentines lavées au NPP



Clémentines lavées à l'OPP



Clémentines lavés au guazatine

Figure 36: Clémentines lavées aux différents agents antifongiques puis blessées expérimentalement (non inoculées), et stockées à 26°C pendant 10 jours

2. Evaluation de l'effet protecteur des agents antifongiques sur des fruits stockés à 8°C

Le **tableau 23** montre les résultats du pourcentage des clémentines saines traitées préalablement par différents agents antifongiques puis blessées expérimentalement et incubées à 8°C pendant 4 semaines.

Tableau 23 : Effet protecteur des différents agents antifongiques contre la pourriture des clémentines de la variété « Nour » blessées expérimentalement (non inoculées), après 4 semaines de stockage à 8°C

Pourcentage des fruits sains (%)	
Témoin	0±0 ^a
NPP	56.7±9 ^{ac}
Imazalil	60±0 ^{ac}
Thiabendazole	23.4±4,44 ^b
OPP	62.2±5,05 ^{ac}
Guazatine	55.52±4,04 ^{ac}

Les valeurs présentées sont les moyennes de trois répétitions (n=2) ± SD (les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes les unes par rapport aux autres à p<0,05).

Après 4 semaines d'incubation à 8°C, les résultats obtenus montrent que le Thiabendazole a un effet protecteur significativement faible contre la pourriture des fruits (23% de fruits sains seulement). Les autres traitements (OPP, guazatine, Imazalil et NPP) permettent de conserver 55 à 62% des fruits contre la pourriture après 4 semaines de stockage à 8°C.

Discussion

Selon le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche Maritime, les revenus des exportations des agrumes du Maroc ont connu des chutes durant les campagnes 2012/2013 et 2014/2015. Ces reculs qui ont menacé la relation commerciale existant entre le Maroc et ses partenaires étrangers, en particulier la Russie, sont dus principalement aux problèmes de pourriture.

Les stations d'emballage reçoivent et stockent les fruits après leur cueillette. Ces fruits sont lavés au Drencher pour les débarrasser des souillures, puis triés pour enlever les fruits ne répondant pas aux exigences des clients. Ensuite, ils sont lavés et enduits d'une cire qui les protège de la déshydratation et leur donne un aspect brillant.

Les professionnels profitent de ce procédé de conditionnement pour appliquer des produits phytosanitaires censés diminuer la charge fongique à la surface des fruits, afin de diminuer le risque de développement de pourritures durant le transport jusqu'à la destination finale (qui peut être de deux à cinq semaines selon la destination). Les produits phytosanitaires utilisés visent essentiellement les champignons les plus fréquents qui sont *P. digitatum*, l'agent causal de la pourriture verte, *Penicillium italicum*, l'agent causal de la pourriture bleue (Valero et Serrano, 2010) et *Geotrichum candidum*, l'agent causal de la pourriture amère des agrumes (Zheng et coll., 2005).

L'usage de ces produits phytosanitaires comporte plusieurs inconvénients :

- D'abord, leur toxicité pour la santé du consommateur et pour l'environnement, ce qui a amené à interdire certains d'entre eux et à limiter les concentrations des résidus tolérées (Tripathi et Dubey, 2004). Pour les produits phytosanitaires qui ne sont pas interdits, les concentrations utilisées sont souvent insuffisantes pour contrôler efficacement la charge fongique à la surface des fruits (Palou et coll., 2008).
- le phénomène de résistance des champignons à ces produits phytosanitaires (Kinay et coll., 2007 ; Cabañas et coll., 2009; Sánchez-Torres et Tuset, 2011). Cette résistance est probablement due à l'exposition répétée à des traitements phytosanitaires utilisés dans le verger. Ces traitements phytosanitaires contiennent souvent des molécules de la même famille que les produits phytosanitaires utilisés dans la station d'emballage (Kuramoto ,1976)

Ces inconvénients sont à l'origine de l'échec des traitements phytosanitaires utilisés dans les stations d'emballage contre la pourriture des agrumes.

Dans ce contexte, nous avons utilisé les résultats obtenus dans le premier chapitre de ce travail, et d'autres résultats obtenus dans notre laboratoire, pour mettre au point une composition innovante, à base de substances naturelles diverses, possédant une activité

antimicrobienne à large spectre (antifongique, antibactérienne, antiparasitaire) (Rhayour et coll., 2003 ; Bennis et coll., 2004a ; Chami et coll., 2005 ; Remmal et coll., 2011 ; Bouddine et coll., 2013).

Afin de valider l'efficacité de cette composition innovante (NPP) dans la protection des agrumes, nous avons effectué plusieurs tests utilisant ce produit, en comparaison avec les fongicides chimiques encore utilisés dans les stations d'emballage au Maroc.

Isolement des champignons.

Nous avons effectué un isolement de champignons appartenant à deux genres *Penicillium* et un genre *Geotrichum*. Des études préliminaires (Résultats non montrés) nous ont permis de sélectionner trois isolats, qui se sont montrés les plus virulents sur des fruits infectés expérimentalement, parmi un grand nombre d'isolats obtenus à partir des fruits pourris.

Détermination des CMI et des CMF

Afin de déterminer les CMI et les CMF des différents agents antifongiques chimiques testés et celles du NPP, nous avons opté pour un test en milieu liquide par la technique de contact directe en macrodilution. Cette méthode a été décrite comme étant la plus sensible et la plus fiable (Bouddine et coll., 2012). Les résultats obtenus montrent que les agents antifongiques phytosanitaires chimiques ont des CMI et des CMF assez élevées vis-à-vis des isolats que nous avons sélectionnés selon leur virulence. En effet, les CMF de l'OPP et de la guazatine vis-à-vis de *G. candidum* sont de l'ordre de 1.5 et 1 g/l. Ces valeurs sont équivalentes à la dose maximale autorisée pour le lavage des fruits dans les stations d'emballage (ONSSA. 2020).

Selon Brown (1979), les souches sensibles de *G. candidum* présentent une CMI de l'ordre de 0.025g/l et une CMF de l'ordre de 0.1g/l pour la guazatine, et pour l'OPP une CMI de l'ordre de 0.125g/l et une CMF de l'ordre de 0.5g/l. Ceci montre que l'isolat de *Geotrichom candidum* que nous avons utilisé est très résistant vis-à-vis de ces deux agents phytosanitaires. Des résultats similaires concernant la résistance à la guazatine ont été rapportés par Wild (1983). Kuramoto et Yamada (1975) ont également mis en évidence des isolats de *G. candidum* résistants à la guazatine avec une CMI de 1g/l. Cette résistance est probablement due à l'exposition préalable de cet isolat à des traitements utilisant des molécules de la même famille que la guazatine et l'OPP en pré-récolte, et aussi probablement à la persistance des spores de champignons résistants dans les stations d'emballage (Kuramoto ,1976 ; Erasmus et coll., 2015). En plus de la résistance développée vis-à-vis de la guazatine et de l'OPP, l'utilisation de ces deux agents reste limitée. En effet, la guazatine n'est pas autorisée dans

plusieurs pays à cause des problèmes de résidus (McKay et coll., 2012). L'OPP et le sodium ortho-phénylphénate (SOPP) ne sont pas utilisés à cause des risques des dommages aux fruits, altérant leur qualité et les rendant impropres à la vente (Ladaniya, 2008).

Les CMI obtenues avec l'Imazalil et le Thiabendazole vis-à-vis de *P. digitatum* et *P. italicum* sont aussi élevées car elles sont de l'ordre de 0.5 à 0.8 g/l pour l'Imazalil et de l'ordre de 1.5 à 3.75g/l pour le thiabendazole. Ces valeurs sont largement supérieures à celles obtenues avec les isolats sensibles qui sont de l'ordre de 0.1mg/l pour l'Imazalil et de l'ordre de 10mg/l pour le Thiabendazole selon Brown et Mille, (1999) et Pérez et coll, (2011). Ceci montre que les isolats que nous avons sélectionnés sont résistants à l'Imazalil et au thiabendazole.

Plusieurs études ont rapporté le développement de la résistance à l'Imazalil dans la population de *Penicillium sp* (Eckert, 1987; Mavroei et Shaw, 2005) et la résistance au Thiabendazole dans cette population de *Penicillium sp* (Kinay et coll., 2007; Cabañas et coll., 2009; Sánchez-Torres et Tuset, 2011). Une étude *in vitro* menée par Delgado et coll. (1997) sur 20 isolats de *P. digitatum* et *P. italicum*, a montré que ces deux moisissures sont capables de se développer sur un milieu de culture contenant 10 g/l d'Imazalil ou 20g/l de thiabendazole. Nous nous trouvons donc dans un contexte extrême, pour tester l'efficacité du NPP sur des isolats qui sont à la fois très virulents sur les fruits, et très résistants vis-à-vis des agents phytosanitaires utilisés en post-récolte.

Les CMI et les CMF du NPP sur *G. candidum* sont de l'ordre de 1.5g/l. Pour *Penicillium italicum*, la CMI est de l'ordre de 1.5g/l et la CMF de 3g/l. Pour *Penicillium digitatum*, la CMI de 0.375g/l et la CMF de 0.75g/l. Ces résultats obtenus *in vitro* montrent que des champignons très virulents et très résistants aux agents phytosanitaires chimiques utilisés dans les stations d'emballage, sont sensibles au NPP. Cette sensibilité varie d'un isolat à l'autre. L'isolat qui s'est avéré le plus sensible au NPP est celui de *P. digitatum* qui a montré une très forte résistance au thiabendazole. En effet, cet isolat a montré une CMF > 3.75g/l vis-à-vis de thiabendazole. L'isolat de *G. candidum* a aussi montré une sensibilité au NPP avec une CMF de 1.5 g/l alors qu'il est très résistant à la guazatine et à l'OPP avec des CMF équivalentes à la dose maximale autorisée pour le lavage des fruits en Drencher dans les stations d'emballage (ONSSA. 2020).

D'après ces résultats, nous avons supposé que le NPP serait un bon traitement alternatif, capable de contrôler la charge fongique à la surface des fruits. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons effectué des essais sur deux aspects importants impliqués dans la pathogénicité des champignons et pouvant témoigner de l'efficacité comparée du NPP aux traitements chimiques. Ces deux aspects sont l'action sur la germination et l'action sporicide.

Effet inhibiteur de germination et effet sporicide des différents agents antifongiques

La germination est une étape clé dans le phénomène de pourriture (Holmes et Eckert, 1999). C'est pour cette raison que nous avons décidé de comparer l'action inhibitrice de la germination des différents produits antifongiques chimiques à celle du NPP. Les résultats obtenus avec *G. candidum* montrent que la moitié de la CMI (CMI/2) permet d'obtenir une inhibition de la germination de l'ordre de 100% pour le NPP et l'OPP, alors que 25% des arthrospores traitées à la guazatine arrivent à démarrer leur germination, avec une longueur de tube germinatif légèrement inférieure à celle des arthrospores non traitées.

Les résultats de la germination de *P. digitatum* montrent que les spores traitées à la CMI/2 du NPP sont totalement inhibées, alors que 31 à 78% de celles traitées à la CMI/2 de l'Imazalil et du Thiabendazole arrivent à démarrer la germination en émettant des tubes germinatifs.

Pour *P. italicum*, le NPP et l'Imazalil inhibent totalement sa germination, alors que le Thiabendazole ne montre qu'une inhibition partielle.

L'ensemble de ces résultats montrent, d'une part, que le NPP à des doses infra-inhibitrices est capable d'inhiber totalement la germination des spores des isolats de *Geotrichum candidum*, de *P. digitatum* et de *P. italicum*. D'autre part, ces résultats montrent une supériorité d'action du NPP par rapport à la guazatine dans le cas de *G. candidum* et au Thiabendazole dans le cas des deux espèces de *Penicillium*.

Plusieurs études ont rapporté que les huiles essentielles avaient une forte activité antifongique inhibitrice de la germination de spores de moisissures et que le thymol et le carvacrol ont une forte activité antifongique sur la germination des spores (Pérez-Alfonso et coll., 2012; Castillo et coll., 2014). Regnier et coll. (2014) ont aussi montré que les huiles essentielles de thym, de géranium, d'origan, et de citron inhibent la germination des spores de *G. candidum* à des concentrations respectives de 1 ml/l, 1 ml/l, 0.5 ml/l et 0.6 ml/l. Boubaker et coll. (2016) ont rapporté que 500 µl/l de l'huile essentielle de thym inhibe la germination des spores de *P. digitatum* et *P. italicum*. Ils ont rapporté également que 250 µl/l de cette même HE inhibent la germination des arthrospores de *Geotrichum candidum*.

Durant les observations microscopiques des tests de germination des spores, nous avons remarqué que certaines d'entre elles étaient déformées et altérées, et que d'autres étaient vidées de leur contenu, en présence de différents agents antifongiques, particulièrement le NPP. Cette observation nous a poussés à émettre l'hypothèse d'une action sporicide du NPP.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons soumis des spores des trois isolats, à des concentrations équivalentes à la CMI/2 et à la CMI en milieu non nutritif. Nous avons comparé dans ce test l'action sporicide du NPP avec celle de la guazatine et de l'OPP sur les

arthrospores de *G. candidum*, et aussi à celle de l'Imazalil et du Thiabendazole sur les spores des deux espèces de *Penicillium*. Les résultats obtenus montrent que le traitement aux différents agents testés pendant 24 heures, provoque la destruction des spores. Une destruction totale des spores de *P. italicum* a été notée en présence de la CMI du NPP, alors qu'elle est partielle en présence de la CMI de l'Imazalil et de la CMI du thiabendazole, avec des pourcentages respectifs de 47 et de 59%. Cette supériorité du NPP par rapport aux autres agents a aussi été observée avec les arthrospores de *G. candidum*, car le NPP à la concentration CMI, provoque 90% de destruction, alors que dans cas de la guazatine et de l'OPP, elle ne dépasse pas 53%. Ces résultats nous permettent de considérer que le NPP pourrait agir comme agent antifongique phytosanitaire, empêchant la germination et détruisant les spores des champignons au même titre que les agents chimiques utilisés habituellement.

Nous avons montré ces résultats obtenus *in vitro* à des professionnels responsables de la production et du contrôle qualité au niveau de différentes stations d'emballage à Casablanca et à Agadir. Ces professionnels les ont beaucoup appréciés, trouvant que le NPP est prometteur comme produit alternatif aux traitements chimiques qui sont de moins en moins efficaces, et de plus en plus contrôlés. Ils sont d'ailleurs interdits dans certains pays (Brown, 1988). C'est dans ce contexte que nous avons décidé de faire des essais de comparaison de l'efficacité du NPP et des agents chimiques sur des fruits infectés expérimentalement par les spores des trois isolats utilisés dans le test *in vitro*.

Test sur fruits des différents agents antifongiques, seuls ou combinés

Dans un premier temps, nous avons réalisé un test préventif dans lequel les fruits sont traités par lavage au NPP ou aux antifongiques chimiques, ensuite ces mêmes fruits sont infectés expérimentalement par les spores de l'un ou l'autre des trois isolats afin d'évaluer l'efficacité des traitements. Cette expérience a été réalisée dans des conditions extrêmes de températures (26°C) et d'humidité, car les fruits étaient incubés dans des boîtes en plastique transparentes, fermées hermétiquement, avec une atmosphère saturée en humidité. Dans ces conditions, nous avons obtenu une pourriture des fruits qui commence dès le deuxième jour après infection chez le témoin non traité. Sur les fruits traités, les résultats obtenus montrent que le NPP est capable de réduire la surface pourrie des fruits, qui ne dépasse pas 44% au bout de 7 jours. Le traitement à l'OPP réduit aussi cette surface à 48% sans différence significative avec le NPP, alors que les fruits traités à la guazatine présentent une surface pourrie significativement grande de l'ordre de 65%. Ces résultats montrent que le NPP est au moins aussi efficace que les autres traitements pour contrôler la pourriture dans ces conditions expérimentales.

Une discussion de ces résultats avec notre partenaire industriel, nous a mené à tester aussi l'efficacité de l'association du NPP avec l'OPP et du NPP avec la guazatine car, pour eux, remplacer totalement les produits chimiques connus pour leur toxicité, et utilisés depuis au moins une décennie par des substances naturelles non toxiques était difficile à imaginer. C'est pour cette raison qu'à défaut de prendre le risque d'utiliser le NPP seul, ils voulaient l'association du NPP avec les produits chimiques habituels. Ainsi, ils considèrent qu'ils prennent moins de risques. En ce qui nous concerne, le test de l'efficacité de l'association était nécessaire pour vérifier si nous allons obtenir une synergie ou un antagonisme.

Les données bibliographiques ont rapporté que l'association entre les différents agents antifongiques peut ajouter un effet additif ou synergique, augmentant leur efficacité antifongique (Palou et coll., 2008 ; Hao et coll., 2010). Ainsi, l'association de l'Imazalil ou du prochloraz à l'extrait de plante de thé (*Tea saponin*) aboutit à un effet antifongique important dans le contrôle de *Penicillium sp.* D'autres études ont rapporté que l'association des fongicides chimiques avec les sels organiques et inorganiques améliore leur activité antifongique (Palou et coll., 2008; Dore et coll., 2010; Venditti et coll., 2010; Cerioni et coll., 2013; Hong et coll., 2014). En effet, l'association de l'Imazalil, du thiabendazole, du SOPP et du pyriméthanil au bicarbonate de sodium est capable d'améliorer leur efficacité (Smilanick et coll., 2005, 2006a ; Erasmus et coll., 2011). L'application combinée du sorbate de potassium aux fongicides chimiques (thiabendazol, Imazalil, pyriméthanil, fludioxonil) améliore également l'efficacité de ces fongicides chimiques contre *Penicillium sp* (Palou et coll., 2002 ; Smilanick et coll., 2008). Par ailleurs Cunningham et coll. (2007) ont rapporté que la combinaison de l'Imazalil avec l'acide gibberellique (AG3) augmente son efficacité contre *Penicillium sp.*

Les résultats que nous avons obtenus montrent que l'association du NPP à l'OPP réduit l'efficacité des deux produits, la surface pourrie étant significativement supérieure à celle observée avec chacun des deux produits utilisés séparément. Cependant, l'association du NPP à la guazatine a permis d'améliorer l'efficacité de chacun des deux produits, la surface pourrie sur les fruits, étant significativement inférieure à celle observée avec chacun des deux produits utilisés séparément. Ainsi, on peut parler d'une synergie ou d'un effet additif du NPP lorsqu'il est associé à la guazatine dans ces conditions expérimentales. Ces résultats obtenus sur fruits se rapprochent de ceux obtenus *in vitro*, car la CMI de l'association du NPP à l'OPP était plus grande que l'OPP seul, alors que la CMI de l'association du NPP à la guazatine était la même que celle de la guazatine seule.

Les résultats obtenus après l'association du Thiabendazole au NPP et de l'Imazalil au NPP, montrent que le NPP seul est au moins aussi efficace que l'association du NPP avec les deux autres traitements chimiques.

Ces résultats ont été appréciés par nos partenaires industriels qui avaient le choix entre remplacer totalement les fongicides chimiques par le NPP ou associer ces fongicides chimiques au NPP, sauf pour l'OPP qui a présenté un antagonisme avec le NPP.

Après avoir montré l'efficacité du NPP dans le contrôle du développement de la pourriture dans des conditions extrêmes de charge fongique, de température et d'humidité, nous avons réalisé un autre essai sur fruits dans des conditions moins extrêmes et plus proches de la réalité dans le procédé habituel de traitement en station d'emballage et de transport.

Effet de la température sur l'efficacité des agents antifongiques testés sur des fruits blessés expérimentalement et non inoculés

Nous avons alors utilisé des fruits blessés mais sans apporter d'inoculum de spores. Ces fruits ont été lavés avec les différents traitements testés, ensuite blessés et incubés dans des boîtes fermées hermétiquement avec une atmosphère saturée en humidité. L'incubation a été réalisée à deux températures différentes qui sont 26°C et 8°C. En considérant que la température normale utilisée en stockage et durant le transport est 8°C, alors que la température de 26°C correspondrait à des cas de rupture de la chaîne de froid, pendant le transbordement au niveau des ports maritimes intermédiaires.

Les résultats obtenus montrent que le NPP protège les fruits contre la pourriture à 8°C, avec un pourcentage de fruits sains de l'ordre de 57%, au même titre que l'OPP, l'Imazalil et la guazatine, qui ont montré des pourcentages des fruits sains respectifs de 62,2, de 60 et de 55%. Le Thiabendazole lui, s'est montré beaucoup moins efficace avec un pourcentage de fruits sains de l'ordre de 23% seulement.

Les résultats obtenus à 26°C montrent que le NPP et l'Imazalil permettent d'obtenir 41% de fruits sains, alors que les autres traitements (OPP, guazatine, thiabendazole) présentent respectivement à peine 13, 5 et 3% de fruits sains. Ceci permet de conclure que le NPP est au moins aussi efficace que les autres traitements de référence aussi bien à la température de 8°C qu'à la température de 26°C.

Conclusion

Dans cette partie du travail, nous avons comparé l'activité antifongique de la composition innovante NPP à celle des fongicides chimiques habituellement utilisés dans les stations de conditionnement des agrumes sur *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* et *Geotrichum candidum*. Les résultats obtenus *in vitro* ont montré que les 3 isolats sont sensibles au NPP qui possède une CMF inférieure à la dose maximale préconisée pour le traitement des agrumes en post-récolte. Ces trois isolats sont résistants aux fongicides chimiques avec des valeurs de CMF supérieures aux doses autorisées pour le traitement des agrumes en post-récolte. L'association du NPP avec l'Imazalil et le Thiabendazole a amélioré leur activité antifongique. Cependant, l'association du NPP avec l'OPP a diminué son activité antifongique.

Le NPP et l'OPP ont montré une inhibition totale de la germination des spores de *G. candidum*. La germination des spores de *P. digitatum* est totalement inhibée en présence de NPP, et partiellement inhibée en présence de l'Imazalil et de Thiabendazole. La germination des spores de *P italicum* est totalement inhibée en présence de NPP et de l'Imazalil.

Les essais sur fruits ont donné des résultats concordants à ceux des essais *in vitro*. Ces résultats permettent de penser que la composition innovante « NPP » que nous avons mise au point, peut représenter une bonne alternative capable de se substituer au traitement chimique même quand il s'agit des champignons résistants et très virulents et ce, dans des conditions expérimentales extrêmes.

CHAPITRE III

Application du NPP sur l'air, le matériel et les fruits dans la station de traitement et d'emballage des fruits destinés à l'export

Comparaison entre le NPP et les fongicides chimiques.

Introduction

Comme nous l'avons déjà signalé précédemment, après la récolte, les fruits d'agrumes sont traités, triés, et emballés dans des stations d'emballage spécialisées, avant d'être exportés vers les pays demandeurs. Les manipulations subies par les fruits dans ces stations d'emballage et les conditions de transport favorisent le développement des champignons pathogènes responsables des maladies post-récolte des agrumes. Les fruits arrivent à la station d'emballage avec une charge importante de spores fongiques provenant du verger. Ces spores sont alors dispersées dans la station de conditionnement, contaminant l'air, les surfaces, le matériel et les fruits. Bancroft et coll. (1984) ont montré que plus la charge en spores de *Penicillium sp* dans la station d'emballage est élevée, plus le nombre des fruits contaminés et les dégâts occasionnés lors du stockage, du transport, et de la commercialisation sont élevés. L'utilisation excessive et répétée des agents antifongiques chimiques durant leur processus de conditionnement engendre des phénomènes de résistance chez les champignons pathogènes responsables des maladies post-récolte des agrumes (Ismail et Zhang, 2004; Smilanick et coll., 2005; Palou et coll., 2008).

L'évaluation de la charge fongique de différents éléments d'une station de conditionnement (les fruits, les surfaces, l'air, et le matériel) peut être une stratégie efficace pour montrer les différents points critiques et les sources de contamination au sein de la station.

Dans le présent chapitre, une première partie consistera à réaliser plusieurs tests dans le verger et au sein de la station d'emballage « Delassus Maroc » afin de détecter les différentes sources de contamination :

- ✓ évaluation de la charge fongique des fruits dans le verger, en comparant la charge fongique des fruits selon leur position sur l'arbre ;
- ✓ évaluation de la charge fongique des fruits dans la station d'emballage, durant les différentes étapes de leurs processus de conditionnement (depuis la réception jusqu'à la mise en caisse) ;
- ✓ évaluation de la charge fongique de l'air ambiant de différentes zones de la station d'emballage.

Une deuxième partie consistera à évaluer l'efficacité des mesures correctives mises au point pour corriger les points critiques, et les sources de contamination détectées. Ces mesures correctives seront mises au point sur la base des résultats obtenus dans le deuxième chapitre de ce travail.

Matériel et méthodes

I. Evaluation de la charge fongique des clémentines de la variété «*Sidi aissa*» selon leur position sur l'arbre (clémentinier)

Pour pouvoir comparer la charge fongique des surfaces des clémentines selon leur position sur le clémentinier, deux lots de fruits ont été utilisés:

Lot 1 : 30 fruits cueillis à partir de la partie inférieure du clémentinier (la jupe de l'arbre).

Lot 2 : 30 fruits cueillis à partir de la partie supérieure la plus haute du clémentinier.

Les fruits ont été cueillis aseptiquement en utilisant des gants stériles sur cinq arbres choisis au hasard à partir d'une ferme de la région de Fès. Les fruits cueillis ont été placés dans des boîtes de refroidissement stériles dont la température à l'intérieur est d'environ 8°C. Ensuite, les boîtes contenant les fruits ont été transportées vers le Laboratoire de Biotechnologie, Environnement, Agro-alimentaire et Santé (LBEAS) à la faculté des sciences Dhar Mehraz (Fès). Le prélèvement pour l'analyse de la charge fongique a été réalisé environ deux heures après leur cueillette.

Afin de déterminer la charge fongique à la surface de chaque fruit, une surface de 2 cm² de chaque fruit a été essuyée à l'aide d'une tige-coton stérile, imbibée d'eau physiologique stérile (**figure 37**). Ensuite, la tige-coton a été utilisée pour ensemercer la surface d'une boîte de Petri contenant le milieu Potato Dextrose Agar (PDA) (**figure 38**). La boîte de Petri est incubée à la température de 26 °C pendant six jours.

La charge fongique des fruits a été déterminée en calculant le nombre des thalles de champignons par 2 cm² de surface de fruit. Les résultats sont exprimés par la moyenne et l'écart type. La significativité des résultats a été vérifiée par l'utilisation du logiciel IBM SPSS Statistics software, version 21, par le test de student à $P < 0.05$.

II. Evaluation de la charge fongique des clémentines de la variété «*Sidi aissa*» depuis la réception jusqu'au conditionnement

Des clémentines de la variété «*Sidi aissa*» de la région de Marrakech sont arrivées à la station d'emballage après 48 heures de leur cueillette sans aucun traitement préalable. Ensuite, elles ont été traitées avec les fongicides chimiques habituellement utilisés dans la station d'emballage. Ces fongicides sont utilisés au niveau de deux étapes:

- ✓ L'étape dite « Drencher » où les fruits sont aspergés par une bouillie contenant deux antifongiques chimiques qui sont l'Imazalil à la dose de 0.4 kg+ l'orthophenylphénol (OPP) à la dose de 1.5 kg /tonne d'eau. Cette étape ne dure que quelques minutes.

- ✓ L'étape dite « Cirage » où les fruits sont traités avec de la cire contenant de l'Imazalil à la dose de 3kg/tonne. Le cirage est assuré à l'aide des gicleurs effectuant un mouvement de va-et- vient en appliquant la cire sur les fruits.

Entre ces deux étapes, les fruits subissent plusieurs manipulations : versement dans la chaîne de convoyage, triage manuel des fruits avariés, lavage et brossage avec de l'eau chlorée, séchage en tunnel et cirage. Après le cirage, les fruits sont séchés en tunnel avant d'être acheminés vers une ligne de calibrage automatisée. Les fruits sont ensuite manuellement rangés dans des caisses en fonction de leurs calibres.

Dans la station d'emballage, dix clémentines sont prélevées aseptiquement au hasard à partir de chaque étape de traitement, depuis la réception jusqu'à la mise en caisse, puis transférés vers le laboratoire de la station d'emballage pour évaluer la charge fongique à leur surface : Une surface de 2 cm² de chaque fruit est essuyée à l'aide d'une tige-coton stérile imbibée d'eau physiologique stérile. Ensuite, la tige-coton est utilisée pour ensemercer la surface d'une boîte de Petri contenant le milieu PDA. La boîte de Petri est incubée à la température de 26 °C pendant six jours.

Lorsque les thalles des champignons dans les boîtes de Petri sont dénombrables, la charge fongique des fruits est déterminée en calculant le nombre de thalles par boîte de Petri. Lorsque les thalles sur les boîtes de Petri sont incomptables, la charge fongique des fruits est déterminée en utilisant un score fixé en fonction de la densité des thalles à la surface de la boîte de Petri (**figure 39**).



Figure 37 : Prélèvement de la charge fongique à la surface des fruits avec une tige-coton



Figure 38 : Ensemencement de la tige-coton sur la surface gélosée de milieu PDA

Le système de score utilisé dans cette étude est représenté sur le tableau ci-dessous :

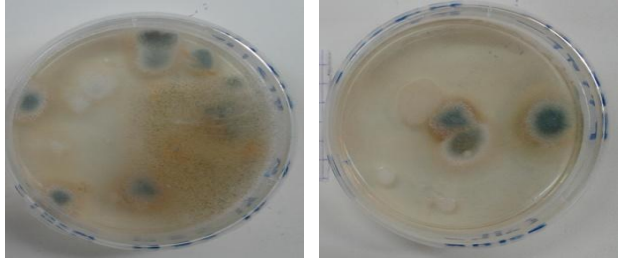
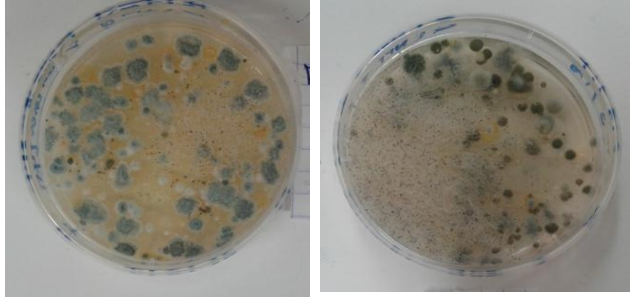
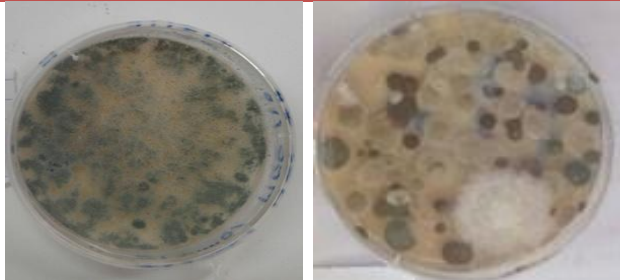
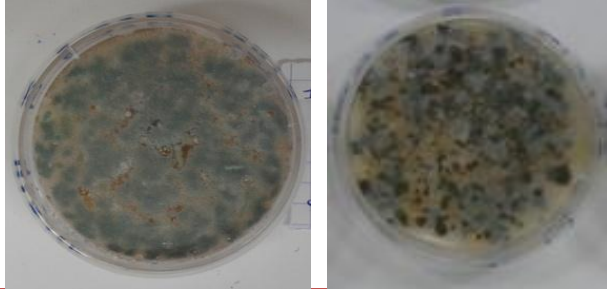
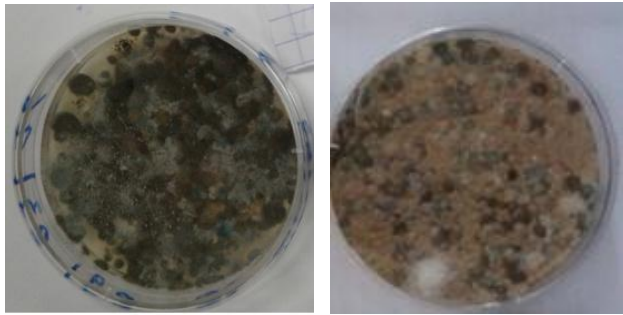
Score	signification	Exemples de Photos
0 à 1	Très faible charge : les boîtes de Petri contenant quelques thalles du genre <i>Penicillium</i> et des levures non identifiées.	
1.1 à 2	Faible charge : les boîtes de Petri sont faiblement chargées en champignons, avec une dominance du genre <i>Penicillium</i> .	
2.1 à 3	Charge moyenne : les boîtes de Petri sont moyennement chargées en différents champignons, avec une dominance du genre <i>Penicillium</i> .	
3.1 à 4	Forte charge : les boîtes de Petri sont fortement chargées en différents champignons, avec une dominance du genre <i>Penicillium</i> et de <i>Geotrichum</i> .	
4.1 à 5	Très forte charge : les boîtes de Petri sont hyperchargées en moisissures, principalement <i>Penicillium italicum</i> , <i>Penicillium digitatum</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>chladosporom</i> , et d'autres champignons non identifiés.	

Figure 39 : Système de score fixé en fonction de la densité des thalles à la surface de la boîte de Petri

III. Evaluation de la charge fongique de l'air ambiant de la station d'emballage

Afin d'évaluer la charge fongique de l'air ambiant des différentes zones de la station d'emballage, des boîtes de Petri contenant le milieu PDA ont été déposées ouvertes pendant 10 min dans différentes zones (critiques) de la station d'emballage :

- la zone de réception et de triage (versement) ;
- la zone de la calibreuse ;
- la zone de mise en caisse ;
- la zone magasin (chambre froide 8°C) ;

Et ceci quatre fois par jour pendant 4 jours :

A 7h 30 min du matin : avant le début de l'activité des ouvriers

A 12h 30 : pendant la pause déjeuner des ouvriers,

A 13h 30 min : Après la pause déjeuner des ouvriers.

A 18h 00 : à la fin de la journée.

Les boîtes ont été incubées à 26 °C, pendant six jours. Un comptage du nombre de thalles des champignons dans chaque boîte a été réalisé. Les résultats sont exprimés par la moyenne et l'écart type de nombre de thalles. La significativité des résultats a été vérifiée par l'utilisation du logiciel IBM SPSS Statistics software, version 21, par le test de l'analyse de variance (ANOVA) en utilisant le test de comparaison least significant difference (LSD) à $P < 0.05$.

Résultats et discussion

La contamination microbienne des tissus des plantes est associée à la surface des fruits et des végétaux. Les tissus internes sont le plus souvent considérés stériles (De Roever, 1988). Plusieurs études ont montré que la surface des fruits d'agrumes est un milieu riche en microorganismes. Les résultats rapportés par Gomba et coll. (2017) montrent que la surface des fruits d'agrumes est riche en bactéries avec une dominance de *Phyla*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* et *Deinococcus*. Elle est aussi riche en moisissures avec une dominance de *Davidiella*, *Cryptococcus*, *Penicillium*, *Epicoccum* et *Sporobolomyces*. Abdelfattah et coll. (2016) ont montré que la surface des fruits est colonisée par différentes variétés de bactéries, de levures, et de moisissures. Parmi ces germes, certains seraient protecteurs contre la pourriture, d'autres la favoriseraient (Andrews et Harris., 2000). La surface des fruits d'agrumes est colonisée également par des bactéries potentiellement pathogènes pour le consommateur: *Escherichia coli* et *Salmonella* (Lopez-Velasco et coll., 2011). Une population fongique est toujours présente à la surface des fruits d'agrumes avant la récolte. Elle peut se développer à des niveaux plus importants si elle trouve les conditions favorables après la récolte (Kanetis et coll., 2007). Ces germes sont adaptés aux conditions environnementales difficiles comme la faible disponibilité des nutriments, et les fortes variations de température et aux pesticides agricoles (Lindow et Leveau, 2002). Les blessures des fruits provoquées au moment de la récolte, au cours du transport, lors des manipulations dans la station d'emballage et au cours du stockage, constituent des portes qui facilitent la pénétration de ces germes à l'intérieur des fruits, provoquant ainsi différentes pourritures (Palou et coll., 2008).

A la demande de nos partenaires industriels (le groupe Delassus), nous avons décidé de faire une évaluation de la charge fongique à la surface des fruits d'agrumes (clémentine de la variété « *Sidi aissa* ») depuis la cueillette jusqu'à la mise en caisse afin d'évaluer l'efficacité des traitements réalisés dans la station d'emballage et de comprendre les causes de la pourriture des agrumes destinés à l'export pendant leur trajet vers la destination finale. Cette évaluation tient lieu d'une étude diagnostique afin d'identifier les points critiques à l'origine du problème et d'essayer d'apporter des mesures correctives. Dans notre contexte, un point critique signifie toute étape de processus de conditionnement et tout élément de la station d'emballage qui peuvent constituer un risque d'augmentation de la charge fongique des agrumes et qui nécessitent des solutions convenables. On appelle ces solutions les mesures correctives.

I. Evaluation de la charge fongique à surface des fruits au moment de la cueillette

Le **tableau 24** résume les résultats de la charge fongique des clémentines selon leur position sur le clémentinier.

Tableau 24 : Charge fongique des clémentines en fonction de leur position sur le clémentinier

Nombre de thalles/2cm ² de surface du fruit	
Fruits de la partie supérieure de l'arbre	22± 2,23 ^a
Fruits de la partie inférieure de l'arbre	31± 3,27 ^b

Les valeurs suivies par des lettres différentes sont significativement différentes les unes par rapport aux autres à p<0.05).

Les résultats obtenus montrent que les fruits cueillis au niveau de la partie inférieure sont significativement plus chargés en champignons que les fruits de la partie supérieure. Des résultats similaires ont été rapportés par Brown (1979) qui a montré que les fruits d'agrumes les plus proches du sol sont les plus contaminés. Cette différence est sûrement due à la proximité des fruits avec le sol qui est l'habitat naturel de ces champignons. En effet, *Geotrichum candidum* est un champignon filamenteux qui existe couramment dans le sol des fermes d'agrumes (Eckert, 1959). De même, *Penicillium digitatum* est un parasite de blessures très ubiquiste qui se trouve dans le sol et dans l'eau (Domsch et coll., 1980). Par ailleurs Martin (1960) a rapporté que *Trichoderma viride*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium javanicum*, *P. decumbens*, et *P. ilacinum* constituent les espèces fongiques les plus dominantes dans les sols des agrumes. Ces champignons s'accumulent à la surface des fruits sous l'action du vent ou par contact direct (Smilanick et coll., 2007).

Nous avons remarqué que, durant la cueillette, les ouvriers sélectionnaient les fruits à cueillir en fonction de leur degré de maturité et de leur calibre. Ceci fait que les fruits de la partie inférieure sont mélangés avec ceux de la partie supérieure au niveau des caisses. Ces caisses vont séjourner dans le champ pendant plusieurs heures en étant exposées au soleil et au vent, ce qui favorise probablement l'augmentation de la charge fongique après la cueillette. Pendant les périodes de la récolte accélérées, les agrumes séjournent parfois à l'extérieur de la station

d'emballage et sont exposés aux conditions environnementales pendant de longues périodes pouvant atteindre 36h, provoquant ainsi une augmentation de la charge fongique à leur surface (Gomba et coll., 2017). Lindow et Brandl (2003) ont rapporté que la charge microbienne à la surface de fruits reflète la charge microbienne de l'environnement où ces fruits sont cultivés. De Roever (1988) considère que, dans le champ, chaque élément qui entre en contact avec la plante est un facteur critique qui peut être une source de contamination des fruits. De plus, il y a la contamination croisée entre les fruits, la main d'œuvre, les variations de température, les équipements de transport qui sont des sources probables de contamination des fruits après la cueillette. D'autres études ont rapporté que la charge microbienne à la surface des fruits, est affectée par les conditions de leur manipulation dans le champ (Johnston et coll., 2006).

Nous avons alors identifié l'étape de la cueillette comme étant le premier point critique pour lequel il faut trouver une solution, surtout que la qualité des fruits d'agrumes à la fin de la chaîne de conditionnement dépend en grande partie de la charge initiale des fruits. En effet, si au départ du Maroc, la charge fongique est faible, la probabilité de pourriture durant le trajet de l'export devrait être faible.

II. Evaluation de la charge fongique à surface des clémentines de la variété « *Sidi aissa* » durant le processus du conditionnement

Un diagnostic de la charge fongique des clémentines traitées dans la station d'emballage avec les antifongiques chimiques habituellement utilisés (Imazalil et OPP) a été réalisé. Ce diagnostic concerne les différentes étapes du processus de conditionnement, depuis la réception jusqu'à la mise en caisse. Ceci, dans le but de détecter les différents points critiques et les différentes sources de contamination des fruits durant leur conditionnement. Rappelant que dans notre contexte, un point critique signifie toute étape de processus de conditionnement et tout élément de la station d'emballage qui peut constituer un risque d'augmentation de la charge fongique des agrumes et qui nécessitent des solutions convenables. On appelle ces solutions les mesures correctives.

La figure 40 montre les résultats de l'évaluation de la charge fongique des clémentines durant les différentes étapes du processus de conditionnement utilisant les fongicides chimiques habituels.

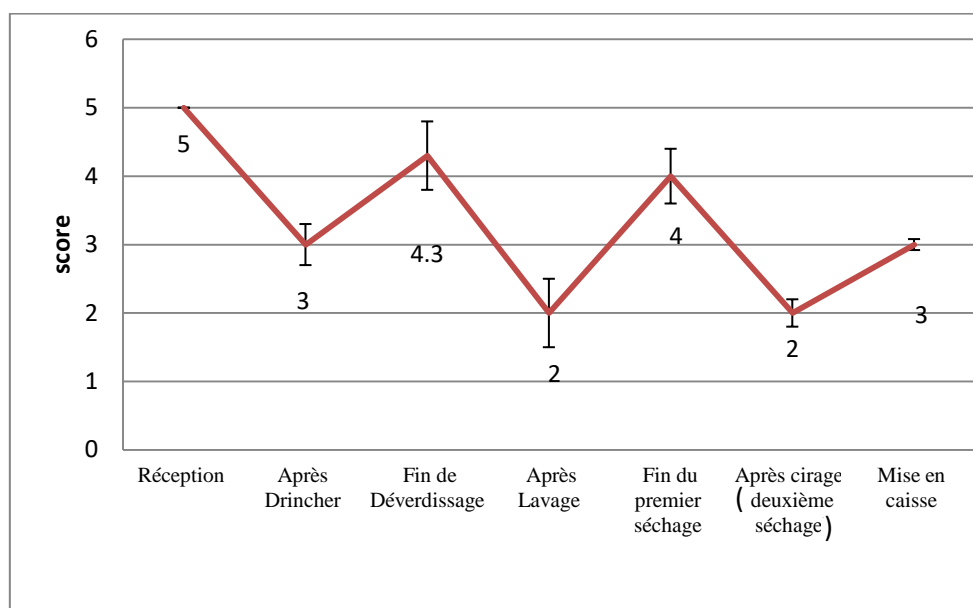


Figure 40 : Evaluation de la charge fongique des clémentines durant les différentes étapes du processus de conditionnement utilisant les fongicides chimiques

Les résultats montrent qu'à la réception, les fruits arrivent à la station d'emballage avec une très forte charge fongique (score 5). Cette charge est largement supérieure à la charge enregistrée au moment de la cueillette (**tableau 24**). D'autres études ont rapporté qu'au moment de l'arrivée des produits frais à la station d'emballage, ces derniers ont une charge microbienne allant de 10^4 à 10^6 microorganismes/gramme de fruit (Beuchat, 1995 ; Narciso, 2005). Ceci confirme qu'entre le moment de la cueillette et l'arrivée des fruits à la station d'emballage, il se passe plusieurs événements (séjour dans le champ, conditions de transport, séjour en chambre froide, ...) qui favorisent le développement fongique. D'autres études ont rapporté qu'après la récolte, les fruits frais ont une charge microbienne réduite et que le retard de transport de ces fruits vers la station d'emballage favorise la croissance de la population microbienne existant à la surface des fruits (De Roever, 1998). Erasmus et coll, (2013) montrent que le temps entre la récolte et le traitement des fruits d'agrumes dans la station d'emballage favorise l'augmentation de la charge fongique en *Penicillium digitatum*.

Ce délai entre la cueillette et l'arrivée à la station d'emballage représente par conséquent un premier point critique pour lequel il faut trouver une mesure corrective. Puisqu'il est difficile de raccourcir le temps entre la cueillette et le traitement à la station d'emballage, nous pensons qu'il serait judicieux de traiter les fruits au moment de la cueillette avec un produit

qui peut empêcher le développement microbien à la surface des fruits en attendant leur arrivée à la station.

L'étape du traitement des fruits d'agrumes par les fongicides chimiques au Drencher est une étape primordiale pour réduire la charge microbienne à la surface des fruits et réduire l'incidence de pourriture des fruits (Ritenour et coll., 2003; Smilanick et coll., 2006b). Cette étape est focalisée sur la réduction des pathogènes fongiques pour ne pas atteindre un niveau d'infection difficile à contrôler (Brown et Miller, 1999). La **figure 40** montre que le traitement des fruits à l'étape de Drencher avec les fongicides chimiques habituellement utilisés dans la station d'emballage (Imazalil à la dose de 0.4 kg + orthophenylphénol (OPP) à la dose de 1.5 kg /tonne d'eau), permet une réduction de la charge fongique initiale des fruits qui passe d'un niveau de très forte charge (score 5) à un niveau moyen de charge fongique (score 3). Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres auteurs. Smilanick et coll. (2006 a et b) ont également constaté que le Drencher des fruits d'agrumes avant le déverdissement permet de réduire leur charge microbienne. Gomba et coll. (2017) ont également constaté que le Drencher des fruits avec les fongicides, réduit la charge fongique à leur surface. Ils ont constaté par ailleurs que les fruits d'agrumes non traités au Drencher et stockés après leur récolte dans des conditions de température semblables à celle de la chambre de déverdissement pendant 3 jours, présentent une grande diversité microbienne et la charge fongique à leur surface a augmenté d'une façon significative. Il est donc important d'appliquer le Drencher aux fruits destinés au déverdissement directement après leur récolte (Dodd et coll., 2010). Brown et Miller 1999 ont rapporté que le Drencher des fruits doit être appliqué au plus tard, 24 heures après la récolte.

La question qui se pose à ce niveau est la suivante: pourquoi le traitement au niveau du Drencher ne permet pas de réduire la charge fongique à un niveau plus bas ?. Est-ce à cause de la résistance des champignons aux produits utilisés ?. Est-ce à cause de la charge fongique qui est tellement élevée que les doses permises d'agents antifongiques utilisés ne sont pas capables de la réduire davantage. Dans les deux cas, la réduction de la charge fongique des fruits avant leur arrivée à la station d'emballage représenterait une solution à ce problème. De même, le remplacement des agents antifongiques de synthèse (imazalil, thiabendazole, OPP et guazatine) par un autre agent plus efficace et ne générant pas de résistance serait une solution. Par conséquent, nous avons identifié le Drencher comme étant le deuxième point critique au niveau duquel il faut agir pour optimiser les traitements suivants.

Au début de la campagne, les fruits d'agrumes ont souvent un degré de maturité acceptable. Cependant la couleur de leur écorce encore verte est inacceptable pour la commercialisation.

Le Déverdissement est dû à une contrainte commerciale afin d'accélérer artificiellement la coloration des fruits, qui passe du vert à l'orange (Porat, 2008). Le Déverdissement des agrumes consiste à exposer les fruits à une concentration d'éthylène allant de 2 à 5 ppm, dans une humidité relative de 90 à 96%, et une température variable en fonction des régions, pendant 1 à 5 jours (Ritenour et coll., 2003). Le déverdissement est réalisé à une température de 20 à 22°C dans les pays à climat méditerranéen (Sdiri et coll., 2012), à une température de 30°C en Floride et au Brésil (Brown, 1975), à une température allant de 18°C à 25°C en Afrique du sud (Krajewski et coll., 2002), et il peut aller jusqu'à 33°C dans d'autres pays (Zhang et Swingle, 2005). Dans notre étude, le déverdissement des fruits a été réalisé à une température d'environ 23°C et une humidité relative de 95%.

La figure 40 montre une réaugmentation de la charge fongique après le séjour des fruits dans la chambre de déverdissement presque au niveau auquel elle était avant le Drencher. Ceci confirme que les conditions de température (23°C) et d'humidité ($\geq 95\%$) de la chambre de déverdissement favorisent le développement des champignons (Plaza et coll., 2003; Zhang et Swingle, 2005). Ce développement fongique est probablement favorisé aussi par la présence d'éthylène (Baudoin et Eckert, 1982). Dans ce contexte, plusieurs travaux ont étudié l'effet de l'éthylène sur le développement fongique. Des études ont rapporté que l'exposition à l'éthylène stimule directement la croissance fongique, et réduit la résistance naturelle des fruits aux champignons pathogènes (Barmore et Brown, 1985; Zhang et Ritenour, 2002). Zhang et Ritenour (2002) ont montré que l'exposition des fruits d'agrumes à l'éthylène stimule la croissance de *Diplodia natalensis*; l'agent causal de la pourriture de l'extrémité des tiges, et de *Colletotrichum gleosporioides*; l'agent causal de l'anthracnose (qui est une maladie caractérisée par l'apparition des taches brunes, sur divers organes de la plante). Brown (1975) a rapporté que l'exposition des agrumes à 5ppm d'éthylène à une température de 30°C et une humidité relative de 90 à 96% pendant 3 jours, augmente significativement l'incidence et la sévérité de l'anthracnose. Par contre, dans ces mêmes conditions, l'incidence et la sévérité de la pourriture verte ont diminué. Porat et coll. (1999) ont montré que l'exposition des fruits d'agrumes à l'éthylène ne stimule pas la croissance de *Penicillium digitatum*. D'autres travaux ont rapporté que le déverdissement des fruits à l'éthylène n'aurait aucun effet sur la qualité des fruits d'agrumes (Sdiri et coll., 2012; Moscoso-Ramírez et Palou, 2014).

L'étape de déverdissement est une étape critique liée à celle du Drencher. Donc, l'optimisation de l'action du Drencher sur les fruits demeure très importante pour avoir la charge fongique la plus faible possible au moment de l'entrée à la chambre de Déverdissement. Il serait aussi

souhaitable que les fruits gardent des résidus du traitement inhibiteur de la croissance fongique provenant du Drencher afin d'inhiber la croissance des champignons pendant le déverdissage.

Après le déverdissage, les fruits sont versés sur un tapis roulant pour un premier triage manuel, qui consiste à enlever les fruits pourris, écrasés, déformés ou non colorés.

A la fin du pré-triage, une opération de lavage des fruits est réalisée afin d'éliminer les poussières et les impuretés. Le lavage est effectué par la pulvérisation d'eau chlorée sur les fruits, et un brossage avec des brosses rotatives et souples pour éviter les blessures des fruits.

La figure 40 montre que le lavage permet une réduction importante de la charge fongique des fruits, qui passe d'une forte charge (score 4,3) à une faible charge fongique (score 2). Ceci montre que le lavage des fruits d'agrumes par pulvérisation d'eau chlorée en plus du brossage est une opération efficace qui permet de diminuer fortement la charge fongique. Des résultats similaires ont été obtenus par Gomba et coll. (2017) qui ont montré que le lavage des fruits d'agrumes par pulvérisation d'eau chlorée avec brossage, réduit d'une façon importante la charge fongique à la surface des fruits d'agrumes, en comparaison avec le trempage dans la même eau chlorée. Ceci peut être expliqué par l'effet de la combinaison entre le brossage et la force mécanique de la pulvérisation de l'eau chlorée. Cette combinaison accélérerait l'élimination des microbes existants à la surface des fruits (Pao et coll., 2009). Murdock (1972) a montré une réduction de 58% de la charge fongique à la surface des fruits d'agrumes lavés avec l'eau chlorée à la dose de 1 à 2 ppm. Cette réduction atteint 90% à la dose de 5ppm. En général, la charge microbienne à la surface des fruits est réduite de 1 à 2 unités logarithmiques après le lavage à l'eau chlorée (World Health Organization, 1998). D'autres études ont également montré l'efficacité du lavage des fruits avec de l'eau chlorée sur la charge microbienne des tomates (Senter et coll., 1985). Beuchat et Brackett (1990) ont montré une diminution de la charge microbienne des laitues après lavage à l'eau chlorée. Cependant après quelques jours de stockage, ces auteurs ont constaté que la charge microbienne a augmenté d'une façon importante, comparable à celle des laitues non lavés. D'autres études ont rapporté au contraire que l'eau chlorée n'a aucun effet sur la charge microbienne des fruits (Li et coll., 2001 ; Johnston et coll., 2005).

Après leur lavage, les fruits traversent un premier tunnel de séchage. A la sortie de ce tunnel, la charge fongique des fruits augmente d'une façon importante pour atteindre une forte charge (score 4). Ceci montre que ce premier tunnel de séchage est une source de contamination des fruits. En effet le courant d'air chaud (35°C) à l'intérieur de ce tunnel de séchage permet de secouer les spores fixées sur ses parois. Ces spores vont se déposer sur la surface des fruits

qui traversent le tunnel durant le séchage. Pour cela, nous avons identifié l'étape du premier séchage comme étant un troisième point critique pour lequel il faut trouver une solution.

Ensuite, les fruits sont cirés, puis séchés dans un tunnel de séchage. Le cirage a pour but d'améliorer l'apparence et de réduire la perte d'eau et le dessèchement des fruits. (Park, 2002). Poa et coll. (1998) ont rapporté que le revêtement des fruits avec la cire seule montre une réduction de la charge bactérienne à la surface des fruits d'agrumes. Au contraire, Segall (1971) avait montré que le cirage augmente le taux de pourriture des tomates. Des résultats similaires ont été rapportés par Murdock (1972) qui a montré que le cirage des fruits d'agrumes avec la cire seule augmente le taux de pourriture, surtout la pourriture amère causée par *G. candidum* et la pourriture des extrémités des tiges causée par *Diplodia natalensis*. Murdock (1972) avait vérifié également la teneur en microorganismes de la cire sur milieu PDA et avait constaté que la cire contient des champignons viables. Ceci s'explique par le fait que la cire contenant les microorganismes, constituant ainsi un obstacle pour leur élimination (Johnston et coll., 2005). C'est pour cela qu'aujourd'hui, la cire est mélangée avec des fongicides chimiques pour avoir une efficacité contre la charge microbienne à la surface des fruits. Dans notre étude, les clémentines de la variété « *Sidi aissa* » ont été traitées avec la cire contenant l'Imazalil à la dose de 3000 ppm. Les résultats montrent que le cirage permet une réduction importante du niveau de la charge fongique des fruits, ce qui montre que le cirage des fruits avec la cire contenant l'Imazalil permet d'avoir un double effet sur les fruits : la brillance et l'effet antifongique dû à l'Imazalil. Des études plus récentes ont montré que l'application des fongicides dans la cire permet d'avoir un effet préventif de la pourriture des fruits (Njombolwana et coll., 2013a).

Hall et coll. (1978) ont rapporté que le cirage des fruits avec la cire contenant le thiabendazole, inhibe la sporulation des souches sensibles au thiabendazole. Aharoni et coll. (1992) ont rapporté que le cirage des fruits du melon « *Galia* » avec la cire contenant 2000 ppm d'Imazalil, permet de prévenir les pourritures dues à *Alternaria alternata* et *Fusarium spp.* Ce traitement est considéré plus efficace pour la lutte contre ces pourritures (Temkin-Gorodeiski et coll., 1985) par rapport au cirage avec la cire contenant l'orthophenyl phénol ou le prochloraze (Aharoni et coll., 1992). Cependant, d'autres travaux ont montré que l'ajout de l'Imazalil dans la cire diminue son efficacité antifongique sur les fruits d'agrumes, en comparaison avec son application à l'étape de Drencher (Namesny, 1988 ; Ecker et coll., 1994). Ceci s'explique par l'immobilisation des résidus antifongiques par la cire (Brown, 1984). Des résultats similaires rapportés par Njombolwana et coll. (2013a) ont montré que le cirage avec la cire contenant le Thiabendazole a montré un faible contrôle de la pourriture des

mandarines de la variété « Satsuma ». D'autres études ont également montré que le cirage des fruits avec la cire contenant le Thiabendazole a montré une faible efficacité sur les pourritures des fruits (Kellerman et coll., 2014), ceci montre que l'efficacité de la cire contenant des fongicides chimiques sur la charge microbienne à la surface des fruits reste limitée. Le remplacement des fongicides chimiques par un autre agent antifongique naturel plus efficace pourrait améliorer l'efficacité du cirage. Par conséquent, nous avons identifié l'étape de cirage comme étant un quatrième point critique qui mérite une optimisation.

A la fin du processus de conditionnement des fruits, leur charge fongique commence à augmenter d'une façon remarquable puisqu'elle passe du score 2 au score 3. Ceci peut être dû à la charge en spores de l'air ambiant de la station d'emballage. Ces spores vont se déposer à la surface des fruits au moment de la mise en caisse, augmentant ainsi leur charge fongique. Cette augmentation peut aussi être expliquée par le manque d'hygiène chez les ouvriers qui mettent en caisse les fruits manuellement. Materon et coll. (2007) ont rapporté que l'étape de la mise en caisse est une étape associée à l'accumulation des microorganismes. Plusieurs travaux ont rapporté que la charge microbienne à la surface de certains produits est significativement plus élevée aux stades finaux par rapport aux stades précédant leur manipulation (Castillo et coll., 2004; Johnston et coll., 2006 ; Ailes et coll., 2008). D'autres études ont montré qu'au moment de la mise en caisse, la charge microbienne des oranges (Duffy et coll., 2005), des pommes (Garcia et coll., 2006), des mandarines de la variété « Satsuma » (Izumi et coll., 2008), du cantaloup (Johnston et coll., 2005), et des poivrons (Soto-Beltra et coll., 2014) est significativement plus élevée par rapport à leur charge après la récolte. Ailes et coll. (2008) ont rapporté qu'à l'étape de la mise en caisse, les fruits sont plus susceptibles d'être contaminés par *E. coli*. Gomba et coll. (2017) ont rapporté que la charge bactérienne des fruits d'agrumes à l'étape de la mise en caisse est plus élevée par rapport aux autres étapes de la chaîne de conditionnement. Ceci peut être expliqué par le contact direct entre les fruits et les surfaces, les équipements, les mains du personnel (Ailes et coll., 2008), la mauvaise désinfection des surfaces et à la contamination croisée (Garcia et coll., 2006; Pao et coll., 2009). Nous avons alors jugé que l'étape de la mise en caisse comme étant un cinquième point critique pour lequel il faut agir.

III. Evaluation de la charge fongique de l'air ambiant de la station d'emballage

A leur arrivée à la station d'emballage, les fruits possèdent une forte charge fongique. Ils répandent les spores dans l'air des différents compartiments de la station, ce qui contamine l'air, les surfaces et le matériel. Hall et Bice (1977) ont considéré que l'incidence de la

pourriture des fruits d'agrumes dans les stations d'emballage est proportionnelle à la présence des spores dans l'air ambiant, sur les surfaces et les équipements.

Des prélèvements préliminaires de la charge fongique de l'air ambiant de différentes zones de la station d'emballage en utilisant la technique de piégeage (Résultats non montrés) nous ont révélés que les différentes zones de la station d'emballage ont une charge fongique importante, avec une supériorité de la zone de versement qui a montré une charge significativement importante par rapport aux autres zones. Des résultats similaires ont été obtenus par Chahboun (1992) dans une station d'emballage de la région du Souss, et par Besri (1990) dans une station d'emballage de la région de Casablanca. Ces travaux ont montré que la zone de versement est plus chargée en champignons pathogènes. Par conséquent, nous avons identifié « l'air ambiant de la station d'emballage » comme un sixième point critique qui peut contribuer à la contamination des fruits pendant les étapes de calibrage et de mise en caisse et aussi pendant la période d'attente avant l'export ou le stockage en chambre froide.

IV. Mise au point des mesures correctives dans la station d'emballage

« Delassus »

Les tests précédents ont permis de détecter l'existence de plusieurs points critiques, qui peuvent être des sources de contamination des fruits au cours de leurs processus de conditionnement dans la station d'emballage. Dans notre contexte, un point critique signifie toute étape de processus de conditionnement et tout élément de la station d'emballage qui peut constituer un risque d'augmentation de la charge fongique des agrumes et qui nécessite des solutions convenables. On appellera ces solutions, mesures correctives.

Sur la base des résultats du diagnostic, d'une part, et sur la base des résultats obtenus dans le deuxième chapitre de ce travail (**figures 31+ 32 +34** du deuxième chapitre) d'autre part, nous avons tenté d'apporter des mesures correctives à ces points critiques, en utilisant l'agent antifongique naturel « NPP » seul ou combiné avec les agents antifongiques chimiques habituellement utilisés.

1. Evaluation de l'efficacité du trempage des fruits dans la solution du NPP pendant la cueillette

Des clémentines de la variété « *Sidi aissa* » de fin de campagne ayant subi une forte pluviométrie et présentant une acidité faible avec un taux de sucre élevé ont été utilisées. Ces fruits représentent un terrain favorable au développement des champignons. Ils arrivent à la station d'emballage avec une charge fongique élevée, constituant ainsi une source de contamination de tout l'équipement de la station d'emballage. La charge initiale des fruits est considérée alors comme un point critique. Nous avons décidé d'apporter une première mesure

corrective. Cette mesure consiste à tremper les fruits au moment de leur cueillette (dans le champ) dans une bassine contenant une solution du NPP à la dose de 1,5 kg/tonne d'eau pendant quelques minutes. Pour évaluer l'efficacité de ce trempage sur la charge fongique de la surface des fruits, un essai à été réalisé dans deux fermes de deux régions Marocaines différentes, la région de Marrakech et la région du Gharb.

Après la cueillette, des clémentines ont été prélevées au hasard et réparties en deux lots :

Lot 1 : 30 fruits ont été trempés dans la solution du NPP (1.5kg/tonne) lors de la cueillette

Lot 2 : 30 fruits non trempés.

Ensuite, les fruits ont été mis dans des grandes caisses et chargés sur la plateforme d'un camion pour être transportées vers la station d'emballage. Le transport s'est fait dans les conditions environnementales ambiantes. Vingt-quatre heures après la cueillette, les fruits sont arrivés à la station d'emballage. La charge fongique à la surface des fruits des deux lots a été évaluée directement après leur arrivée. Les résultats sont exprimés en scores en utilisant le système de scores décrit précédemment. Ces résultats sont présentés sur **le tableau 25**.

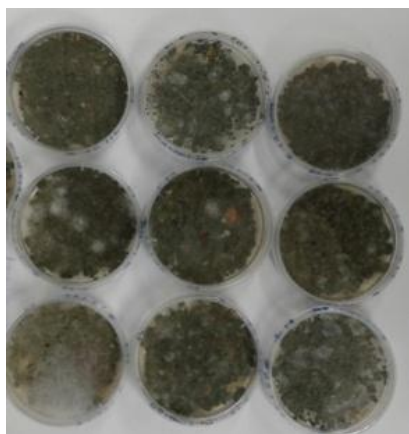
Tableau 25 : Moyennes des Scores de la charge fongique des clémentines trempées dans le NPP et des clémentines non trempées

Moyennes des Scores		
	Fruits non trempés n=30	Fruits trempés n=30
Marrakech	4,77±0,32	3,33±0,32
Gharb	4,62±0,4	3,6±0,2

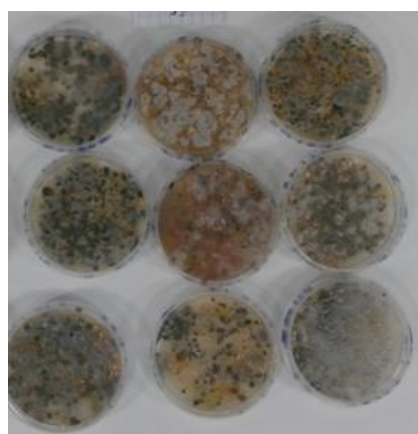
Les résultats obtenus montrent que le trempage des fruits directement après leur cueillette dans la solution du NPP (1.5kg/tonne) permet de réduire la charge fongique initiale des fruits d'un score de très forte charge (environ 4,7) à un score de forte charge (environ 3,6). Ceci pour les fruits des deux fermes. Ces résultats confirment que le trempage des fruits directement après la cueillette dans la solution du NPP à la dose de 1.5kg/tonne, permet de réduire la charge fongique à la surface des fruits reçus à la station d'emballage. Ces fruits vont donc arriver à la station d'emballage avec une charge fongique initiale plus faible. Par conséquent, la probabilité de pourriture durant le trajet est plus faible et le traitement à la station d'emballage est d'autant plus efficace que la charge initiale est réduite.

Nafussi et coll. (2001) ont rapporté que le trempage des fruits d'agrumes dans l'eau chaude (52°C - 53°C) pendant quelques minutes (2 min) est une approche qui montre un effet inhibiteur des germes pathogènes en ralentissant leur croissance de 24 à 48 heures. Cependant, les températures élevées peuvent provoquer des altérations de l'aspect extérieur des fruits (Ben-Yehoshua et coll., 1987). L'application des fongicides chimiques sur les arbres quelques jours avant la récolte comme le thiophanate methyl et le benomyl (Ritenour et coll., 2004 ; Yildiz et coll., 2005 ; Smilanick et coll., 2006b) est une stratégie couramment utilisée pour la prévention des pourritures en post-récolte. Cependant, l'application répétée de ces fongicides au niveau du champ comporte le risque de provoquer l'apparition de souches résistantes aux fongicides utilisés dans la station d'emballage (résistance croisée) (Smilanik et coll., 2006). Les résultats de cette première mesure corrective montrent que le trempage des fruits d'agrumes dans la solution du NPP au moment de la cueillette est une solution efficace pour la réduction de la charge initiale des fruits d'agrumes. Sachant que notre laboratoire a montré que le NPP ne provoque aucun dommage à l'aspect extérieur des fruits et ne comporte aucun risque de résistance croisée avec les traitements utilisés en post-récolte.

Par conséquent, nous pouvons considérer que le trempage des fruits dans la solution du NPP au moment de la cueillette est une mesure corrective efficace pour la correction du premier point critique lié au délai d'attente entre la cueillette et l'arrivée à la station d'emballage.



Charge fongique des fruits avant trempage Score $4,77 \pm 0,32$



Charge fongique des fruits après trempage Score $3,33 \pm 0,32$

Figure 41: Boîtes de Petri représentant la charge fongique des fruits de la ferme de Marrakech avant et après trempage dans la solution du NPP

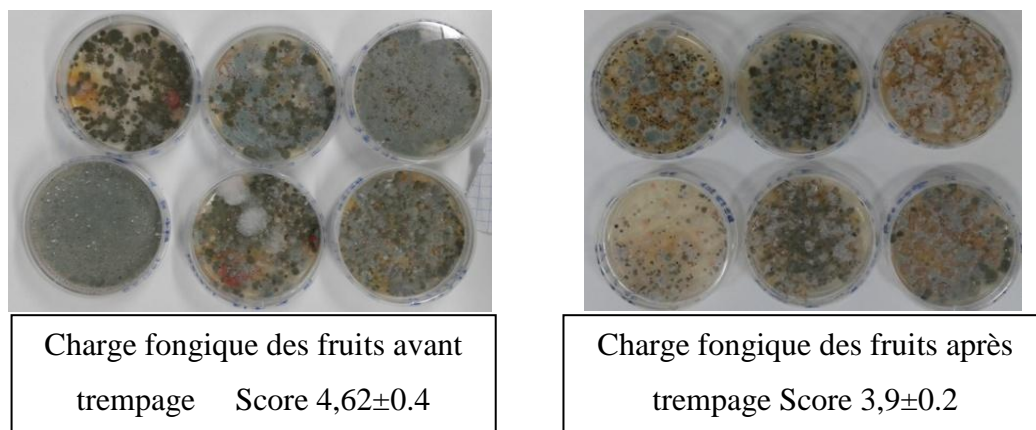


Figure 42: Boîtes de Petri représentant la charge fongique des fruits de la ferme de Gharb avant et après trempage dans la solution du NPP

2. Evaluation de l'efficacité de l'utilisation du "NPP" pendant l'étape du Drencher et lors du premier tunnel de séchage

Dans le contexte des mesures correctives mises au point, l'antifongique naturel « NPP » a été testé dans le traitement des fruits à l'étape de « Drencher » et lors du premier séchage.

Pour pouvoir comparer l'efficacité du NPP et des antifongiques chimiques habituellement utilisés dans la station d'emballage sur la charge des fruits, nous avons travaillé sur deux lots d'environ 20 tonnes de fruits (clémentines) chacun. Ces deux lots provenant de deux régions marocaines différentes (la région de Marrakech et la région du Gharb), sans aucun traitement préalable. Les clémentines de chaque région ont été transportées à la station d'emballage dans les conditions de températures ambiantes 24 heures après leur cueillette.

Pour chaque lot, 30 clémentines ont été prélevées pour définir leur charge fongique initiale avant Drencher. Puis, les clémentines de chaque lot ont été réparties en trois sous-lots de 6 à 7 tonnes chacun :

- ✓ Sous-lot 1 : les clémentines ont été traitées avec les fongicides chimiques (FC) habituellement utilisés dans la station d'emballage, au niveau de l'étape de « Drencher »: 0.4 kg d'Imazalil + 1.5kg d'orthophenylphénol (OPP)/tonne d'eau.
- ✓ Sous-lot 2 : les clémentines ont été traitées avec le produit NPP seul à l'étape de « Drencher » à la dose de 3kg/tonne d'eau.
- ✓ Sous-lot 3 : les clémentines ont été traitées avec un mélange du produit NPP et les fongicides chimiques à l'étape de « Drencher »: 3kg de NPP+ 0.4kg d'Imazalil+ 1.5kg d'OPP/tonne d'eau.

Après Drencher, les fruits de chaque sous-lot ont été lavés et séchés dans un premier tunnel de séchage préalablement traité par nébulisation au NPP.

Afin de comparer l'efficacité des trois traitements, 10 clémentines ont été prélevées aseptiquement au hasard à partir de chaque sous-lot après Drencher et à la sortie du premier tunnel de séchage (après le premier séchage). Les prélèvements pour évaluer la charge fongique à la surface de chaque fruit ont été réalisés dans le laboratoire de la station d'emballage.

La figure 43 résume les résultats de la charge fongique des fruits des deux fermes en fonction du traitement utilisé, durant les trois premières étapes de leur processus de conditionnement : Réception, après Drencher et après le premier séchage.

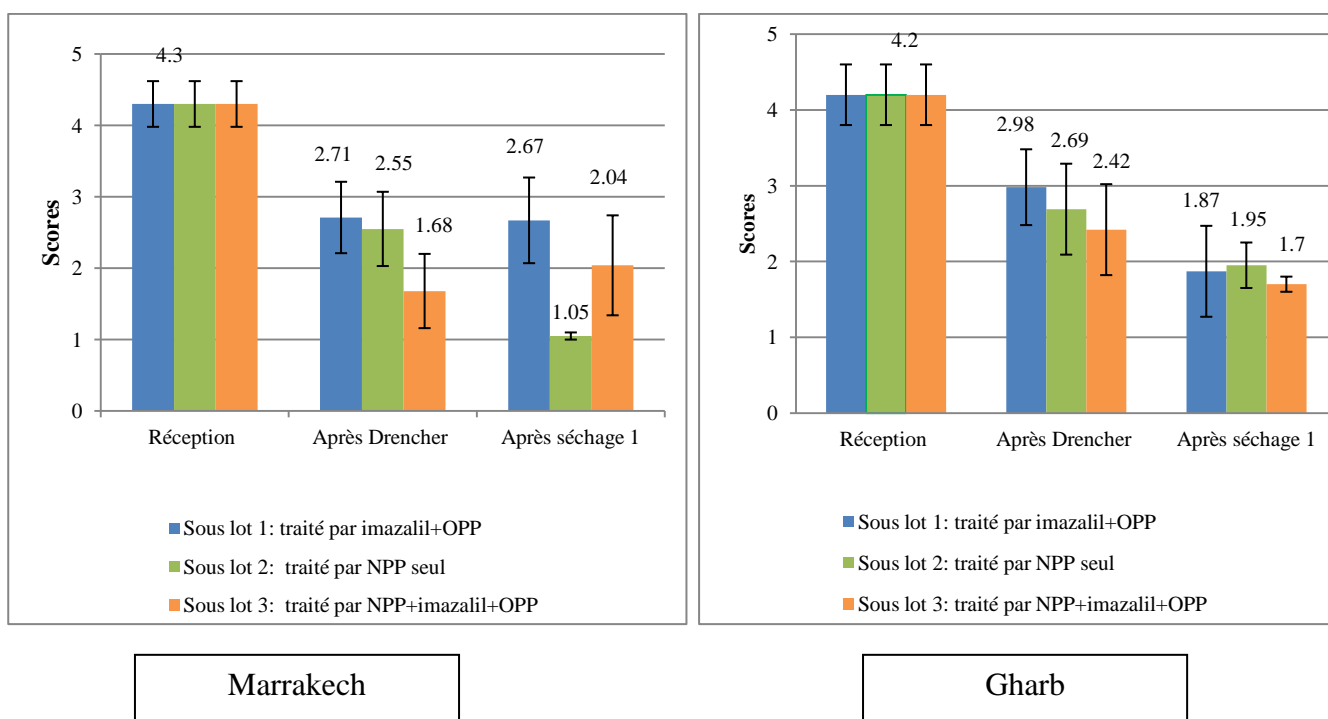


Figure 43: Charge fongique des clémentines provenant des deux fermes durant les trois premières étapes du processus de conditionnement. La charge fongique est exprimée en scores. (Le système de scores utilisé est le même que celui décrit précédemment)

Les résultats présentés sur la figure 43 montrent que les fruits des deux fermes, n'ayant pas été trempés dans la solution du NPP au moment de la cueillette, arrivent à la station d'emballage avec une très forte charge fongique (Un score de 4.3 dans le cas des fruits de Marrakech et un score de 4.2 dans le cas des fruits de Gharb).

Dans le cas des fruits de la ferme de la région de Marrakech, les résultats de la charge fongique de la surface des fruits après Drencher ont montré que, le NPP seul et l'Imazalil plus l'OPP, ont une même efficacité sur la charge fongique des fruits. Cependant, la combinaison des trois antifongiques (NPP + Imazalil + OPP) a montré une meilleure réduction de la charge fongique de surface des fruits. Ceci permet de penser à une synergie entre les trois agents

antifongiques. En effet, il a déjà été rapporté que la combinaison entre les différents agents antifongiques peut ajouter un effet additif ou synergique augmentant ainsi l'efficacité du traitement (Palou et coll., 2008). Smilanick et coll. (2005) ont rapporté que la combinaison du Thiabendazole ou de l'Imazalil avec le bicarbonate de sodium serait capable d'augmenter leur efficacité. Une synergie a été notée pour le pyrimethanil combiné avec le bicarbonate de sodium (Smilanick et coll., 2005). Le lavage qui suit le Drencher permet une réduction de la charge fongique à la surface des fruits. Cette charge passe d'un score de charge moyenne (score 3) à un score de faible charge (score 2) (**Figure 40**). Ceci confirme l'efficacité du lavage des fruits à l'eau chlorée avec brossage dans la réduction de la charge fongique à la surface des fruits. Les résultats de **la figure 43** montrent également qu'à la sortie du premier tunnel de séchage traité préalablement par nébulisation du NPP, la charge fongique des fruits de la région de Marrakech traités avec le NPP a été maintenue à un faible niveau. Cependant, une augmentation de la charge a été notée pour les fruits traités avec les deux autres traitements (Imazalil + OPP et NPP + Imazalil + NPP). Ceci peut être expliqué par l'effet du lavage à l'eau chlorée avec brossage. Ce lavage élimine les résidus des antifongiques chimiques seuls ou combinés avec le NPP à la surface des fruits, diminuant ainsi leur efficacité. Les résidus du NPP ont probablement été conservés et auraient pénétré dans l'épaisseur de l'écorce du fruit, prolongeant ainsi leur conservation. Ces résultats peuvent s'expliquer également par l'incompatibilité de l'Imazalil avec le chlore, et la compatibilité du NPP avec le chlore. En effet, des études ont montré que la combinaison du chlore avec l'Imazalil est incompatible (Ritenour et coll., 2003 ; Adaskaveg et coll., 2004 ; Smilanick et coll., 2006a). Cette incompatibilité a été notée également par Adaskaveg et coll. (2004) dans le cas du pyrimethanil associé au chlore. Cependant les deux antifongiques chimiques Thiabendazole et fludioxonil sont compatibles avec le chlore (Adaskaveg et coll., 2004).

Les résultats obtenus pour les fruits de la ferme de la région de Gharb ont montré qu'avec les trois traitements ; NPP seul, Imazalil+OPP seuls et NPP+Imazalil+OPP, nous obtenons à peu près la même efficacité de réduction de la charge fongique à la surface des fruits après Drencher. Ces trois traitements réduisent le score d'une très forte charge initiale à un score de charge moyenne. Ces résultats confirment que le NPP ou le mélange des fongicides chimiques (Imazalil + OPP) habituellement utilisés ont des efficacités similaires à l'étape de Drencher, et que la combinaison du NPP avec le mélange de ces fongicides chimiques n'apporte pas d'effet supplémentaire à l'effet du NPP seul. Le lavage à l'eau chlorée avec brossage améliore la réduction de cette charge à un score de faible charge. Ce faible niveau de charge fongique des fruits est maintenu à la sortie du premier tunnel de séchage traité préalablement par

nébulisation du NPP. Ceci confirme que la nébulisation au NPP à l'intérieur du tunnel de séchage est une mesure efficace; car ce dernier ne représente plus une source de contamination des fruits après leur lavage.

Les résultats de la charge fongique des fruits des deux fermes confirment que l'application du NPP à l'étape de Drencher a montré la même efficacité que la combinaison de l'Imazalil à l'OPP. On pourrait donc utiliser un seul produit naturel au lieu de deux produits chimiques. D'un autre côté, le NPP permet le maintien de la faible charge fongique des fruits durant les étapes qui suivent le Drencher car les résidus de NPP fixés à la surface des fruits permettent la conservation des fruits durant la suite des étapes de la chaîne de conditionnement. Par conséquent, nous considérons que l'application du NPP à l'étape de Drencher est une mesure efficace pour l'amélioration de cette étape qui représente un deuxième point critique.

Nos résultats confirment aussi que la nébulisation du NPP à l'intérieur du tunnel de séchage est un traitement efficace. Ce tunnel n'est plus une source de contamination des fruits après leur lavage. La nébulisation de NPP à l'intérieur du tunnel de séchage est donc, une mesure efficace pour la décontamination du tunnel du premier séchage considéré comme étant un troisième point critique.

D'autres inventions brevetées ont décrit des compositions à base d'huiles essentielles pour la lutte contre la pourriture des fruits et des légumes en post-récolte. Une composition à base de l'huile essentielle de girofle mélangée avec l'acide phosphonique (FR 2967553 (A1)) appliquée en Drencher ou par trempage, a une activité bactéricide et fongicide. Une autre invention (ES 201130390 (A1)) comprenant un mélange d'huiles essentielles combinées avec d'autres agents ayant des propriétés antifongiques connues, protège les fruits et les légumes contre les infections fongiques en pré et en post-récolte. Enfin, une autre invention brevetée (MX2011013349 (A)) comprenant des huiles essentielles combinées avec l'extrait de *Larrea tridentata* et du chitosan (un polysaccharide composé de la distribution aléatoire de D-glucosamine) est efficace pour protéger les fruits contre les champignons en post-récolte.

3. Evaluation de l'efficacité de l'utilisation de "NPP" à l'étape du cirage des fruits

Après l'étape du premier séchage, les clémentines traitées des trois sous-lots de chaque ferme ont été cirées avec la cire contenant les différents agents antifongiques selon le sous-lot étudié :

- ✓ Sous-lot 1 : les fruits ont été cirés avec la cire contenant 3kg d'Imazalil /tonne ;
- ✓ Sous-lot 2 : les fruits ont été cirés avec la cire contenant le NPP à la dose de 5kg/tonne ;

- ✓ Sous-lot 3 : les fruits ont été cirés avec la cire contenant le mélange de 5kg de NPP + 3kg d’Imazalil/tonne d’eau ;

Après le cirage, les clémentines des 3 sous-lots de chaque ferme ont été séchées au 2^{ème} tunnel de séchage (séchage 2) avant d’être acheminées vers une ligne de calibrage automatisée. Les fruits ont été ensuite manuellement rangés dans des caisses en fonction de leur calibre. La charge fongique à la surface des fruits des 3 sous-lots de chaque ferme après cirage (10 fruits ont été prélevés), et au moment de la mise en caisse (30 fruits pour chaque sous-lot), sont présentés dans **la figure 44**. La significativité des résultats a été vérifiée par l’utilisation du logiciel IBM SPSS Statistics software, version 21, par le test de l’analyse de variance (ANOVA) en utilisant le test de comparaison least significant difference (LSD) à $P < 0.05$.

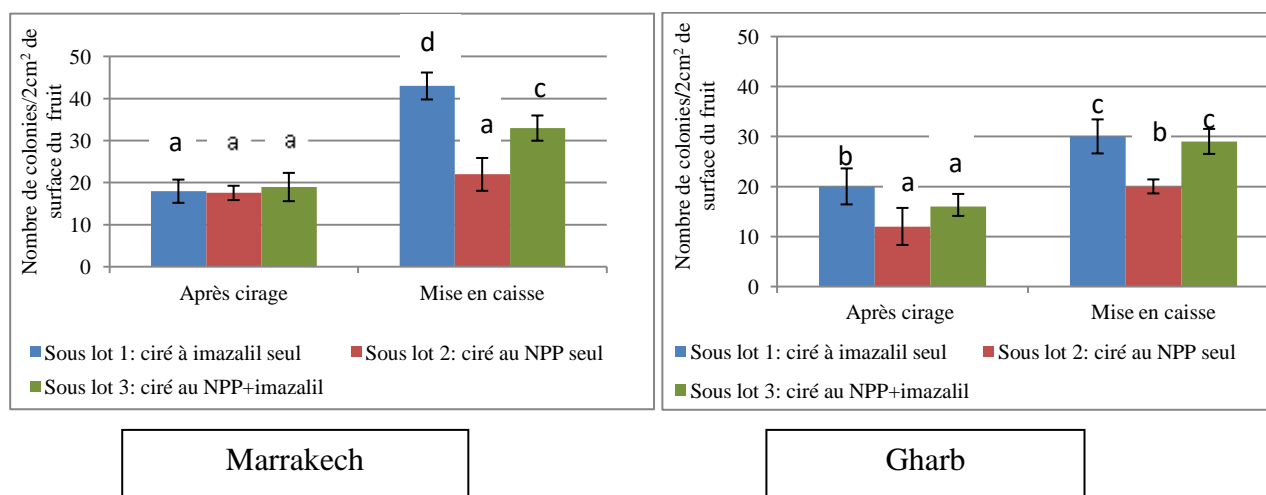


Figure 44: Charge fongique des clémentines des deux fermes durant les deux dernières étapes du processus de conditionnement. La charge fongique est exprimée en nombre de thalles/2cm² de surface du fruit

(La différence significative ($p < 0.05$) entre les traitements les uns par rapport aux autres est indiquée par des lettres différentes sur les histogrammes).

Après cirage, l’efficacité du NPP seul (appliqué à la concentration de 5kg/tonne de cire) a été comparée avec l’efficacité de l’Imazalil (appliqué à la concentration de 3kg/tonne de cire) et avec la combinaison des deux agents antifongique (3kg d’Imazalil + 5kg de NPP par tonne de cire).

Après cirage des fruits de la ferme de la région de Gharb, les résultats montrent que la charge fongique à la surface des fruits traités à l’Imazalil seul est significativement plus forte que celle des fruits traités au NPP seul ou au mélange du NPP plus l’Imazalil. Ce résultat permet

de conclure que dans les conditions de la station d'emballage, l'Imazalil seul est moins efficace que le NPP seul. Il s'avère aussi que la combinaison du NPP avec l'Imazalil n'a apporté aucune efficacité supplémentaire comparée à l'efficacité du NPP seul (**Figure 44**). Pour les fruits de la région de Marrakech, les trois traitements ont montré la même efficacité pour réduire la charge fongique à la surface des fruits après cirage. Ceci confirme que la combinaison du NPP avec l'Imazalil dans la cire n'a aucun effet additif sur l'effet du NPP seul.

A la mise en caisse, les fruits de la ferme de Marrakech cirés avec le NPP seul ont maintenu quasiment la même charge fongique qu'ils avaient après cirage (**Figure 44**). Pour les fruits de la ferme du Gharb, une légère augmentation a été notée dans la charge fongique des fruits cirés au NPP seul. Cependant, une augmentation significative de la charge fongique a été enregistrée pour les fruits des deux fermes cirés à l'Imazalil seul et à l'Imazalil + NPP. Ces résultats montrent une supériorité de l'action antifongique du NPP seul par rapport à l'Imazalil seul et à l'association du NPP à l'Imazalil. Cette supériorité s'exprime par une inhibition significative de la croissance des champignons et/ou de la contamination des fruits par les champignons de l'air ambiant entre le moment du cirage et le moment de la mise en caisse. Ceci peut s'expliquer par une meilleure rémanence du NPP par rapport à l'Imazalil entre le moment du cirage et le moment de la mise en caisse. On note aussi que l'association de l'Imazalil avec le NPP est significativement moins efficace que le NPP seul si on regarde la charge fongique à la surface des fruits au moment de la mise en caisse. Ceci laisse penser à un antagonisme entre le NPP et l'Imazalil dans les conditions de traitement à la station d'emballage.

Une question se pose : pourquoi l'Imazalil seul ou en association avec le NPP est-il plus efficace quand il est en solution au niveau du Drencher que lorsqu'il est utilisé dans la cire ?

On peut expliquer cette différence par le fait que les molécules de l'Imazalil en solution dans l'eau du Drencher sont mobiles et, par conséquent, disponibles pour agir sur les champignons. Par contre, lorsque la cire se solidifie à la surface des fruits, les molécules d'Imazalil sont immobilisées, ce qui diminue leur capacité d'interagir avec les champignons pour les contrôler. Ces résultats sont contradictoires avec d'autres études qui ont rapporté que les antifongiques appliqués dans la cire sont plus efficaces par rapport à leur application dans la solution aqueuse (Erasmus et coll., 2011, 2013; Njombolwana et coll., 2013a, b).

D'autres études cependant ont montré que la cire immobilise les résidus antifongiques à la surface des fruits d'agrumes, limitant ainsi leur efficacité (Ecker et coll., 1994 ; Pérez et coll., 2011). Cet effet n'a pas été observé d'une façon importante sur les fruits cirés au NPP seul,

qui ont maintenu la même charge fongique qu'ils avaient après cirage. Des études ont rapporté que l'application des huiles essentielles combinées avec la cire pour le cirage des fruits, ralentit le taux de diffusion des huiles essentielles, ce qui laisse des concentrations élevées à la surface des fruits réduisant ainsi l'inoculum fongique pathogène, et la pourriture probable qui ne peut s'installer qu'après une longue période (Sanchez- Gonzalez et coll., 2011). Regnier et coll (2010) ont décrit que l'utilisation de l'huile essentielle de *Lippia scabrrin* dans la cire exerce un effet protecteur contre l'antracnose. Ce même traitement a montré une réduction de perte de poids dans les fruits d'agrumes (Du Plooy et coll., 2009).

Les résultats que nous avons obtenus confirment que l'application du NPP à l'étape de cirage, est une mesure capable de remplacer les fongicides chimiques pour améliorer l'efficacité de l'étape de cirage considérée comme étant un quatrième point critique. Ces résultats confirment aussi que l'application du NPP à l'étape du cirage est une solution efficace pour emballer les fruits avec une charge fongique minimale au moment de la mise en caisse. Par conséquent, l'application du NPP à l'étape de cirage est une mesure efficace pour la correction du cinquième point critique qui est la mise en caisse.

4. Suivi du taux de pourriture des clémentines de chaque sous-lot après Drencher et cirage

Afin de comparer l'efficacité du traitement des clémentines des deux fermes au NPP à l'étape de Drencher et à l'étape de cirage, avec l'efficacité du traitement aux fongicides chimiques ou avec l'association du NPP aux fongicides chimiques durant ces mêmes deux étapes, le test suivant à été réalisé :

Après la mise en caisse des trois sous-lots de chaque ferme, les clémentines de chaque sous-lot ont été réparties dans des palettes de 15 caisses. Chaque palette contient 5 caisses de 3 calibres différents (2,3 et4).

Deux palettes de chaque sous-lot ont été stockées à deux températures différentes pour pouvoir suivre l'évolution du taux de pourriture des clémentines :

- Une palette a été stockée à la température de 8°C (dans la chambre froide de la station).
- Une palette a été stockée à la température d'environ 25°C (température ambiante de la station).
- Les autres palettes ont été envoyées à l'export.

Les six palettes provenant de chaque ferme (2 traitées au NPP, 2 traités aux fongicides chimiques (FC) et 2 traités par l'association du NPP aux FC), ont été contrôlées une fois par

semaine, pendant quatre semaines. L'évolution du taux de pourriture des clémentines de chaque palette a été suivie.

Les figures 45 et 46 montrent l'évolution du pourcentage des fruits pourris dans les trois sous-lots de chacune des deux fermes (la ferme de Marrakech et la ferme de Gharb) en fonction de la température de stockage.

➤ **Stockage des fruits à la température ambiante de la station (25°C±3) :**

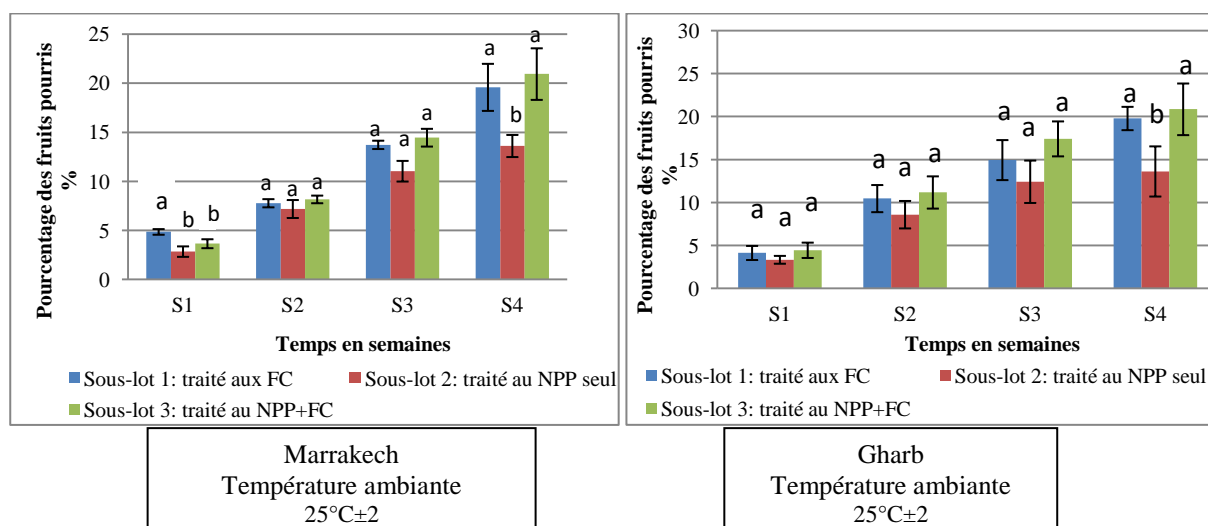


Figure 45 : Evolution du pourcentage cumulé des clémentines pourries dans les trois sous-lots des deux fermes pendant quatre semaines de stockage à 25°C

Une comparaison du pourcentage cumulé des clémentines pourries après différents traitements a été réalisée chaque semaine par le test de l'analyse de variance (ANOVA), en utilisant le test de comparaison least significant difference (LSD) à $P < 0.05$ (la différence significative ($p < 0.05$) entre les traitements les uns par rapport aux autres est indiquée par des lettres différentes sur les histogrammes).

Les résultats obtenus dans le cas des fruits de la région de Marrakech montrent, qu'après la première semaine de stockage à la température ambiante, le taux de pourriture dans le sous-lot1 traité aux fongicides chimiques (FC) après les étapes de Drencher et de cirage, est significativement plus élevé par rapport aux deux autres sous-lots. Ceci permet de penser que le traitement des fruits au NPP à l'étape de Drencher et à l'étape de cirage, est plus efficace que les fongicides chimiques. La combinaison de NPP avec les FC n'apporte pas de bénéfice supplémentaire à l'effet du NPP seul.

Après la deuxième et la troisième semaine, aucune différence significative n'a été notée dans le taux de pourriture des fruits dans les trois sous-lots. Ce résultat permet de penser que le NPP et les fongicides chimiques ont la même efficacité après leur application à l'étape de

Drencher et à l'étape de cirage. L'association du NPP aux fongicides chimiques n'apporte pas d'effet supplémentaire à l'effet du NPP seul et des fongicides chimiques seuls.

Après la quatrième semaine de stockage des fruits de la région de Marrakech à la température ambiante, les résultats obtenus ne montrent pas de différence significative entre le sous-lot traité aux FC et le sous-lot traité avec l'association du NPP aux FC concernant le taux de pourriture des fruits. Ce taux de pourriture est significativement plus élevé que celui du sous-lot traité au NPP. Ceci confirme que le traitement des fruits à l'étape de Drencher et à l'étape de cirage au NPP seul, est plus efficace en comparaison avec les fongicides chimiques. Ces résultats confirment aussi que la combinaison de NPP avec les FC n'apporte pas d'effet bénéfique à celui du NPP seul.

Pour les fruits de la région de Gharb, les résultats obtenus montrent que durant les trois premières semaines de stockage des fruits à la température ambiante de la station, aucune différence significative n'a été enregistrée dans le taux de pourriture entre les fruits des trois sous-lots. Cependant, après la quatrième semaine de stockage, le taux de pourriture des fruits est significativement moins important dans le sous-lot traité au NPP par rapport aux deux autres sous-lots. Ces résultats confirment que la NPP est plus efficace en comparaison avec les fongicides chimiques et que l'association du NPP avec les fongicides chimiques n'a aucun effet supplémentaire ou additif à celui du NPP seul.

➤ **Stockage des fruits au frigo (8°C±2) :**

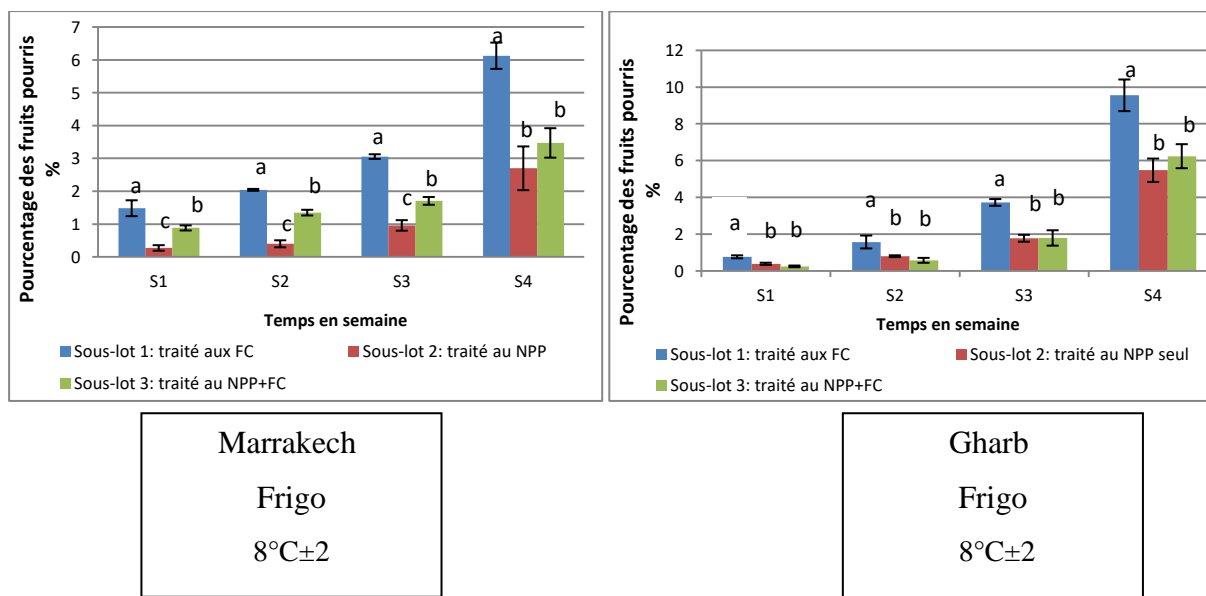


Figure 46 : Evolution du pourcentage cumulé des clémentines pourries dans les trois sous-lots des deux fermes pendant quatre semaines de stockage à 8°C

Une comparaison du pourcentage cumulé des clémentines pourries après les différents traitements a été réalisée chaque semaine par le test de l'analyse de variance (ANOVA), en utilisant le test de comparaison least significant difference (LSD) à $P < 0.05$ (la différence significative ($p < 0.05$) entre les traitements les uns par rapport aux autres est indiquée par des lettres différentes sur les histogrammes).

Les résultats présentés sur **la figure 46** indiquent qu'après la première, la deuxième, et la troisième semaines de stockage des fruits de la région de Marrakech au frigo, le sous-lot traité aux fongicides chimiques (au niveau de l'étape de Drencher et de l'étape de cirage), montre un taux de pourriture de fruits significativement plus important par rapport aux autres sous-lots, avec un pourcentage variant entre 1.5 et 3% des fruits pourris, suivi par le sous-lot traité avec l'association du NPP aux FC, avec un pourcentage qui varie entre 0.9 et 1.2% des fruits pourris. Le sous-lot traité au NPP seul présente un taux de pourriture de fruits significativement plus faible, avec un pourcentage qui varie entre 0.27 et 0.9%.

Après la quatrième semaine de stockage des fruits au frigo, aucune différence significative n'a été détectée dans le taux de pourriture de fruits entre le sous-lot traité au NPP et le sous-lot traité avec l'association du NPP aux FC. Ce taux de pourriture reste significativement plus faible en comparaison avec la pourriture de fruits du sous-lot traité aux fongicides chimiques. Ces résultats confirment que le traitement des fruits à l'étape de Drencher et à l'étape du cirage au NPP seul, est plus efficace en comparaison avec les fongicides chimiques. Ces résultats confirment aussi que la combinaison du NPP aux FC n'apporte rien de plus à l'effet du NPP seul.

Concernant les fruits de la région du Gharb les résultats obtenus montrent qu'après les quatre semaines de stockage des fruits au frigo (8°C), aucune différence significative n'a été notée dans le taux de pourriture entre le sous-lot traité au NPP seul et celui traité avec l'association du NPP aux FC. Ce pourcentage qui varie entre 0.25 et 6.24% reste significativement plus faible par rapport au taux de pourriture dans le sous-lot traité aux fongicides chimiques seuls (entre 0.77 et 9.5%). Ces résultats confirment que l'application du NPP à l'étape de Drencher et du cirage reste plus efficace contre la pourriture des clémentines de la variété « *Sidi aissa* » en comparaison avec l'application des fongicides chimiques. Ces résultats confirment aussi que l'association du NPP aux fongicides chimiques n'apporte pas d'effet supplémentaire à l'effet du NPP seul.

L'ensemble des ces résultats nous permet donc de conclure que l'application du NPP à l'étape de Drencher et à l'étape de cirage donne un taux de pourriture significativement plus faible que celui des fongicides chimiques. L'association du NPP aux fongicides chimiques dans les

meilleurs cas, n'apporte pas de bénéfice supplémentaire à l'effet du NPP seul, et dans certaines cas, cette association inhibe l'effet du NPP seul.

Les figures 45 et 46 montrent également la différence de la charge fongique entre les fruits des deux fermes. Ceci montre que le phénomène de pourriture est lié à la nature des fruits en pré-récolte. Cette nature est en relation avec la situation géographique de la région et les conditions climatiques, la conduite de la culture en matière d'apport d'engrais et d'apports d'eau et de nutriments, le degré de maturité et les conditions de stockage et de transport vers la station d'emballage (De Jager et coll., 2001; Taylor et coll., 2014 ; Sivakumar et Bautista-Baños, 2014). Il est intéressant de noter aussi la différence entre les résultats obtenus à la température ambiante et ceux obtenus à la température de 8°C. En effet, la température ambiante de la station est favorable au développement des germes pathogènes provoquant ainsi la pourriture des fruits. Par contre, la température du frigo (8°C) ralentit le développement fongique. Eckert et Eaks (1989) ont rapporté que les conditions de réfrigération durant le stockage est une procédure importante pour la prévention des maladies des agrumes. Ceci montre l'importance de la chaîne de froid au cours du transport vers les pays lointains. Effectivement les transbordements successifs provoquent la rupture de la chaîne de froid, ce qui favorise le développement des champignons et la pourriture des fruits (Foulquier, 2016).

Une demande de brevet d'invention déposée en 2016 sous le numéro WO 2016051403 (A1), décrit une invention à base d'huiles essentielles mise au point pour améliorer la conservation des fruits contre la pourriture au cours du stockage grâce à son activité insecticide, fongicide, fongistatique, bactéricide et bactériostatique. Cette invention consiste à couvrir les palettes des fruits d'un tissu imbibé avec l'huile essentielle de *Tea tree* (arbre à thé) qui permet leur conservation pendant une longue durée.

5. Evaluation de l'efficacité du traitement de l'air ambiant de la station d'emballage par pulvérisation du NPP

Dans le contexte de la mise au point des mesures correctives, les responsables de la station « Delassus » ont adopté l'installation de buses de nébulisation au niveau des plafonds des différentes zones de la station, pour faire un traitement décontaminant de l'air à base de NPP à la dose de 10kg/tonne d'eau. La pulvérisation dans les différentes zones se fait deux fois par jour : à midi (12 h 30) et à la fin de l'activité journalière (18h 30). Cette nébulisation crée un nuage de fines gouttelettes d'eau chargées en NPP pouvant entrer en contact avec les champignons de l'air. Ces gouttelettes se déposent ensuite sur les surfaces de la station pour exercer l'action antifongique du NPP sur les microbes de ces surfaces.

Afin d'évaluer l'efficacité de ce traitement, nous avons réalisé des prélèvements de la charge fongique de l'air ambiant des différentes zones de la station avant et après le traitement. Les résultats obtenus sont présentés sur **la figure 47**:

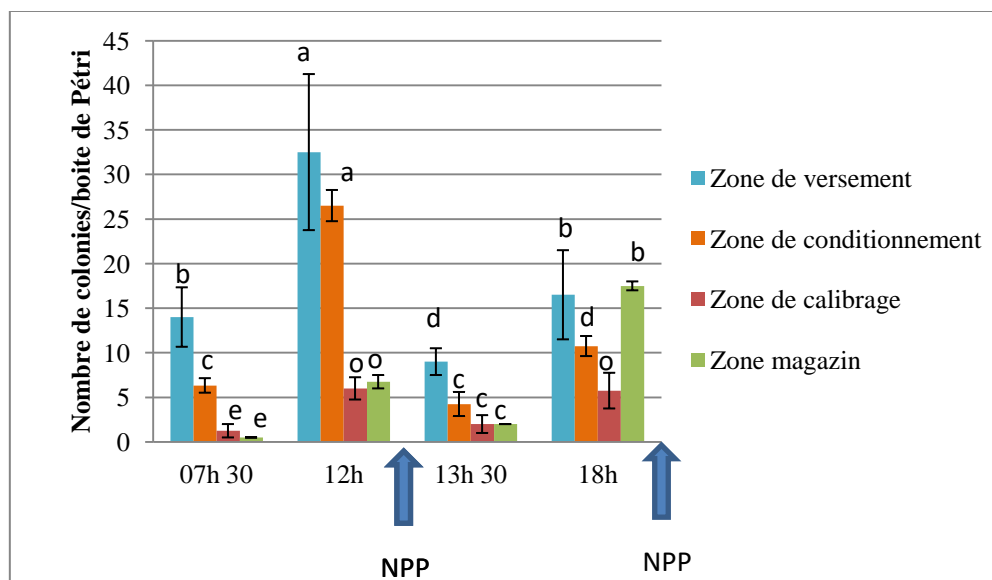


Figure 47 : Evolution de la charge fongique de l'air ambiant de différentes zones de la station d'emballage avant et après traitement au NPP. Les valeurs présentées sont les moyennes des prélèvements de 4 jours

La différence significative ($p < 0.05$) entre les moyennes des quatre prélèvements de chaque zone est indiquée par des lettres différentes sur les histogrammes.

Les résultats représentés sur **la figure 47** montrent que la charge fongique de l'air des différentes zones était faible en début de journée, ceci grâce au traitement de l'air par la pulvérisation du NPP effectuée à la fin de la journée précédente. Pendant la journée, cette charge augmente significativement ($p < 0.05$) jusqu'à midi où une pulvérisation du NPP provoque une diminution significative de cette charge. De l'après-midi jusqu'à la fin de la journée, une augmentation significative de la charge fongique de l'air ambiant des différentes zones a été notée. Cette charge sera traitée par une deuxième pulvérisation du NPP en fin de journée (18h30). Les résultats de cette deuxième nébulisation sont enregistrés le lendemain matin. Ces résultats montrent que le traitement en fin de journée (18h 30) provoque une diminution significative de la charge fongique de l'air ambiant. Cette diminution a été enregistrée au niveau des zones de mise en caisse (conditionnement), de calibrage et au niveau du magasin. Au niveau de la zone de versement, la charge a diminué d'une façon non significative ($p < 0.05$). Ceci s'explique par la présence constante de fruits non traités dans

cette zone. Les fruits non traités constituent une source de contamination constante de l'air ambiant. Ceci étant dit, la charge enregistrée dans cette zone le matin, est significativement inférieure à la charge enregistrée dans cette même zone à midi.

Mercier et Smilanick (2005) ont rapporté que la moisissure *Muscodor albus* est capable de protéger les agrumes contre les maladies post-récolte. Ce champignon a été utilisé comme un biofumigant dans l'air ambiant des différentes zones des stations d'emballage des agrumes. En effet, *Muscodor albus* produit des composés volatiles à effet antimicrobien qui permettent d'inhiber les bactéries et les champignons pathogènes (Strobel et coll., 2001). D'autres études ont montré que plusieurs huiles essentielles et d'autres composés antifongiques d'origine végétale peuvent être utilisés comme des biofumigants (Palou et coll., 2008). Sivakumar et Bautista-Baños (2014) ont rapporté que l'activité antimicrobienne de la phase vapeur des huiles essentielles encourage leur utilisation comme des biofumigants. Ces études sont restées limitées à l'échelle du laboratoire, elles n'ont pas atteint l'échelle industrielle, peut être à cause de la complexité de l'application, ou du coût élevé (Palza et coll., 2004).

Le NPP a réduit d'une façon significative la charge fongique de l'air ambiant des différentes zones de la station d'emballage après sa pulvérisation à une concentration de 10kg/tonne d'eau. Ces résultats confirment que la pulvérisation du NPP est une mesure efficace pour réduire la charge fongique de l'air ambiant des différentes zones de la station d'emballage. La réduction de la charge fongique de l'air ambiant de ces zones permet de manipuler et d'emballer les fruits d'agrumes dans des conditions plus propres. Ceci confirme que la pulvérisation du NPP est une autre mesure corrective pour le contrôle de l'étape de la mise en caisse considérée comme étant un cinquième point critique.

V. Evaluation de la charge fongique des clémentines de la variété « Sidi aissa » après la mise au point des cinq mesures correctives

Sur la base des résultats obtenus après la mise au point de chaque mesure corrective, les responsables de la station d'emballage « Delassus Maroc » ont décidé d'appliquer toutes ces mesures depuis le champ (trempage des fruits au moment de la cueillette), ensuite dans la station d'emballage en appliquant le NPP à l'étape de Drencher et à l'étape de cirage + traitement du premier tunnel de séchage et traitement de l'air ambiant de la station par nébulisation du NPP.

Après l'application des cinq mesures correctives dans le champ et dans la station d'emballage « Delassus », il a fallu faire un diagnostic de la charge fongique des clémentines de la variété « Sidi aissa » durant les différentes étapes (depuis la cueillette jusqu'à l'emballage), afin d'évaluer l'efficacité globale des cinq mesures mises au point. Pour cela, un lot de 15 tonnes

de fruits de la variété « *Sidi aissa* » de la région de Marrakech ont été trempés au moment de leur cueillette (dans le champ) dans des bassines contenant une solution de NPP à la dose de 1,5 kg/tonne d'eau, pendant quelques minutes. Ensuite, les fruits ont été mis dans des grandes caisses et chargés sur la plateforme d'un camion pour être transportés vers la station d'emballage. Le transport s'est déroulé dans les conditions environnementales ambiantes. Vingt-quatre heures après la cueillette, les fruits sont arrivés à la station d'emballage. Directement après leur arrivée à la station d'emballage, les fruits ont été traités à l'étape de Drencher par une bouillie de NPP à la concentration de 3Kg/tonne d'eau. Après l'étape de Drencher, les fruits ont été versés dans la chaîne de convoyage pour le triage manuel des fruits avariés. A l'étape de lavage et brossage, les fruits ont été lavés à l'eau chlorée. Ensuite, ils ont été séchés dans le premier tunnel de séchage traité préalablement par nébulisation du NPP à la concentration de 3kg/tonne. A l'étape de cirage, les fruits ont été cirés en rajoutant le NPP à la concentration de 5Kg/tonne de cire. Après le cirage, les fruits sont séchés en tunnel avant d'être acheminés vers une ligne de calibrage automatisée. Les fruits sont ensuite manuellement rangés dans des caisses en fonction de leurs calibres.

Dans la station d'emballage, dix fruits sont prélevés aseptiquement au hasard à partir de chaque étape de traitement (depuis la réception jusqu'à la mise en caisse), puis transférés vers le laboratoire de la station d'emballage pour la détermination de la charge fongique à leur surface. Les résultats exprimés en scores, sont présentés sur la **figure 48**

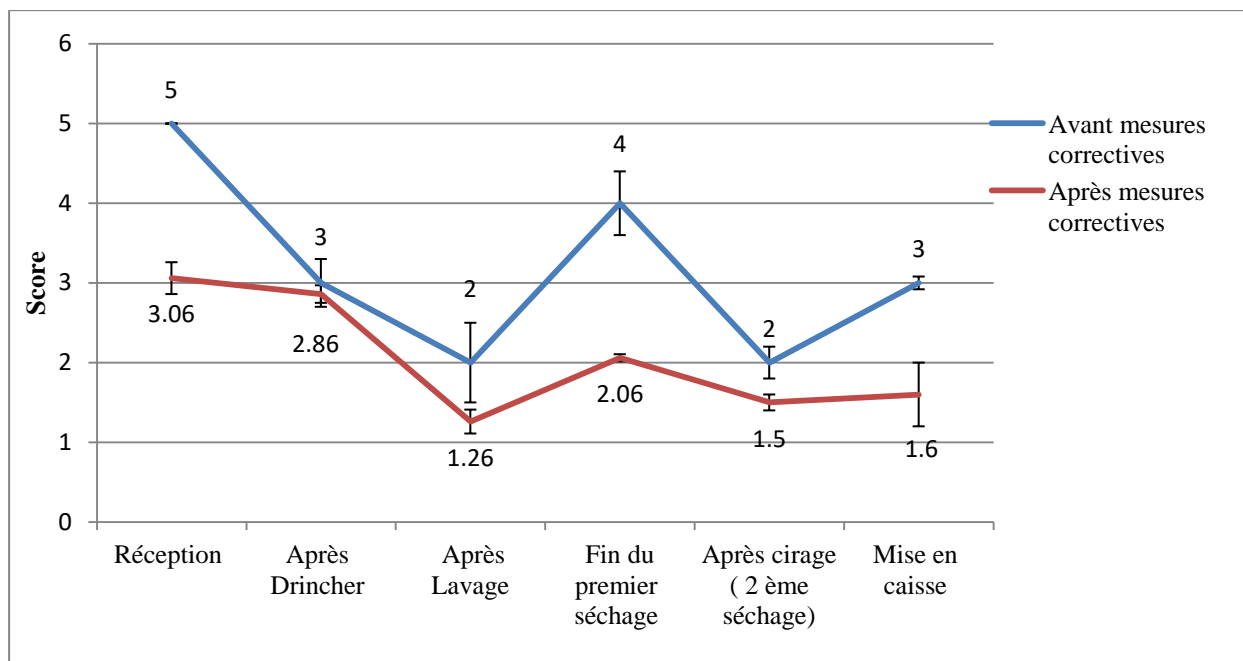


Figure 48: Evaluation de la charge fongique des clémentines de la variété « Sidi aissa » durant leur processus de conditionnement avant et après l'application des cinq mesures correctives utilisant le NPP

Les résultats obtenus montrent que les fruits arrivent à la station d'emballage avec une charge fongique plus faible que celle avec laquelle ils arrivaient quand ils n'ont pas subi la mesure de trempage dans le NPP au moment de la cueillette. Ceci montre que le trempage des fruits a permis de réduire la charge fongique des fruits d'un score de 5 à un score de 3.06 . Cette charge a été réduite encore plus après Drencher au NPP à la concentration de 3kg/tonne. Ceci montre l'efficacité de l'application du NPP à l'étape de Drencher sur la réduction de la charge fongique à la surface des fruits. Cette charge est passée d'un score 3 lorsque les fruits étaient traités au Drencher avec des fongicides chimiques à un score 2,86. Il est évident que l'efficacité observée à ce niveau est le résultat de l'addition de l'effet du trempage et de celui du Drencher, car la charge fongique initiale des fruits à l'entrée au Drencher était déjà plus faible grâce au trempage.

Au moment où les cinq mesures correctives ont été appliquées, les fruits étaient déjà colorés et n'avait donc pas besoin de l'étape de Deverdissage. C'est pour cette raison que **la figure 48** ne comporte pas cette étape.

Après lavage, les fruits avaient une charge fongique plus faible que celle qu'ils avaient après l'étape de Drencher. Ceci confirme l'efficacité du lavage et du brossage dans la réduction de la charge fongique à la surface des fruits. Cette faible charge fongique augmente un peu à la

sortie du premier tunnel de séchage traité préalablement avec nébulisation du NPP. Cette faible augmentation est beaucoup plus réduite que celle observée avant l'application des mesures correctives en raison de l'addition des effets du NPP au niveau des étapes précédentes (trempage et Drencher) qui fait baisser la charge fongique des fruits. Concernant le traitement préalable du tunnel de séchage au NPP et son impact sur l'augmentation de la charge fongique des fruits, on peut dire que, même s'il y a une augmentation, celle-ci est moins sévère que celle observée avant.

La **figure 48** montrent aussi qu'après l'application des mesures correctives, la charge fongique des fruits reste à un niveau très bas et qu'aucune augmentation n'a été observée entre le cirage et la mise en caisse, alors que cette charge a fortement augmenté entre ces deux étapes avant l'application du NPP dans la cire et dans le traitement de l'air ambiant. Ces résultats confirment alors l'efficacité des cinq mesures correctives appliquées depuis le moment de la cueillette jusqu'à la station d'emballage afin de réduire la charge fongique des agrumes, pour que ces fruits arrivent au consommateur en bon état et sans pourriture.

Conclusion

Le diagnostic de la charge fongique des fruits d'agrumes depuis la cueillette dans le champ jusqu'à la mise en caisse dans la station d'emballage a permis de détecter les différents points critiques et les sources de contamination. L'application du NPP est une procédure efficace pour corriger ces points critiques. Le trempage des fruits tout de suite après la cueillette dans la solution du NPP à la concentration de 1kg/tonne, est une technique efficace pour minimiser la charge fongique initiale des fruits. L'application du NPP à l'étape du Drencher à la concentration de 3kg/tonne s'est révélée une bonne alternative naturelle aux fongicides chimiques et efficace pour la réduction de la charge fongique à la surface des fruits d'agrumes. La nébulisation du NPP à l'intérieur du tunnel de séchage est un traitement efficace pour la décontamination de ce tunnel. Aussi, l'application du NPP à l'étape de cirage s'est révélée une alternative naturelle à l'Imazalil, efficace pour la conservation des fruits contre la pourriture au cours du stockage et au cours du transport. Enfin, la pulvérisation du NPP dans l'air ambiant des différentes zones de la station d'emballage a montré une réduction significative de la charge fongique, permettant ainsi de manipuler les fruits dans des conditions plus propres. Ces résultats confirment que le NPP peut être une alternative efficace et prometteuse pour remplacer les fongicides chimiques dans les stations de conditionnement des agrumes.

Conclusion générale et perspectives

Cette étude a commencé depuis le début par une collaboration étroite entre notre laboratoire de recherche et la société industrielle Delassus.

Nous avons commencé notre travail par une étude *in vitro* de l'activité antifongique de deux huiles essentielles et leurs composés majoritaires sur *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* et *Geotrichum candidum*. Cette étude nous a permis de sélectionner le thymol comme étant le meilleur principe actif.

L'efficacité de thymol sur fruit a été démontrée en utilisant un modèle expérimental reproductible et fiable que nous avons développé. Sur la base des résultats obtenus, nous avons mis au point une composition innovante dont nous avons comparé l'efficacité avec celle des fongicides chimiques. Cette composition innovante nommée NPP a montré *in vitro* et sur fruits une forte activité antifongique contre des isolats de *P. italicum*, *P. digitatum* et *G. candidum* résistants aux fongicides chimiques. L'association de NPP avec l'Imazalil et le Thiabendazole a amélioré leur activité antifongique. Cependant, l'association du NPP avec l'OPP a diminué son activité antifongique. Le NPP a montré également une inhibition totale de la germination et un effet sporicide sur les spores des trois isolats. La collaboration avec la société Delassus nous a permis de réaliser un diagnostic de la charge fongique des fruits d'agrumes depuis la cueillette dans le champ jusqu'à la mise en caisse dans la station d'emballage pour détecter les différents points critiques et les sources de contamination et de tester l'application de cette composition innovante pour corriger ces points critiques. La solution innovante s'est alors avérée efficace aussi bien pour le traitement des fruits d'agrumes, que pour traiter l'air de la station d'emballage et le matériel. Cette solution innovante qui a fait l'objet d'un brevet d'invention et d'une demande d'homologation par l'ONSSA. Elle représente une alternative naturelle issue de la recherche marocaine pour remplacer les produits chimiques qui sont importés et qui font l'objet de projets d'interdiction en raison de leur toxicité et parfois leur manque d'efficacité.

Cette étude nécessite d'être complétée par un certain nombre de travaux. Ainsi, on se propose de :

- ✓ Trouver de nouvelles applications pour cette solution innovante en post-récolte pour les maladies post-récolte des pommes, de tomates et des rosacés.
- ✓ Déterminer l'activité de cette solution innovante sur d'autres germes et étudier ses mécanismes d'action en relation avec chaque germe sur lequel elle agit.
- ✓ Étudier les types d'interactions entre le NPP et les fongicides chimiques.

- ✓ Développer une solution innovante pour la désinfection des mains du personnel dans les stations de conditionnements des agrumes

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdelfattah A., WisniFewski M., Li Destri Nicosia M.G., Cacciola S.O. and Schena L.** (2016) Metagenomic analysis of fungal diversity on strawberry plants and the effect of management practices on the fungal community structure of aerial organs. *PLoS ONE* 11, e0160470. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160470>.
- Achahbar S.** (2011) Etude de l'activité ookysticides des huiles essentielles et de leurs composés majoitaires. Application *in vivo* sur un modèle expérimental de coccidiose sévère chez le poulet.
- Adaskaveg J. E., Kanetis L., Soto-Estrada A. and Förster H.** (2004) A new era of postharvest decay control in citrus with the simultaneous introduction of three new 'reduced-risk' fungicides. In *Proc Int Soc Citriculture* .3 : 999-1004.
- AFNOR: Association Française de Normalisation** (1986) Recueil de normes Françaises "Huiles essentielles", Paris. AFNOR NF T 75-006.
- Aharoni Y., Copel A., Davidson H. and Barkai-Golan R.** (1992) Fungicide application in water and in wax for decay control in 'Galia' melons. *New Zealand journal of crop and horticultural science*.20: 177-179.
- Ailes E. C., Leon J. S., Jaykus L. A., Johnston L. M., Clayton H. A., Blanding S., et al.** (2008) Microbial concentrations on fresh produce are affected by postharvest processing, importation, and season. *Journal of Food Protection*. 71: 2389-2397.
- Ameziane N., Boubaker H., Boudyach H., Msanda F., Jilal A., Ait ben oumar A.** (2007) Antifungal activity of Moroccan plants against citrus fruit pathogens. *Agronomy for sustainable development*. 27: 273-277.
- Amitava D. and Kimberly K.** (2014) Chapter 15 - Antioxidant Vitamins and Minerals. *Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements*. p 277-294.
- Andrews J.H. and Harris R.F.** (2000) The ecology and biogeography of microorganisms of plant surfaces. *Annu Rev Phytopathol*. 38: 145–180.
- Arras G., De Cicco V., Arru S. and Lima G.** (1998) Biocontrol by yeasts of blue mould of citrus fruits and the mode of action of an isolate of *Pichia guilliermondii*. *J. Horticultural Science and Biotechnology*. 73: 413-418.
- Askarne L., Talibi I., Boubaker H., Serghini M. A., Boudyach E. H., Ait Ben Aoumar A.** (2011) Effects of Organic Acids and Salts on the Development of *Penicillium italicum*, the Causal Agent of Citrus Blue Mold. *Plant Pathology Journal*. 10 : 99-107.
- Badawy F.M.I., Sallam M.A.N., Ibrahim A., Asran M.** (2011) Efficacy of Some Essential Oils on Controlling Green Mold of Orange and their Effects on Postharvest Quality Parameters. *Plant Pathology Journal*. 10: 168-174.

- Bagamboula C.F., Uyttendaele M. and Debevere J.** (2004) Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene toward *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food. Microbiol.* 21: 33-42.
- Bancroft M.N., Gardner P.D., Eckert J.W. and Baritelle J.L.** (1984) Comparison of decay control strategies in California lemon packinghouses. *Plant disease.* 68: 24-28.
- Baraldi E., Mari M., Chierici E., Pondrelli M., Bertolini P. and Pratella G. C.** (2003) Studies on Thiabendazole resistance of *Penicillium expansum* of pears: pathogenic fitness and genetic characterization. *Plant Pathology.* 52: 362-370.
- Barkai-Golan R.** (2001). *Postharvest diseases of fruits and vegetables: development and control.* Elsevier, Amsterdam.
- Barmore C.R. and Brown G.E.** (1985) Influence of ethylene on increased susceptibility of orange to *Diplodia natalensis*. *Plant Dis.* 69: 228–230.
- Baudoin A. B. A. M. and Eckert J. W.** (1982) Factors influencing the susceptibility of lemons to infection by *Geotrichum candidum*. *Phytopathology.* 72: 1592-1597.
- Baudoin A. and Eckert J.** (1985) Influence of preformed characteristics of lemon peel on susceptibility to *Geotrichum candidum*. *Physiological plant pathology.* 26: 151-163.
- Nafussi B., Ben-Yehoshua S., Rodov V., Peretz J., Ozer B. K. and D'hallewin G.** (2001) Mode of action of hot-water dip in reducing decay of lemon fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 49: 107-113.
- Benediste A. and baches M.** (2002) Agrumes. *Ed. Ugen Ulmer*, PARIS, n° 132, 96 p.
- Bennis S., Chami F., Chami N., Bouchikhi T., and Remmal A.** (2004a) Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. *Lett. J. Appl. Microbiol.* 38: 454-458.
- Bennis S., Chami F., Chami N., Rayour K., Tantaoui-Elaraki A. and Remmal A.** (2004b) Eugenol induces damage of bacterial and fungal envelope. *Moroccan J. Biol.* 1: 33- 39.
- Ben-Yehoshua S., Shapiro B. and Moran R.** (1987) Individual seal-packaging enables the use of curing at high temperatures to reduce decay and heal injury of citrus fruits. *HortScience.* 22: 777-783.
- Besri M., Chataina N., Chetoufi B et Faraj M.** (1990) Contamination de quelques stations de conditionnement des agrumes par des spores de *Penicillium digitatum* et de *Penicillium italicum* sensibles et résistantes au thiabendazole. *Actes Inst. Agron.Vété.* 10 :19-22
- Beuchat L. R. and Brackett R. E.** (1990) Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on lettuce as influenced by shredding, chlorine treatment, modified atmosphere packaging and temperature. *J.Food Sci.* 55:755–870.

- Beuchat L. R.** (1995) Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *J. Food Prot.* 59:204-216.
- Bisht D., Pal A., Chanotiya C.S., Mishra D. and Pandey K.N.** (2011) Terpenoid composition and antifungal activity of three commercially important essential oils against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. *Nat. Prod. Res.* 25:1993-8.
- Boubaker H., Saadi B., Boudyach E. H. and Ait Ben Oumar A.** (2009) Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to Imazalil and Thiabendazole in Morocco. *Plant Pathology Journal.* 8:152-158.
- Boubaker H., Karim H., El Hamdaoui A., Msanda F., Leach D., Bombarda I., et al.** (2016) Chemical characterization and antifungal activities of four *Thymus* species essential oils against postharvest fungal pathogens of citrus. *Industrial Crops and Products.* 86: 95-101.
- Bouddine L., Louaste B., Achahbar S., Chami N., Chami F., and Remmal A.** (2012) Comparative study of the antifungal activity of some essential oils and their major phenolic components against *Aspergillus niger* using three different methods. *African Journal of Biotechnology.* 11:14083-14087.
- Brown G.E.** (1975) Anthracnose, a serious decay of degreened 'Robinson' tangerines. *Proc. Fla. State Hortic. Soc.* 88: 308–311.
- Brown G.E.** (1979) Biology and control of *Geotrichum candidum*, the cause of citrus sour rot. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society.* 92:186–189.
- Brown G.E.** (1984) Efficacy of citrus postharvest fungicides applied in water or resin solution water wax. *Plant Dis.* 68: 415–418.
- Brown G. E.** (1988) Efficacy of guazatine and iminoctadine for control of postharvest decays of oranges. *J. Plant disease.* 72: 906-908.
- Brown G. and Eckert J.** (1988) Sour rot. Compendium of citrus diseases. American Phytopathological Society, St. Paul. 37–38.
- Brown G.E. and Chambers M.** (1996) Evaluation of biological products for the control of postharvest diseases of Florida citrus. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society.* 109:278–282.
- Brown G. E. and Miller W. R.** (1999) Maintaining fruit health after harvest. *Citrus Health Management.* 175-188.
- Bull C., Wadsworth M., Sorensen K., Takemoto J., Austin R., Smilanick J.** (1998) Syringomycin E produced by biological control agents controls green mold on lemons. *Biological control.* 12: 89-95.

- Burt S.** (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods -a review. *Int. J. Food Microbiol.* **94**: 223-253
- Cabañas R., Abarca M.L., Bragulat M.R., Cabañas F.J.** (2009) Comparison of methods to detect resistance of *Penicillium expansum* to thiabendazole. *Applied Microbiology.* **48**: 241–246.
- Camele I., Altieri L., De Martino L., De Feo V., Mancini E., Rana G.L.** (2012) *In vitro* control of post-harvest fruit rot fungi by some plant essential oils components. *Int J Mol Sci.* **13**:2290-2300.
- Cañamás T.P., Viñas I., Usall J., Torres R., Anguera M., Teixidó N.** (2008). Control of postharvest diseases on citrus fruit by preharvest applications of biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2 : Part II. Effectiveness of different cell formulations. *Postharvest Biology and Technology.* **49**: 96-106.
- Castillo A., Mercado I., Lucia L. M., Martinez-Ruiz Y., De Leon J. P., Murano E. A. and Acuff G. R.** (2004) Salmonella contamination during production of cantaloupe: a binational study. *Journal of food protection.* **67**: 713-720.
- Castillo S., Pérez-Alfonso C.O., Martínez-Romero D., Guillén F.** (2014) The essential oils thymol and carvacrol applied in the packing lines avoid lemon spoilage and maintain quality during storage. *Food Control.* **35**: 132–136.
- Cerioni L., Sepulveda M., Rubio-Ames Z., Volentini S.I., Rodríguez-Montelongo L., Smilanick J.L., Ramallo J., Rapisarda V.A.** (2013) Control of lemon postharvest diseases by low-toxicity salts combined with hydrogen peroxide and heat. *Postharvest Biol. Technol.* **83**: 17–21.
- Chahboun B.** (1992) lutte contre les pourritures à *Penicillium spp* en post récolte des fruits d'agrumes dans le Souss. Mémoire de 3ème cycle agronomie. I.A.V. Hassan II. Campus d'Agadir. 92pp
- Chami F., Chami N., Bennis S., Trouillas J. and Remmal A.** (2004a) Evaluation of carvacrol and eugenol as prophylaxis and treatment of vaginal candidiasis in an immunosuppressed rat model. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**: 909-914.
- Chami F., Chami N., Bennis S., Bouchikhi T. and Remmal A.** (2005a) Oregano and clove essential oils induce surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae*, *Phytotherapy.* **19**: 405-8.
- Chami N., Chami F., Bennis S., Trouillas J. and Remmal A.** (2004b) Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *Braz. J. Infect. Dis.* **8**:217-26.

- Chami N., Bennis S., Chami F., Aboussekhra A. and Remmal A.** (2005b) Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol *in vitro* and *in vivo*. *Oral. Microbiol. Immunol.* 20: 106-111.
- Craig W. J.** (1997) Phytochemicals: guardians of our health. *Journal of the American Dietetic Association.* 97: 199–204.
- Cunningham N. M. and Taverner P. D.** (2007) Efficacy of integrated postharvest treatments against mixed inoculations of *penicillium digitatum* and *geotrichum citri-aurantii* in 'leng' navel oranges (*Citrus sinensis*). *New Zealand journal of crop and horticultural science.* 35: 187-192.
- D'Aquino S., Fadda A., Barberis A., Palma A., Angioni A., Schirra M.** (2013) Combined effects of potassium sorbate, hot water and Thiabendazole against green mould of citrus fruit and residue levels. *Food Chem.* 141:858–864.
- Dauchet L., Ferrieres J., Arveiler D., Yarnell J. W., Gey F., Ducimetiere P., et al.** (2004) Frequency of fruit and vegetable consumption and coronary heart disease in France and Northern Ireland: the PRIME study. *British journal of nutrition.* 92: 963-972.
- De Jager E.S., Wehner F.C. and Korsten L.** (2001) Microbial ecology of the mango phylloplane. *Microbial Ecol.* 42 : 201–207.
- Delgado R.A., Pérez G.M., Díaz L.E.** (1997) Comportamiento de *Penicillium digitatum*, *P. italicum* y *P. ulaiense* en postcosecha de citrus en Uruguay. IX Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Resumen.
- Deliopoulos T., Kettlewell P.S., Hare M.C.** (2010) Fungal disease suppression by inorganic salts : A review. *J. Crop Protection.* 29: 1059-1075.
- Département de l'Agriculture des Etats Unis :** Foreign Agricultural Service. Global Market Analysis USDA. 2 July 2020. Disponible sur <https://downloads.usda.library.cornell.edu/usdaesmis/files/w66343603/00000g55g/kp78h0193/citrus.pdf>
- De Roever C.** (1998) Microbial safety evaluations and recommendations on fresh produce. *Food Control.* 9: 321–347.
- Dewa N.S., Kei A. and Hisashi I.** (1997) Effects of volatile compounds on arthrospore germination and mycelia growth of *Geotrichum candidum* citrus race. *Mycoscience.* 38: 31–35.
- Dodd M., Cronje P., Taylor M., Huysamer M., Kruger F., Lotz E. and Van der Merwe K.** (2010) A review of the postharvest handling of fruits in South Africa over the past twenty five years. *South African Journal of Plant and Soil.* 27 :97–116.

- Domsch K.H., Gams N., Anderson T.H.** (1980) Compendium of soil fungi. Academic Press. London. 859 p.
- Dore A., Molinu M.G., Venditti T., D'Hallewin G.** (2010) Sodium bicarbonate induces crystalline wax generation, activates host-resistance, and increases Imazalil level in rind wounds of oranges, improving the control of green mold during storage. *J. Agric. Food Chem.* 58: 7297–7304.
- Droby S., Cohen L., Daus A., Weiss B., Horev B., Chalutz E., Katz H., Keren-Tzur M., Shachnai A.** (1998) Commercial testing of Aspire : a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. *Biological control.* 12: 97-101.
- Duffy E. A., Lucia L. M., Kells J. M., Castillo A., Pillai S. D. and Acuff G. R.** (2005) Concentrations of Escherichia coli and genetic diversity and antibiotic resistance profiling of Salmonella isolated from irrigation water, packing shed equipment, and fresh produce in Texas. *Journal of food protection.* 68: 70-79.
- Du Plooy W., Regnier T., Combrinck S.** (2009) Essential oil amended coatings as alternatives to synthetic fungicides in citrus postharvest management. *Postharvest Biol. Technol.* 53: 117–122.
- Eckert J. W.** (1959) Lemon sour rot. *Calif. Citrograph.* 45:30-31, 35-36.
- Eckert J. W. and Brown G. E.** (1986) Evaluation of postharvest treatments for citrus fruits. Methods for Evaluating Pesticides for Control of Plant Pathogens. K. D. Hickey, ed. *American Phytopathological Society*, St. Paul, MN. 92-97
- Eckert J.W.** (1987) *Penicillium digitatum* biotypes with reduced sensitivity to Imazalil. *Phytopathology.* 77: 1728
- Eckert J. W. and Eaks I. L.** (1989) Postharvest disorders and diseases of citrus fruits. *The citrus industry.* 179-260.
- Eckert J.W.** (1990) Recent development in the chemical control of postharvest diseases. *Acta Horticulturae.* 269:477–494.
- Eckert J. W., Sievert J. R. and Ratnayake M.** (1994) Reduction of Imazalil effectiveness against citrus green mold in California packinghouses by resistant biotypes of *Penicillium digitatum*. *Plant Dis.* 78:971-974.
- EL-Affas Aziza.** (2003, 07 octobre) Le commerce mondial des agrumes dominé par les pays du Nord. L'Economiste. Edition N°:1577. <http://mobile.leconomiste.com/article/le-commerce-mondial-des-agrumes-domine-par-les-pays-du-nord>
- Elkhamass M., Oulahcen B., Lekchiri A., Sebbata A. and Charhabaili Y.** (1994) Stratégie de lutte contre les maladies de post-récolte des fruits d'agrumes. *Postharvest Pathology and*

technology for Horticultural Commodities: Recent advances. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II. Agadir. Maroc. 388-398.

El-Mougy N., El-Gamal N., Abd-El-Kareem F. (2008) Use of organic acids and salts to control postharvest diseases of lemon fruits in Egypt. *Archives of Phytopathology and Plant Protection.* 41: 467-476.

Engelhart M.J., Geerlings M.I., Ruitenbergh A., et al. (2002) Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. *JAMA.* 287: 3223–9

Erasmus A., Lennox C.L., Jordaan H., Smilanick J.L., Lesar K., Fourie P.H. (2011) Imazalil residue loading and green mould control in citrus packhouses. *Postharvest Biol. Technol.* 62: 193–203.

Erasmus A., Lennox C.L., Smilanick J.J., Lesar K. and Fourie P.H. (2013) Imazalil residue loading and green mould control on citrus fruit as affected by formulation, solution pH and exposure time in aqueous dip treatments. *Postharvest Biology and Technology.* 77: 43–49.

Erasmus A., Lennox C. L., Korsten L., Lesar K. and Fourie P. H. (2015) Imazalil resistance in *Penicillium digitatum* and *P. italicum* causing citrus postharvest green and blue mould: Impact and options. *Postharvest Biology and Technology.* 107: 66-76.

Fan F., Tao N., Jia L., He X. (2014) Use of citral incorporated in postharvest wax of citrus fruit as a botanical fungicide against *Penicillium digitatum*. *Postharvest Biol. Technol.* 90: 52–55.

Fatemi S., Jafarpour M., Eghbaisaied S., Rezapour A., Borji H. (2011) Effect of essential oils of *Thymus vulgaris* and *Mentha piperita* on the control of green mould and postharvest quality of *Citrus sinensis* cv. Valencia. *African Journal of Biotechnology.* 10: 14932–14936.

Fédération Interprofessionnelle Marocaine des Agrumes : Maroc Citrus. Statistiques 2020. Disponible sur <http://maroc-citrus.com/statistiques-2/>.

Fernandez-Cruz M.L., Mansilla M.L., Tadeo J.L. (2010) Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. *J Adv Res.* 1:113-122.

Foulquier E. (2016) Transport maritime sous régime de froid, mondialisation des circulations des marchandises périssables. In : « Dossier commerce agricole mondial : géographie du transport maritime et fluvial ». *Le Demeter.* 22 : 259-279.

Gao X., Cassidy A., Schwarzschild M.A., et al. (2012) Habitual intake of dietary flavonoids and risk of Parkinson disease. *Neurology* 78: 1138–45.

- Garcia L., Henderson J., Fabri M. and Oke M.** (2006) Potential sources of microbial contamination in unpasteurized apple cider. *Journal of Food Protection*. 69: 137–144.
- Gardner P.D., Eckert J.W., Baritelle J.L. and Bancroft M.N.** (1986) Management strategies for control of *Penicillium* decay in lemon packinghouses : economic benefits. *Crop Protection*. 5:26–32.
- Gatto M.A., Ippolito A., Linsalata V., Cascarano N.A., Nigro F., Vanadia S., Di Venere D.** (2011) Activity of extracts from wild edible herbs against postharvest fungal diseases of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*. 61: 72-82.
- Gennaro A. R.** (1990) Remington's pharmaceutical sciences. 18e Ed. Mack Publishing Company. *Easton, Pennsylvania*. 18042: 1680-1681.
- Gezundhait Y. and Pelah A.** (07/04/2016) non-woven fabric containing microencapsulated essential oils for preservation of cropS. Brevet WO2016051403 (A1).
- Giweli A., Džamić A.M., Soković M., Ristić M.S. and Marin P.D.**(2012) Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils of *Satureja thymbra* Growing Wild in Libya.*Molecules*. 17: 4836-4850.
- Gomba A., Chidamba L. and Korsten L.** (2017) Effect of postharvest practices including degreening on citrus carpoplane microbial biomes. *Journal of applied microbiology*. 122: 1057-1070.
- Gorinstein S., Martin-Belloso O., Park Y.S., Haruenkit R., Lojek A., Cíz M., Caspi A., Libman I. and Trakhtenberg S.** (2001) Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Journal Food chemistry*. 74: 309-315.
- Gupta S. and Dikshit A.K.** (2010) Biopesticides: an eco-friendly approach for pest control. *J. Biopesticides*. 3: 186–188.
- Hall D. J. and Bice J. R.** (1977) Packinghouse strategies for the control of fungicide resistant molds [Citrus decay]. In *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*.
- Hall D.J., Bice J.R., Lewis P.J.** (1978) Fungicide combinations as replacement for biphenyl on citrus. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 91: 159–161.
- Hamamoto H., Hasegawa K., Nakaune R., Lee Y. J., Makizumi Y., Akutsu K. and Hibi T.** (2000) Tandem Repeat of a Transcriptional Enhancer Upstream of the Sterol 14 α -Demethylase Gene (CYP51) in *Penicillium digitatum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 3421-3426.

- Hao W., Zhong G., Hu M., Luo J., Weng Q. and Rizwan-ul-Haq M.** (2010) Control of citrus postharvest green and blue mold and sour rot by tea saponin combined with Imazalil and prochloraz. *Postharvest Biology and Technology*. 56: 39-43.
- Harding P.R.** (1962) Differential sensitivity to sodium orthophenylphenate by biphenyl-sensitive and biphenyl-resistant strains of *Penicillium digitatum*. *Plant Dis. Rep.* 46: 100–104.
- Harding P. R.** (1972) Differential sensitivity to Thiabendazole by strains of *penicillium-italicum* and *penicillium-digitatum*. *Plant Disease Reporter*. 56: 256.
- Hatimi S., Boudouma M., Bichichi M., Chaib N. and Idrissi N.G.** (2001) Evaluation *in vitro* antileishmanial activity of *Artemisia herba-alba* Asso. *Therapeutic, Bull. Soc. Pathol. Exot.* 94: 29-31.
- Helal G.A., Sarhan M.M., Abu Shahla A.N.K. and Abou E.K.** (2007) Effects of *Cymbopogon citratus* L. essential oil on the growth, morphogenesis and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* ML2-strain. *J Basic Microbiol.* 7: 5–15.
- Hershenhorn J., Dori S. and Barash I.** (1992) Association of *Geotrichum citri-aurantii* with citrus groves in Israel. *Phytoparasitica*. 20: 31–36.
- Holmes G., Eckert J. and Pitt J.** (1994) Revised description of *Penicillium ulaiense* and its role as a pathogen of citrus fruits. *Phytopathology* .84: 719-727.
- Holmes G.J. and Eckert J.W.** (1999) Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. *Phytopathology*. 8:716-721.
- Hong P., Hao W., Luo J., Chen S., Hu M., Zhong G.** (2014) Combination of hot water, *Bacillus amyloliquefaciens* HF-01 and sodium bicarbonate treatments to control postharvest decay of mandarin fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 88: 96–102.
- Huang Y., Wild B. and Morris S.** (1992) Postharvest biological control *Penicillium digitatum* decay on citrus fruit by *Bacillus pumilus*. *Annals applied biology*. 120: 367-372.
- Ismail M. and Zhang J.** (2004) Post-harvest citrus diseases and their control. *Outlooks Pest Manage.* 15: 29–35.
- Izumi H., Tsukada Y., Poubol J. and Hisa K.** (2008) Potential sources of microbial contamination of Satsuma mandarin fruit in Japan, from production through packing shed. *Journal of Food Protection*. 71:530–538.
- Joshipura K. J., Hu F. B., Manson J. E., Stampfer M. J., Rimm E. B., Speizer F. E., et al.** (2001) The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Annals of Internal Medicine*. 134: 1106–1114

- Johnston L. M., Jaykus L. A., Moll D., Martinez M. C., Anciso J., Mora B. and Moe C. L.** (2005) A field study of the microbiological quality of fresh produce. *Journal of Food Protection*. 68: 1840–1847.
- Johnston L. M., Jaykus L. A., Moll D., Anciso J., Mora B. and Moe C. L.** (2006) A field study of the microbiological quality of fresh produce of domestic and Mexican origin. *International journal of food microbiology*. 112: 83-95.
- Kanetis L., Förster H. and Adaskaveg J.E.** (2007) Comparative efficacy of the new postharvest fungicides azoxystrobin, fludioxonil, and pyrimethanil for managing citrus green mold. *Plant disease*. 91: 1502-1511.
- Kato T.** (1986) Sterol biosynthesis in fungi, a target for broad spectrum fungicides. *Chemistry of Plant Protection (Germany, FR)*. 1: 1-24
- Kellerman M., Erasmus A., Cronjé P. J. and Fourie P. H.** (2014) Thiabendazole residue loading in dip, drench and wax coating applications to control green mould and chilling injury on citrus fruit. *Postharvest biology and technology*. 96: 78-87.
- Kerkenaar A., Janssen G. G. and Costet M. F.** (1986) Special effects of Imazalil on sterol biosynthesis of *Penicillium italicum*. In *The sixth international congress of pesticide chemistry*, Abstract book, IUPAC, Ottawa, Canada.
- Khan A., Ahmad A., Manzoor N. and Khan L.A.** (2010) Antifungal activities of *Ocimum sanctum* essential oil and its lead molecules. *Nat. Prod. Commun.* 5 :345–349.
- Kim J. Y., Jung K. J., Choi J. S. and Chung H. Y.** (2006) Modulation of the age-related nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) pathway by hesperetin. *Aging Cell*. 5:401-411.
- Kinay P., Mansour M.F., Gabler F.M., Margosan D.A., Smilanick J.L.** (2007) Characterization of fungicide-resistant isolate of *Penicillium digitatum* collected in California. *Crop Protection*. 26 : 647–656.
- Klieber A., Scott E., Wuryatmo E.** (2002) Effect of method of application on antifungal efficacy of citral against postharvest spoilage fungi of citrus in culture. *Aust. Plant Pathol.* 31: 329–332.
- Knekt P., Ritz J., Pereira M.A., O'Reilly E.J., Augustsson K., Fraser G. E., et al.** (2004) Antioxidant vitamins and coronary heart disease risk: a pooled analysis of 9 cohorts. *American Journal of Clinical Nutrition*. 80:1508–1520.
- Krajewski A. J., Pittaway T. M. and Barry G. H.** (2002) Common defects associated with degreening of citrus. Citrus Research International. 4-18. Nelspruit, South Africa
- Kuramoto T. and Yamada S.** (1975) Occurrence of sour rot in Satsuma mandarin. *Bulletin of the Fruit Tree Research Station*. Series B.

- Kuramoto T.** (1976) Resistance to benomyl and thiophanate-methyl in strains of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* in Japan. *Plant Dis.Rep.* 60: 168–172.
- Kwok E. S. C. and Silva M.** (2013) Re-evaluation of Developmental and Reproductive Toxicity of Ortho-Phenylphenol (OPP) and Sodium Ortho-Phenylphenate (SOPP). *Cell Dev Biol.2:* 2.
- Ladaniya M. S. (2008)** Citrus fruit: Biology, technology and evaluation. San Diego, CA: Academic Press (Elsevier)
- Lahlou M.** (2004) Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytother. Res.* 18: 435-448.
- Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P.J. and Nychas G.J.E.** (2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91 : 453-462.
- Lecerf J. M.** (2014) Agrumes et prévention des maladies neurodégénératives. *Phytothérapie.* 12 : 84-88.
- Leelasuphakul W., Hemmanee P. and Chuenchitt S.** (2008) Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology.* 48: 113-121.
- Le Marchand L., Murphy S. P., Hankin J. H., Wilkens L. R. and Kolonel L. N.** (2000) Intake of flavonoids and lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 92: 154-160.
- Lesar K.H.** (2013) Compendium of postharvest citrus diseases . *Citrus Research International.* Nelspruit. 12. South Africa.
- Li Y., Brackett R. E., Chen J. and Beuchat L. R.** (2001) Survival and growth of *Escherichia coli* O157: H7 inoculated onto cut lettuce before or after heating in chlorinated water, followed by storage at 5 or 15 C. *Journal of Food Protection.* 64: 305-309.
- Lindow S.E. and Leveau J.H.** (2002) Phyllosphere microbiology. *Curr Opin Biotechnol.* 13: 238–243.
- Lindow S. E. and Brandl M. T.** (2003) Microbiology of the phyllosphere: Mini-review. *Applied and Environmental Microbiology.* 69: 1875–1883.
- Liu X., Wang L. P., Li Y.C., Li H.Y., Yu T. and Zheng X. D.** (2009) Antifungal activity of thyme oil against *Geotrichum citri-aurantii* *in vitro* and *in vivo*. *Journal of applied microbiology.* 107: 1450-1456.
- Lopez-Reyes J.G., Spadaro D., Gullinoa M.I., Garibaldia A.** (2010) Efficacy of plant essential oils on postharvest control of rot caused by fungi on four cultivars of apples *in vivo*. *Flavour Fragr J.* 25:171-177.

- Lopez-Velasco G., Welbaum G.E., Boyer R.R., Mane S.P. and Ponder M.A.** (2011) Changes in spinach phylloepiphytic bacteria communities following minimal processing and refrigerated storage described using pyrosequencing of 16S rRNA amplicons. *J Appl Microbiol.* 110: 1203–1214.
- Lowe G., Woodward M., Rumley A., Morrison C., Tunstall-Pedoe H. and Stephen K.** (2003) Total tooth loss and prevalent cardiovascular disease in men and women: possible roles of citrus fruit consumption, vitamin C, and inflammatory and thrombotic variables. *J Clin Epidemiol.* 56: 694-700.
- Ma Z. and Michailides T.J.** (2005) Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection.* 24: 853–863.
- Manohar V., Ingram C., Gray J., Talpur N.A., Echard B.W., Bagchi D., et al.** (2001) Antifungal activities of oregano oil against *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biochem.* 228: 111–117.
- Martin J. P.** (1960) Fungi and Nematodes in South African Citrus Orchard Soils in Relation to the Citrus Replant Problem. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 24:469-472
- Materon L. A., Martinez-Garcia M. and McDonald V.** (2007) Identification of sources of microbial pathogens on cantaloupe rinds from preharvest to postharvest operations. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 23: 1281–1287.
- Mavroei V. I. and Shaw M. W.** (2005) Sensitivity distributions and cross-resistance patterns of *Mycosphaerella graminicola* to fluquinconazole, prochloraz and azoxystrobin over a period of 9 years. *Crop Protection* 24:259-266.
- McKay A.H., Förster H., Adaskaveg J.E.** (2012) Efficacy and application strategies for propiconazole as a new postharvest fungicide for managing sour rot and green mold of citrus fruit. *Plant Dis.* 96: 235–242.
- McNulty H., Jacob R. F. and Mason R. P.** (2008) Biologic activity of carotenoids related to distinct membrane physicochemical interactions. *The American journal of cardiology.* 101 :20-29.
- Mecteau M. R., Arul J. and Tweddell R. J.** (2002) Effect of organic and inorganic salts on the growth and development of *Fusarium sambucinum*, a causal agent of potato dry rot. *Mycological Research.* 106: 688-696.
- Mehra L.K., MacLean D.D., Shewfelt R.L., Smith K.C., Scherm H.** (2013) Effect of postharvest biofumigation on fungal decay, sensory quality, and antioxidant levels of blueberry fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 85:109–115

- Mercier J. and Smilanick J.L.** (2005) Control of green mold and sour rot of stored lemon by biofumigation with *Muscodor albus*. *Biological control*. 32: 401-407.
- Meziane H., Gavriel S., Ismailov Z., Chet I., Chernin L., Hofte M.** (2006) Control of green and blue mould on orange fruit by *Serratia plymuthica* strains IC14 and IC1270 and putative modes of action. *Postharvest Biology and Technology*. 39: 125-133.
- Ministère de l’Agriculture et de la Pêche Maritime**, du développement rural et des eaux et forêts -Direction de la Stratégie et des Statistiques. L’année agricole 2014/15. Note stratégique N°106. Publié le 30 septembre 2016: disponible sur <http://www.agriculture.gov.ma/pages/rapports-statistiques/annee-agricole-20142015>.
- Mishra A.K. and Dubey N.K.** (1990) Fungitoxicity of essential oil of *Amomum subulatum* against *Aspergillus flavus*. *J. Econ. Bot.* 44: 530–533.
- Montesinos-Herrero C., Ángel del Río M., Pastor C., Brunetti O. and Palou L.** (2009) Evaluation of brief potassium sorbate dips to control postharvest *Penicillium* decay on major citrus species and cultivars. *Postharvest Biology and Technology*. 52:117–125.
- Montesinos-Herrero C. and Palou L.** (2016) Synergism between potassium sorbate dips and brief exposure to high CO₂ or O₂ at curing temperature for the control of citrus postharvest green and blue molds. *Crop Protection*.81: 43-46.
- Morris S.C.** (1982) Synergism of *geotrichum candidum* and *Penicillium digitatum* in infected citrus fruit. *Phytopathology*.72:1336-1339.
- Moscoso-Ramírez P. A. and Palou L.** (2014) Preventive and curative activity of postharvest potassium silicate treatments to control green and blue molds on orange fruit. *European journal of plant pathology*. 138: 721-732.
- Murbach Teles Andrade B. F., Nunes Barbosa L., da Silva Probst I. and Fernandes Júnior A.** (2014) Antimicrobial activity of essential oils. *Journal of Essential Oil Research*. 26: 34-40.
- Murdock D. I.** (1972) Microbiological study of a lemon packing house operation. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*.84: 266
- Myllyharju J. and Kivirikko K.I.** (2004) Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet.* 20: 33–43
- Namesny C. and Decoud A. P.** (1988) Effectivity of Imazalil, prochloraz, and TBZ applied in commercial citrus waxes. *Proc. Sixth Int. Citrus Congr.* 3:1435-1442
- Narciso J. A.** (2005) An assessment of methods to clean citrus fruit surfaces. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. 118: 437–440.
- Nève J.** (2002) Optimisation of dietary intakes of antioxidants. *Nutrition Clinique et*

Métabolisme. **16**: 292-300.

Nikos G.T. and Costas D.E. (2007) Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citrates* L.) essential oil against key postharvest pathogens. *Innov Food Sci Emerg Technol*.**8**: 253–258.

Njombolwana N.S., Erasmus A. and Fourie P.H. (2013a) Evaluation of curative and protective control of *Penicillium digitatum* following Imazalil application in wax coating. *Postharvest Biol. Technol.* **77**: 102–110.

Njombolwana N.S., Erasmus A., van Zyl J.G., du Plooy W., Cronje P.J.R. and Fourie P.H. (2013b) Effects of citrus wax coating and brush type on Imazalil residue loading, green mould control and fruit quality retention of sweet oranges. *Postharvest Biol. Technol.* **86**: 362–371

Nurhayat T., Betul D. and Husnu Can Baser K. (2007) Characterization of volatile constituents of *Scaligeria tripartita* and studies on the antifungal activity against phytopathogenic fungi. *J Chromatogr B*.**850**: 221–229.

Office National de Sécurité Sanitaire des produits Alimentaires (ONSSA). Homologation des intrants chimiques. Services en ligne 2020. Disponible sur <http://eservice.onssa.gov.ma/Default.aspx>

Osman M.S., Sivakumar D., Korsten L. (2011) Effect of biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* and 1-methyl cyclopropene on the control of postharvest diseases and maintenance of fruit quality. *Crop Protection*. **30**; 173-178.

Palou L., Usall J., Smilanick J.L., Aguilar M. J., Viñas I. (2002) Evaluation of food additives and low-toxicity compounds as alternative chemicals for the control of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* on citrus fruit. *Pest Manage. Sci.* **58**: 459–466.

Palou L., Smilanick J.L. and Droby S. (2008) Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue moulds. *Stewart Postharvest Review*. **4**: 1-16.

Pao S. and Brown G. E. (1998) Reduction of microorganisms on citrus fruit surfaces during packinghouse processing. *Journal of Food Protection*.**61**: 903–906.

Pao S., Kelsey D. F. and Long W. (2009) Spray washing of tomatoes with chlorine dioxide to minimise *Salmonella* on inoculated fruit surfaces and cross-contamination from revolving brushes. *Journal of Food Protection*. **72**: 2448–2452.

Park H. J. (2002). Edible coatings for fruits. (ed.). Fruit and vegetable processing. Woodhead Publishing Limited. In W. Jongen. p. 331–345 Cambridge, UK.

- Pérez E., Blanco O., Berreta C., Dol I., Lado J.** (2011) Imazalil concentration for *in vitro* monitoring of Imazalil resistant isolates of *Penicillium digitatum* in citrus packinghouses. *Postharvest Biology and Technology*. 60: 258–262.
- Pérez-Alfonso C.O., Martínez-Romero D., Zapata P.J., Serrano M., Valero D., Castillo S.** (2012). The effects of essential oils carvacrol and thymol on growth of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* involved in lemon decay. *Int. J. Food Microbiol.* 158: 101–106.
- Pinto E., Pina-Vaz C., Salgueiro L., Gonçalves M.J., Costa-de-Oliveira S., Cavaleiro C. et al.** (2006) Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J. Med Microbiol.* 55: 1367–1373.
- Pitt J. I. and Hocking A. D.** (2009) Fungi and food spoilage. 519. New York: Springer.
- Plaza P., Usall J., Torres R., Lamarca N., Asensio À., Viñas I.** (2003) Control of green and blue mould by curing on oranges during ambient and cold storage. *Postharvest Biology and Technology*. 28:195-198.
- Plaza P., Torres R., Ussal J., Lamarca N. and Viñas I.** (2004) Evaluation of the potential of commercial postharvest application of essential oils to control citrus decay. *Hortic. Sci. Biotechnol.* 79: 935–940.
- Plotto A., Roberts D. D. and Roberts R. G.** (2002) Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of tomato (*Lycopersicon esculentum*). In *XXVI International Horticultural Congress: Issues and Advances in Postharvest Horticulture*. 628: 737-745.
- Porat W.B., Cohen L., Daus A., Goren R., Droby S.** (1999) Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene on the postharvest qualities of ‘Shamouti’ oranges. *Postharvest Biol. Technol.* 15: 155–163
- Porat R.** (2008) Degreening of citrus fruit. *Tree Forest Sci. Biotechnol.* 2: 71–76.
- Rajendran P., Nandakumar N., Rengarajan T., Palaniswami R., Gnanadhas E. N., Lakshminarasaiah U., et al.** (2014) Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta*. 436: 332-347.
- Regnier T., Combrinck S., Du Plooy W., Bothan B.** (2010) Evaluation of *Lippia scaberrima* essential oil and some pure terpenoid constituents as postharvest mycobiocides for avocado fruit. *Postharvest Biol. Tec.* 57: 176-182
- Regnier T., Combrinck S., Veldman W., Du Plooy W.** (2014) Application of essential oils as multi-target fungicides for the control of *Geotrichum citri-aurantii* and other postharvest pathogens of citrus. *Ind. Crops Prod.* 61: 151–159.

- Remmal A., Tantaoui-Elaraki A., Bouchikhi T. and Ettayebi, M.** (1993a) Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar Medium. *J. Essent. Oil. Res.* 5: 1179-184.
- Remmal A., Bouchikhi T., Tantaoui-Elaraki A. and Ettayebi M.** (1993b) Inhibition of antibacterial activity of essential oils by tween 80 and ethanol in liquid medium. *J. Pharm. Belg.* 48: 352-356.
- Remmal A., Achahbar S., Bouddine L., Chami N. and Chami F.** (2011) *In vitro* destruction of *Eimeria* oocysts by essential oils. *Vet. Parasitol.* 182: 121-126.
- Rhayour K., Bouchikhi T., Tantaoui Elaraki A., Sendide K. and Remmal A.** (2003) The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Essent. Oil. Res.* 15:286-292.
- Rippon L.E. and Morris S.C.** (1981) Guazatine control of sour rot in lemons, oranges and tangors under various storage conditions. *Scientia Horticulturae.* 14:245–251.
- Ritenour M. A., Zhang J., Wardowski W. F. and Brown G. E.** (2003) Postharvest decay control recommendations for Florida citrus fruit. *UF IFAS Ext. Circ. A.* 359 : 1-6.
- Ritenour M. A., Pelosi R. R., Burton M. S., Stover E. W., Dou H. and McCollum T. G.** (2004) Assessing the efficacy of preharvest fungicide applications to control postharvest diseases of Florida citrus. *HortTechnology.* 14:58- 62.
- Roger L.** (1953) Genre *Rosellinia* De Not. *Phytopathologie des Pays Chauds.* 2 :1286-1297.
- Rossa S. A., Ziska D. S., Zhao K. and ElSohly M. A.** (2000) Variance of common flavonoids by brand of grapefruit juice. *Fitoterapia.* 71: 154-161.
- Rossi M., Garavello W., Talamini R., La Vecchia C., Franceschi S., Lagioui P., Zambon P., Dal Maso L., Bosetti C. and Negri E.** (2007) Flavonoids and risk of squamous cell esophageal cancer. *Int J Cancer.* 120 : 1560-1564.
- Saldo Alberto.** (25/05/2012) NOUVEAU PROCEDE DE TRAITEMENT DE PRODUITS VEGETAUX AVANT OU APRES RECOLTE PAR L'ACIDE PHOSPHONIQUE ET L'HUILE DE GIROFLE. Brevet FR 2967553(A1).
- Sanchez-Gonzales L., Vargas M., Gonzalez-Martínez C., Chiralt A., Ch_ afer M.** (2011) Use of essential oils in bioactive edible coatings. *Food Eng. Rev.* 3: 1-16.
- Sánchez-Torres P. and Tuset J.J.** (2011) Molecular insights into fungicide resistance in sensitive and resistant *Penicillium digitatum* strains infecting citrus. *Postharvest Biology and Technology.* 59: 159–165.
- Schirra M., D'hallewin G., Cabras P., Angioni A., Ben-Yehoshua S. and Lurie S.** (2000) Chilling injury and residue uptake in cold-stored “Star Ruby” grapefruit following

Thiabendazole and Imazalil dip treatments at 20 and 50°C. *Postharvest Biology and Technology*. 20: 91–98.

Schirra M., D'Aquino S., Palma A., Angioni A. and Cabras P. (2008) Factors affecting the synergy of thiabendazole, sodium bicarbonate, and heat to control postharvest green mold of citrus fruit. *Journal of agricultural and food chemistry*. 56: 10793-10798.

Schmidt L.S., Ghosop J.M., Margosan D.A., Smilanick J.L. (2006) Mutation at β -tubulin codon 200 indicated Thiabendazole resistance in *Penicillium digitatum* collected from California citrus packinghouses. *Plant Disease*. 90:765–770.

Sdiri S., Navarro P., Monterde A., Benabda J., Salvador A. (2012) New degreening treatments to improve the quality of citrus combining different periods with or without ethylene exposure. *Postharvest Biol. Technol.* 63: 25–32.

Segall S. and Ralph H. (1971) Personal Communication. USD A Hort. Field Station.

Sellamuthu P.S., Sivakumar D., Soundy P., Korsten L. (2013) Essential oil vapours suppress the development of anthracnose and enhance defence related antioxidant enzyme activities in avocado fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 81:66–72.

Senter S. D., Cox N. A., Bailey J. S. and Forbus W. R. (1985) Microbiological changes in fresh market tomatoes during packing operations. *Journal of Food Science*. 50:254-255.

Shao X., Wang H., Xu F., Cheng S. (2013a) Effects and possible mechanisms of tea tree oil vapor treatment on the main disease in postharvest strawberry fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 77: 94–101.

Sholberg P.L., Harlton C., Haag P., Levesque C.A., O'Gorman D. and Seifert K. (2005) Benzimidazole and diphenylamine sensitivity and identity of *Penicillium spp.* that cause postharvest blue mold of apples using tubulin gene sequences. *Postharvest Biology and Technology*. 26: 41–49.

Singh V. and Deverall B.J. (1984) *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. *Transactions of the British Mycological Society*. 83:487-490.

Sivakumar D. and Bautista-Baños S. (2014) A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop Protection*. 64 : 27-37.

Smilanick J. and Denis-Arrue R. (1992) Control of green mold of lemons with *Pseudomonas* species. *Plant disease*. 76: 481.

Smilanick J.L., Margosan D.A., Mlikota F., Usall J., Michael I.F. (1999) Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of commercial postharvest practices on their efficacy. *Plant disease*. 83: 139-145.

- Smilanick J., Mansour M., Margosan D., Gabler F.M. and Goodwine W.** (2005) Influence of pH and NaHCO₃ on effectiveness of Imazalil to inhibit germination of *Penicillium digitatum* and to control postharvest green mold on citrus fruit. *Plant disease*. 89: 640-648.
- Smilanick J., Mansour M., Gabler F.M. and Goodwine W.** (2006a) The effectiveness of pyrimethanil to inhibit germination of *Penicillium digitatum* and to control citrus green mold after harvest. *Postharvest Biology and Technology*. 42: 75-85.
- Smilanick J. L., Mansour M. F., Sorenson D.** (2006b) Pre- and postharvest treatments to control green mold of citrus fruit during ethylene degreening. *Plant Dis*. 90: 89–96.
- Smilanick J.L. and Mansour M.F.** (2007) Influence of temperature and humidity on survival of *Penicillium digitatum* and *Geotrichum citri-aurantii*. *Plant Disease*. 91:990–996
- Smilanick J.L., Mansour M.F., Gabler F.M., Sorenson D.** (2008) Control of citrus postharvest green mold and sour rot by potassium sorbate combined with heat and fungicides. *Postharvest Biol. Technol.* 47: 226–238
- Soto-Beltran M., Campo C. N., Campos-Sauceda J., Aven-Bustillos R. and Chaidez C.** (2014) Prevalence of *Salmonella*, *Escherichia coli* and coliforms on bell pepper from the field to the packing process. *African Journal of Microbiology Research*. 9 : 718–724.
- Soylu E.M., Kurt S., Soylu S.** (2010) *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *Int. J. Food Microbiol.* 143: 183–189.
- Spadaro D. and Gullino M.L.** (2004) State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *Journal Food Microbiol.* 91: 185–194.
- Strobel G. A., Dirkse E., Sears J. and Markworth C.** (2001) Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*. 147: 2943-2950.
- Suarez M.H. and Saldivar R.H.L.** (17/06/2013) ORGANIC ANTIFUNGAL FOR AGRICULTURAL POST-HARVEST USE MADE OF EXTRACTS OF LARREA TRIDENTATA RESIN AND CHITOSAN BIOPOLYMER. Brevet MX2011013349 (A).
- Suprapta D., Arai K., Iwai H. and Matsuo T.** (1996) Change in susceptibility of satsuma mandarin fruit to sour rot pathogen (*Geotrichum candidum* citrus race) with relation to biochemical changes during maturation and storage. *Mycoscience*. 37 : 209-216.
- Suprapta D. N., Arai K., Iwai H.** (1997) Effects of volatile compounds on arthrospore germination and mycelial growth of *Geotrichum candidum* citrus race. *Mycoscience*. 38: 31-35.

- Talibi I., Askarne L., Boubaker H., Boudyach E., Msanda F., Saadi B., Ait Ben Aoumar A.** (2012) Antifungal activity of some Moroccan plants against *Geotrichum candidum*, the causal agent of postharvest citrus sour rot. *Crop Protection*. 35: 41-46.
- Talibi I., Boubaker H., Boudyach E. H. and Ait Ben Aoumar A.** (2014) Alternative methods for the control of postharvest citrus diseases. *Journal of applied microbiology*.117: 1-17.
- Tanaka T., Makita H., Kawabata K., Mori H., Kakumoto M., Satoh K., Hara A., Sumida T., Tanaka T. and Ogawa H.** (1997) Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by the naturally occurring flavonoids, diosmin and hesperidin. *Carcinogenesis*. 18: 957-965.
- Tao N., Jia L., Zhou H.** (2014) Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Food Chem*. 153: 265–271.
- Taqarort N., Echairi A., Chaussod R., Nouaim R., Boubaker H., Benaoumar A.A., Boudyach E.** (2008) Screening and identification of epiphytic yeasts with potential for biological control of green mold of citrus fruits. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* .24: 3031-3038.
- Taylor M.W., Tsai P., Anfang N., Ross H.A. and Goddard M.R.** (2014) Pyrosequencing reveals regional differences in fruit-associated fungal communities. *Environ Microbiol*. 16: 2848–2858.
- Temkin-Gorodeiski N., Grinberg S. and Gur G.** (1985) Evaluation of new fungicide to control decay in ‘*Galia*’melons during storage. *Report of Department of Fruit and Vegetable Storage*.
- Thierry R., Wilmam D.P., Sandra C. and Ben B.** (2008) Fungitoxicity of *Lippia scaberrima* essential oil and selected terpenoid components on two mango postharvest spoilage pathogens. *Postharvest Biol Technol*. 48: 254–258.
- Tripathi P. and Dubey N.** (2004) Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*. 32: 235-245.
- Ugalde M.U.O ; Rodriguez U.A.B ; Ubegun L.A.** (17/06/2011) PHYTOSANITARY COMPOSITION COMPRISING ESSENTIAL OILS THAT POTENTIATE ANTIFUNGAL ACTIVITY. Brevet ES2361432(A1).
- Valero D. and Serrano M.** (2010) Postharvest biology and technology for preserving fruit quality. CRC press.

- Vanamala J., Leonardi T., Patil B. S., Taddeo S. S., Murphy M. E., Pike L. M., Chapkin R. S., Lupton J. R. and Turner N. D.** (2006) Suppression of colon carcinogenesis by bioactive compounds in grapefruit. *Carcinogenesis*. 27: 1257-1265.
- Venditti T., Dore A., Molinu M.G., D'hallewin G., Rodov V.** (2010) Treatment with UV-C light followed by NaHCO₃ application has synergic activity against citrus green mold. *Acta Hort.* 877:1545–1550.
- Vitoratos A., Bilalis D., Karkanis A., Efthimiadou A.** (2013) Antifungal activity of plant essential oils against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Not. Bot. Hort. Agrobot.* 41: 86–92.
- Wild B. L.** (1983) Double resistance by citrus green mould *Penicillium digitatum* to the fungicides guazatine and benomyl. *Annals of applied biology*. 103: 237-241.
- Wild B.L.** (1987) Fungicidal activity of potassium sorbate against *Penicillium digitatum* as affected by Thiabendazole and dip temperature. *Sci. Hort.* 32: 41– 48.
- Wilson C.L. and Wisniewski M.E.** (1989) Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables : An Emerging Technology. *Annual Review of Phytopathology* .27: 425-441.
- World Health Organization.** (1998) Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/64435/1/WHO_FSF_FOS_98.2.pdf Accessed 15 September 2017.
- Yahyazadeh M., Omidbaigi R.Z. and Taheri H.** (2008) Effect of some essential oils on mycelia growth of *Penicillium digitatum* Sacc. *World J Microbiol Biotechnol.* 24: 1445–1450.
- Yang M., Tanaka T., Hirose Y., Deguchi T., Mori H. and Kawada Y.** (1997) Chemopreventive effects of diosmin and hesperidin on N-butyl-N-(4 hydroxybutyl) nitrosamine-induced urinary-bladder carcinogenesis in male ICR mice. *Int J Cancer.* 73: 719-724.
- Yildiz F., Kinay P., Yildiz M., Sen F. and Karacali I.** (2005) Effects of preharvest applications of CaCl₂, 2,4-D and benomyl and postharvest hot water, yeast and fungicide treatments on development of decay on *Satsuma* mandarins. *J. Phytopathol.* 153:94-98.
- Yu J., Wang L., Walzem R. L., Miller E. G., Pike L. M. and Patil B. S.** (2005) Antioxidant activity of *citrus* limonoids, flavonoids, and coumarins. *Journal of agricultural and food chemistry.* 53: 2009-2014.
- Yuan J.M., Stram D.O., Arakawa K., Lee H.P. and Yu M.C.** (2003) Dietary cryptoxanthin

and reduced risk of lung cancer: the Singapore Chinese health study. *Cancer Epidemiol, Biomarkers & Prevention*. 12: 890-898.

Zhang J. and Ritenour M. A. (2002) Biology and control of *Diplodia* stem-end rot and anthracnose on early harvested Florida citrus. *Packinghouse Newsletter*.196: 4-6.

Zhang J. and Swingle P.P. (2005) Effects of curing on green mold and stem-end rot of citrus fruit and its potential application under Florida packing system. *Plant Disease*. 89: 834–840

Zheng X.D., Zhang H.Y. and Sun P. (2005) Biological control of postharvest green mold decay of oranges by *Rhodotorula glutinis*. *European Food Research and Technology*. 220:353-357.

Zhou Z. Q. (2012) *Citrus Fruits Nutrition*. *Science Press*. Beijing . China.

Zhou H., Tao N., Jia L. (2014) Antifungal activity of citral, octanal and α -terpineol against *Geotrichum citri-aurantii*. *Food Control*. 37: 277–283.

Zou Z., Xi W., Hu Y., Nie C. and Zhou Z. (2015) Antioxidant activity of Citrus fruits. *Food chemistry*. 196: 885-896.