

INTRODUCTION GENERALE

Les agrumes comptent parmi les principales cultures agricoles Marocaines, dont le fruit irrigue à la fois le marché national et international. L'essor de la culture agrumicole n'a cessé de se confirmer, au fil des années pour jouer un rôle économique et social indéniable, tant au niveau de la superficie agricole utilisée, avec plus de 81 549 ha (Faostat, 2013), qu'au niveau de la main d'œuvre mobilisée, avec 25 millions de journées de travail (Er-raki, 2007). En outre, l'agrumiculture est d'un rôle important au niveau de la balance commerciale, avec des exportations d'agrumes, qui oscillent autour d'une moyenne de 500 000 t par an, représentant ainsi, une source importante de devises, avec l'équivalent de près de 3 milliards de dirhams par an (Anonyme, 2015).

A l'instar de toute activité agricole à vocation commerciale, l'activité agrumicole est sujette à des aléas qui en altèrent la qualité et le rendement. Ces aléas se déclinent en plusieurs types de risques liés au marché, à la production et à la conservation, qui s'étend depuis la récolte jusqu'au marché. Mais, les risques qui surviennent en aval de la chaîne de valeur agrumicole, semblent être nettement, plus importants que ceux rencontrés en amont. En effet, durant la phase de conservation, les fruits d'agrumes connaissent de nombreuses contraintes dont, la principale étant l'attaque par des champignons pathogènes, et ce, en raison de la teneur élevée en eau, ainsi que leur richesse en élément nutritifs (Tripathi et Dubey, 2004). Ces attaques s'opèrent souvent lors des processus de manipulations (cueillette et transport), provoquant des blessures au niveau du fruit, en favorisant l'accès accidentel aux différents agents pathogènes. Ces derniers regroupent de nombreuses espèces de champignons dont, l'agressivité est variable (Holmes et *al.*, 1994).

À l'échelle mondiale, les pourritures à *Penicillium* spp. sont responsables d'environ 90 % des pertes de post-récolte des agrumes (Holmes et *al.*, 1994). Il semble que *Penicillium digitatum* (agent de la pourriture verte) *Penicillium italicum* (agent de la pourriture bleue) et *Geotrichum candidum* (agent de la pourriture amère) sont les plus dangereux par les dégâts qu'elles causent sur les fruits post-récoltes (Boubaker, 1993).

Pour faire face aux problèmes causés par ces agents pathogènes, la lutte chimique reste malheureusement, la plus utilisée, malgré ses effets néfastes sur l'Homme et son environnement. Toutefois le recours intensif et récurrent aux fongicides dans la protection

des fruits d'agrumes, devient progressivement, inefficace à cause de l'apparition des souches pathogènes résistantes aux principales matières actives homologuées. Par ailleurs, la prise de conscience du coût environnemental de la lutte chimique et les inquiétudes des consommateurs des dangers, que peuvent engendrer les résidus de pesticides sur la santé humaine, suscitent la remise en question de l'utilisation de la lutte chimique.

Pour remédier à toutes ces contraintes, des solutions alternatives à la lutte chimique doivent être envisagées. En effet, dans le cadre d'élaboration de nouvelles méthodes alternatives, de nombreux travaux de recherche ont été entrepris, dans le but de minimiser les dégâts causés par les agents pathogènes, attaquant les fruits en post-récoltes. Ces derniers ont porté essentiellement, sur l'utilisation de nombreux produits dont, les substances naturelles, les sels organiques et inorganiques à effet antimicrobien (Montesinos-herrero *et al.*, 2009 , 2011 ; Youssef *et al.*, 2012) ou les micro-organismes antagonistes (Meziane *et al.*, 2006 ; Leelasuphakul *et al.*, 2008 ; Abraham *et al.*, 2010 ; Hao *et al.*, 2011).

Il semble que l'utilisation des essences végétales de certaines plantes aromatiques et médicinales est l'une des stratégies efficaces de lutte contre les maladies d'agrumes en post-récolte, et ceci en raison de leurs propriétés antimicrobiennes, antioxydantes et antifongiques (Ameziane *et al.*, 2007 ; Askrane *et al.*, 2012 ; Talibi *et al.*, 2012). Cependant, l'utilisation des HE dans la lutte contre les pourritures des fruits en post-récolte reste très limitée. D'où l'intérêt de la présente étude, portant sur l'évaluation de l'efficacité d'une stratégie alternative aux fongicides de synthèse, à savoir : l'utilisation des extraits de plantes pour contrecarrer le développement de la pourriture verte et bleue des agrumes en post-récolte. Pour ce faire, nous avons mené une étude, afin d'évaluer le niveau de contamination des fruits d'agrumes en post-récolte, par les deux champignons *Penicillium italicum* et *Penicillium digitatum*. Ainsi, des tests d'activité antifongique "In vitro" des huiles essentielles des plantes aromatiques et médicinales étudiées sont effectués. Par ailleurs, des tests "in vivo" sont menés sur fruits d'agrumes, après induction de la maladie, et ceci dans les mêmes conditions que celles des stations de conservation des fruits en post-récoltes (humidité, température...).

GENERALITES

De nos jours, les agrumes sont les fruits les plus consommés dans le monde. Ils tiennent la première place dans la production fruitière mondiale (Taqaort, 2008), et sont des Angiospermes de la Famille des *Rutaceae*. Les agrumes sont originaires du Sud-est asiatique, du nord-est de l'Inde au Nord de la Birmanie. Leur répartition géographique s'étend vers la Chine, l'Est de l'Inde, l'archipel Malais, le nord-est de l'Asie et le Japon (Gmitter eyhu, 1990). Le cédratier (*Citrus medica*) fut la première espèce connue en Europe (Webber, 1967). Le bigaradier (*Citrus aurantium*), le citronnier (*Citrus limon*) et l'oranger (*Citrus sinensis*) ont été introduits dans le bassin méditerranéen vers la moitié du XIIe siècle et le mandarinier (*Citrus reticulata*) au XIX^{ème} siècle.

L'introduction des agrumes en Afrique de l'Est a été effectuée par les commerçants arabes et hindous vers le XIV^{ème} siècle (Spiegel-roy et Goldschmidt, 1996). On compte plusieurs genres chez les agrumes, dont les principaux sont *Citrus*, *Forunella* et *Poncirus*. Le genre *Citrus* comprend de nombreuses espèces, dont certaines sont formées par des hybridations naturelles (Colombo, 2004), on en distingue *c. sinensis* (orangers doux), *c. aurantium* (orangers amers), *c. paradisi* (pomelos), *c. limon* (citrons), *c. latifolia* (limes), *c. maxima* (pamplemousses), *c. reticulata* (mandarines) et *c. medica* (cédrats) qui sont considérés comme les plus représentés.

I. IMPORTANCE ECONOMIQUE DE L'AGRUMICULTURE

De nos jours, les agrumes sont les fruits les plus consommés dans le monde. Selon les statistiques de la FAO (FAOSTAT, 2013), Le bassin méditerranéen produit plus du quart de la production mondiale. Les principaux pays producteurs sont la Chine, le Brésil, les États-Unis et les pays du bassin méditerranéen (ER-Raki, 2007; FAOSTAT, 2013)

Le Maroc forme avec l'Espagne et l'Italie les principaux pays de la region mediterraneenne (Tableau 1).

Tableau 1 : Principaux pays producteurs des agrumes à l'échelle mondiale

Rang	Pays	Surface (10000 ha)	Production (10 000t)
1	Chine	290,50	3001,39
2	Brésil	92,21	2201,77
3	Etats-Unis d'Amérique	32,85	1067,85
4	Espagne	29,13	515,96
5	Italie	16,99	384,04
6	Egypte	16,62	373,07
7	Turquie	10,04	361,38
8	Nigéria	74,30	350,00
9	Argentine	13,10	269,53
10	Afrique du sud	7,53	233,11
11	Iran	14,36	214,24
12	Pakistan	19,45	198,22
13	Indonésie	5,17	181,90
14	Maroc	8,07	136,25
15	Colombie	8,88	131,02
16	Thaïlande	9,87	129,58
17	Syrie	4,17	116,37
18	Japan	5,55	107,93

Au Maroc, l'agrumiculture constitue l'un des principaux secteurs de l'économie nationale. Elle couvre une superficie de l'ordre de 81 549 ha. La vallée de Sous et de Massa abritent 40,5 % de la superficie agrumicole totale, suivie du Gharb avec 19,8 %, Moulouya (16,8%), puis la zone de Tadla avec 14,1 %. Les régions de l'Haouz et le Loukkos arrivent en dernier lieu, avec des superficies de 7,3 et 1,6 % respectivement (Anonyme, 2007). Ainsi au cours de la campagne 2010-2011 la production annuelle marocaine d'agrumes enregistrée s'élève à 1 362 495 tonnes (Faostat, 2013). En outre le Maroc occupe la 11^{ème} position mondiale concernant la production des agrumes et la 7^{ème} position dans la production des petits fruits (CGA, 2007). Cependant la production nationale connaît des fluctuations, variant d'une année à l'autre. Cette irrégularité de production résulte des phénomènes d'alternance conjugués à l'état phytosanitaire et aux effets de la sécheresse qui affectent fortement le niveau des nappes phréatiques, et par conséquent la disponibilité en eau d'irrigation (Loussert, 1989). Au niveau régional, la hausse de la production a concerné toutes les principales régions de production d'agrumes, sauf le Sous Massa, qui a connu une baisse de sa production estimée à 8% .

Pourtant, le vieillissement normal ou prématuré a largement contribué à la régression quantitative et qualitative de la production dans de nombreux vergers (Anonyme, 2011).

II. REPARTITION REGIONALE DES AGRUMES

La superficie occupée par l'agrumiculture a connu une augmentation au cours de ces dernières années. Elle est passée de 30 107 ha (2002/2003) à 36 285 ha durant la campagne agrumicole 2010/2011. Quant aux superficies relatives aux petits fruits, elles atteignent les 18 163 ha, contre 17 081 ha pour le groupe des oranges, soit 50 % du verger agrumicole régional (Ormva-sm, 2011). En ce qui concerne le taux de production, la région de Souss-Massa-Draa vient au premier rang avec 51 % de la production nationale d'agrumes qui est de 698 300 t, avec une exportation de 365 629 t, soit 69 % des exportations nationales des fruits d'agrumes.

La production est dominée essentiellement par la Clémentine (36 %), suivie de Maroc-Late (23 %) et les Navels (14 %). En termes d'évolution des productions, on assiste à une fluctuation autour de 551 000 t et 698 300 t, durant les dernières décennies (Ormva-sm, 2011).

III. PROBLEMES PHYTOSANITAIRES DES AGRUMES

L'agrumiculture marocaine est une activité qui est orientée essentiellement vers l'exportation. Celle-ci est parmi les rares créneaux de la production agricole où le Maroc peut s'épanouir et se prévaloir par la qualité gustative des produits. Malheureusement ce secteur connaît au cours des dernières décennies de nombreuses difficultés liées à des conditions naturelles, mais également, à l'augmentation des charges de production. Toutefois, les fruits d'agrumes sont sujets aux attaques par des maladies de post-récolte dans les stations de conditionnement. En effet, ces derniers constituent un milieu favorable pour la multiplication, la dissémination et la contamination par des germes pathogènes, responsables de pourritures des fruits tels que : le *Penicillium* et le *Geotrichum*, générant des pertes importantes au niveau des fruits en post-récolte.

Les dégâts occasionnés par ces champignons se montrent variables et dépendent de nombreux facteurs, dont les conditions climatiques, avant et au moment de la récolte, l'importance des blessures causées durant la cueillette, l'efficacité des traitements fongicides et l'environnement des stations de conditionnement (Eckert et Brown, 1986). Les agents pathogènes les plus importants peuvent être classés en deux groupes, selon que l'infection a lieu au niveau du verger ou après la récolte, les champignons pathogènes à infection quiescente et ceux de blessures (Eckert et Ogawa, 1985).

1. Champignons pathogènes à infection quiescente

Parmi les agents pathogènes pouvant infecter les fruits au verger, on en distingue *Diplodia natalensis* (Pole-Evans), *Phomopsis citri* (Fawcett), *Colletotrichum gleosporioides* (Penz) et *Phytophthora* spp (Laville, 1971). Ces derniers dits « quiescents ou latents » infectent les fruits au niveau du verger, mais les symptômes n'apparaissent qu'après la récolte, durant la période de stockage, du conditionnement ou du transport (Kolbezen, 1977).

2. Champignons pathogènes de blessures

En outre les manipulations que subissent les fruits pendant les opérations de cueillette et les ouvertures dues à la sénescence et la chute du pédoncule, causent des blessures et des lésions facilitant ainsi, la pénétration des agents pathogènes. Ces champignons infectent les fruits, en se servant d'une porte d'entrée accidentelle, et par conséquent, ils sont en

contact direct avec la chair du fruit et leur développement est immédiat. Il est à noter, que les trois champignons *Penicillium digitatum*, *P. italicum* et *Geotrichum citri-aurantii* étant les principaux agents de blessures. En effet, Laville (1971) avait rapporté que plus de 90 % des dégâts sur fruits d'agrumes en post-récolte sont dus aux pathogènes de blessures.

IV. PRINCIPALES MALADIES EN POST-RECOLTE DES AGRUMES

Les principaux champignons causant ces types de maladies sont *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Geotrichum citri-aurantii*, *Phytophthora citrophthora* (Jaouadi, 1990 ; Boubaker, 1993):

1. Pourritures à *Penicillium* spp.

Les maladies des fruits en post-récolte constituaient une menace importante pour les fruits d'agrumes dans les stations de conditionnement. En effet, les principaux champignons qui occasionnent des pertes considérables sont *P. digitatum* et *P. italicum*. Globalement, ces pertes avoisinent les 90% de l'ensemble des pertes de post-récolte dans les régions de production des agrumes (Holmes et *al.*, 1994). L'agressivité de ces deux espèces de *Penicillium*, semble être liée à leur grande capacité de produire des spores à potentiel infectieux très élevé. Ces deux agents pathogènes sont essentiellement, des parasites de blessures, mais elles peuvent également, pénétrer par un simple contact direct, entre fruits pourris et fruits sains (Barmore et Brown, 1982). En effet, une orange complètement pourrie, peut porter plusieurs spores de *P. digitatum*, qui restent viables et infectieuses, pendant une période de 2 ans.

Il semble que le potentiel de dissémination élevé des champignons et l'adaptation à la pénétration des tissus blessés, ainsi que l'envahissement rapide de ces derniers par le mycélium, exposent les fruits aux infections qui peuvent avoir lieu pendant la récolte, la période du conditionnement et pendant le stockage, ou au moment du transport (Wild, 1981).

a. Agent causaux et symptômes des maladies

Les pourritures à *Penicillium* spp. sont causées par deux espèces : *P. digitatum*, agent causal de la pourriture verte, et *P. italicum*, responsable de la pourriture bleue. Ces deux espèces de *Penicillium* sont systématiquement associées, mais leur biologie diffère par leur mode d'infection et par les symptômes qu'ils provoquent.

La position systématique de ces deux champignons

Classe : Hyphomycètes

Ordre : Moniliales

Section : Phyalidées

Genre : *Penicillium*

Espèce : *Penicillium digitatum* (Pourriture verte) (Const et benekc, 1968) / *Penicillium italicum* (pourriture bleue).

- *Penicillium digitatum*

Les symptômes de la pourriture verte sont facilement reconnus par la masse des spores de couleur vert-olive, produite sur les fruits infectés. Le champignon pénètre ainsi, dans les fruits à travers des blessures qui peuvent être des piqûres, des plaies profondes ou des écorchures de la peau, des cicatrices du calice pouvant constituer aussi, une voie de pénétration (Tuset et al., 1981).

Selon Brown (1987), suite à l'infection et la colonisation des tissus de la peau d'un fruit, par des hyphes mycéliens, une zone molle apparaît à la surface. Celle-ci, continue à se propager, puis se recouvre d'un mycélium initialement blanchâtre, évoluant ainsi en un amas de spores de couleur vert-olive après fructification du champignon. La zone sporifère est alors délimitée par une large couronne de couleur blanche.

A un stade avancé de la contamination, le fruit se trouve couvert de spores. Ces dernières se détachent facilement par de faibles courants d'air. Les colonies de *P. digitatum* sont de couleur brune-verdâtre avec un revers incolore ou bronze terne. Le mycélium se compose

d'hyphes ramifiés, d'un diamètre de 3 à 17 μm . Les conidiophores sont de taille courte de 30 à 100 μm de long et 4 à 5 μm de diamètre. Au niveau de leur sommet, ils se résolvent en un certain nombre de pénicilles à orientation généralement, parallèle.

Les conidiophores présentent souvent un seul étage de ramification et se terminent par des phialides (Domsch *et al.*, 1980). Ces derniers sont de forme cylindrique, dont leur taille varie de 15 à 28 μm de long et 3 à 5 μm de diamètre, avec une petite collerette bien distincte. Ces phialides portent une chaîne de conidies, ayant jusqu'à 160 μm de long, ce qui donne à l'ensemble l'aspect de pinceau.

Les conidies de *P. digitatum* sont lisses, de teinte vert-olive. Elles présentent des formes et des dimensions souvent variables sur une même chaîne (3,5- 5,0 x 3,0- 3,5 μm voir 6-8 x 4-6 μm). Le *Penicillium* spp. Présente donc des caractéristiques variables, selon le type des conidiophores (figure1)

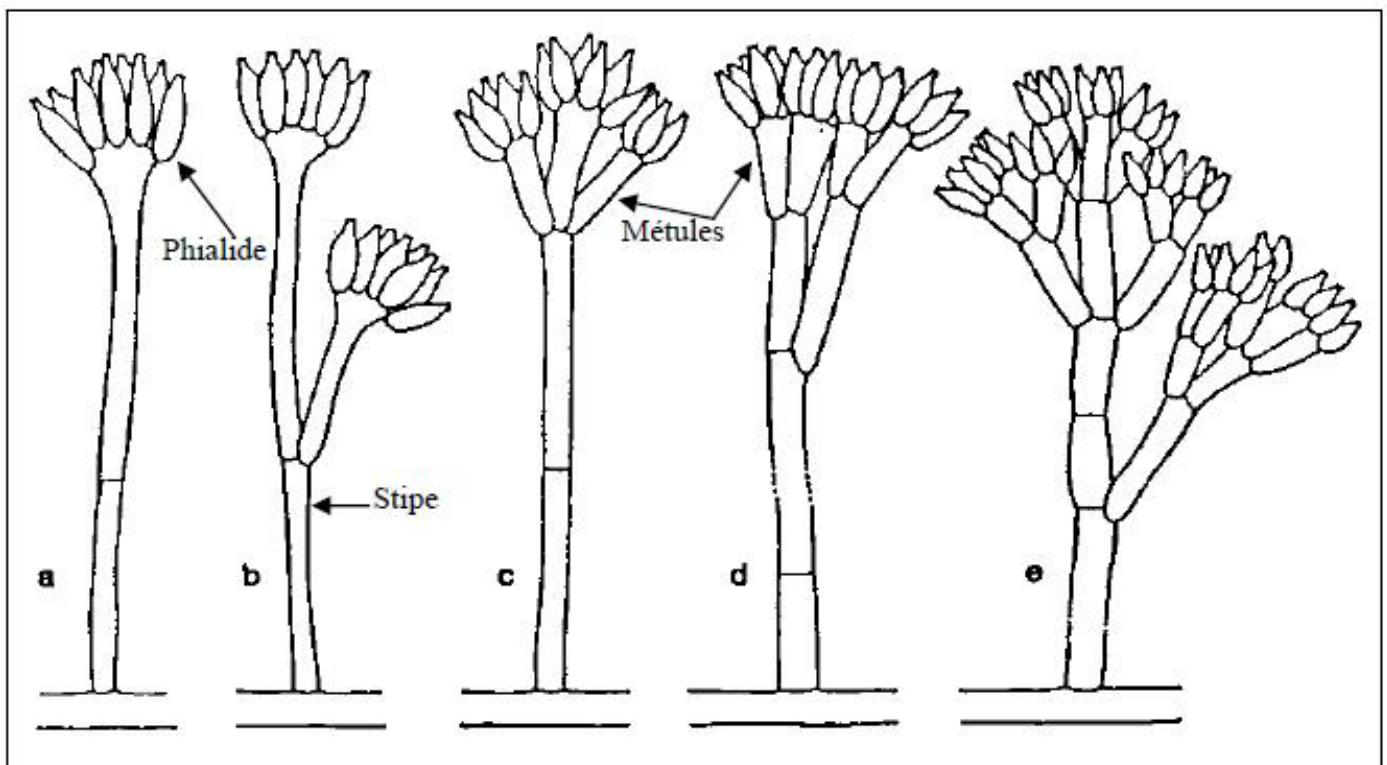


Figure 1 : Caractérisation des *Penicillium* spp. selon le type de conidiophore (Samson *et al.* 1996)
a et b: simple (mono verticillé) ; c : un étage (bi verticillé) ; d: deux étages (ter verticillé) ; e: 3 étages quadri verticillé

- *Penicillium italicum*

C'est un champignon qui se présente sous forme d'une petite tâche humide, qui apparaît sur le fruit, cédant facilement sous le doigt. Cette tâche s'agrandit dans tous les sens et se couvre d'un mycélium blanc, qui produit des spores de couleur bleue. La zone bleue est bordée d'une mince couronne blanche, elle-même entourée d'une frange de tissus gorgés d'eau et extrêmement mous. Le fruit n'adhère pas aux objets, mais transmet facilement, la contamination aux fruits voisins (Barmore et Brown, 1982).

Penicillium italicum possède un appareil conidial, d'une longueur approximative de 4-5 μm , elle à la forme d'un pinceau asymétrique, portant des chaînes emmêlées de conidies et constitué, par un axe principal qui se divise d'abord en 2 à 3 branches longues. Ces dernières se divisent elles-mêmes, en plusieurs branches, donnant des phialades peu nombreux de 3 μm .

Les conidies prennent une forme cylindrique, dans un premier temps, puis deviennent elliptiques ou souvent subglobuleuses, (Onions, 1966). Les deux espèces de *Penicillium* peuvent cohabiter sur le même fruit. Cependant, à basses températures de stockage, c'est *P. italicum* qui emporte sur *P. digitatum*.

b. Cycle des maladies et épidémiologie

Les spores des deux espèces de *Penicillium* sont ubiquistes. On les trouve au niveau des vergers, dans des stations de conditionnement, des entrepôts, dans des eaux de lavage des fruits et sur les caisses de stockages. Ces spores peuvent survivre pendant plusieurs mois dans un environnement sec. La dissémination et la transmission des spores peuvent être assurées par de nombreux facteurs dont, les courants d'air et par le contact direct entre un fruit sain et un fruit infesté. En effet, après l'infection, les hyphes des deux champignons sécrètent une enzyme, appelée polygalacturonase, qui dégrade la pectine située au niveau de l'exocarpe du fruit pour ramollir les tissus sains et faciliter ainsi, la pénétration et la progression des hyphes à l'intérieur du fruit (Barmore et Brown, 1982). Il semble que selon ces auteurs le contact est l'un des facteurs importants dans la transmission de la maladie d'un fruit infecté à un fruit sain.

2. Pourriture amère

La pourriture amère a été rapportée dans la plupart des zones agrumicoles. Les fruits d'agrumes murs sont les plus susceptibles d'être attaqués par ce type de pourriture que les fruits verts ou immatures. Les dégâts occasionnés sur les fruits d'agrumes sont très importants, durant et après une longue saison pluvieuse. Ces dégâts se produisent chez tous les cultivars, mais ils sont particulièrement importants, sur les fruits stockés pendant une longue durée. Les pourritures à *Penicillium* se trouvent souvent associées à une pourriture amère dans des infections mixtes (Brown et Eckert, 1988).

- Agent causal et symptômes de la maladie

La pourriture amère est causée par le champignon *Geotrichum citri-aurantii*. Celui-ci, présente une structure extrêmement simple d'hyphomycètes. Ses filaments se désarticulent par schizolyse, en donnant des chaînes d'arthroconidies, unicellulaires, à paroi lisse, de forme arrondie à cylindrique et de taille variable. Le mycélium aérien ramifié peut atteindre 6 à 7 µm de diamètre et présente des inclusions huileuses, plus au moins abondantes, selon le substrat.

Geotrichum citri-aurantii croît rapidement sur le milieu PDA, produisant des colonies de couleur blanc terne, levuriformes ou légèrement duveteuses (Laville, 1974). Les symptômes initiaux de la pourriture amère causée par *Geotrichum citri-aurantii* sont similaires à ceux des pourritures à *Penicillium*. On remarque un ramollissement de la zone atteinte, suivi de l'apparition d'une pourriture aqueuse, visqueuse ou gluante à odeur putride, d'où l'appellation anglo-saxonne de "Sour rot" pour désigner cette pourriture.

En atmosphère humide, il y a l'apparition en surface de fines efflorescences mycéliennes, blanches et compactes à crémeuses, par contre en atmosphère sèche, les fruits se déshydratent et se momifient (Laville, 1974).

À des stades avancés, l'infection par *Geotrichum citri-aurantii* se distingue par la facilité avec laquelle la cuticule peut se séparer de l'épiderme, au niveau de la partie atteinte et finie par une macération totale du fruit, à cause de la production d'enzymes extracellulaires qui dégradent l'ensemble des tissus du fruit.

3. Pourriture à *Phytophthora citrophthora*

L'agent causal de la pourriture brune des fruits d'agrumes est *Phytophthora citrophthora*. Celui-ci, attaque le plus fréquemment, les parties aériennes des plants d'agrumes, mais il peut également, causer la gommose et la pourriture des racines. Ce champignon est à l'origine d'énormes pertes de production surtout dans les zones irriguées et celles qui reçoivent des précipitations abondantes.

-Agent causal et symptômes de la maladie

La pourriture brune due à *P. citrophthora* se manifeste par une pourriture ferme du tissu infecté, L'attaque se présente, sous forme de tache brune extensive et sèche, pouvant couvrir toute la surface du fruit.

Le champignon produit des sporanges, qui dans des conditions humides, libèrent un grand nombre de zoospores biflagellées. Les sporanges de *P.citrophthora* sont très allongés, en forme de poire, dont leur taille varie entre 45 à 60 µm. La température optimale pour la croissance du mycélium est comprise entre 24 et 28°C.

V. METHODES DE LUTTE CONTRE LES MALADIES EN POST-RECOLTE

Pour faire face aux problèmes de pourritures causées par les champignons phytopathogènes décrits précédemment, il convient de combiner plusieurs méthodes de lutte, aussi bien au niveau des vergers, que tout au long, des différentes étapes de conditionnement des fruits.

Parmi les techniques les plus utilisés, on trouve les moyens prophylactiques, la lutte chimique, physique, biologique et la lutte intégrée.

1. Prévention ou moyen prophylactique

Il existe une corrélation entre la sévérité des maladies en post récolte et le nombre de propagules infectieuses, au niveau des sites potentiels d'infection d'un fruit ; il s'ensuit que la réduction de ces propagules, réduit le développement des maladies (Eckert et Ogawa, 1985). Ainsi, la réduction des infections en pré-récolte se fait par une bonne pratique culturale et par l'utilisation des traitements en pré-récolte. En effet, l'élimination des fruits chutés et des rameaux morts, réduit l'inoculum des champignons.

Par ailleurs, la diminution de l'humidité relative au verger par une irrigation appropriée, le drainage du sol et l'élimination des herbes, sont des techniques utilisées pour diminuer la sévérité de l'attaque de *Phytophthora* (Brown et al., 1995). Il est à noter que, le traitement contre cet agent pathogène, devrait être appliqué, pendant des périodes favorables au développement des champignons, juste avant la première pluie et si nécessaire de répéter le traitement un mois après. C'est ainsi, que le phosetyl aluminium et metalaxyl se sont avérés efficaces, comme traitement en pré-récolte vis-à-vis de la pourriture brune (Davis, 1982).

La pulvérisation du benomyl, en pré-récolte à un mois avant la récolte, prévient le développement de *Diplodia* et de *Phomopsis* (Wardowski et Brown, 1993). En outre, l'utilisation des traitements insecticides pour éliminer les populations d'insectes piqueurs de fruits (cas de la cératite), pourrait contribuer à la diminution des dégâts (Pelser, 1988).

Il a été largement souligné par (Amiri, 2004 et Taqarort, 2008) que pour assurée une bonne conservation des fruits, il serait d'une grande importance de prendre les précautions suivantes :

- Superviser les équipes de cueillette, afin de permettre une meilleure coordination et un bon déroulement des opérations ;
- Garder les surfaces des caisses non abrasives et propres par des lavages fréquents
- Habituer les cueilleurs à ne pas s'appuyer sur les paniers contenant les fruits et de réduire au maximum le contact entre ces derniers
- Porter des gants pour empêcher tout contact direct avec les fruits
- Limiter le temps de séjour des fruits récoltés au verger
- Améliorer la qualité de transport
- Éliminer les fruits visiblement blessés et les fruits infectés pour éviter les contaminations
- Sécher les fruits après le lavage lors du conditionnement
- Désinfecter les caisses et les locaux de stockage

La désinfection des locaux et des caisses se fait selon le mode d'emploi préconisé par le fabricant du produit fongicide.

On en distingue Deux types de désinfection :

- Désinfection quotidienne : celle-ci, est effectuée chaque jour après arrêt de travail, en utilisant de l'eau de javel à 2%. Ce produit à action biocide est utilisé comme désinfectant, par lavage ou pulvérisation.
- Désinfection périodique : la station est entièrement désinfectée périodiquement, par Le formol, qui est un antiseptique à large spectre d'action ; il peut être sous forme liquide ou gazeuse. Cependant il présente l'inconvénient de laisser une odeur désagréable, de même il est néfaste pour la santé humaine (Morras et Chapon, 1983).

2. Lutte chimique

Les produits chimiques, destinées à la lutte contre les maladies en post-récolte, peuvent être des fongicides ou des bactéricides (éliminant les champignons et les bactéries), ou des fongistatiques et bactériostatiques (inhibant le développement fongique et bactérien).

Pour assurer une efficacité du produit chimique utilisé, celui-ci doit entrer en contact avec l'agent pathogène. Cette efficacité dépend essentiellement de l'agent pathogène.

Les traitements chimiques contre les champignons, peuvent être appliqués en vertu de diverses stratégies, avec des timings différents :

- Avant la récolte, pour prévenir l'infection dans le domaine ;
- Procédure d'assainissement, afin de réduire le niveau d'inoculum dans l'environnement auquel, les fruits ou légumes sont exposés ;
- Application post-récolte, pour prévenir l'infection via les blessures et éradiquer ou atténuer les infections établies ;

a. Traitements chimiques en pré-récolte

La possibilité de contrôler les agents pathogènes, bien établis, par des traitements post-récoltes, reste très limitée, puisque la plupart des fongicides sont incapables de pénétrer profondément dans les tissus et par la suite, ne peuvent pas atteindre des infections profondes.

Il semble que le moyen efficace pour réduire les infections initiées dans le champ, y compris les infections quiescentes, est l'application de fongicides à large spectre de protection pour le fruit en développement sur la plante, afin d'empêcher la germination des spores ou de l'établissement de l'infection dans les lenticelles, ou dans les restes de fleurs. Cependant, la lutte chimique a des effets néfastes sur la santé de l'homme et de l'environnement, dans la pratique, en pré-récolte des fongicides sont combinées avec d'autres traitements insecticides appliquées (Barkai et Golan, 2001).

b. Traitements chimiques en post-récolte

Les blessures causées lors de la récolte, sont des principaux sites d'invasion des fruits par des agents pathogènes, lors du conditionnement et du stockage. La protection chimique des fruits est l'un des moyens les plus souvent utilisé pour minimiser les dégâts causé par les maladies de post-récolte.

L'utilisation des fongicides (produits systémiques et non systémique) en post-récolte sur fruits d'agrumes, sont appliqués en prétraitement au Drencher, juste après réception et au niveau du site applicateur après nettoyage.

- Produits systémiques

L'imazalil C'est un fongicide appartenant à la famille des imidazoles. Il inhibe la biosynthèse de l'ergostérol (Brown, 1981), provoquant une perturbation importante de la formation des membranes cytoplasmiques des cellules fongiques (Leroux et Cavelier, 1983). L'imazalil présente l'avantage d'être, très efficace sur les *Penicillium* spp. Des agrumes (Laville, 1971) et même sur les souches résistantes aux fongicides du groupe des benzimidazoles. Cependant, il n'a aucun effet sur *G. citri-aurantii* (Cornack et Brown, 1977).

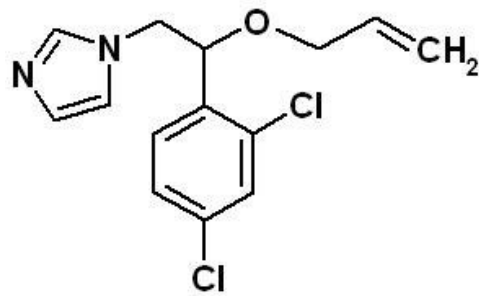
C'est le témoin positif dans nos essais in vivo et in vitro

Il est caractérisé par :

Formule brute : C₁₄ H₁₄ Cl₂ N₂ O

Poids moléculaire : 297,18

Formule plane :



- Benzimidazoles Ce sont des fongicides appartenant au groupe des carbamates.

Les produits utilisés en post-récolte au Maroc sont le thiabendazole, le bénomyl, le thiophanate méthyle et le carbendazime. Ces produits sont antimitotiques ; ils perturbent la formation des fuseaux achromatiques lors de la division mitotique des cellules des champignons. Ils peuvent avoir une action préventive ou curative (Eckert et Kolbezen, 1977).

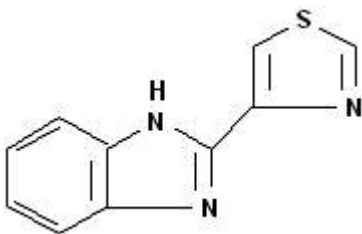
Benzimidazoles sont plus efficaces en suspension dans l'eau qu'en incorporation à la cire (Brown, 1984). Cependant, ils ne contrôlent pas les pourritures à *Geotrichum*, *Alternaria citri* et *Phytophthora* spp. sur fruits d'agrumes.

Le thiabendazole constitue le produit le plus utilisé en post-récolte des agrumes, est caractérisé par :

Formule brute: C₁₀ H₇ N₃ S

Poids moléculaire : 201,26

Formule plane :



- Guazatine

C'est un produit appartenant à la famille des guanidines qui ont une action multisite. Il provoque la perturbation de divers processus cellulaires, dont la perméabilité cellulaire, la respiration, la division nucléaire et la biosynthèse de l'ergostérol.

La guazatine entrave le développement des maladies à *Penicillium*, aussi bien celles causées par des souches sensibles, que par des souches résistantes aux autres fongicides (Kuramoto, 1976). Mais, il n'a pas d'effet ni sur la sporulation de *Penicillium* spp ni sur les infections dues à *Alternaria citri* (Gutter et al., 1981), c'est le premier fongicide reconnu comme ayant une grande efficacité vis-à-vis de *G. citri-aurantii* (Brown, 1988).

- Phosethyl d'aluminium

C'est un produit de la famille des monoethyl phosphites de métal, utilisé dans le traitement des fruits d'agrumes en post-récolte, au niveau du Drencher. Il possède aussi bien, une action préventive que curative contre les infections causées par *Phytophthora* spp. (Cohen et Schiffman-nadel, 1978), il peut agir aussi, contre d'autres champignons tel que *G. citri-aurantii*, *P. italicum*, *P. digitatum* et *A. citri*.

- Produits non systémiques

Ce sont des produits qui ont une action préventive toute en restant à la surface du fruit.

SOPPO, C'est un composé aromatique, possédant un double rôle (Eckert et Brown, 1986):

- Inhibition des spores situées à la surface du fruit ou dans la solution de lavage.
- Déposé sur les blessures, le SOPP prévient les infections durant le stockage et le transport. En plus, il peut nettoyer les brosses de la chaîne de conditionnement et réduire les contaminations des fruits sains par *Penicillium* spp. et *G. citri-aurantii*.

Le SOPP est un produit qui agit au niveau de la chaîne respiratoire par la diminution de la production de l'énergie nécessaire à la germination (Didi Cheikh, 1991), de même il inhibe plusieurs enzymes du cycle de Krebs.

Le diphényle est un composé aromatique à mode d'action similaire à celui du SOPP. Le papier imprégné de diphényle agit par vapeur sur les pourritures pédonculaires et les

pourritures molles (Mc Cornak et Brown, 1977). Cependant, ce produit présente quelques inconvénients :

- L'odeur désagréable qu'il dégage dans l'emballage.
- Apparition des souches résistantes au diphényle et au SOPP (Harding, 1968).
- Problème de résidus.

3. Méthodes de lutte alternative

- Traitements physiques

Les produits chimiques utilisés pour contrôler les maladies en post-récolte sont potentiellement nocifs pour le consommateur. Malgré leur efficacité dans le traitement des fruits en post-récolte, celle-ci reste néfaste pour l'homme et son environnement, d'où l'intérêt d'utiliser d'autres méthodes alternatives dont la lutte physique qui consiste à un traitement par Froid positif, l'irradiation, traitement thermique (Barkai et Golan, 2001) :

Froid positif

La conservation à basse température est considérée depuis longtemps, comme le principal moyen de réduire la détérioration des fruits et légumes en post-récolte (Eckert et Sommer, 1967). Ce sont des conditions qui permettent d'éviter la perte d'humidité des tissus de l'hôte et se ratatiner. Le retard dans l'activité physiologique de l'hôte est accompagné d'un retard dans le développement de l'apparition des maladies en post-récolte. L'activité métabolique de l'agent pathogène est directement influencée par la température de l'environnement, et par conséquent, sa capacité de croissance et son activité enzymatique peuvent être considérablement, retardées par des basses températures.

Il semble que le froid peut ainsi, retarder le développement des maladies en post-récolte de deux manières, directement et indirectement.

- Indirectement, par l'inhibition de la maturation et la sénescence de l'hôte et l'extension de la période pendant laquelle, il maintient sa résistance à la maladie ;

- Directement, par l'inhibition du développement de l'agent pathogène, en l'assujettissant à une température défavorable pour sa croissance (Barkai et Golan, 2001).

Les températures favorables pour le stockage des fruits d'agrumes varient de 0 à 7°C, selon les variétés et 85 à 90% d'humidité relative et ceci pendant une période pouvant aller de 2 à 5 mois (Elbouhairi, 1992).

Irradiation

La possibilité d'utiliser des radiations ionisantes pour étendre la durée de conservation des fruits et légumes frais a été étudiée, depuis les années 1950. Ces études visaient essentiellement trois points importants qui sont :

- contrôler les maladies en post-récolte ;
 - retarder la maturation des processus de sénescence et contrôler l'infestation d'insectes.
- Par ailleurs, certains travaux antérieurs (Stevens et *al.*, 1994) avaient montré que l'application de faibles doses d'ultraviolets (254 nm) réduit d'une manière significative l'incidence de la pourriture à *Penicillium*.

Traitement thermique

Le traitement thermique, peut être appliqué sur fruits, au moyen de bains d'eau chaude, de vapeur chaude, de vaporisateurs de l'air sec, de l'infrarouge ou d'un rayonnement micro-ondes. Parmi ces techniques l'utilisation d'eau chaude et de vapeur reste la plus souvent utilisée (Couey, 1989). Lurie (1998) a rapporté que l'air chaud peut être utilisé pour lutter contre des champignons pathogènes et certains insectes ravageurs. L'efficacité de ce traitement, a été prouvée également, dans le cas des pourritures causées par les deux champignons *Penicillium digitatum* et *Penicillium italicum* sur des oranges et citrons préalablement infectés.

Il semble que la technique de thérapie permet de retarder l'apparition des symptômes, les spores thermorésistantes, telles que celles du *Penicillium*, ne sont pas éliminés complètement, elles finissent par germer au cours du stockage à long terme. Les mécanismes par lesquels le traitement à la chaleur réduit l'incidence des pourritures en

post-récolte sont nombreux. Ainsi la chaleur peut avoir un rôle d'éliciter des réponses de résistance chez les produits entreposés (Marquenie *et al.*, 2002). D'autres auteurs (Plaza *et al.* 2004) ont rapporté que la chaleur aurait une action directe sur *Penicillium digitatum* et *Penicillium italicum* en agissant sur la germination des spores et la longueur des tubes germinatifs.

4. Lutte biologique

La lutte biologique étant définie comme l'utilisation d'organismes vivants, afin de réduire la densité d'une population ou l'impact d'un organisme nuisible, en le rendant moins dommageable (Eilenberg *et al.*, 2001). L'organisation internationale de la lutte biologique (OILB) l'a définie, comme étant l'utilisation d'organismes vivants pour prévenir ou réduire les dégâts causés par des ravageurs. Par contre, certains auteurs (Cook et Baker, 1983) ont souligné que la lutte biologique est une méthode de protection qui consiste à réduire la densité d'un agent pathogène et/ou son potentiel infectieux, en mettant en œuvre un ou plusieurs organismes autres que l'homme.

Quant à l'agence de la protection environnementale (EPA), elle a adopté une définition très large de la lutte biologique. Ainsi, les bio-pesticides ou pesticides biologiques sont des dérivés de matériels naturels, tels que les animaux, les plantes, les bactéries et certains minéraux.

Les bio-pesticides peuvent être repartis en trois catégories : microbiens, d'origine végétale, biochimiques

- Pesticides microbiens, **dont** l'ingrédient actif est un microorganisme (bactérie, champignon, protozoaire, algue) ou un virus ;
- Pesticides d'origine végétale, **y** compris les molécules, que les plantes transgéniques produisent après l'incorporation d'un transgène (comme la protéine Bt de *Bacillus thuriangiensis* ou une chitinase d'origine végétale) ;
- Pesticides biochimiques, sont des substances naturelles ne présentant pas de toxicité directe, vis-à-vis des ravageurs et des phytopathogènes, mais qui interfèrent avec leur

croissance ou leur reproduction (substances hormonales chez les insectes, répulsifs, attractifs) ainsi qu'avec la physiologie de la plante.

Globalement la lutte biologique a été envisagée pour répondre à plusieurs préoccupations. D'une part, l'utilisation intensive des pesticides, ayant provoqué une pression de sélection sur les populations des pathogènes, ce qui s'est traduit par l'apparition de souches résistantes aux matières actives homologuées, pour lutter contre les maladies de conservation (Spotts et Cervantes, 1986 ; Eckert, 1989).

D'autre part, sous la pression des consommateurs, plus soucieux quant à la qualité des produits consommables, les législations deviennent de plus en plus strictes, quant à l'utilisation des fongicides synthétiques (Lepoivre et *al.*, 1992). Ainsi, la définition proposée par l'agence de la protection environnementale a été adoptée, et qui cite que la protection biologique accepte les extraits de plantes, les composés minéraux et organiques, de manière à élargir la gamme des produits à l'ensemble des substances autorisés dans les productions biologiques.

a. Utilisation des sels et des additifs en post-récolte

Les sels et les acides organiques, utilisés comme additifs alimentaires (conservateurs) semblent avoir des activités antimicrobiennes sur les champignons. De nombreux travaux ont rapporté l'effet inhibiteur de ces composés sur les champignons pathogènes en post-récolte. En effet, Palou et ses collaborateurs (2002) ont testé l'activité *in vivo* de plusieurs sels minéraux et acides organiques, contre deux champignons et qui sont *Penicillium italicum* et *P. digitatum* attaquant des fruits d'agrumes après leur récolte, par l'utilisation de ces produits ils ont réussi à réduire l'incidence des pourritures bleue et verte à plus de 50 %. Parmi ces sels, on trouve : le lactate de sodium, le lactate de calcium, le propionate de sodium, l'acétate de sodium, l'acétate de potassium, le benzoate de potassium, le molybdate de sodium et le molybdate d'ammonium.

De même l'utilisation de sorbate de potassium à 0.6 % a complètement inhibé le développement de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sp. melonis*, *Macrophomina phaseolina* et *Rhizoctonia solani* (Arslan et *al.* 2009). Le même effet a été observé sur l'incidence de la pourriture causée par *Botrytis cinerea* chez les raisins de table (Karabulut et *al.*, 2005), ainsi

que la sévérité de la pourriture noire des racines des carottes causée par *Chalara elegans* (Punja et Gaye, 1993).

De même, le carbonate de sodium et le bicarbonate de sodium ont été utilisés dans la conservation des fruits d'agrumes et ont montré des effets négatifs sur la pourriture bleue et verte. Des résultats pareils ont été obtenus sur la pourriture amère causée par *Geotrichum citri-aurantii* (Palou *et al.*, 2001; Smilanick et Sorenson, 2001).

En outre les acides organiques de courtes chaînes, tels que l'acide formique, l'acide acétique ou propénoïque, sont aussi efficaces, contre les pourritures des agrumes en conservation. Ces acides organiques sont généralement, appliqués par fumigation (Sholberg, 1998).

D'autres produits dont, le silicate de potassium (Abraham, 2010) a été utilisé pour réduire la germination des spores de *P. digitatum*. L'application du silicium soluble en pré-récolte réduit l'incidence des pourritures dues aux champignons phytopathogènes chez plusieurs fruits et légumes (Rodrigues *et al.*, 2003).

L'utilisation des propriétés antimicrobiennes des sels et des acides organiques et inorganiques a encouragé de nombreux chercheurs à réaliser des travaux visant leur application pour combattre les agents pathogènes des végétaux.

b. Utilisation des microorganismes antagonistes en post-récolte

La lutte biologique basée sur l'utilisation des microorganismes antagonistes, bactéries, levures et champignons filamenteux, joue un rôle non négligeable dans le contrôle de nombreux pathogènes de fruits en post-récolte. Depuis plusieurs années, de nombreuses recherches ont été conduites pour isoler et sélectionner les meilleurs agents antagonistes (Janisiewicz, 1987 ; Wilson et Chalutz, 1989 ; Lima *et al.*, 1997 ; Janisiewicz et Korsten, 2002) en vue de leur utilisation en post-récolte.

Bien que la taille actuelle du marché des bio-pesticides soit très étroite, en comparaison avec celle des pesticides de synthèse, ce marché (des bio-pesticides) est en développement continu (Adam, 2008).

Il a été largement souligné que de nombreux microorganismes antagonistes sont des inhibiteurs efficaces des pourritures de post-récolte des pêches, fruits d'agrumes, pommes et tomates. Ces microorganismes ont plusieurs modes d'action ; l'antibiose, la compétition pour les nutriments et l'espace. L'utilisation de ces antagonistes dans le contrôle des pourritures en post-récolte sur fruits et légumes, pourrait être une alternative aux pesticides de synthèse (Wilson et *al.*, 1991). Selon Wilson et Chalutz (1989), certains microorganismes dont les levures *Debaryomyces hansenii* (Zopf), et *Aureobasidium pullulans* (DeBary), ainsi que les bactéries *Pseudomonas cepacia* (Van Hall) et *P. syringae* (Burkholder) sont considérés comme des antagonistes les plus efficaces contre *P. digitatum* et *P. italicum*.

Ces microorganismes sont qualifiés d'antagonistes prometteurs de contrôle biologique des pourritures à *Penicillium* sur fruits d'agrumes (Chalutz et *al.*, 1988).

5. Lutte intégrée

La protection intégrée est un concept de lutte qui consiste en la combinaison de plusieurs méthodes de lutte. Celle-ci, fait appel en priorité, aux techniques alternatives à la lutte chimique (biologique, culturale, physique, etc.). Cette technique utilise, autant que possible, les moyens de contrôle biologique combinés à d'autres moyens de lutte. En post récolte, aucune de ces techniques alternatives, employées seules, ne permet de diminuer suffisamment les pertes occasionnées par les pathogènes en post-récolte (Palou et *al.*, 2008).

Droby et ses collaborateurs (1998) ont rapporté que, le plus souvent, l'emploi des antagonistes seuls, offre une protection insuffisante et inférieure à celle apportée par l'utilisation des produits chimiques. Toutefois, la lutte intégrée n'exclut pas le recours aux pesticides chimiques. Elle en prévoit l'usage, tout en respectant les exigences à la fois écologiques, économiques et toxicologiques.

L'intégration des plantes transgéniques dans les schémas de lutte intégrée apparaît également, comme l'un des points intéressants à utiliser dans le futur. Plusieurs exemples de lutte intégrée contre les pathogènes d'agrumes en post-récolte ont été rapportés dans la littérature. Le plus souvent, ces exemples font recours à la thérapie et aux agents de lutte biologique combinés avec d'autres moyens de lutte.

5.1. Utilisation des produits naturels

Les plantes constituent un réservoir de molécules biologiques qui peuvent constituer des fongicides naturels. Leur utilisation dans le contrôle des bio-agresseurs, que ce soit dans la préservation des aliments ou dans la lutte contre les maladies infectieuses, a été employée de manière traditionnelle depuis les temps les plus reculés. La bonne connaissance des mécanismes d'action, mis en œuvre par ces produits, offre des perspectives nouvelles pour la protection des cultures, en raison de leurs nombreux avantages écologiques et également, au regain d'intérêt pour les plantes et leurs extraits, face à la méfiance accrue, suscitée par l'usage des produits chimiques, et ceci en thérapeutique, comme en alimentation.

De nombreuses études ont montré que des extraits de certaines plantes, ainsi que certains métabolites secondaires produits par les plantes, comme les huiles essentielles ou les composants actifs purs, peuvent avoir une action biocide, contre un grand nombre de pathogènes en post-récolte (Obagwu et Korsten, 2003 ; Bajpai *et al.*, 2008; Al-Reza *et al.*, 2010 ; Regnier *et al.*, 2010 ; askrane *et al* 2012)

La valorisation des Plantes aromatiques et médicinales (PAM) est devenue indispensable, dans un pays regorgeant d'une richesse très importante en flore, comme le Maroc. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que les plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires.

La valorisation de ces ressources naturelles végétales passe essentiellement par l'extraction de leurs essences végétales. Ces dernières sont des produits à forte valeur ajoutée, utilisées dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques et agroalimentaires

5.1.1. Huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des complexes naturels de molécules volatiles et odorantes, synthétisées par les cellules sécrétrices des plantes aromatiques et médicinales, et conservées dans des poches au niveau de certains organes (Duquenois, 1968). Généralement, les huiles essentielles sont obtenues avec des rendements très faibles, ce sont des substances fragiles, rares, mais toujours précieuses.

Leur utilisation dans la lutte contre des microorganismes, y compris les parasites des fruits en post-récolte, a été largement étudiée (Amiri *et al.*, 2008 ; Kumar *et al.*, 2008 ; De Corato *et al.*, 2010 ; Soylu *et al.*, 2010). Les essences végétales sont connues pour être dotées de propriétés antiseptiques et antimicrobiennes. Beaucoup d'entre elles, ont des propriétés antitoxiques, antivenimeuses, antivirales, anti-oxydantes et antiparasitaires. En outre, on leur reconnaît également, des propriétés anticancéreuses (Valnet, 2005).

Ces dernières années, de nombreuses recherches se concentrent sur l'étude de l'effet antifongique des produits issus de Plantes aromatiques et médicinales (Olanya et Larkin, 2006 ; Bansod et Rai, 2008 ; Hadizadeh et al., 2009 ; Aoudou *et al.*, 2010). Ainsi il a été montré que les huiles essentielles extraites des clous des girofles et des feuilles de cinnamon ont inhibé la germination des spores de *Botrytis cinerea*.

D'autres travaux ont souligné l'effet des huiles essentielles extraites de certaines plantes aromatiques et médicinales, marocaines contre quatre champignons de fruits en post-récolte à savoir (*Penicillium digitatum*, *Phytophthora citrophthora*, *Geotrichum citri aurantii* et *Botrytis cinerea*) (Chebli *et al.* 2003). Parmi ces substances végétales, seules les huiles extraites de *Chrysanthemum viscidifolium* ont donné des résultats prometteurs, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, contre les champignons précités.

Une autre étude menée par la même équipe sur des plantes appartenant à la famille des *Lamiacée*, a montré que les huiles essentielles d'*Origanum compactum* et de *Thymus glandulosus* ont une grande activité contre *Botrytis cinerea*.

Il a été rapporté par Soylu *et ses collaborateurs* (2010) que les huiles essentielles d'*Origanum syriacum*, de *Lavandula stoechas* et de *Rosmarinus officinalis* inhibent complètement la croissance mycélienne, la germination des spores et la croissance des tubes germinatifs de *Botrytis cinerea*. Plus particulièrement les huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* ont montré une bonne protection contre la pourriture grise des tomates notamment, en traitement curatif. De ces études on peut déduire l'effet efficace des huiles essentielles contre les champignons pathogènes des fruits en post-récolte

5.1.2. Extraction des huiles essentielles

Les techniques d'extractions des huiles essentielles sont diverses, on en distingue l'entraînement à la vapeur, hydro distillation simple, vapo-hydro distillation, extraction assistée par micro-ondes

- Entraînement à la vapeur

Procédé connu depuis l'Antiquité, qui utilise la vapeur d'eau pour extraire les substances aromatiques. Les plantes reçoivent simplement, la vapeur d'eau produite par une chaudière. Les essences de la plante se combinent à la vapeur d'eau et forment alors un mélange gazeux homogène. Ces derniers, circulent dans le serpentin baignant dans l'eau froide, ce qui produit une condensation dont le liquide final, aboutit dans l'essencier. L'eau de distillation qui contient les parties hydrosolubles de l'essence distillée est récupérée pour produire l'hydrolat ou l'eau florale.

- Hydro distillation simple

La plante est mise en contact avec l'eau, lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel. Le tout est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les HE se séparent de l'eau par différence de densité.

- Vapo-hydrodistillation

La plante est placée sur une grille perforée, au-dessus de la base de l'alambic. Elle n'est pas en contact avec l'eau (Belaiche, 1979). Les particules de vapeur d'eau, se dirigeant vers le haut, font éclater les cellules contenant l'essence et entraînent avec elles, les molécules odorantes. La vapeur passe ensuite, à travers un récipient réfrigérant, où la température diminue, provoquant ainsi, le déclenchement des molécules huileuses des particules de vapeur, qui se condense en eau. L'huile et l'eau se séparent du fait de leur poids spécifique différent (Padrini et Lucheroni, 1996).

- Extraction assistée par micro-ondes

La technique d'extraction par micro-ondes a été développée au cours des dernières décennies, à des fins analytiques. Le procédé d'extraction est basé sur l'absorption de l'énergie, par les composantes du matériel végétal, qui est chauffée par micro-ondes, dans une enceinte close dans laquelle, la pression est réduite de manière séquentielle.

Les composés volatils sont entraînés, par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite, récupérés à l'aide des procédés classiques de condensation, refroidissement et décantation. Toutefois, une plus grande proportion de composés oxygénés est généralement, observée dans les huiles essentielles extraites par micro-ondes.

5.1.3. Activités biologiques des huiles essentielles

- Activité antibactérienne

Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des huiles essentielles, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (Carson et *al.*, 2002).

Globalement les huiles essentielles sont caractérisées par une diversité d'actions toxiques sur les bactéries, comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, la perturbation de la force motrice de protons, fuite d'électrons et la coagulation du contenu protéique des cellules (Davidson, 1997).

Le mode d'action des huiles essentielles, dépend en premier lieu, du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe, qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane cellulaire des bactéries

- Activité antifongique

Dans le domaine phytosanitaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également, être employés comme agents de protection, contre les champignons

phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires (Lis-Balchin, 2002).

Généralement les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature, pour leurs propriétés antifongiques, appartiennent à la famille des Lamiacées : thym, origan, lavande, menthe, romarin, sauge, etc. Etant donné, leur grande complexité de la composition chémotypique.

Des études réalisées, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, ont montré que les huiles essentielles, possèdent des propriétés antifongiques, contre un certain nombre de mycètes (Reddy *et al.*, 1998).

- Activité insecticide

Plusieurs études ont montré l'effet insecticide des huiles essentielles de certaines plantes aromatiques et médicinales. Le groupe des phénols par exemple possède une action puissante contre les insectes (Isman *et al.*, 2006).

5.1.4. Détermination de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

La technique de détermination du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles a une grande influence sur les résultats. Les difficultés pratiques viennent de l'insolubilité des constituants dans l'eau, de leur volatilité, de la nécessité de les tester à de faibles concentrations et, des problèmes de standardisation des méthodes (Bousbia, 2004).

- Technique d'aromatogramme

Cette technique se fait de la même manière qu'un antibiogramme, où les antibiotiques sont remplacés par des essences aromatiques, préalablement sélectionnées et reconnues.

L'aromatogramme (Figure 2) ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode de disques est une technique qualitative permettant de déterminer la sensibilité des microorganismes, vis-à-vis d'une substance réputée antimicrobienne. Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des huiles essentielles à l'intérieur d'une boîte de Pétri,

Dans un milieu nutritif solide, où le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque de papier sur lequel, on dispose une quantité donnée d'huile essentielle

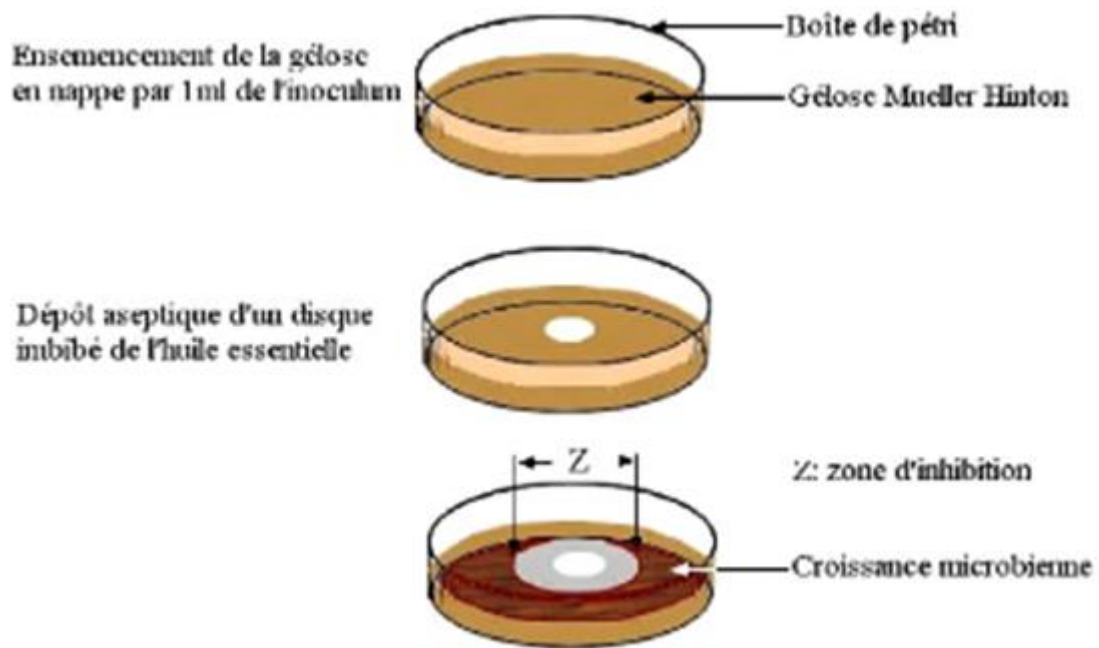


Figure 2 : Technique d'aromatogramme (Bousbia, 2004)

- Technique de micro atmosphère

Le protocole de micro atmosphère est techniquement, proche de celui d'aromatogramme. Cette méthode en boîte de Pétri, constitue une première approche pour l'étude de l'activité antimicrobienne des vapeurs de produits volatils (Billerbeck, 2007).

Selon Bousbia (2004), cette technique consiste à déposer un disque de papier filtre imprégné des huiles essentielles, au centre du couvercle d'une boîte de Pétri, sans que ces huiles entrent en contact avec la géloseensemencée par les micro-organismes. La boîte est hermétiquement fermée. Il se produit une évaporation des substances volatiles dans l'enceinte de la boîte et les cellules sensibles de l'inoculum, sont inhibées. La lecture du test porte donc, sur la croissance ou non de l'inoculum se traduisant par un halo qui sera mesuré par un pied à coulisse.

Cette technique d'étude ne quantifie pas l'activité antimicrobienne réelle des huiles essentielles, elle montre seulement la sensibilité du microorganisme présent aux constituants volatils, à la température d'incubation.

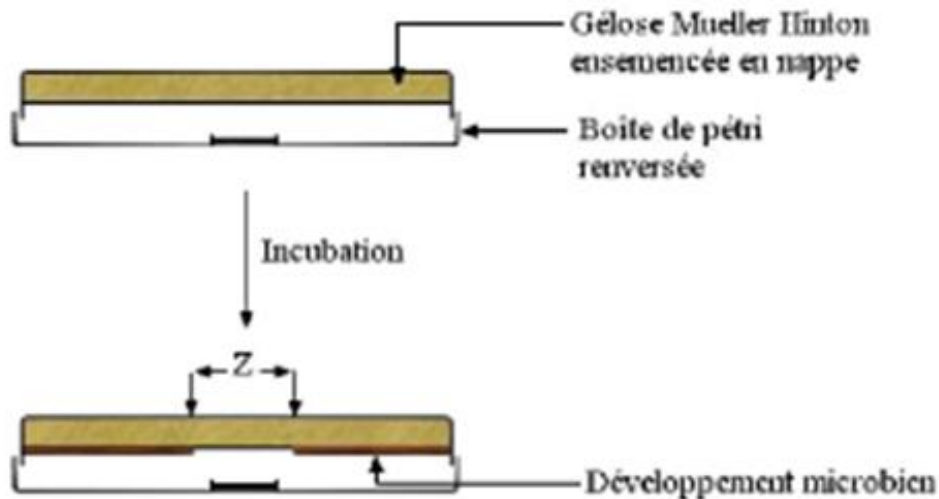


Figure 3 : Illustration schématique de la méthode de micro atmosphère

La technique par contact direct, consiste à mettre en présence des huiles essentielles et les micro-organismes, puis à observer la croissance de ces derniers. Le contact peut avoir lieu en milieu gélosé ou liquide.

- Méthode de diffusion en puits ou en cylindre

C'est une méthode très ancienne, elle assure une diffusion radiale de l'huile essentielle à partir d'un puits, en donnant une zone d'inhibition claire et facilement mesurable. La méthode consiste à découper un trou circulaire vertical dans la gélose et à y verser une solution d'huile essentielle, de concentration connue, qui diffuse radialement, en créant une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablement, ensemencée avec la suspension microbienne (Dorman et Deans, 2000).

- Méthode de dilution

Les huiles essentielles à tester peuvent également, être directement mélangées en concentration connue, au milieu de culture, soit solide ou liquide (exigent la dispersion homogène par émulsifiant). Le milieu est ensuite, inoculé à un taux déterminé de microorganismes, après incubation, on note la présence ou l'absence de culture.

5.2. Extraits de plantes

La plupart des huiles essentielles et des substances volatiles ou composés actifs purs, mentionnés précédemment, sont inclus dans cette section. Ils font partie des principaux composants (biologiquement actifs), contenus dans certains extraits végétaux. Les extraits de certaines plantes, aqueux ou par solvants organiques de polarités différentes, ont un effet antimicrobien. Ainsi, il a été rapporté que les extraits aqueux de *Cistus villosus*, *Thymus leptobotrys* et *Peganum harmala* ont été utilisés pour inhiber la croissance mycélienne de *P. italicum* (Ameziane et al., 2007).

En outre l'extrait aqueux d'autres plantes aromatiques et médicinales comme l'*Acacia nilotica* a montré une activité antifongique prononcée contre *P. italicum* (Tripathi et Dubey, 2004). De même, il a été largement souligné que les extraits aqueux d'autres plantes, *Rubus ulmifolius*, *Ceratonia siliqua*, *Cistus monspeliensis*, *Halimium umbellatum*, *Cistus villosus*, *Pistacia atlantica* *Halimium antiatlanticum*, *Inula viscosa* et *Ighermia pinifolia* réduisent significativement la croissance mycélienne de *Geotrichum citri-aurantii* (Talibi et al., 2012).

Quant aux extraits de *Halimium umbellatum*, *Inula viscosa*, *Cistus villosus*, *Cistus siliqua* et *Halimium antiatlanticum* réduisent significativement l'incidence de la pourriture amère causée par *Geotrichum citri-aurantii*, ainsi que sa sévérité chez des agrumes en post-récolte, sans altérer l'écorce des fruits traités.

Obagwu et ses collaborateurs (2003), ont souligné que les extraits, aqueux et éthanolique, d'ail ont permis le contrôle des pourritures bleue et verte des agrumes en post-récolte, aussi bien, *in vitro* qu'*in vivo*, *P. italicum* se montre plus sensible aux traitements que *P. digitatum*.

Il a été montré que les extraits aqueux et méthanoliques d'*Inula viscosa* montrent une efficacité contre *P. italicum* et un effet inhibiteur quant à la biosynthèse de la chitine (Kanan et Al-Najar, 2009). D'autres travaux ont rapporté qu'*Inula viscosa* possède une activité antifongique contre plusieurs champignons en post-récolte (Wang et al., 2004).

Dans ce sens il semble que l'activité antifongique des extraits de plantes est liée à leur teneur en métabolites secondaires, connus pour leur effet antifongique dûs plus

particulièrement aux composés alcaloïdes, composés phénoliques, flavonoïdes et terpénoïdes, (Mohamed *et al.*, 2008).

Il semble que l'utilisation d'*I. viscosa* est très fréquente dans la pharmacopée traditionnelle marocaine, pour traiter les bronchites, le diabète, les blessures et les troubles gastriques et intestinaux...etc (Bellakhdar, 1997). Alors que les extraits méthanolique et éthanolique de *Punica granatum* sont utilisés dans le contrôle de la pourriture verte des agrumes par rapport aux fongicides de synthèse utilisés (imazalil) (Tayel *et al.*, 2009).

L'extrait méthanolique de *Sanguisorba minor* a permis une bonne protection contre *Penicillium digitatum* (Gatto *et al.*, 2011). De même, les extraits méthanoliques de *Cistus villosus*, *Halimium umbellatum* et *Ceratonia siliqua* ont été utilisés pour contrôler le développement de la pourriture amère causée par *Geotrichum citri-aurantii* (Talibi *et al.* 2012).

L'extrait méthanolique de *Cistus villosus* est plus actif que l'extrait chloroformique de la même plante contre *P. digitatum* et *G. citri-aurantii* ont montré (Ameziane *et al.*, 2007), l'extrait méthanolique de *Rubus ulmifolius* a montré une efficacité vis-à-vis de certains champignons de post-récolte tels que *Botrytis sp.*, *Penicillium sp.* Et *Fusarium solani* (Sisti *et al.*, 2008).

Il a été largement souligné que la flore marocaine se montre particulièrement riche en plantes aromatiques et médicinales, qui sont dotés d'une forte activité antimicrobienne (Al-Reza *et al.*, 2010; Obeidat *et al.*, 2012).

MATERIEL ET METHODES

I. EVALUATION DES NIVEAUX D'INFECTION DES FRUITS

1. Matériel végétal

Les fruits d'agrumes utilisés, sont issus de la variété "Navel" non préalablement traités d'origine de Beni mellal (figure 4). Les échantillons sont collectés directement à leur arrivé du champ et pendant l'étape de triage.

Nous avons utilisé deux types de fruits :

-Fruits qui ne présentent pas de symptômes de pourriture à *Penicillium*

-Fruits infectés : présentant des symptômes caractéristiques des pourritures à *Penicillium*

Au cours des prélèvements des fruits, des mesures de précaution ont été prises en considération, afin d'éviter toute contamination des échantillons. Ces derniers une fois ramenés au laboratoire, ils ont été mis au frais, dans le réfrigérateur, à une température de 4°C.



Figure 4 : Etape de triage

2. Préparation des échantillons

Les fruits étudiés sont lavés abondamment avec de l'eau, sont ensuite, déposés dans des boîtes en plastiques (Figure 5) préalablement, désinfectées avec de l'alcool à 70° et contenant du papier filtre humidifié, avec de l'eau distillée stérile.

Après sept jours d'incubation dans la chambre humide, nous avons apporté des observations pour identifier la présence de contamination des fruits par les champignons en question, les fruits infectés sont ainsi, dénombrés.



Figure 5 : Incubation des fruits

3. Isolement des champignons

Pour procéder à l'isolement des champignons, nous avons sélectionné les fruits infectés par la pourriture des champignons. Ces derniers, sont répartis en deux lots selon la nature de pourriture bleue ou verte. Ainsi, nous avons prélevé dans chacun des lots, un petit fragment de la partie infectée à l'aide d'une aiguille stérile et nous l'avons déposé sur milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar), préalablement préparé et coulé dans des boîtes de Pétri (90 mm). Les boîtes sont ensuite incubées à 26°C et à l'obscurité pour le développement des champignons.

Après une période d'incubation de 7 jours, les boîtes sont récupérées, afin de déterminer les caractères morphologiques de chacune des deux espèces de champignons étudiées. Les observations du mycélium et des spores prélevés à partir des colonies sont effectués, sous le microscope optique (Grossissement x40). Les figures ci-dessous montrent les formations des colonies des deux champignons étudiés.

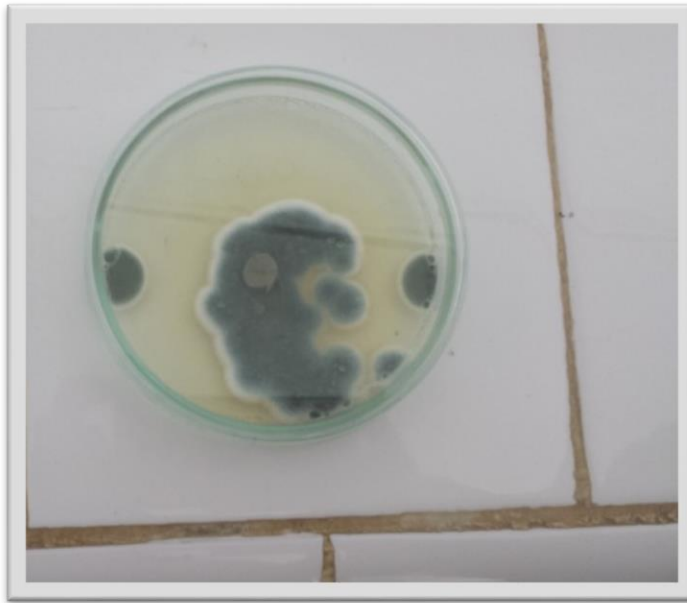


Figure 6 : Colonies de *Penicillium digitatum*

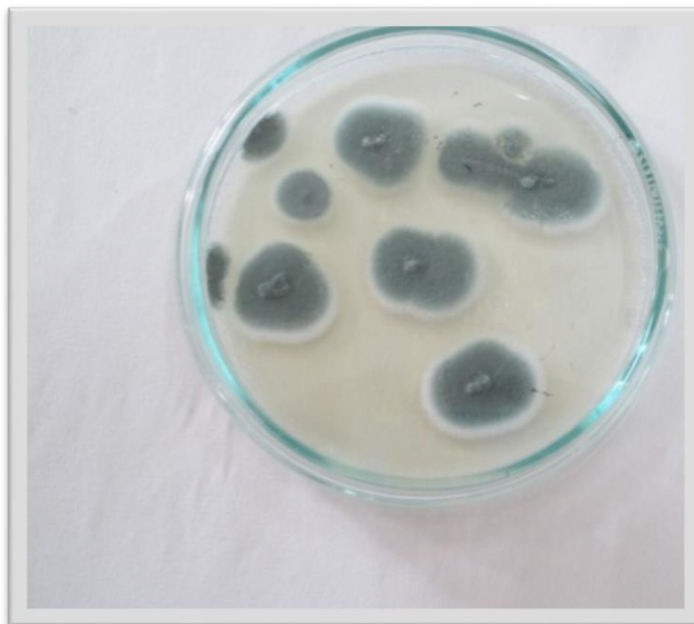


Figure 7 : Colonies de *Penicillium italicum*

4. Test de pathogénie des isolats de *P. italicum* et *P. digitatum*

Pour assurer le maintien des deux champignons étudiés *P. italicum* et *P. digitatum*, nous avons inoculés périodiquement les champignons, à raison d'une fois par six mois, à des fruits d'agrumes. Des fruits sains sont lavés à l'eau, désinfectés par trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium pendant 2 mn et rincés à l'eau distillée stérile. Après séchage à l'air libre, les fruits désinfectés sont blessés à l'aide d'une aiguille stérile. Les blessures sont, par la suite, inoculées par 20 µl d'une suspension de spores des deux pathogènes ajusté à 10⁶ spores/ml. Les fruits, ainsi inoculés, sont maintenus dans des boîtes en plastique, imbibés d'eau distillée stérile, pour augmenter l'humidité et sont incubés à une température ambiante, pendant une semaine.

II. Plantes étudiées

Nous avons utilisé les huiles essentielles de quatre plantes aromatiques et médicinales, *Thymus vulgaris*, *Mentha pulegium*, *Artémisia herba alba*, *Lavandula hybrida*, celles-ci ont été largement utilisées dans divers domaines : industries pharmaceutiques, cosmétiques et agroalimentaires, préparations culinaires.

a. Mentha pulegium L.

Mentha pulegium (figure 8) est une espèce très répandue au Maroc, est plus particulièrement entre Marrakech et Azrou, c'est une plante fertile, dont la descendance semble assez homogène. Elle se distingue des autres menthes par son port étiré, ses tiges en partie couchées sur le sol, ses fleurs rosées disposées au long de la tige et des rameaux, le calice est obstrué par les poils. La plante peut atteindre entre 10 et 50 cm de hauteur.



Figure 8 : Photo d'un buisson de *Mentha pulegium L.* (Louhbi, 2016)

Systematique

Régne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Lamiales

Famille : *Lamiaceae*

Genre : *Mentha*

Espèce : *Mentha Pulegium*

L'utilisation de la plante peut être de plusieurs façons : en inhalation, en infusion ou en décoction dans du lait ou du thé. Elle est largement utilisée en cas de refroidissement, rhume, grippe, bronchite, toux et de douleurs abdominales. Par contre l'hydrolat est utilisé comme fébrifuge et antiseptique.

En usage externe, on utilise la menthe pouliot fraîche réduite en pulpe et appliquée sur les contusions, les enflures, les engorgements laiteux, les points douloureux des

rhumatismes et en compresses, contre la névralgie faciale et la migraine. En outre, la menthe pouliot est utilisée en bain.

En cataplasme, les feuilles fraîches sont appliquées pour arrêter la sécrétion lactée. Les huiles essentielles de la *Menthe pouliot* sont souvent utilisées comme produits de massage pour calmer les douleurs de rhume et les névralgies.

b. Thymus vulgaris L.

Thymus vulgaris L. est un arbuste aromatique à tiges ramifiées, et possède de petites feuilles recourbées sur les bords, de couleur vert foncé, sont recouvertes de poils et de glandes appelés trichomes (Figure 9). Les trichomes contiennent des huiles essentielles majoritairement composées de mono terpènes. Ses petites fleurs zygomorphes sont regroupées en glomérules et leur couleur varie du blanc au violet, en passant par le rose.



Figure 9 : Photo d'un buisson de *Thymus vulgaris L.* (Louhibi, 2016)

Systématique

Régne : Plantae

Sous-régne : Trachebionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Asteridae

Ordre : Lamiales

Famille : *Lamiaceae*

Genre : *Thymus*

Espèce : *Thymus vulgaris*

La plante de *Thymus vulgaris* pousse de façon spontanée dans les endroits secs et ensoleillés un peu partout dans le pourtour méditerranéen, elle est largement utilisée pour remédier aux problèmes de pathologies respiratoires. Elle semble avoir un rôle important contre les quintes de toux, notamment dans les affections de type coqueluche, bronchite, pleurésie, ainsi que d'autres pathologies de la sphère pulmonaire (emphysème par exemple) par son effet spasmolytique. Cette plante aromatique et médicinale est utilisée aussi dans le traitement des personnes atteintes d'asthme ou de rhume.

En outre, *Thymus vulgaris* est comme antiseptique et antifongique. Elle soulage les inflammations de la sphère bucco-pharyngée, caries, soins dentaires divers, sous forme de bains de bouche et diminue les sécrétions nasales ou rhinorrhées, elle est utilisée aussi, comme vertus spasmolytiques, en soulageant les dérèglements intestinaux, tels que la diarrhée, ballonnements, flatulences, les colopathies diverses.

Au Maroc, le thym est un arbrisseau qui croit dans le Rif, dans le haut et le moyen Atlas.

Son utilisation externe s'effectue dans de nombreuses pathologies dermatologiques. Ses vertus antivirales, antimicrobiennes et antiseptiques sont mises à profit dans le traitement des mycoses, des plaies, de la gale, de l'herpès et, globalement, d'un large panel d'affections cutanées allant jusqu'au zona.

C. Artemisia herba alba

L'Armoise blanche est une plante herbacée (figure 10) à tiges ligneuses, qui sont rigides et droites (Coline, 2002), elles sont ramifiées, de 30 à 50cm. Les feuilles sont de petite taille, sessiles, pubescentes avec un aspect argenté. Les fleurs sont groupées en grappes, à capitules très petites et ovoïdes. L'involucre est à bractées imbriquées. Le réceptacle florales est tenu avec 2 à 5 fleurs jaunâtres par capitule toutes hermaphrodites.

L'armoise blanche se distingue par un gout amer, d'où son caractère astringent. Ses caractéristiques morphologiques et physiologiques font de l'armoise blanche une espèce bien adaptée aux conditions climatiques arides. Le dimorphisme saisonnier de son feuillage lui permet de réduire la surface transpirante et d'éviter ainsi, les pertes d'eau (Fervhivhi *et al*, 2004)



Figure 10 : Photo d'*Artemisia herba alba* (Louhibi, 2016)

Systematique

Régne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Asterales

Famille : Asteraceae

Genre : *Artemisia*

Espèce : *Artemisia herba alba*

L'Artemisia herba alba (Figure 10) est très utilisée en médecine traditionnelle lors d'un désordre gastrique, telle que la diarrhée et les douleurs abdominales. Elle est aussi utilisée en tant que remède de l'inflammation du tractus gastro-intestinal (Gharabi, 2008). En outre, *l'Artemisia herba alba est largement utilisée* dans le traitement du diabète. Ainsi, de nombreuses études ont montré que l'armoise blanche est caractérisée par son efficacité, en tant qu'agent antidiabétique, antiparasitaire, antibactérien, antiviral, antioxydant, anti malarien, antipyrétique, antispasmodique et antihémorragique (Boudjelal, 2013).

L'Armoise blanche est une plante spontanée très répandue en Afrique du nord et au moyen Orient, elle affectionne les climats secs et chauds. Au Maroc, cette plante se rencontre à l'état spontané, il n'est pas rare de trouver des zones de plusieurs dizaines de Kilomètres de rayon ou seule l'armoise blanche règne dans un paysage quasi-désertique.

d. Lavandula hybrida

Le lavandin (Figure11) est issue du croisement entre *lavandula angustifolia* et *lavandula latifolia*. A l'époque où les coupeurs allaient cueillir les lavandes fines sauvages, ils avaient déjà remarqué des plants plus développés que les autres qu'ils appelaient "grandelavande". Il s'agissait de lavandins, issus de l'hybridation spontanée de la lavande fine et de l'aspic. Cette hybridation est possible grâce aux insectes butineurs et

particulièrement, les abeilles. D'une manière générale, les lavandins ont un développement végétal bien plus important que celui de la lavande. Ils ont une robustesse remarquable, une grande faculté d'adaptation aux différents climats et aux différents types de sols. Son rendement en huile essentielle est plus important par rapport à celui de la lavande fine.



Figure 11 : Photo de *lavandula hybrida* (Louhibi, 2016)

Systematique

Régne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Lamiales

Famille : *Lamiaceae*

Genre : *Lavandula*

Espèce : *Lavandula hybrida*

Le lavandin est une plante aromatique et médicinale avec des propriétés thérapeutiques qui sont antispasmodiques et antibactériennes, anti-inflammatoire et vulnérable, cicatrisante et calmante, relaxante et sédative, antalgique et antidépressive. Elle est surtout conditionnée, sous forme d'huiles essentielle, qui peut être utilisée soit en diffuseur ou brûle-parfum, en friction cutanée, en massage, en inhalation voir en gargarisme.

Son usage dans de nombreux maux du quotidien fait de cette espèce un produit indispensable dans toute pharmacie familiale. Elle permet de réguler le système nerveux, pour calmer, apaiser et relaxer les tensions élevées, les insomnies en favorisant l'endormissement, les anxiétés et les dépressions,

Lavandula hybrida est un antistress naturel, un décontracteur des tensions musculaires et squelettiques, elle soulage des douleurs dues aux spasmes des muscles, et elle est d'une grande efficacité pour des personnes pratiquant du sport. En outre, l'espèce est utilisée pour traiter les migraines et pour lutter contre la couperose et les varices et dans différents troubles de la circulation sanguine.

III . Extraction des Huiles Essentielles et leur caractérisation chimique

1. Technique d'extraction

Les échantillons des Plantes aromatiques et médicinales utilisées, sont récoltés dans la région de Meknes (jardin Botanique à l'ENA) et Azrou, ensuite numérotés et placés dans des sacs en plastique propres, et séchés à l'ombre et à l'abri de l'humidité, durant une semaine. Les différentes parties de la plante utilisée sont données dans le tableau 2.

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée, par la technique d'entraînement à la vapeur d'eau, à l'aide d'un appareil de type Clevenger, selon le protocole suivant :

La plante est mise en contact avec de l'eau distillée stérile dans un ballon. L'ensemble est porté à ébullition, après l'apparition de la première goutte de distillat à la sortie du tube de condensation de la vapeur ; l'huile essentielle est alors, entraînée par la vapeur d'eau. Celle-ci, est ensuite condensée, en passant par un réfrigérant et récupérée à l'aide d'une seringue. Les huiles essentielles récupérées ont été déshydratées par le sulfate de sodium

anhydre et stockées par la suite à une température de 4°C, dans des flacons en verre brun fermé hermétiquement pour les préserver de l'air et de la lumière.

Tableau 2 : Les différents Parties des Plantes Aromatiques et médicinales utilisées et lieu de récolte

Nom scientifique	Région de récolte	Partie utilisée
<i>Artemisia herba alba</i> Asso	Meknès (552 m)	Feuilles+tiges
<i>Thymus vulgaris</i> L.	Azrou (1250m)	Feuilles+tiges+fleures
<i>Lavandula hybrid</i>	Meknès (552m)	Feuilles+tiges+fleures
<i>Mentha pulegium</i> L.	Azrou (1250m)	Feuilles

2. Calcul du rendement en huile essentielle

Le rendement en HE, est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M) (AFNOR (1986). Le rendement est déterminé selon la formule suivante :

$$R = M'/M \times 100$$

R : Rendement en huile essentielle ;

M': Masse de l'HE obtenue en gramme;

M : Masse du matériel végétal du départ.

Les valeurs de rendement sont exprimés par rapport à la matière sèche (en ml/ 100 g).

3. Caractérisation chimique des huiles essentielles

La caractérisation chimique des huiles essentielles des différentes plantes étudiées a été effectuée sur un chromatographe phase gazeuse, de type varian 3400, équipé d'une colonne capillaire polaire BP – 5 (30m x 0,25 mm, épaisseur du film : 0,25 μ m), d'un détecteur FID réglé à une température de 250°C et alimenté par un mélange et d'un injecteur réglé à 250°C. Le gaz vecteur utilisé est l'azote avec un débit de 2ml/mn. La température de la colonne est de l'ordre 40°C (isotherme pendant 5mn) à 200°C (isotherme pendant 20°C) à raison de 3°C/mn.

L'identification chimique des différents constituants a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse, couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS) ; ce qui permet une détermination qualitative et quantitative de leurs composés.

L'appareillage utilisé est le Chromatographe à phase gazeuse (Trace GC ULTRA) couplé à un spectromètre de masse (Polaris Q MS à trappe ionique), l'ionisation a été réalisée par impact électronique (70 eV).



Figure 12 : Chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse

La base de données utilisée : NIST MS Search. Le tableau ci-après, résume les conditions de l'injection, ainsi que le type de colonne et le solvant utilisés :

Tableau 3 : Conditions de la caractérisation chimique des huiles essentielles étudiées

Solvant	Type de colonne	Volume d'injection	Température d'injection	Température d'interface	Mode d'injection	Gaz vecteur
Acétate d'éthyle (C ₄ H ₈ O ₂)	VB-5 (Methylpolysiloxane à 5% phenyl) 30 m * 0.25 mm * 0.25 µm.	1µl	220°C	300°C	Split	Hélium

IV. ACTIVITE ANTIFONGIQUE DES HUILES ESSENTIELLES IN VITRO

Les plantes étudiées dans le présent travail sont largement utilisées dans divers domaines en médecine, en parfumerie, en cosmétique et pour l'aromatisation culinaire.

Nous avons évalué l'effet antifongique des huiles essentielles des quatre PAM : *Artemisia herba alba*, *Lavandula hybrida*, *Thymus vulgaris*, *Mentha pulegium*. Ces huiles ont été conservées dans des conditions spécifiques de température et de lumière (4°C et obscurité)

1. Evaluation de l'effet inhibiteur

Pour évaluer l'effet inhibiteur des huiles essentielles testés, il existe de nombreuses méthodes (aromatogramme, méthode de puits, méthode de dilution... etc). Dans la présente étude, nous avons opté pour la technique d'aromatogramme. Celle-ci, repose sur le pouvoir migratoire des essences testés sur un milieu solide, contenu dans des boîtes de Pétri.

La méthode de diffusion des disques appliquée est celle utilisée par de nombreux auteurs (Mayachiew et Devahastin, 2008 ; Hussain et al., 2010).

Les spores isolés d'une culture de 7 jours de chaque souche par un lavage des boîtes de Pétri, avec un volume de 5 ml de l'eau physiologique stérile, à partir de cette suspension, qui est considérée comme suspension mère, nous avons préparé les différentes dilutions dans des tubes à essai, contenant chacun 9 ml d'eau physiologique stérile.

Après une bonne agitation des tubes contenant la suspension, permettant d'avoir une répartition homogène des spores dans l'eau physiologique, nous avons procédé à un

comptage de spores à l'aide d'une cellule de Mallassez. Une évaluation de la densité optique (DO) de la suspension fongique à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 620 nm a été effectuée, afin de standardiser la suspension de spores à 10^7 spores/ml. Une DO de 0,1 correspond à une concentration de 10^7 spores/ml.

Pour la réalisation du test par la technique d'aromatogramme, 20 ml de PDA en surfusion sont coulés dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre. Après solidification du milieu de culture, 200µl de la suspension fongique à tester (10^7 spores.ml⁻¹) sont étalés en surface et laissés jusqu'au dessèchement total.

Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, les disques de papier Wattman grade 1, de 6 mm de diamètre (1 disque/boîte) sont stérilisés, puis déposés sur la gélose séchée, inoculée au préalable avec les suspensions fongiques. Ensuite ces disques sont chargés des volumes croissants des HE utilisés (10, 20, 40, 60 et 80 µl) à l'aide d'une micropipette. Pour chacun de ces volumes, trois répétitions (sur boîtes de Pétri) sont réalisées pour minimiser l'erreur expérimentale.

Les boîtes de Pétri destinées à l'essai sont maintenues à 4°C pendant 2h, pour s'assurer d'une bonne diffusion des huiles essentielles dans le milieu de culture.

Parallèlement trois boîtes de témoins positifs, contenant des disques imbibés de l'imazalil sont utilisées.

Cinq boîtes témoins, ne contenant que des disques vides déposés sur la gélose, ont étéensemencées par la suspension de chaque champignon. Ceci nous permettra de comparer la croissance et le développement des champignons en présence et en absence des huiles essentielles testés.

Les boîtes de Pétri ont été incubées à 26°C pendant 14 jours, jusqu'à ce que la croissance des champignons dans les boîtes de contrôle atteigne les bords des boîtes.

Après l'incubation, l'absence de la croissance mycélienne se traduit par un halo translucide autour du disque, identique à la gélose stérile, dont le diamètre est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse (y compris le diamètre de disque de 6mm).

Dans la littérature relative aux huiles essentielles, les résultats de l'aromatogramme sont exprimés exclusivement à partir de la mesure du diamètre des halos d'inhibitions en mm

ou cm) (Baser et Buchbauer, 2010), chaque diamètre est représenté par la moyenne de deux mesures ou plus, comme la montre la figure 13 :



Ensemencement de la suspension fongique

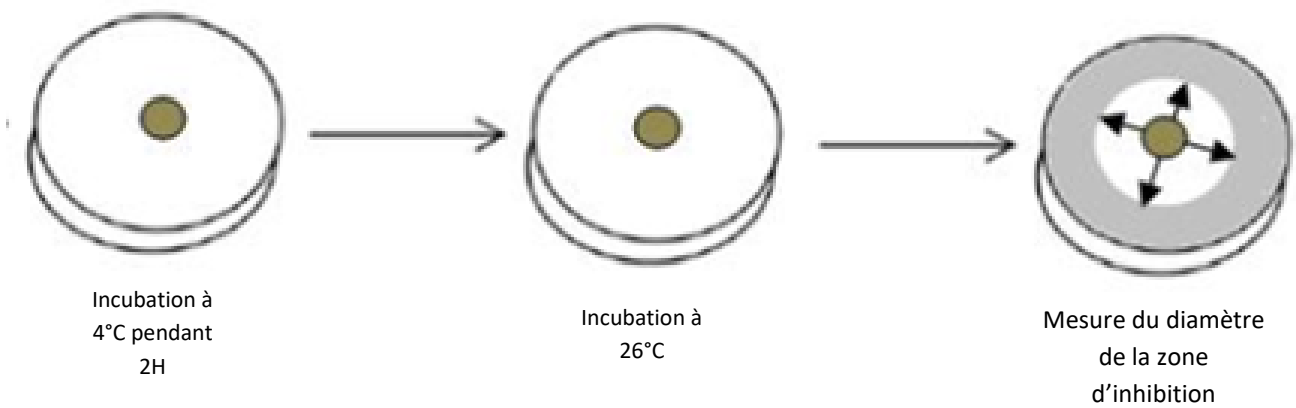


Figure 13 : Effet des huiles essentielles sur la croissance mycélienne des champignons

V. CALCUL DES CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES

La concentration minimale inhibitrice, ou CMI correspond à la plus faible concentration en huiles essentielles capables d'inhiber la croissance microbienne.

La technique utilisée dans la détermination des concentrations minimales inhibitrices des huiles essentielles à été largement utilisée (Remmal, 1993 ; satrani et *al.*, 2001) . Du fait de la non-miscibilité des huiles essentielles dans l'eau et donc, au milieu de culture, une mise en émulsion à été réalisée grâce à une solution d'agar 0.2%. Celle-ci, permet d'assurer une répartition homogène des huiles essentielles dans le milieu et d'augmenter au maximum le contact "germe /composé". Les dilutions des huiles essentielles utilisées sont (1/10, 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/300(v/v)).

Dans des tubes à essai contenant chacun 13,5ml du milieu de culture PDA (*Potato Dextrose Agar*), stérilisés au préalable à l'autoclave, pendant 20 min à 121°C et refroidis à 45°C, nous avons ajouté aseptiquement (figure 14) un volume de 1,5ml de chacune des dilutions de façon à obtenir les concentrations finales qui sont de 1 /100 ,1/250 ,1/500 ,1/1000 ,1/2000, 1/3000(v/v). Une agitation des tubes à été utilisé afin de bien disperser les huiles essentielles dans le milieu de culture, avant de les couler dans les boites de pétri.

Des témoins, contenant le milieu de culture et la solution d'agar 0,2% seule, sont également préparés. L'ensemencement se fait par dépôt de fragments de 6 mm de diamètre, prélevés à partir d'un tapis mycélien des deux champignons testés. L'incubation est ainsi, effectuée à 25°c pendant 7 jours. Chacun des essais est répété 3 fois.

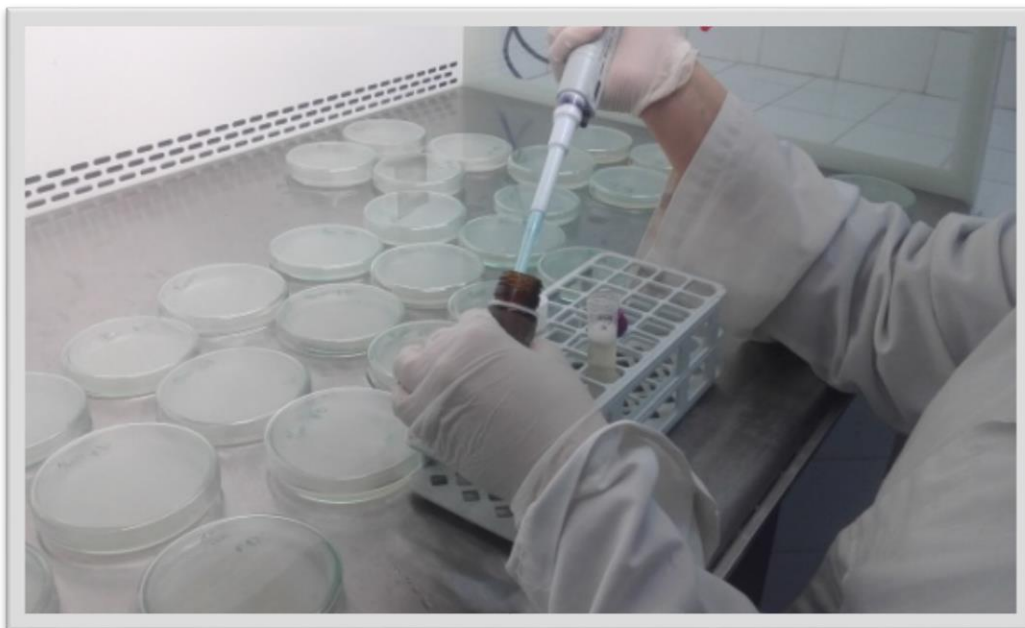


Figure 14 : Détermination des concentrations minimales inhibitrices des HE

Afin de déterminer la nature de l'effet antifongique testé (fongistatique ou fongicide), nous avons repiqué les disques du champignon n'ayant montré aucune croissance, en présence des huiles essentielles, sur un nouveau milieu PDA (sans huiles essentielles). Après une période d'incubation de neuf jours à 25 °C, l'absence d'une reprise de croissance de l'agent pathogène, témoigne d'un effet fongicide de la plante étudiée. Par contre, le développement du champignon, témoigne d'un effet fongistatique des huiles essentielles utilisées.

VI. SCREENING IN VIVO DES HUILES ESSENTIELLES

L'activité antifongique, *in vivo* des huiles essentielles étudiées, a été testée sur les mêmes souches utilisées *in vitro* (*Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*). Ainsi Les suspensions fongiques correspondant aux deux souches, ont été préparées dans les mêmes conditions et suivant le même protocole que dans l'essai *in vitro*.

1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé *in vivo* est constitué de fruits d'agrumes, non traités au préalable, et sélectionnés sur la base du même calibre de la variété Navel (figure15).



Figure 15 : Fruits d'agrumes non traités

2. Préparation des dilutions des huiles essentielles

Afin d'étudier l'efficacité *in vivo* des huiles essentielles des plantes aromatiques et médicinales étudiés, nous avons préparé une gamme de dilutions de six concentrations, allant de 100 ppm à 3000 ppm (100 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 2000 ppm, et 3000 ppm) pour chacune des HE étudiées.

La préparation des dilutions consiste en l'ajout des différentes doses des huiles essentielles à l'eau distillée stérile et avec 0.2% de tween 20, afin de garantir la miscibilité des HE. L'ensemble est soumis à une agitation magnétique pendant 10 min pour l'obtention d'un mélange homogène.

Le produit chimique testé l'imazalil (80%) a été utilisé comme contrôle positif à une dilution de concentration de 1000 ppm (dose prescrite : 0,1 l/100 l d'eau) semblable, à celle utilisée dans les stations de conditionnements.

Afin d'évaluer l'activité antifongique des huiles essentielles *in vivo* des deux champignons testés, *Penicillium digitatum* et *penicillium italicum*, nous avons adopté le protocole suivant :

-Préparation du matériel végétal

Après trempage des fruits dans une solution d'eau de javel (10%), un rinçage trois fois à l'eau distillée a été effectué. Les fruits bien séchés ont été blessés à l'aide d'un emporte-pièce à 5 mm de largeur à raison de 2 blessures par fruit

-Traitement

Le traitement des fruits a été réalisé, en utilisant la technique de pulvérisations avec les différentes dilutions des HE.

Le contrôle positif (T+ : Imazalil 80%) est traité par pulvérisation.

Concernant le contrôle négatif, nous avons opté pour deux témoins :

Te : Témoin traité avec de l'eau distillée stérile

Tw : Témoin traité avec de l'eau distillée stérile mélangée avec 0,2 % de Tween 20, afin de s'assurer que celui-ci n'a aucun effet sur le développement des deux champignons étudiés.

Pour chacun de ces traitements, cinq répétitions ont été réalisées pour essayer de minimiser au maximum l'erreur expérimentale.

-Inoculation et Incubation

Pour tester l'effet antifongique in vivo des HE sur la croissance mycélienne des champignons, un volume de 20 µl de chaque suspension a été injecté dans chaque blessure, puis chaque fruit inoculé de suspension fongique a été déposé sur du papier filtre, dans une boîte plastique préalablement, désinfectée avec de l'alcool à 70°. Après humectation à l'eau distillée (environ 2ml), les boîtes sont déposées à une température de 25° (figure 16)

Après quatre jours d'incubation, le diamètre de la lésion issue de chaque blessure a été mesuré, à l'aide d'un pied à coulisse (en mm), pendant une semaine. Et ceci pour définir le diamètre de la zone d'inhibition.



Désinfection des fruits



a



b

Figure 16 : Étapes suivies dans le traitement des oranges, Inoculation de la suspension fongique
(a) Induction de blessure des fruits (b)

3. Analyses statistiques

Les traitements statistiques des résultats obtenus ont été réalisés au moyen du logiciel statistique SPSS 20.

L'analyse de la variance à une seule dimension (prenant en considération la nature des HE testés,) a été réalisée .En cas d'effet significatif, au seuil de 5%, un classement des moyennes est effectué par le test de Newman-Keuls

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. EVALUATION DES NIVEAUX D'INFECTION DES FRUITS D'AGRUMES

L'évaluation des niveaux de contamination des fruits, provenant du champ a été réalisée par la détection de l'apparition des symptômes de la maladie sur les fruits collectés, la comparaison avec des symptômes, après inoculation artificielle, par les deux champignons *P. italicum* et *P. digitatum* a été réalisée.

Les résultats obtenus nous ont permis de montrer l'existence d'un niveau du taux d'infection de l'ordre de 16.6% par la pourriture bleue. Celui-ci, se montre plus élevé que le taux d'infection de la pourriture verte, qui est de 15%. Ceci donne un total de 31.6% pour les maladies à *Penicillium* en général.

La contamination observée peut être expliquée d'une part, par une contamination de la surface des fruits par les spores des deux espèces de champignons, au niveau du champ associée aux blessures des fruits causées au moment de la cueillette, ou de la contamination des caisses de stockages, comme elle peut être issue de l'infection de l'aire de réception de la station de conditionnement lors de l'arrivage des fruits.

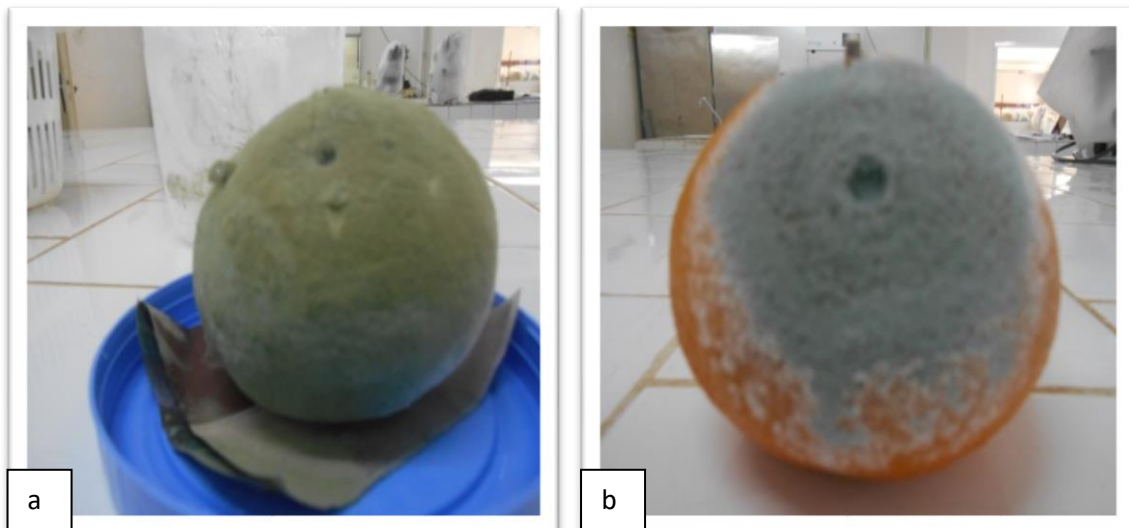


Figure 17 : Aspect des fruits présentant des symptômes d'infection par la pourriture bleue (b) et verte(a)

1. Isolement de la flore microbienne

À partir des échantillons de fruits présentant des symptômes d'infection, nous avons pu isoler des souches pures d'agents pathogènes responsables des maladies de fruit en post-récolte. Ainsi, deux souches d'aspects macroscopiques différents, ont été mises en évidence : une souche avec des colonies vertes et une autre avec des colonies de couleur bleues. Ces deux souches obtenues sont observés au microscope afin de déterminer leur appartenance spécifique.

2. Observation microscopique

L'observation microscopique nous a permis d'identifier deux espèces appartenant au même genre, mais présentant des différences microscopiques.

La Souche ayant un aspect macroscopique des colonies de couleur verte, présente un mycélium composé d'hyphes ramifiés, sur lequel se développent des conidiophores courts et abondants, portant ainsi des phialides peu nombreux et produisant des conidies de forme arrondie.

En comparant ces informations descriptives recueillis des deux souches avec celles mentionnés dans la clé d'identification des champignons, nous avons pu confirmer que la souche décrite correspond au champignon *penicillium digitatum* (Figure 18)

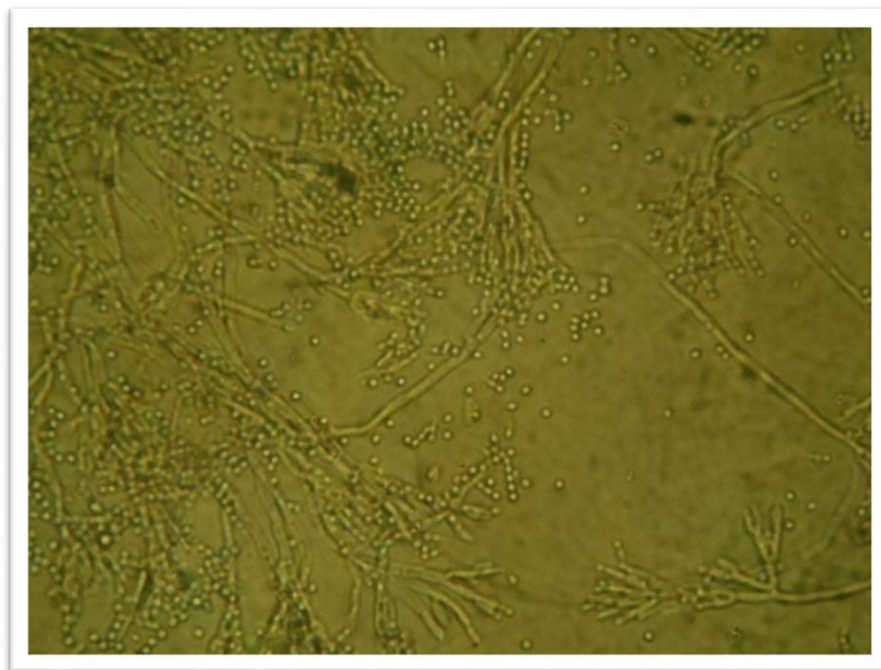


Figure 18 : Spores et mycélium de *Penicillium digitatum* (GX40)

La Souche a un aspect macroscopique de colonies de couleur bleuâtre, et un appareil conidial sous forme de pinceau asymétrique. Les conidiophores sont lisses et caractérisés par un pinceau, constitué par un axe principal qui se divise en plusieurs branches, donnant ainsi des phialides peu nombreux. Les phialides sont de forme cylindrique et se terminent par un long col de même forme. Quant aux conidies, ils sont cylindriques, mais s'élargissent lors de la maturation pour former des ellipses avec de petits cylindres.

En utilisant la clé d'identification, nous avons pu confirmer que cette deuxième souche correspond au champignon *Penicillium italicum* (figure 19).

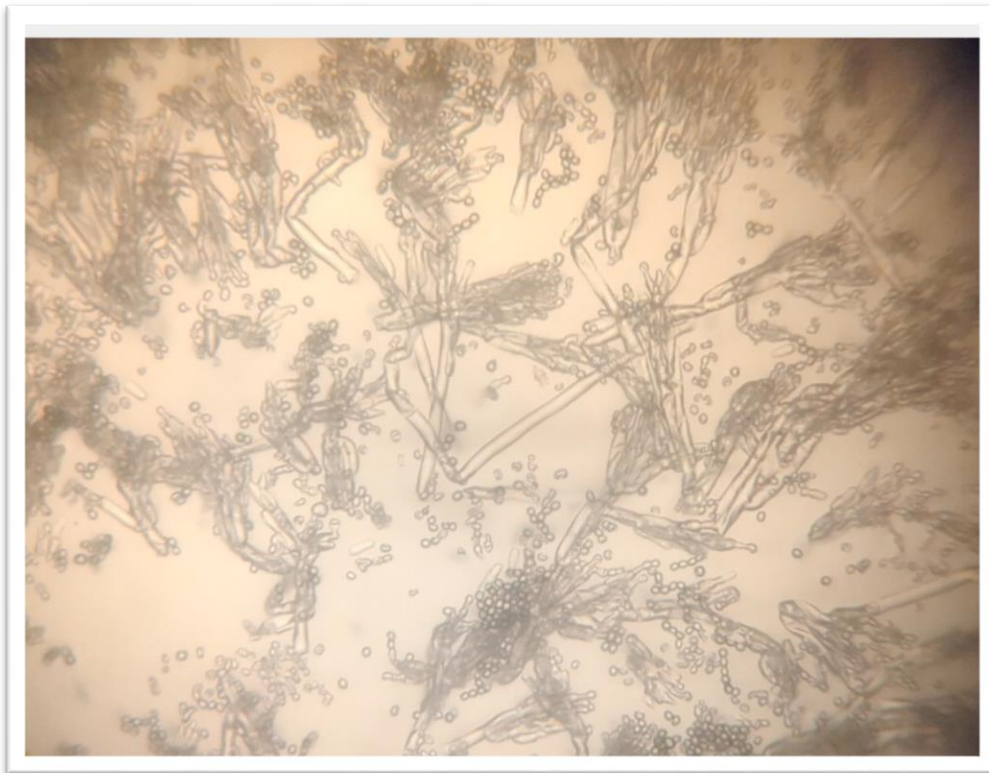


Figure 19 : Spores et mycélium de *Penicillium italicum* (GX40)

Bien qu'elles appartiennent au même genre, l'observation des deux souches (1 et 2) a révélé la présence des différences morphologiques qui les distinguent, permettant ainsi, de confirmer que le champignon *Penicillium digitatum* est responsable de la pourriture verte, et que le champignon *Penicillium italicum* est l'agent causal de la pourriture bleue.

Le taux d'infection des fruits collectés par ces deux champignons dans les stations de conditionnement, est de l'ordre de 31,6%.

La différence existante au niveau des contaminations relatives aux deux champignons, se montre relativement faible, elle est de l'ordre de 16% pour la pourriture bleue et 15% pour la pourriture verte.

II. DETERMINATION DU RENDEMENT DES HUILES ESSENTIELLES

Les rendements des huiles essentielles obtenues des quatre plantes aromatiques et médicinales étudiées sont représentés sur la figure ci-dessous :

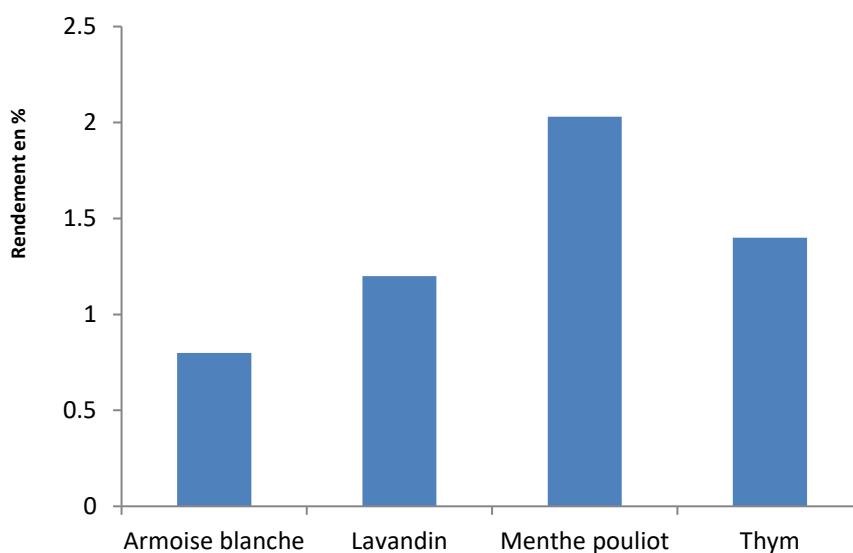


Figure 20 : Rendement des huiles essentielles des quatre PAM étudiées

De ces résultats, il ressort que 2.03% est le rendement de la *Mentha pulegium*, étant le plus élevé, suivi de celui des trois plantes aromatiques et médicinales restantes : 1,40 %, 1,2%, 0,8% respectivement pour *thymus vulgaris*, *Lavandula hybrida*, d'*Artemisia herba alba* (figure 20).

Le rendement obtenu en huiles essentielles, semble dépendre de nombreux facteurs, dont le stade de développement de la plante étudiée, les conditions pédoclimatiques de la station de récolte, la technique d'extraction, ou autres.

Les résultats obtenus sont en désaccord avec ceux obtenus par de nombreux auteurs. Ainsi, selon Idrissi (2007) le rendement en huiles essentielles de la même espèce du Thym peut atteindre 3.17%. Dans le même sens, il a été montré que le rendement en huiles essentielles de la menthe pouliot varie entre 2.33 et 3.25%.

Certains auteurs (Khia et *al.*, 2014) ont pu souligner que les facteurs pédoclimatiques de la région d'étude et l'âge de la plante sont d'une grande influence sur le rendement en huile essentielle du romarin.

Les résultats obtenus pour le rendement en huiles essentielles d'*Artemisia herba alba* au Maroc (Ghanmi et *al.*, 2010) et plus particulièrement dans la région de Guerssif, ont montré que le taux des huiles essentielles, varie en fonction de la date de récolte. Ainsi, il est de l'ordre de 0.86% au mois de mars et de 1.23% au mois de juin.

De même Chericoni (2004) avait montré que le rendement d'*Artemisia verlotiorum* est de l'ordre de 0.6% pour des échantillons récoltés au mois d'avril est de 0.1% pour les récoltes du mois de janvier.

III . ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE DES HUILES ESSENTIELLES

1. Composition chimique des huiles essentielles de *T. vulgaris*

Les huiles essentielles de *Thymus vulgaris* ont été analysées en utilisant la chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à une spectrométrie de masse (SM), on en distingue 24 composés identifiés et caractérisés, ils sont présentés dans le tableau ci-dessous. Les constituants majoritaires sont le Thymol (41.39%), le Gamma terpinène (22.25%) et la p-cymène (15.59%). Les pics de ces derniers sont présentés dans la figure 21.

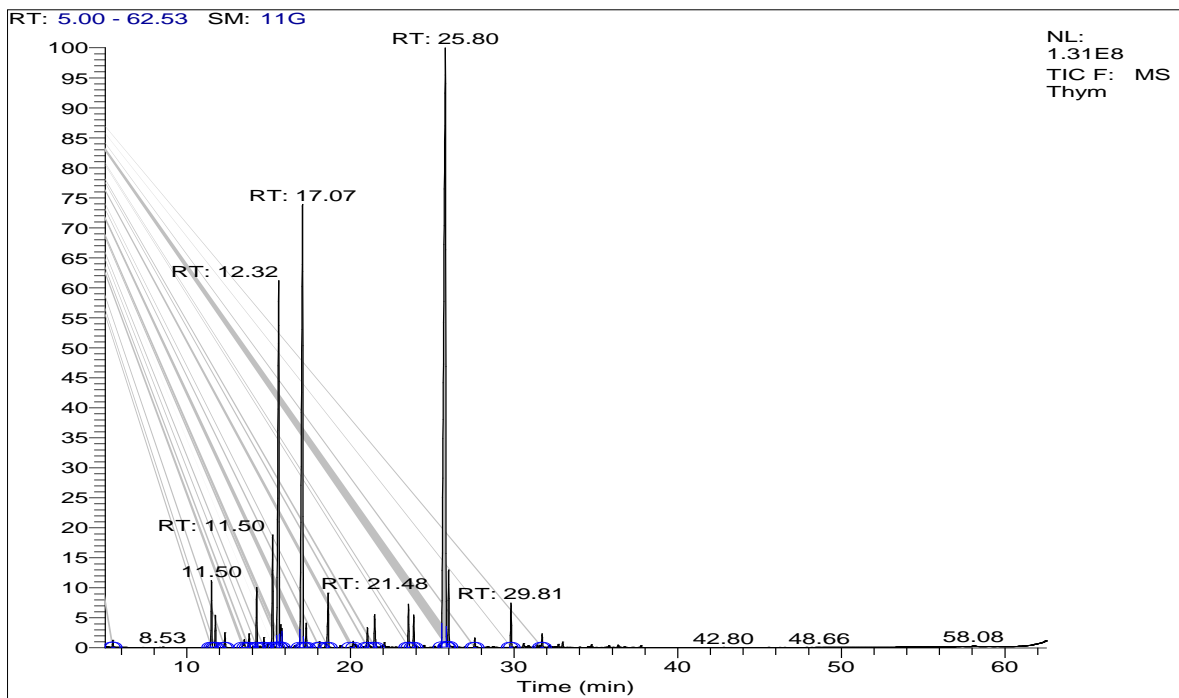


Figure 21 : Chromatogramme des HE de *Thymus vulgaris*

Les résultats obtenus montrent des variations qualitatives et quantitatives dans la composition chimique, en comparaison à celles obtenues par certains chercheurs (Özcan et Chalchat, 2004), travaillant sur la même espèce. Ainsi, les composants majoritaires sont le thymol (46,2%), l'alpha terpinène (14,1 %), le p-cymène (9,9 %), l'alphapinene (3,0 %) et le carvacrol (2,06 %). Ceci peut être expliqué par l'existence de différentes familles chimiques ou chémotypes de *Thymus vulgaris* : à thymol, carvacrol, linalol, thuyanol, alpha terpinéol, géraniol, et paracymène.

La composition chimique des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* est présentée dans le tableau 4 :

Tableau 4 : Composition chimique des huiles essentielles de *Thymus vulgaris*

Temps de Rétention (min)	Composé	Valeur Indicative %
5.48	Methyl 2-methylbutanoate	0.18
11.50	Alpha thujène	1.76
11.74	Alpha pinène	0.85
12.32	Camphène	0.40
13.51	Sabinène	0.33
13.81	2-hexen-1-ol 2-ethyl	0.41
14.27	Béta pinène	1.63
14.70	Alpha phellandrène	0.28
15.24	Alpha terpinène	3.25
15.61	p-cymène	15.59
17.07	Gamma terpinène	22.25
17.30	p-menth-2-en-1-ol	0.65
18.10	Terpinolène	0.16
18.63	Linalool	1.79
20.16	Camphre	0.24
21.04	Bornéol	0.65
21.48	4-terpinéol	1.15
23.54	Thymol methyl ether	1.18
23.86	2-isopropyl-4-methylanisole	0.88
25.80	Thymol	41.39
26.00	Carvacrol	2.06
27.60	Isothymol	0.27
29.81	Caryophyllène	1.30
31.71	Germacrène D	0.40

2. Composition chimique des huiles essentielles de *M. pulegium*

Les résultats obtenus des analyses chromatographiques montrent que la pulegone (78.98 %) est le constituant majoritaire des huiles essentielles de *M. pulegium* (elle présente une large bande dans la figure 22, ce qui justifie l'appellation Menthe à pulegone. Ces résultats semblent en accord avec ceux obtenus par certains chercheurs (Lorenzo et *al.*, 2002), ayant affirmé une composition chimique des huiles essentielles de *Mentha pulegium* dominée par la pulegone (73.4%).

De même, d'autres travaux ont montré que la composition chimique des HE de la même espèce et caractérisée par la présence de la pulegone à des taux variant entre 44,27 et 61,11 % (Ouraini et *al.*, 2007 ; Chebli et *al.*, 2003). La composition chimique des HE de *Mentha pulegium* est donnée dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5 : Composition chimiques des HE de *M.pulegium*, temps de rétention et leur valeur indicative

Temps de Rétention (min)	Composé	Valeur Indicative %
8.30	α -Pinène	0.17
9.74	Sabinene	0.11
11.65	Limonene	1.63
16.50	p-Menthone	5.24
17.35	Neomenthyl acetate	0.53
19.47	Pulegone	78.98
21.47	3-p-Menthene	1.75
21.47	Carene	1.75
26.08	α -Caryophyllene	2.33
26.91	Germacrene-D	0.42

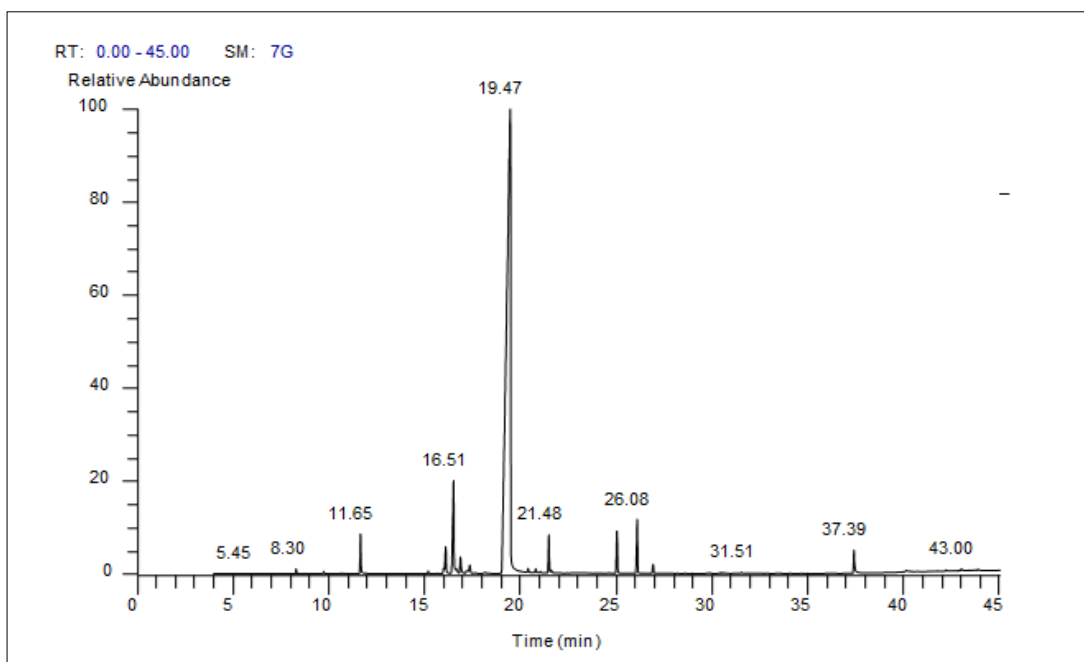


Figure 22 : Chromatogramme des huiles essentielles de *Mentha pulegium*

3. Composition chimique des huiles essentielle d'*Artémisia herba alba*

Les huiles essentielles d'*A. herba alba* est composée principalement de davanone (62,20%) accompagné d'autres constituants à des teneurs relativement faibles (tableau6) : carvacrol (4,88%), davana ethère (3,62%), camphore (3,48%), eucalyptol (2,24%).

Nos résultats sont en désaccord avec ceux obtenus en Tunisie pour la même espèce (Akrouf et *al.*, 2004) . Ces derniers ont montré que la composition chimique des huiles essentielles de cette espèce est dominée par l' α -thujone (43,85 %), le trans-acétate de sabinyle (17,46 %) et la β -thujone (10,10 %) accompagné du 1,8-cinéole (3,30 %), du chrysanthénone (2,32 %) et de l'acétate de chrysanthényle (3,93 %). Alors que le davanone est considéré comme le constituant majeur des HE d'*A. herba alba*, provenant du Maroc et de l'Espagne (Salido et *al.*, 2004).

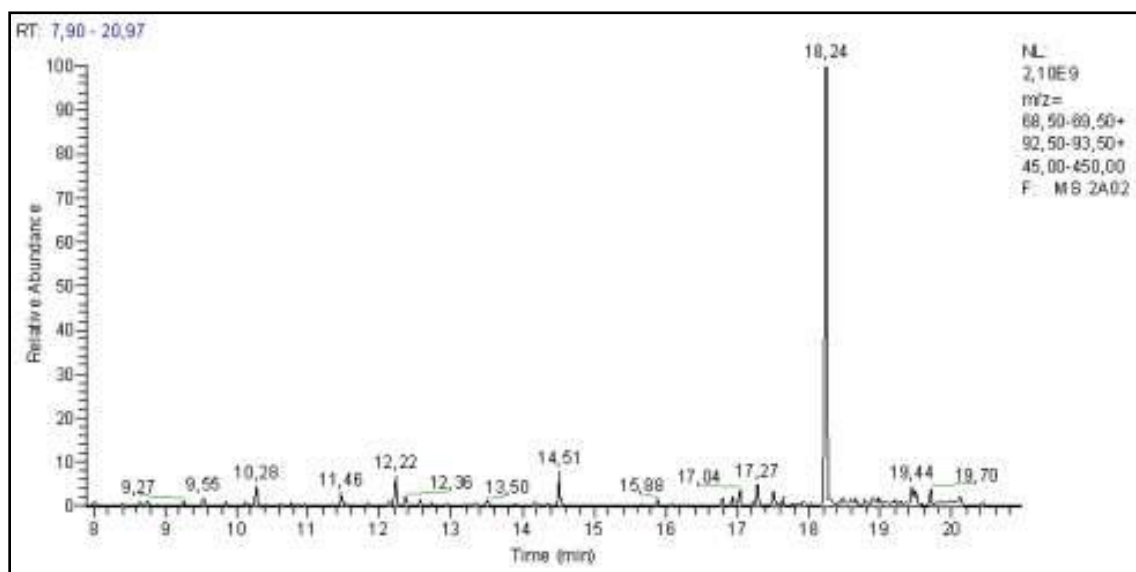


Figure 23 : Profil chromatographique des H.E d'*Artémisia herba alba*

Les variations rencontrées dans la composition chimique des huiles essentielles, peuvent être liées à de nombreux facteurs, dont l'écologie de la plante, la partie de la plante utilisée, l'âge de la plante et la période du cycle végétatif, ou même les facteurs génétiques (Thompson et *al.*, 2003).

Tableau 6 : Composant chimiques des HE d'*Artémisia herba alba*

Temps de retention (min)	composé	Valeur indicative %
9,27	β -Pinene	0,46
9,54	Myrcene	0,84
10,28	EucalyptoL	2,24
11,46	Linalool	1,61
12,22	Camphor	3,48
14,51	Carvacrol	4,88
16,79	Davanone isomer + impureté	0,81
17,03	Davana ether + Germacrene D	2,20
17,28	Davana ether + Germacrene D	3,62
17,51	Davana ether	1,80
18,24	Davanone	62,20
19,43	Davanone isomer	2,50

4. Composition chimique des huiles essentielles de *lavandula hybrida*

Les résultats de l'analyse chromatographique par CPG et CPG/SM de l'huile essentielle de *lavandula hybrida* sont consignés dans le tableau 7. Au total 23 constituants, représentant plus de 90,6% de la composition globale de l'huile essentielle. Les principaux constituants majoritaires qui caractérisent cette huile essentielle sont les composés phénoliques, dont le linalool est le composé majoritaire 29%.

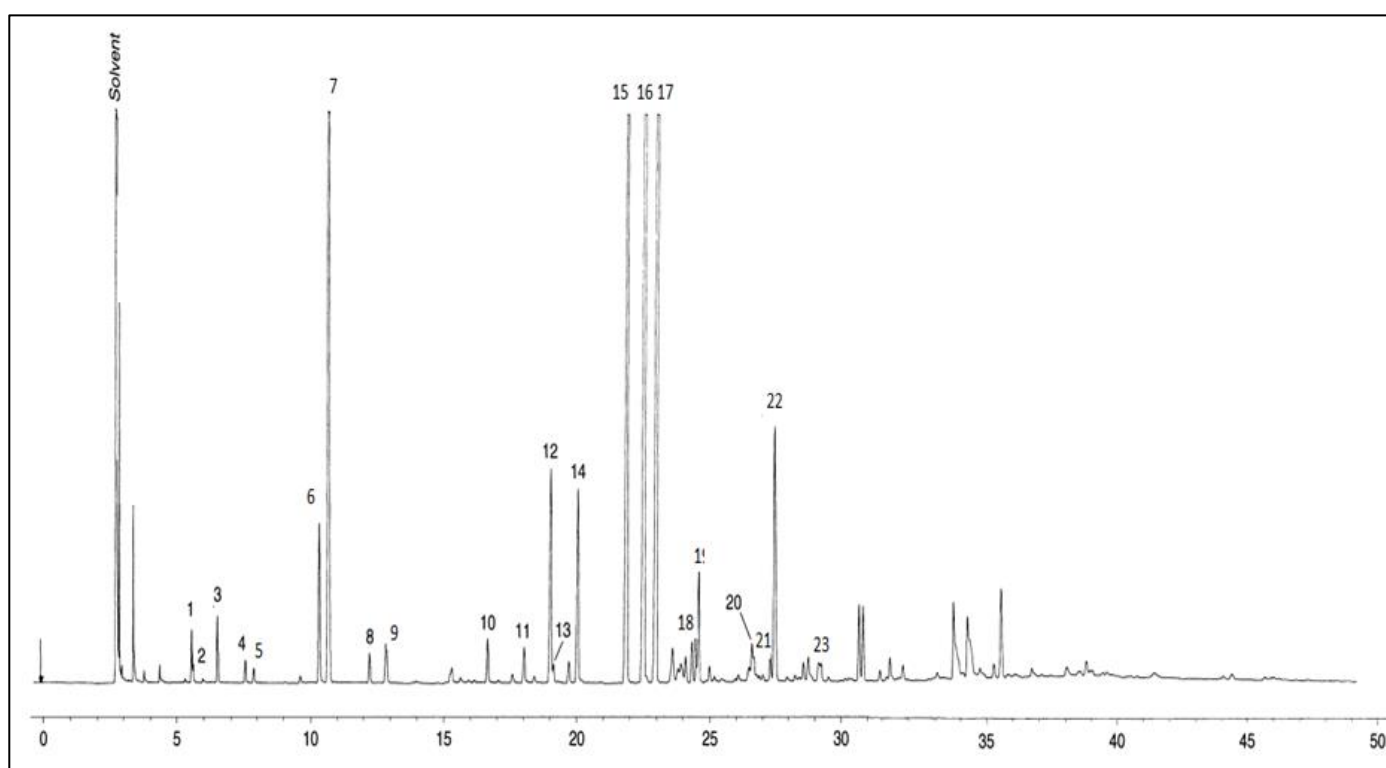


Figure 24 : Profil chromatographique des HE de *lavandula hybrida*

Tableau 7 : Composant chimiques des HE *de lavandula hybrida*

<i>RT</i>	<i>composés</i>	<i>Valeur inductive %</i>
1	α -Pinene	0.41
2	α -Thujene	0.12
3	Camphene	0.57
4	β -Pinene	0.2
5	Sabinene	0.17
6	Limonene	1.71
7	1,8-Cineole	12.36
8	(E)- β -Ocimene	0.29
9	<i>p</i> -Cymene	0.61
10	1-Octenyl-3-acetate	0.52
11	Hexyle butyrate	0.39
12	Trans-Linalool oxide	2.6
13	1-Octen-3-ol	0.22
14	Cis-Linalool oxide	2.3
15	Camphor	13.5
16	Linalool	29
17	Linalyl acetate	23.9
18	Terpinen-4-ol	0.16
19	β -Caryphellene	1.36
20	Lavondululol	0.42
21	α -Terpineol	0.31
22	Borneol	3.62
23	Geranyl acetate	0.05

IV. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE IN VITRO

1. *Artémisia herba alba*

a. *Penicillium italicum*

Pour étudier la sensibilité du champignon *P. italicum* vis-à-vis des huiles essentielles d'*Artemisia herba alba* utilisée à différentes concentrations, nous avons choisi la méthode d'aromatogramme.

Les résultats obtenus sont exprimés par des zones d'inhibition provoquées par les huiles essentielles testées, en comparaison avec celles générées par le traitement chimique "Imazalil" appelé témoin positif et ceci comme le montre les images de la figure 24.

Nous avons remarqué que les huiles essentielles testées, ont pu inhiber la sporulation du champignon par rapport au témoin positif (Imazalil) et ceci, quelque soit la dose utilisée. Ainsi, les zones d'inhibition associées aux concentrations 10 et 20 μ l sont clairement plus faibles que celles obtenues pour les autres concentrations 40, 60 et 80 μ l.

La lecture des résultats obtenus montre donc que le champignon *P. italicum* se montre sensible aux HE utilisées à faibles doses (10 et 20 μ l). Les halos d'inhibition obtenus sont de diamètres de 1cm et 2.1 cm respectivement. Par contre, utilisées à fortes concentrations nous (40, 60 et 80 μ l), les HE ont induit des halos d'inhibitions plus importants de 3.1, 5 et 6.8cm respectivement.

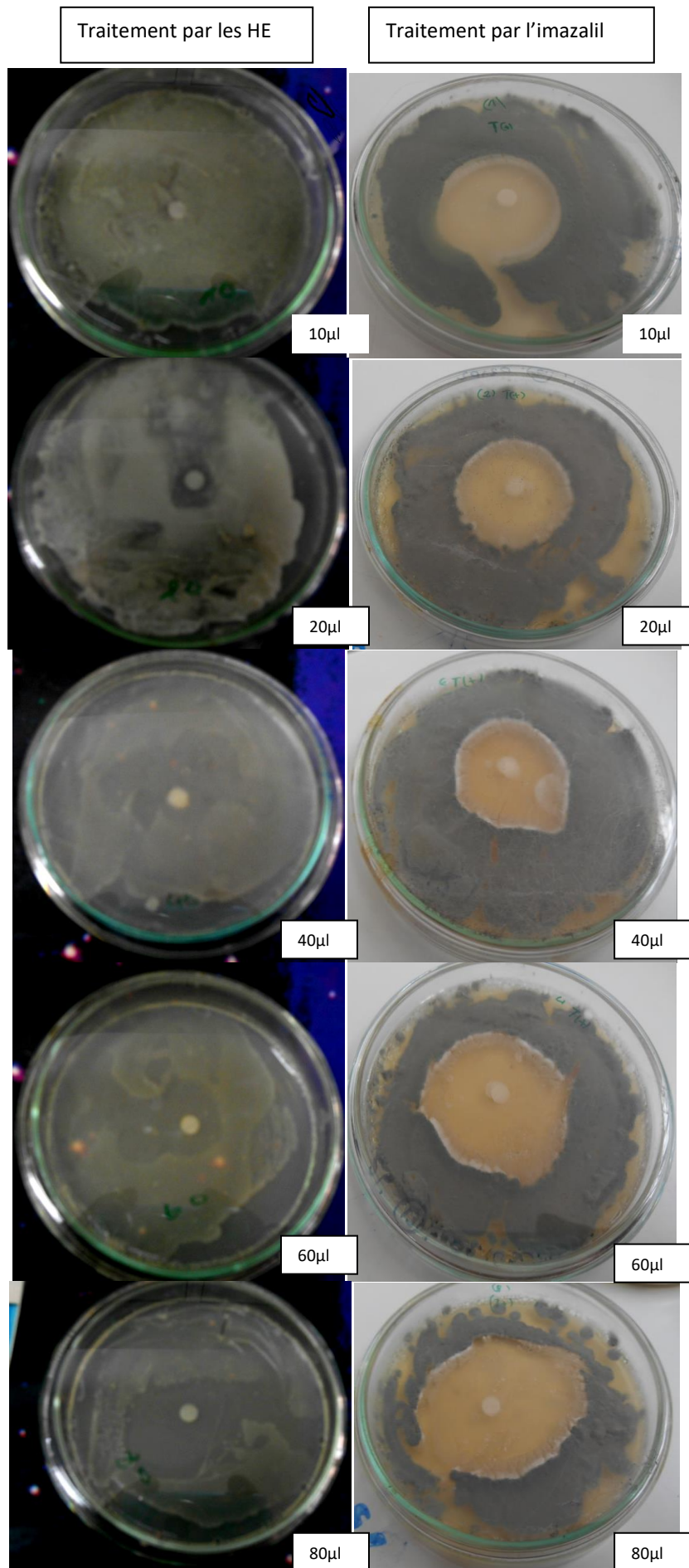


Figure 25 : Zones d'inhibition provoquées par les huiles essentielles d'*Artemisia herba alba* (gauche) et par l'Imazalil (droite) à différentes concentrations sur la croissance mycélienne de *P.Italicum*

Les résultats obtenus sur l'inhibition de la croissance mycelienne du champignon *Penicillium italicum* par les deux produits utilisés : HE d'*Artémisia herba alba* et l'Imazalil sont représentés sur la figure ci-dessous. Ces résultats montrent que la zone d'inhibition augmente avec l'augmentation de la concentration du produit utilisé. Et ceci, aussi bien pour les HE que pour le témoin positif (Imazalil).

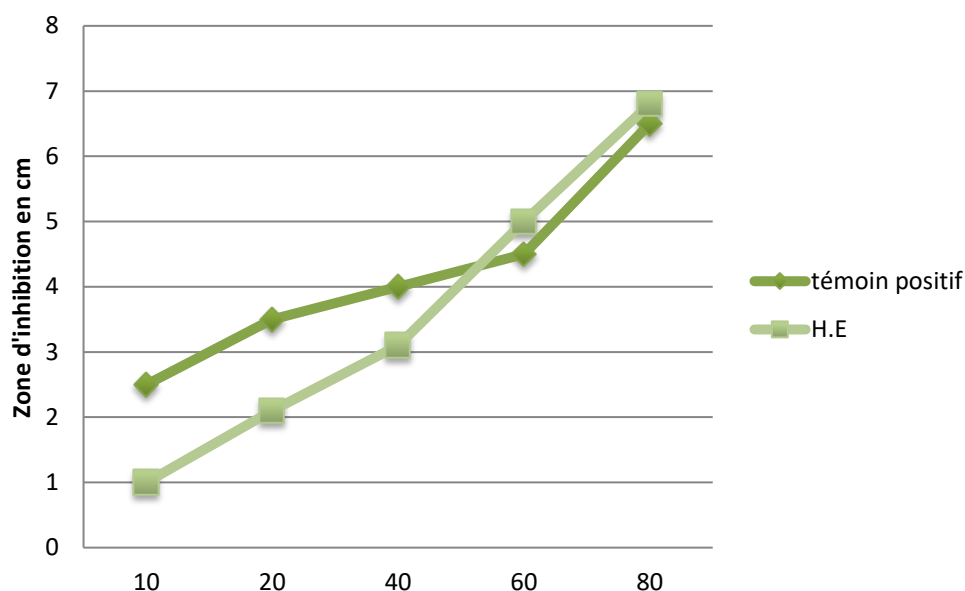


Figure 26 : Développement des zones d'inhibition provoquées par les huiles essentielles d'*Artemisia herba alba* et traitement par imazalil à différentes concentrations sur *P. Italicum*

L'étude comparative des deux courbes d'évolution de la zone d'inhibition de la croissance mycelienne, induite par les deux produits (HE, Imazalil), montre qu'à forte concentration ($\geq 60 \mu\text{l}$), l'effet des huiles essentielles dépasse celui de l'imazalil (témoin positif) .

Il est à noter que les deux suspensions utilisées (les HE d'*Artémisia herba alba*, imazalil) à la forte concentration $80 \mu\text{l}$, montrent un effet inhibiteur très efficace sur la croissance du champignon *P. italicum*. Le diamètre de la zone d'inhibition passe de 5 cm à 6.8 cm.

b. Penicillium digitatum

Les résultats relatifs à la croissance fongique de *Penicillium digitatum* (figure 27), nous ont permis de constater une action antifongique des huiles essentielles d'*Artemisia herba alba* utilisée, et ceci quelque soit la concentration testée. En effet, utilisée à forte dose ($80 \mu\text{l}$),

les huiles essentielles ont inhibé complètement la croissance du champignon *Penicillium digitatum*.

Contrairement au produit chimique testé (l'imazalil) dont la zone d'inhibition n'est pas à 100 %. Dans cette partie d'étude, nous pouvons avancer que les huiles essentielles d'*Artémisia herba alba* peuvent être utilisées comme moyens alternatifs à la lutte chimique contre la pourriture du champignon *penicillium digitatum*. En effet, quelque soit la concentration utilisée des deux produits (HE, Imazalil), l'effet inhibiteur des huiles essentielles dépasse celui de l'imazalil.

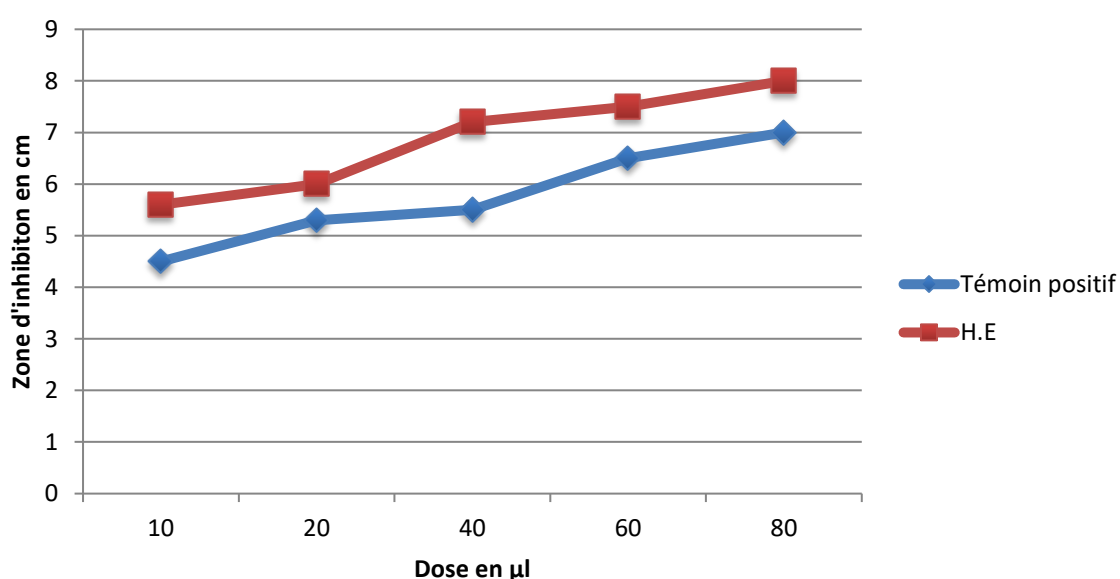


Figure 27 : Variation des zones d'inhibitions en fonction de différentes doses utilisées des deux substances testées (*Artémisia herba alba*, Imazalil)

Les représentations graphiques relatives à la comparaison des effets des deux produits utilisés (HE et Imazalil) sur la croissance mycelienne du champignon *Penicillium digitatum*, nous ont permis de montrer que le traitement par les huiles essentielles d'*Artemisia herba alba* est nettement efficace par rapport au témoin positif pour toute les doses (figure 27). Le diamètre des zones d'inhibitions de la croissance mycelienne est plus importante pour les HE que celles induites par l'imazalil. Et ceci quelque soit la concentration utilisée

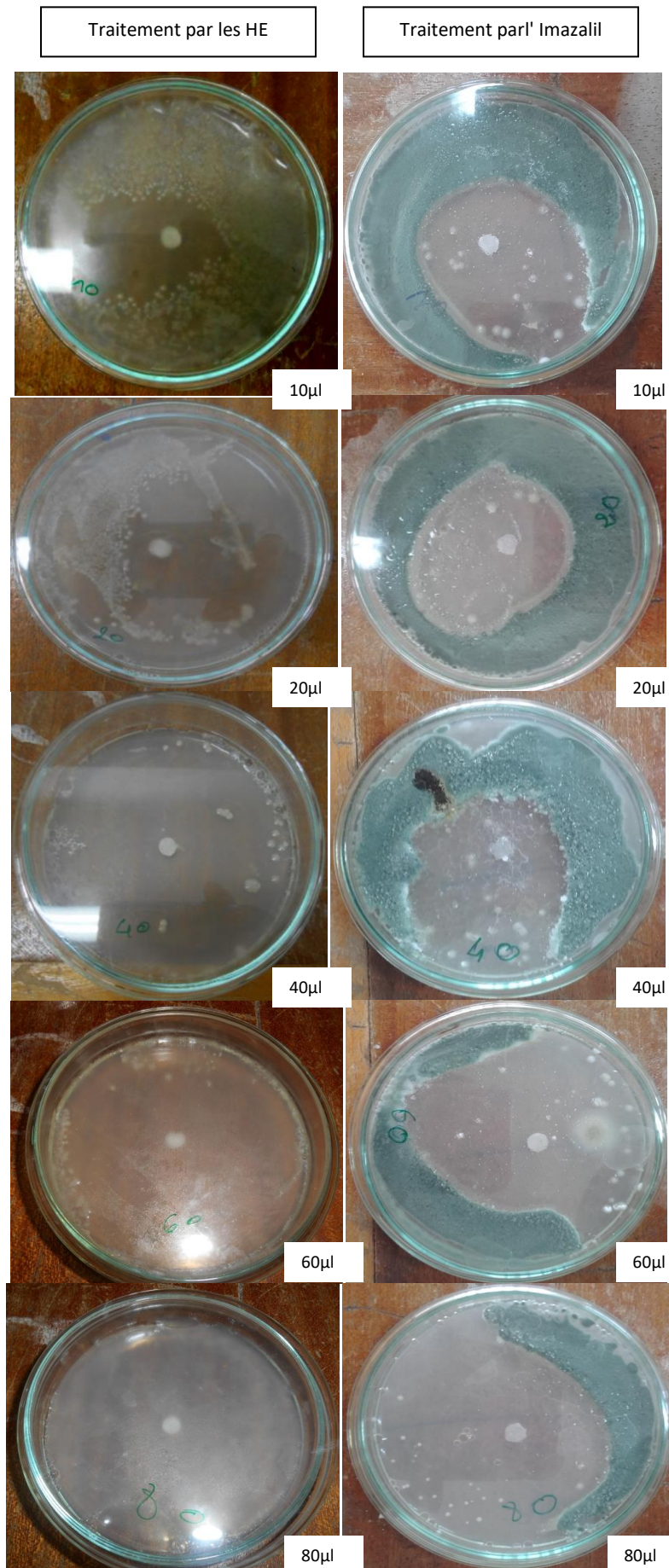


Figure 28 : Comparaison entre les zones d'inhibition provoquées par les huiles essentielles d'*Artemisia herba alba* et l'Imazalil à différentes doses sur la croissance mycélienne de *P. digitatum*

Nous avons pu montrer que quelque soit la concentration utilisée des HE testées, celle-ci, présente une activité antifongique relative sur la croissance des champignons. Cet effet, peut être expliqué par la nature de la composition chimique de ces substances végétales et plus particulièrement, par la présence des composés phénoliques et terpeniques de la plante testée. Ceci est en accord avec les travaux de Valnet (2005) ayant montré que les composés chimiques présentant un effet antifongique et antibactérien à large spectre sont les phénols, les aldéhydes, les alcools et les cétones terpéniques. Les meilleures activités ont été observées pour les huiles essentielles du thym, d'origan, de clous de girofle, d'*armoise blanche*. Celles-ci, sont toutes riches en composés phénoliques (thymol, carvacrol et eugénol).

2. *Lavandula hybrida*

a. *Penicillium italicum*

Les résultats relatifs à l'effet antifongique "in vitro" des huiles essentielles de *lavandula hybrida* sur la croissance du champignon *Penicillium italicum* est illustré dans la figure 29.

Les résultats nous ont permis de souligner que le champignon *P.italicum* est sensible aux faibles doses de 10 et 20 µl avec des diamètres de 1.8 et 2.5 cm respectivement. Alors que celui-ci, s'est montré extrêmement sensible aux fortes doses de 40, 60 ,80 µl avec les diamètres de 3 ; 4.8 ; 6.8 cm respectivement. Nous avons pu montrer que les deux substances utilisées (les HE et l'imazalil) ont un effet inhibiteur sur la croissance mycelienne de *P.italicum*. Cet effet, varie en fonction de la concentration utilisée. Plus la concentration augmente, plus le diamètre des zones d'inhibition du champignon est important, et ceci, aussi bien pour les HE que l'imazalil.

Le profil évolutif du diamètre des zones d'inhibitions relatives aux deux substances utilisées sont représentés sur la figure 30. Cette représentation graphique nous permet de souligner l'importance de l'effet de l'imazalil par rapport à celui des HE utilisées, et ceci, pour toutes les concentrations testés. Nous avons pu montrer qu'au delà de la concentration 40µl des huiles essentielles le diamètre de la zone d'inhibition deviennent plus important.

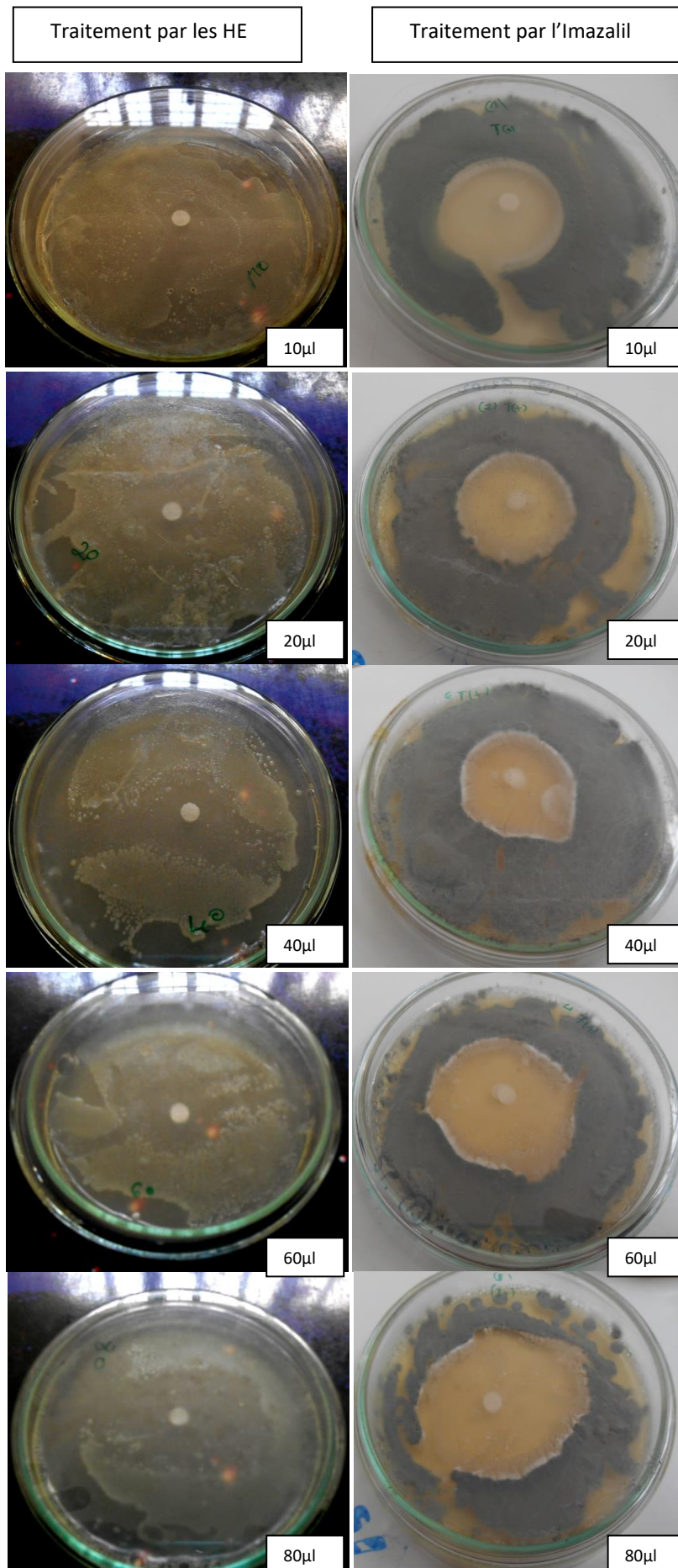


Figure 29 : Variation de l'effet in vitro des huiles essentielles de *Lavandula hybrida* et l'Imazalil sur la croissance mycélienne de *P.italicum*

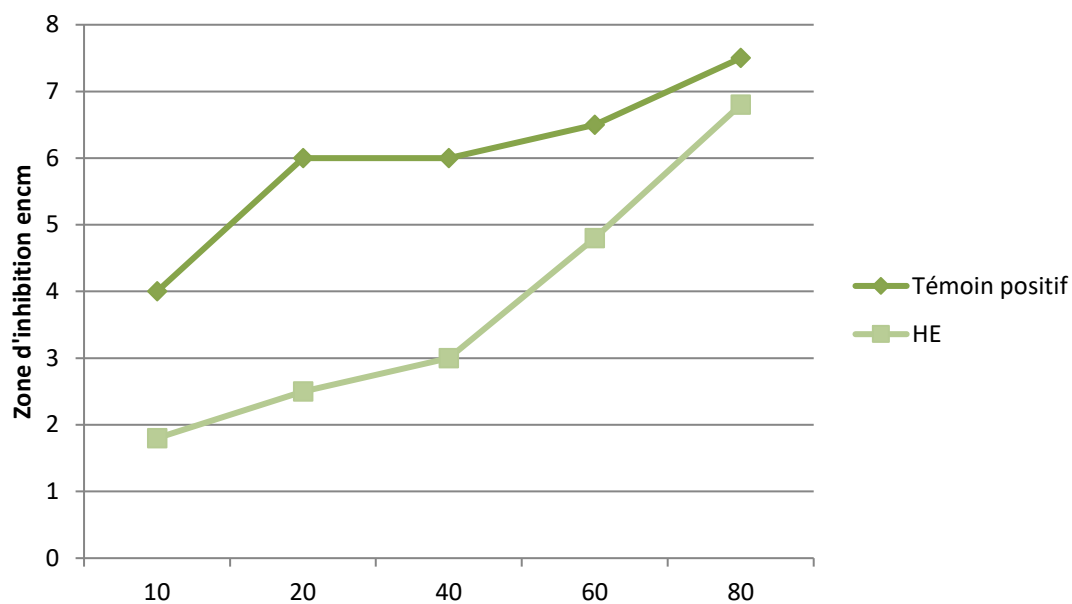


Figure 30 : Zones d'inhibition induites par les huiles essentielles de *Lavandula hybrida* et par l'imazalil sur *P. Italicum*

b. *Penicillium digitatum*

L'étude de la sensibilité de *P. digitatum* vis-à-vis des différentes doses des huiles essentielles de *lavandula hybrida*, en utilisant les techniques d'aromatogramme, nous a permis d'obtenir les résultats présentés dans (figure 31).

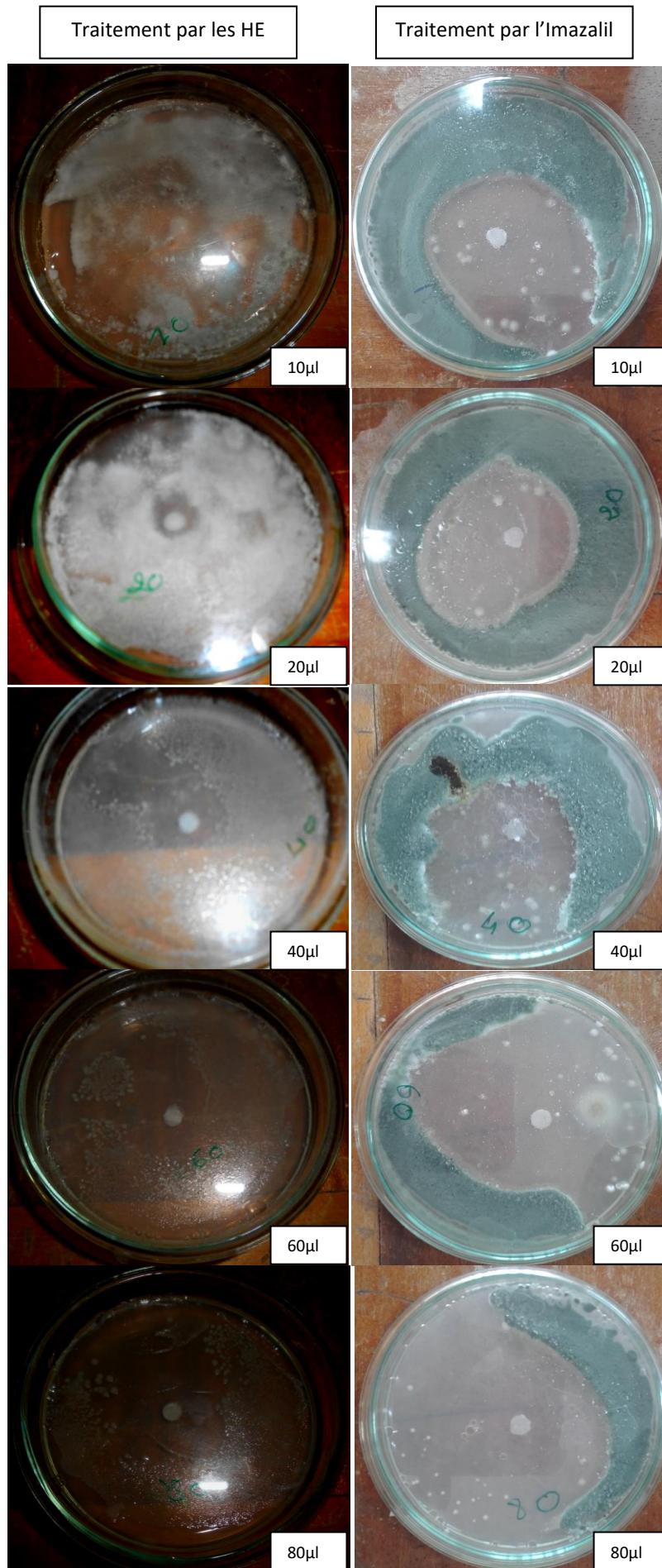


Figure 31 : Zones d'inhibition de la croissance mycelienne de *P. digitatum* en fonction des doses utilisés des HE de *lavandula hybrida* et de l'imazalil

Les résultats obtenus sur l'effet inhibiteur de la croissance mycelienne du champignon par les HE et l'imazalil, nous ont permis de souligner la sensibilité du champignon vis-à-vis des différentes doses utilisées, cette sensibilité augmente avec l'augmentation des concentrations des deux produits. Les halos d'inhibition obtenus par les huiles essentielles sont de diamètre inférieur au Témoin positif (Imazalil). A une forte concentration, le diamètre de la zone d'inhibition dépasse les 6 cm pour les deux produits utilisés.

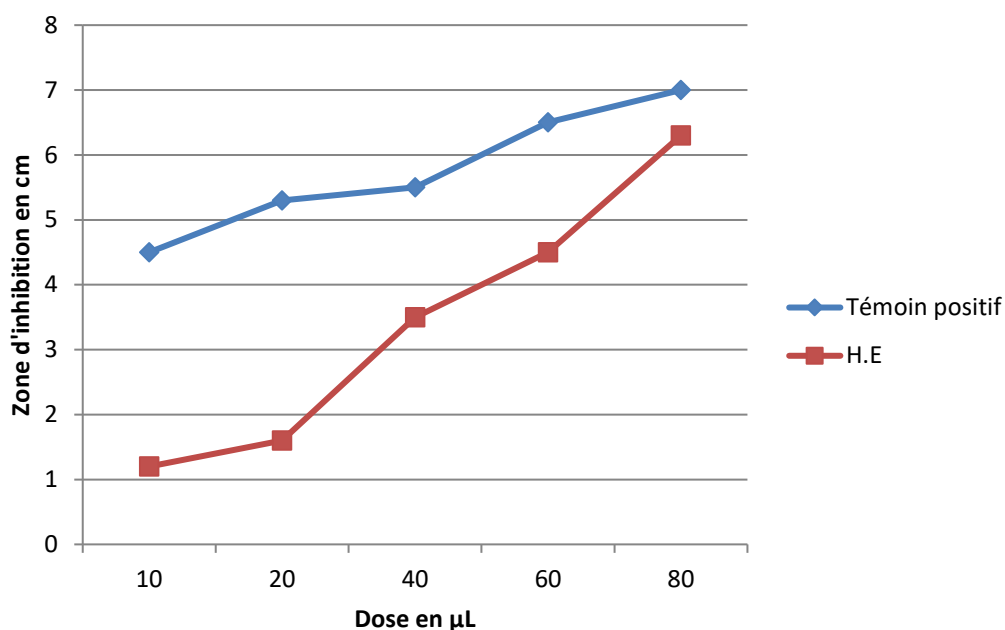


Figure 32 : Variation des zones d'inhibition provoquées par les HE de *lavandula hybrida* et par imazalil sur *P. digitatum*

La nature de l'activité biologique des huiles essentielles sur la croissance mycelienne du champignon *P. digitatum*, semble être liée à sa composition chimique. Les effets antifongiques observés, peuvent être dus aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et aux effets synergiques des composants de ces essences végétales. Il semble que les huiles essentielles de *Lavandula hybrida* sont caractérisés par des composés chimiques phénols (1,8 cinéole, octanol, ..) des alcools, (α - terpineol, terpinen-4-ol, linalol), des aldéhydes, des cétones, (Camphor) (Dorman et Deans, 2000), ayant une grande efficacité antifongique, ceci, peut expliquer l'activité de ces substances biologiques sur les deux champignons.

La dose utilisée (observée in vitro) semble être l'un des facteurs intervenant sur l'intensité de l'action antifongique des HE. Nos résultats montrent bien que le taux de réduction des moisissures, par rapport au témoin positif (Imazalil) croît avec l'augmentation des concentrations des huiles essentielles de *Lavandula hybrida*. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par certains auteurs (Daferera et *al.*, 2000) ayant montré que les huiles essentielles de la lavande sont inhibitrices de la croissance radiale et de la germination conidiale de *Penicillium digitatum*.

3. Activité antifongique de la *Menthe pouliot*

a. *Penicillium italicum*

Les résultats du test de sensibilité de *P. italicum* vis-à-vis des huiles essentielles de *la menthe pouliot* et de l'Imazalil par la méthode d'aromatogramme, sont présentés dans la figure 33 :

Ces résultats montrent que toutes les différentes concentrations utilisées des H.E de *Mentha pulegium* et de l'imazalil ont montré une activité inhibitrice de la croissance mycélienne, et de la production des spores du champignon *P. italicum*.

Les diamètres des zones d'inhibition augmente au fur et à mesure que la concentration augmente, et ceci, aussi bien pour les HE que pour l'Imazalil.

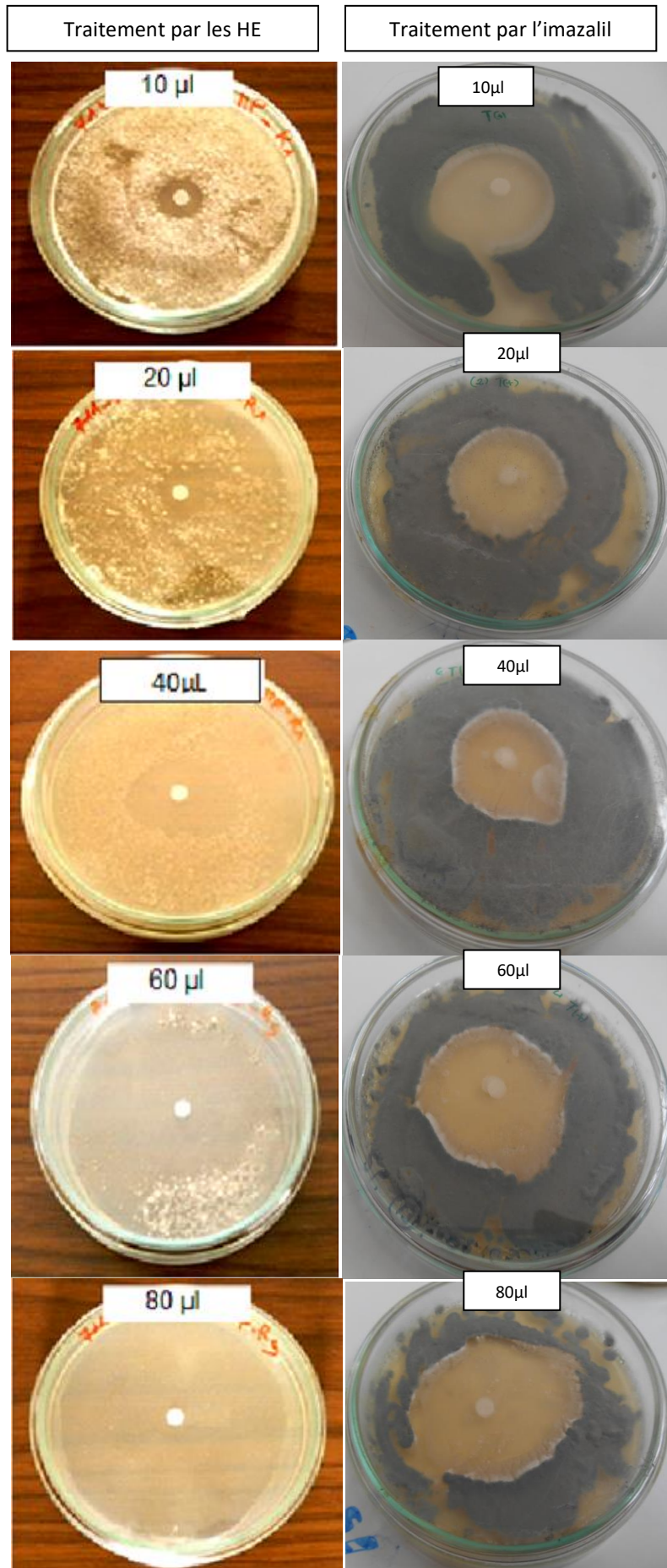


Figure 33 : Zones d'inhibition provoquées par les HE de *Mentha pulegium* et l'Imazalil à différentes doses sur la croissance mycélienne de *P. Italicum*

Nous avons pu montrer que le champignon *P. italicum* est sensible aux H.E utilisées à différentes doses 10 et 20, 40, 60 et 80 μl avec des diamètres d'inhibition de 1.6 et 2.2 ; 3.7 ; 6.9 et 9 Cm (inhibition totale du développement du champignon) respectivement. Contrairement au témoin positif, la souche testée s'est montrée extrêmement sensible dès la plus faible dose 10 μl , avec un effet antifongique moins important que celui des huiles essentielles utilisées à une forte dose de 80 μl .

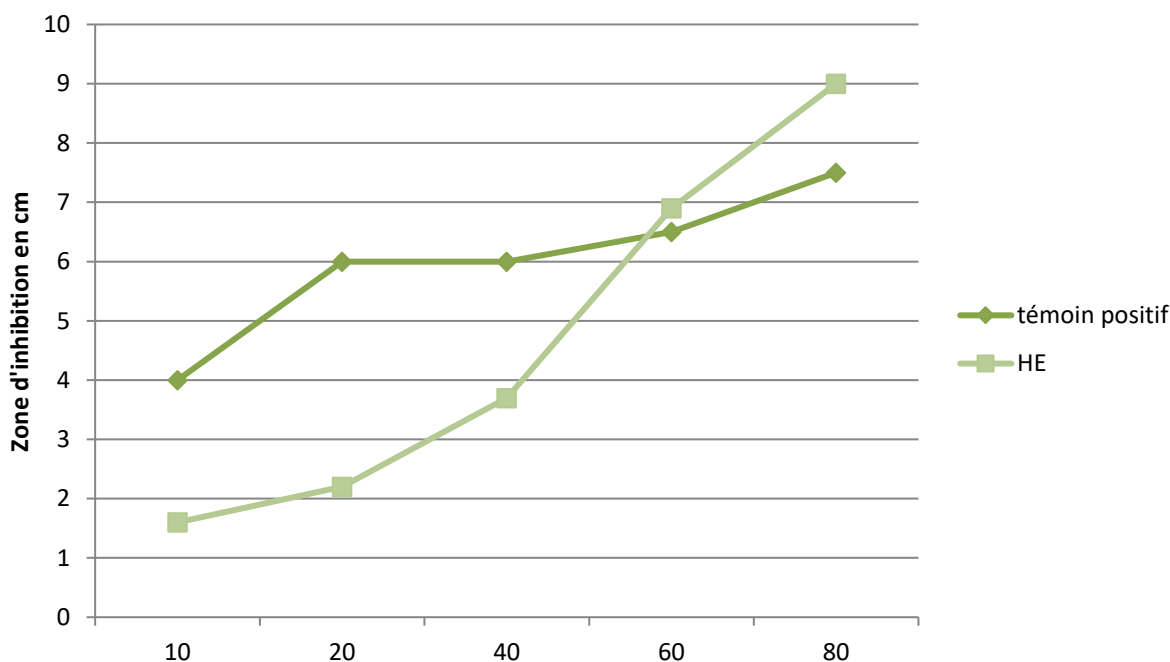


Figure 34 : Développement des zones d'inhibition provoquées par les huiles essentielles de la *Menthe pouliot* et par l'imazalil à différentes concentrations sur *P. Italicum*

Pour une représentation graphique de l'évolution de la zone d'inhibition de la croissance mycelienne de *P.Italicum* en fonction de l'augmentation des concentration des deux produits (HE, Imazalil), nous avons pu souligner qu'à faibles concentrations, le témoin positif (Imazalil) induit un effet inhibiteur plus important que celui des HE de *lavandula hybrida*. Par contre à fortes concentrations ce sont les huiles essentielles qui manifestent une activité inhibitrice plus importante et qui dépasse celle de l'imazalil.

b. *Penicillium digitatum*

Les résultats correspondants, à l'effet antifongique "in vitro" des huiles essentielles de la Menthe pouliot sur la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* est illustré dans la figure 35 :

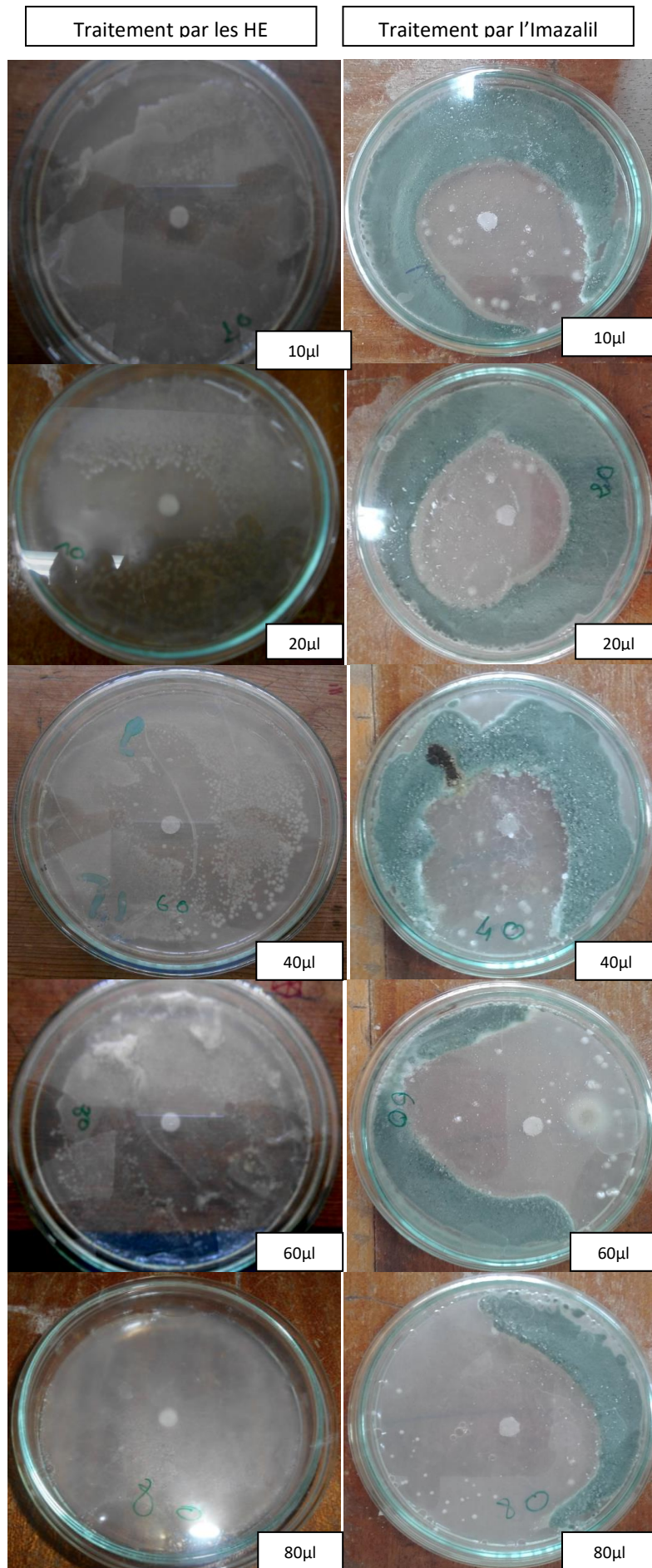


Figure 35 : Zones d'inhibition induites par les huiles essentielles de *Mentha pulegium* et l'Imazalil sur la croissance du champignon *P. digitatum*

La représentation graphique des résultats obtenus montre qu'à forte concentrations (60 et 80 μl), les huiles essentielles de *Mentha pulegium* ont un effet inhibiteur qui dépasse celui du produit chimique utilisée (Imazalil).

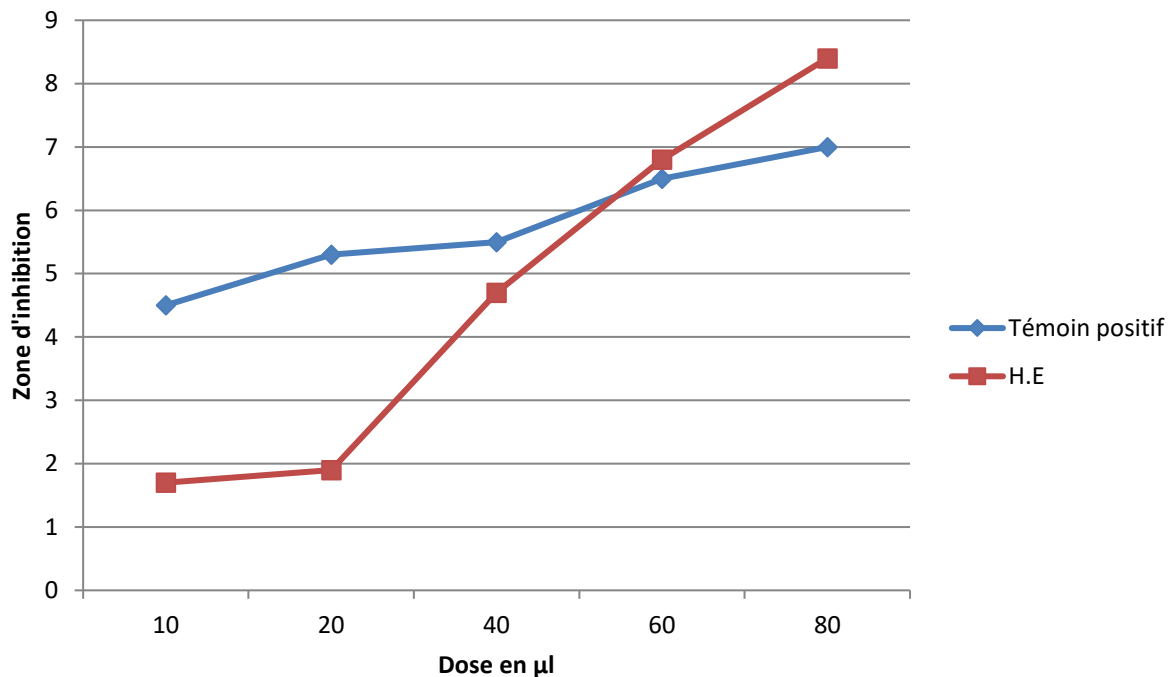


Figure 36 : Profil évolutif des zones d'inhibition induites par les HE de la menthe pouliot et par l'imazalil sur *P. digitatum*

Globalement, l'activité antifongique des huiles essentielles semble être liée étroitement, à leur composition chimique. Toutefois, il est probable que cette activité dépend aussi de composés minoritaires qui agissent d'une manière synergique.

L'ensemble des résultats obtenus, montrent que les huiles essentielles de la *Mentha pouliot* présentent une activité antifongique importante vis-à-vis des champignons testés. Cette activité trouve probablement son origine dans sa composition chimique riche, en composé majoritaire pulegone avec 78,98%. Ce composé est largement connu par son pouvoir d'inhibition de la croissance mycélienne, de la germination des conidies et de la production des spores des pathogènes, puisque une dose de 20 μl des huiles essentielles de cette plante inhibe complètement la croissance du *Penicillium sp* (Lahlou *et al.*, 2005). En outre, *Hmiri et ses collaborateurs* (2013) ont bien montré que les huiles essentielles de *M.*

pulegium exercent une activité inhibitrice remarquable sur les trois agents pathogènes (*Alternaria alternata* ; *Botrytis cinerea* ; *Penicillium expansum*).

Nos résultats se rapprochent de ceux de Qjidaa et ses collaborateurs (2015), ayant obtenu des taux d'inhibitions sur la croissance mycelienne du champignon *P. digitatum* très élevés des huiles essentielles de la *menthe pouliot*.

4. Activité antifongique de *Thymus vulgaris*

a. *Penicillium italicum*

Le test de sensibilité de *P. italicum* aux huiles essentielles du thym par la méthode d'aromatogramme a donné les résultats présentés dans la figure 38.

Les résultats obtenus ont décelé que la sensibilité du champignon *P. italicum* vis-à-vis des deux produits testés (HE, Imazalil) varie selon la concentration utilisée. Ainsi, à faibles concentrations (10 et 20 μ l) c'est l'effet du produit chimique l'imazalil qui l'apporte. Par contre, à fortes doses (60 et 80 μ l) ce sont les HE du Thym qui ont manifesté un effet inhibiteur plus important sur la croissance du champignon *P. italicum*. Ceci peut être expliqué par une augmentation des taux des composés phénolique des huiles essentielles testées, accompagné de l'augmentation du taux de composés minoritaires

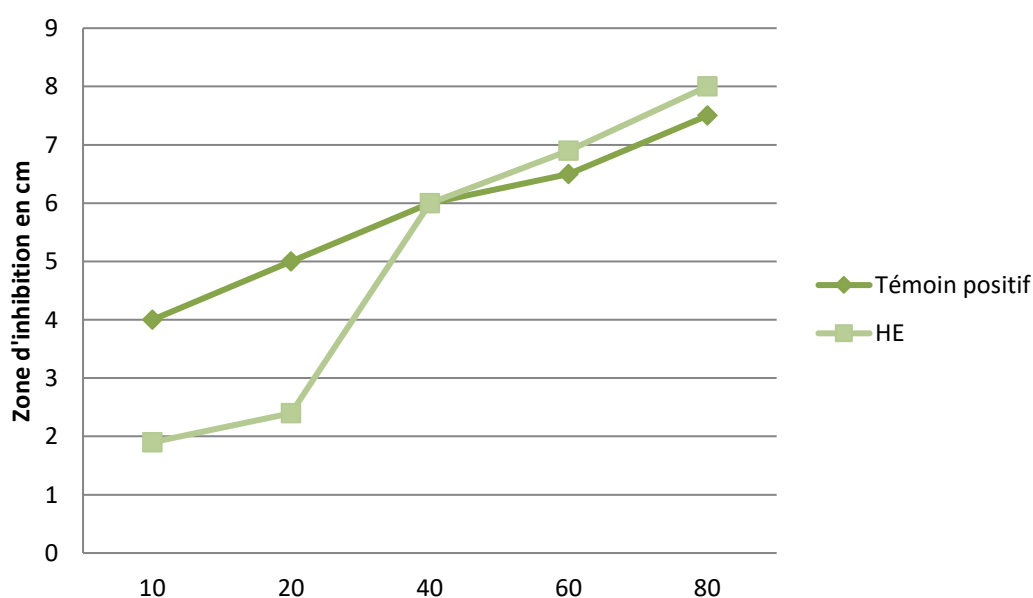


Figure 37 : Variation des zones d'inhibition générées par les huiles essentielles du *Thym* et par l'imazalil sur *P. italicum*

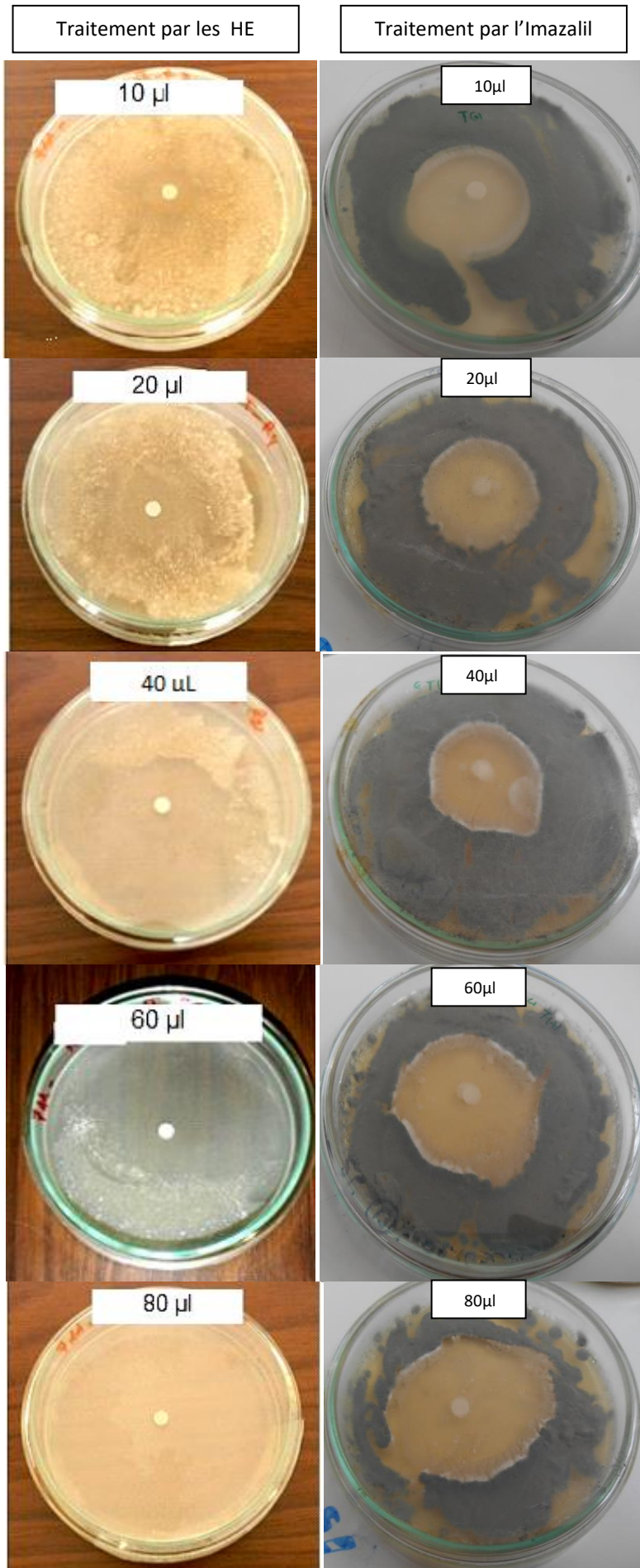


Figure 38 : Zones d'inhibition générées par les huiles essentielles du *Thymus vulgaris* et l'Imazalil à différentes concentrations sur la croissance mycélienne *P. Italicum*

b. Penicillium digitatum

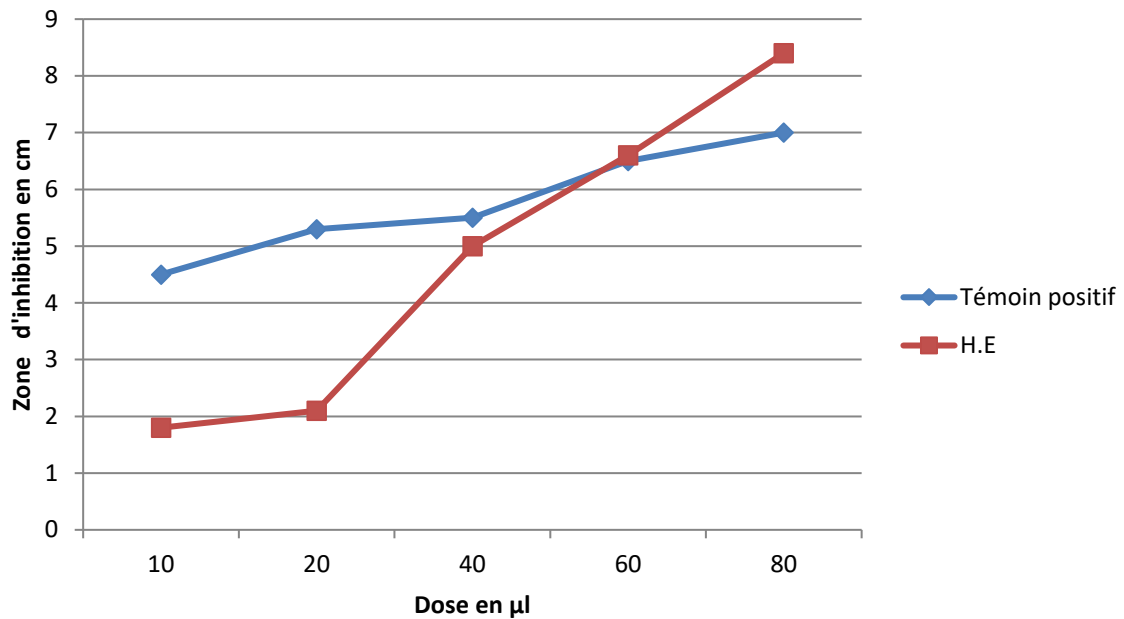


Figure 39 : Variation des zones d'inhibition induites par les deux substances à différents volumes sur la croissance mycélienne *P. digitatum*

Dans ce test d'activité antifongique, nous avons remarqué que les huiles essentielles de *thymus vulgaris* utilisées à faibles doses (10,20 et 40 μl), se montrent moins efficaces que l'imazalil. Par contre, à partir de la dose de 60 μl , l'effet inhibiteur des HE s'accroît et dépasse celui de l'imazalil. Ces résultats sont en accord avec ceux de nombreux chercheurs, (Daferera *et al.*, 2000 ; Karaman *et al.*, 2001 ; Kulevanova *et al.*, 2002) sur l'activité antibactérienne et antifongique des HE de thym.

Il semble que l'importance de l'activité biologique de ces HE est en relation avec sa teneur en thymol. En effet, de nombreux travaux (Trombetta *et al.*, 2002 ; Satrani *et al.*,2008) ont montré que les huiles essentielles du thym sont riches en dérivés phénoliques (carvacrol et thymol) et possèdent une forte activité antimicrobienne.

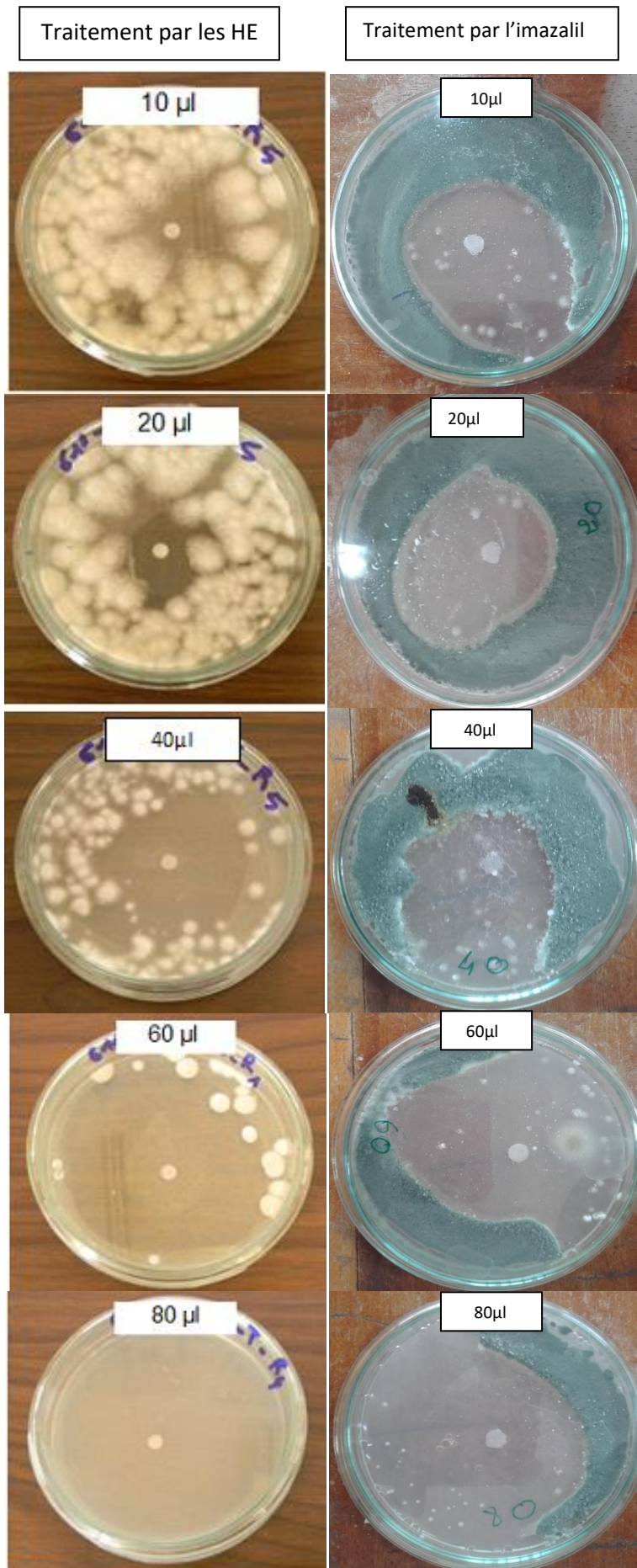


Figure 40 : Zones d'inhibition générées par les huiles essentielles de *Thymus vulgaris* et l'Imazalil à différentes concentrations sur la croissance mycélienne *P. digitatum*

De ces résultats obtenus (figure 40), nous pouvons avancer que l'activité antifongique observée des huiles essentielles de thym, peut provenir de l'efficacité de ses composants chimiques majoritaires, comme elle peut être le résultat d'une synergie entre les différents constituants minoritaires et / ou majoritaires de ces huiles comme ceci a été montré par de nombreux travaux (Mustapha *et al.*, 2008 ; Chebli *et al.*, 2003 ; Ouraini *et al.*, 2007) .

5. Etude comparative de l'activité antifongique induites par les huiles essentielles des quatre PAM étudiées et de l'Imazalil

a. *Penicillium italicum*

Les résultats relatifs à l'inhibition de la croissance mycelienne de *P.italicum* par les quatre plantes aromatiques et médicinales étudiées et du produit chimique testé sont représentés sur le tableau 8 :

Tableau 8 : Variation de la sensibilité du champignon vis-à-vis des différents produits utilisés

<i>Penicillium italicum</i>	<i>Artémisia herba alba</i>	<i>Mentha pulegium</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Lavandula hybrida</i>	Traitement par Imazalil
10 µl	1 (+)	1.6 (+)	1.9 (+)	1.8 (+)	4
20µl	2.1 (+)	2.2 (+)	2.4 (+)	2.5(+)	5
40µL	3.1 (++)	3.7 (+++)	6 (+++)	3 (++)	6
60µl	5 (+++)	6.9 (+++)	6.9 (+++)	4.8 (+++)	6.5
80µl	6.8 (+++)	9 (+++)	8 (+++)	6.8 (+++)	7.5

(+) : sensible

(+++): Extrêmement sensible

b. Penicillium digitatum

Tableau 9 : Variation de la sensibilité du champignon *P. digitatum* vis-à-vis l'ensemble des produits utilisés

<i>Penicillium digitatum</i>	<i>Artémisia herba alba</i>	<i>Mentha pulegium</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Lavandula hybrida</i>	Traitement par Imazalil
10 µl	5.6 (+++)	1.7 (+)	1.8 (+)	1.2 (+)	4.5
20µl	6 (+++)	1.9 (+)	2.1 (+)	1.6(+)	5.3
40µL	7.2 (+++)	4.7 (+++)	5 (+++)	3.5 (++)	5.5
60µl	7.5 (+++)	6.8 (+++)	6.6 (+++)	4.5 (+++)	6.5
80µl	8 (+++)	8.4 (+++)	8.4 (+++)	6.3 (+++)	7

(+) : sensible

(+++): Extrêmement sensible

D'après ces résultats, nous pouvons conclure que quelque soit les concentrations utilisées des huiles essentielles de toutes les PAM testés, les deux champignons *P. digitatum*, *P. italicum* se montrent sensibles. Ces deux derniers deviennent plus sensibles avec l'augmentation des concentrations utilisées des huiles essentielles.

Certains HE, à fortes concentrations, ont induit un effet antifongique plus important que celui du témoin positif (Imazalil). Cet effet, varie en fonction du champignon utilisé. Ainsi, les huiles essentielles des deux plantes *Mentha pulegium* et *thymus vulgaris* à fortes concentrations (60 et 80µl) ont manifesté une activité antifongique contre *P. italicum* plus importante que celle de l'Imazalil. Le même résultat est obtenu pour l'inhibition de la croissance mycelienne du champignon *P. digitatum* par les HE des deux plantes *Menthe pouliot* et *Thym*.

Par contre, de l'ensemble des plantes utilisées, les huiles essentielles de l'*Artemisia herba alba* se montrent les plus efficaces sur la croissance mycelienne du champignon *Penicillium*

digitatum, leur effet inhibiteur dépasse celui de l'imazalil (contrôle positif) dans leur utilisation à la dose de 40µl.

L'importance de l'activité antifongique des huiles essentielles de certains, PAM étudiés semblent d'une grande utilité dans la substitution des produits chimique dans le traitement des fruits en post-récolte contre la pourriture de *Penicillium*.

V. Concentrations minimales inhibitrices

Dans cette partie d'étude, le calcul de la concentration minimale inhibitrice à été effectuée selon la méthode de *Remmal et ses collaborateurs (1993)*, en observant le pouvoir inhibiteur de nos échantillons des huiles essentielles, utilisées à différentes concentrations, sur la croissance des champignons testés. L'observation de l'effet antifongique permet d'accéder à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), qui correspond à la plus faible concentration en huiles essentielles capables d'inhiber la croissance microbienne. Les résultats obtenus sontainsi, regroupés dans le tableau ci-dessous.

1. *Artémisia herba alba*

Tableau 10 : Concentration minimale inhibitrice des deux champignons testés

	1/100 v/v	1/250v/v	1/500v/v	1/1000v/v	1/2000 v /v	1/3000v/v	Témoin
<i>Champignons</i>							
<i>P. digitatum</i>	-	-	+	+	+	+	+
<i>P. italicum</i>	-	-	+	+	+	+	+

(-) : inhibition ;(+) : croissance

La détermination de la concentration minimale inhibitrice des champignons nous a permis de montrer que les huiles essentielles d'armoise blanche ont un effet inhibiteur important des micro-organismes étudiés. Ainsi, nous avons remarqué que toutes les deux souches des champignons ont été complètement inhibées à la concentration de 1/250 v/v (tableau 10)

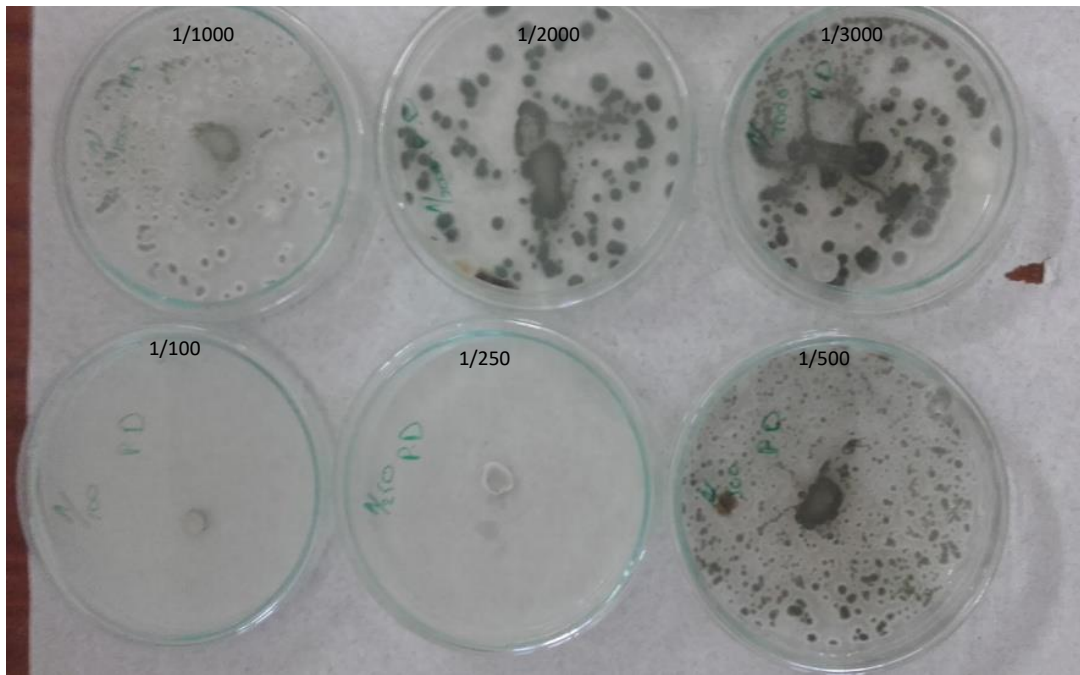


Figure 41 : Effet des huiles essentielles d'*Artémisia herba alba* sur croissance mycélienne de *P. digitatum*

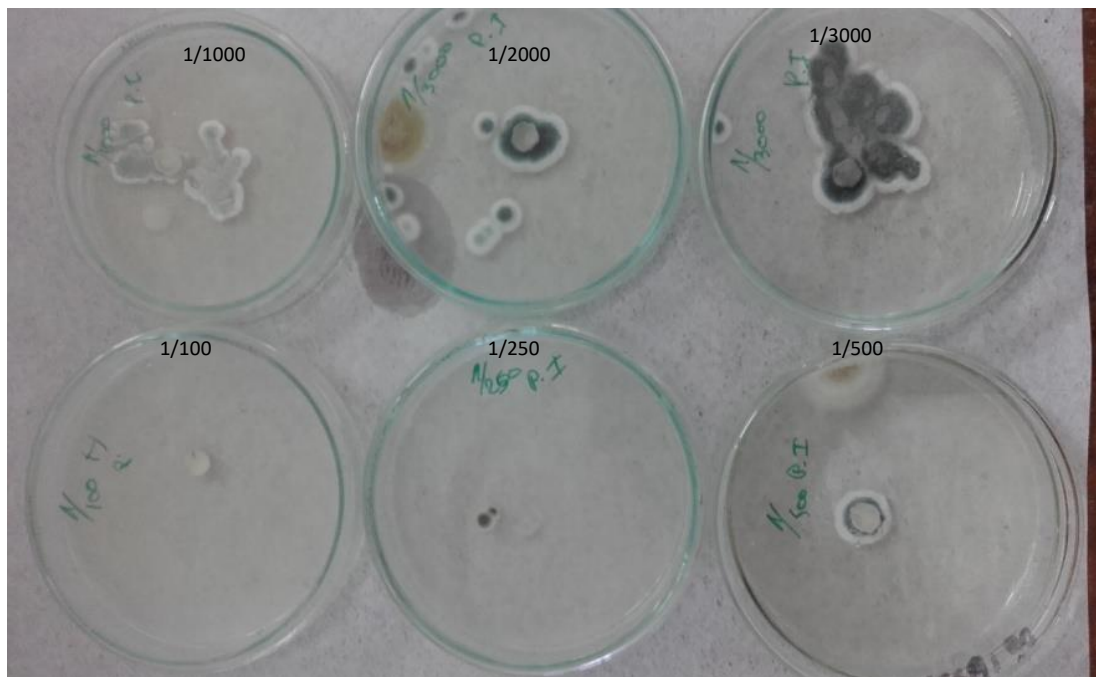


Figure 42 : Effet antifongique in vitro des huiles essentielles d'*Artemisia herba alba* sur croissance mycélienne de *P. italicum*

De ces résultats (figure 41 et 42) il ressort que les huiles essentielles *d'Artémisia herba alba* ont manifesté des effets antifongique très intéressants sur les microorganismes testés. Ces résultats sont en accord avec ceux de certains auteurs (*Bencheqroun et al., 2012*), ayant montré que les HE d'Artémisia herba alba sont caractérisés par une activité antifongique très importante.

Celles-ci, *inhibent le développement mycélien de certains champignons comme P. digitatum, P. expansum, A. niger* avec des concentrations minimales inhibitrices comprises entre 1/100 et 1/250 v /v

Communément, les huiles essentielles d'armoise blanche sont largement connue par leur composition riche en monoterpénoïdes, surtout oxygénés (Ghanmi, 2010), Comme le 1,8 cinéole, chrysanthénone, chrysanthénol, α/β thujones, davanone et le camphre qui sont considérés comme composants majoritaires, ces derniers semblent d'une grande importance dans l'inhibition de la croissance mycelienne.

La présence d'une teneur importante de monoterpènes oxygénés, dans les huiles essentielles *d'Artémisia herba alba*, peut être responsable de son activité prononcée contre ces deux agents pathogènes testés. Contrairement, à certains plantes aromatiques et médicinales, comme l'armoise *A. campestris* dont les HE sont composées essentiellement de monoterpènes hydrocarbonés, et ayant révélé une faible activité antimicrobienne, contre certains germes pathogènes, comme *E. coli* et *S. aureus* (Akrouf, 2010). Ceci, nous a permis de souligner que la présence d'une fonction oxygène dans la structure des HE augmente les propriétés fongistatiques des terpénoïdes.

Nous pouvons donc conclure, que cette activité, peut être le résultat d'un effet synergique entre plusieurs composés de ces essences végétales, comme ceci à été montré par Felice et ses collaborateurs (2004).

2. *Lavandula hybrida*

L'activité antifongique est évaluée en observant le pouvoir inhibiteur des huiles essentielles de *Lavandula hybrida* à différentes concentrations sur la croissance mycelienne des champignons testés. Les résultats sont regroupés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 11 : Concentration minimale inhibitrice de l'activité antimicrobienne des HE de *Lavandula hybrida*

	1/100 v/v	1/250 v/v	1/500 v/v	1/1000 v/v	1/2000 v/v	1/3000v/v	Témoin
<i>P. digitatum</i>	-	-	+	+	+	+	+
<i>P. italicum</i>	-	-	-	+	+	+	+

(-) : inhibition ;(+) : croissance

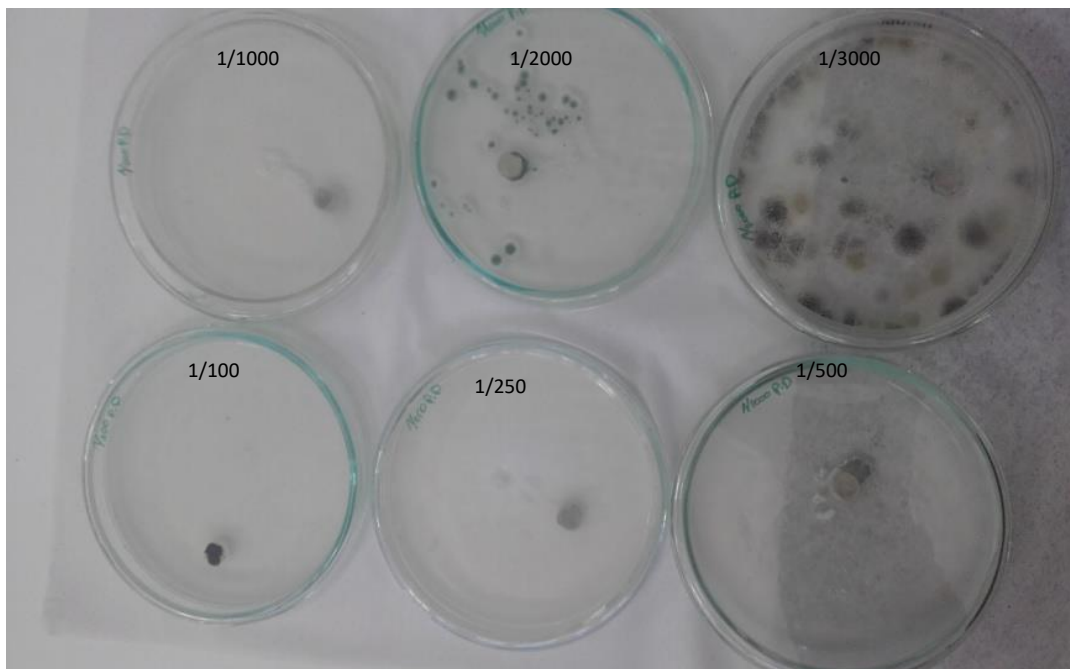


Figure 43 : Effet des huiles essentielles de *lavandula hybrida* sur *P. digitatum*

Les huiles essentielles de *Lavandula hybrida* ont montré un important effet inhibiteur contre les microorganismes étudiés. Toutes les souches microbiennes ont été inhibées à la concentration 1 /250 v/v. le micro organisme le plus sensible a ces essences végétales est *Penicillium italicum* (figure 44), dont la croissance a été arrêtée à la faible concentration de 1/500v/v.

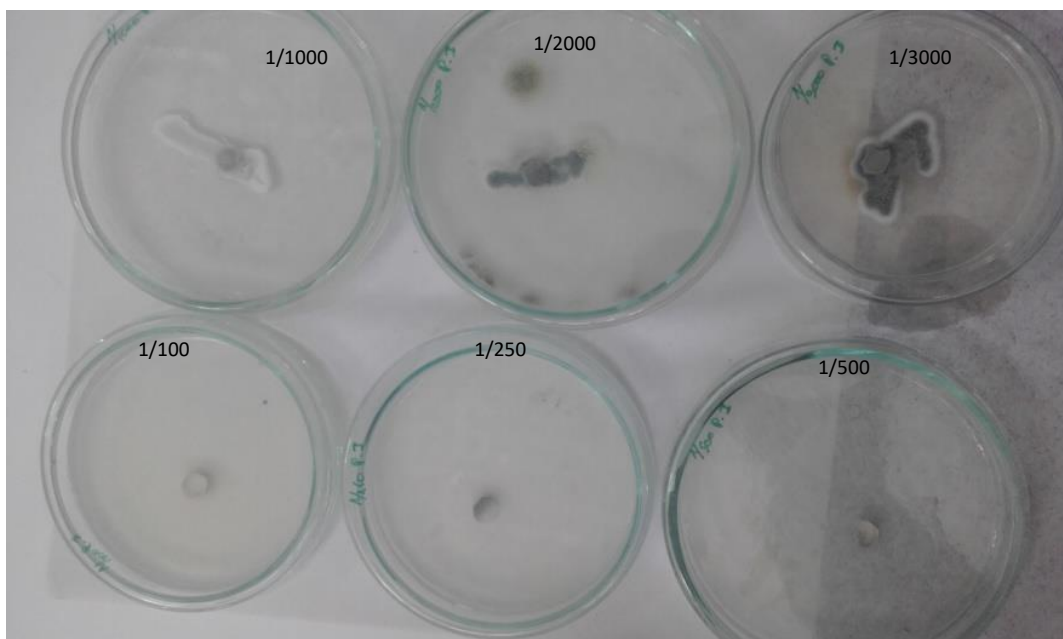


Figure 44 : Effet des huiles essentielles de *lavandula hybrida* sur *P.italicum*

Ces résultats, sont en accord avec celui de Laib (2012) ayant montré que les huiles essentielles de *Lavandula officinalis* ont Inhibé la croissance des moisissures isolées des légumes secs, dont *Penicillium spp.* D'autre travaux (Iaghchimi et al., 2014) ont confirmé l'activité antifongique de *lavandula multifida* en inhibant la croissance de *P. expansum* avec une CMI de 0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Les phénols qui sont des composants des huiles essentielles utilisée de *lavandula hybrida*, pour cette étude, présentent des propriétés antifongiques très marquées (Chaumont et al., 2001). Ainsi, il a été rapporté que la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea*, agent responsable de la pourriture grise de la pomme, a été complètement inhibée par les huiles essentielles d'une Labiée Marocaine, dont le carvacrol est son constituant principal (chebli et al., 2003). Cependant, la valeur des huiles essentielles tiennent à son « totum », c'est-à-dire l'intégralité de ses composants et non seulement aux composés majoritaires

3. *Mentha pulegium*

Afin de déterminer la concentration minimale inhibitrice, nous avons apporté des observations sur l'activité antifongique des huiles essentielles de *Mentha pulegium* sur la croissance des champignons étudiés. Les résultats sont regroupés dans (figure 45) :

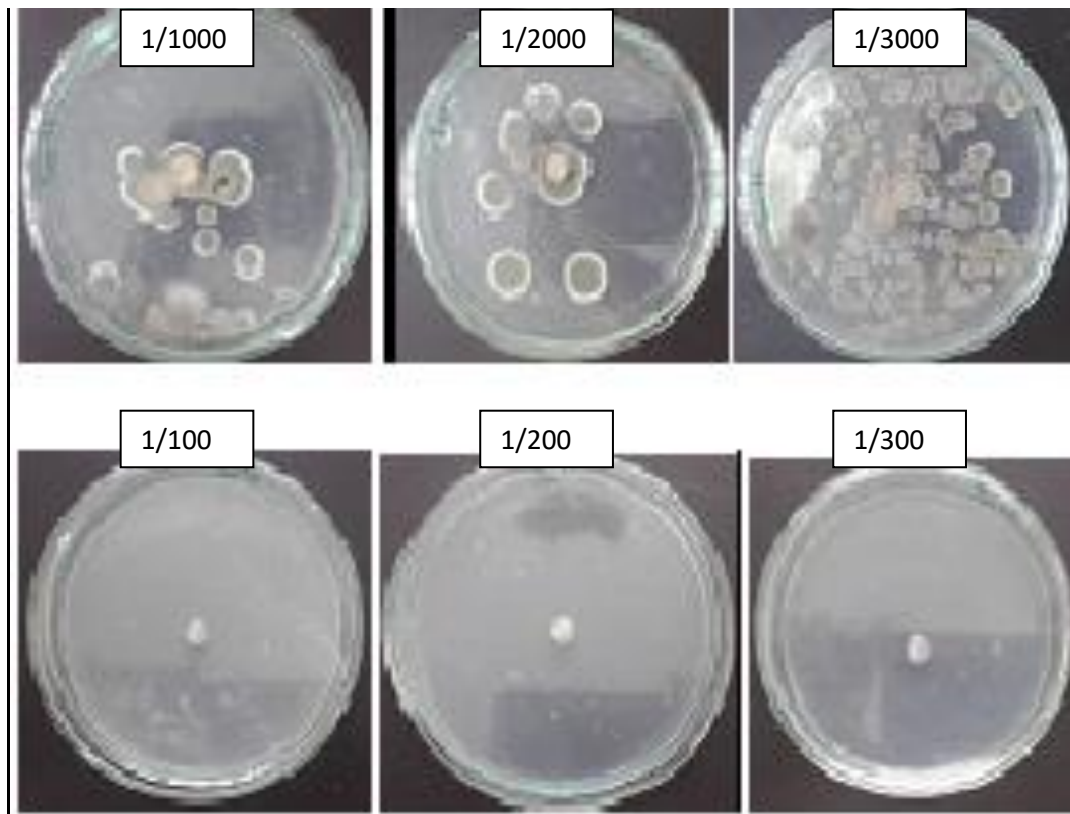


Figure 45 : Effet des huiles essentielles de *Mentha pulegium* sur *P. digitatum*

De ces résultats, il ressort que les huiles essentielles de *Mentha pulegium* inhibent la croissance de *P. italicum* à une dose de 1/500v/v

Tableau12 : Activité antifongique des HE de *Mentha pulegium*

	1/100 v/v	1/250 v/v	1/500 v/v	1/1000 v/v	1/2000 v/v	1/3000 v/v	Témoin
<i>P. digitatum</i>	-	-	-	+	+	+	+
<i>P. italicum</i>	-	-	-	-	+	+	+

(-) : inhibition ;(+) : croissance

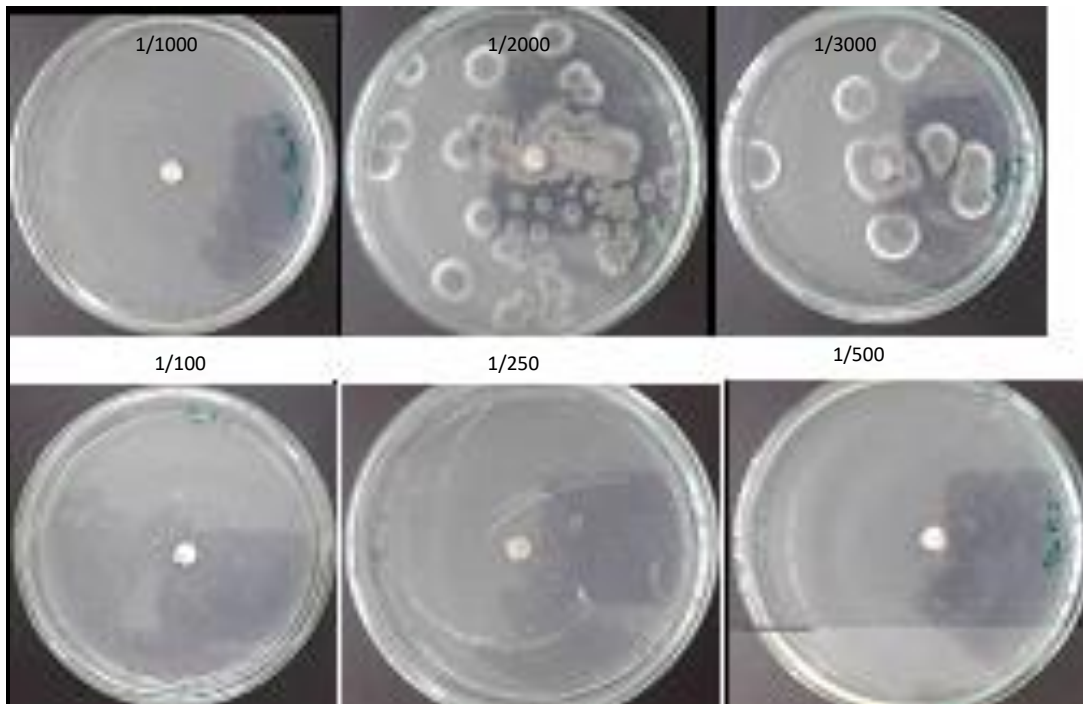


Figure 46 : Effet des huiles essentielles de *Mentha pulegium* sur *P.italicum*

Contrairement à *P. digitatum*, le champignon *P. italicum* se montre très sensible vis-à-vis les huiles essentielles de *Mentha pulegium*, la croissance n'a eu lieu qu'à partir de la concentration 1/2000 v/v.

Ces résultats confirment l'activité antifongique des huiles essentielles de *M. pulegium*. Le degré d'activité de ces huiles essentielles, varie selon l'espèce étudiée et la dose utilisée.

Des résultats analogues ont été obtenus par certains auteurs (*EL Arch et al.*, 2013) , ces derniers ont montré que *Mentha rotundifolia* inhibe la croissance de *P. parasiticus* à une CMI de 1/500 v/v .

D'autres travaux (*Ouraini et al.*, 2007) ont mis en évidence l'effet antifongique des huiles essentielles de *M. pulegium* sur les dermatophytes. Cette activité antimicrobienne des huiles, pourrait être attribuée a ses composés majoritaires, qui sont des monoterpènes monocycliques oxygénés. En effet *Smid et ses collaborateurs* (1995) ont étudiés l'effet inhibiteur de quinze constituants d'huiles essentielles sur la germination des conidies de *Penicillium hirsutum* et ont montré que parmi les composés testés se trouvent quatre principaux composants des huiles essentielles de *M. pulegium*. Leurs résultats ont pu mettre en évidence un effet antifongique très important de la pulegone, la menthone, le

menthol et la carvone exercent. Cependant nous ne pouvons pas négliger l'existence des phénomènes de synergie entre les divers composés majoritaire et minoritaires

4. *Thymus vulgaris*

Les résultats obtenus, sur la détermination des concentrations minimales inhibitrices des huiles essentielles de *thymus vulgaris*, sur les deux champignons étudiés, manifestent le même degré de sensibilité vis-à-vis des essences végétales de *Thymus vulgaris* avec une CMI de 1/1000 v/v, sauf que pour *P. italicum*, la CMI est de 1/2000 v/v.

Ce résultat nous permet de mettre en valeur l'exploitation des huiles essentielles dans la lutte biologique.

Tableau 13 : Effet antifongique des HE de *Thymus vulgaris*

	1 /100 v/v	1/250 v/v	1/500 v/v	1/1000 v/v	1/2000 v/v	1/3000 v/v	Témoin
<i>P. digitatum</i>	-	-	-	-	+	+	+
<i>P. italicum</i>	-	-	-	-	-	+	+

(-) : inhibition ;(+) : croissance

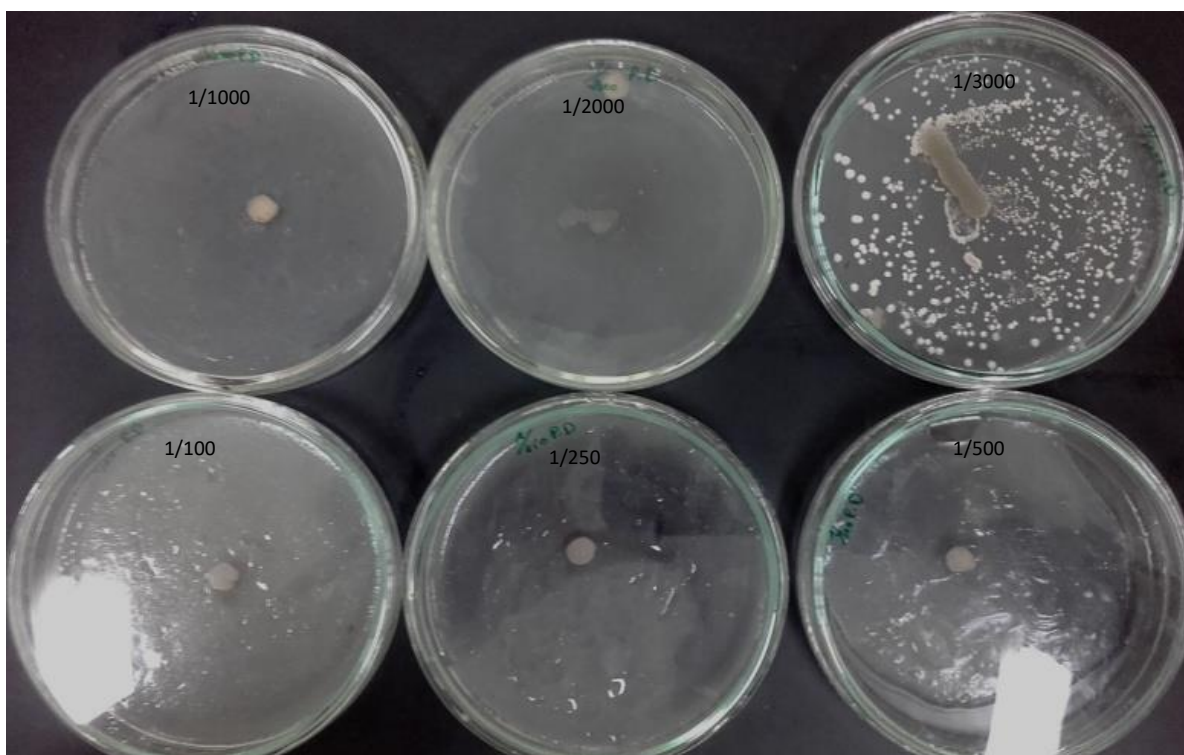


Figure 47 : Effet des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* sur *P. digitatum*

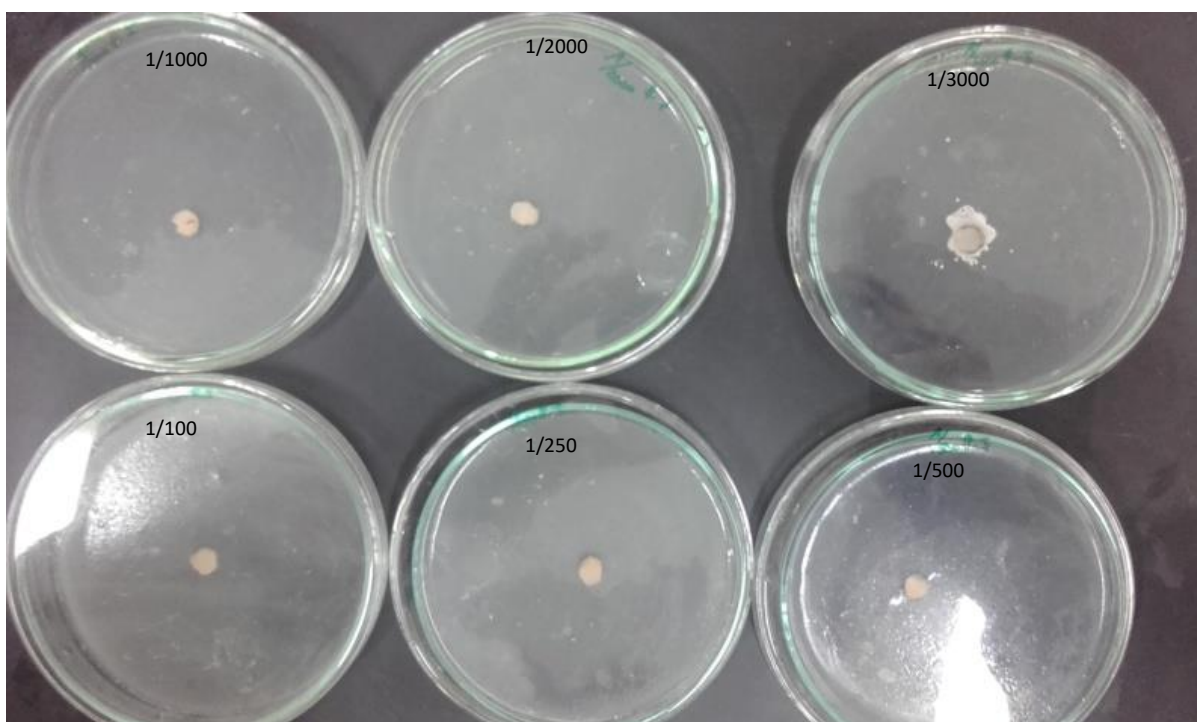


Figure 48 : Effet des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* sur *P. italicum*

VII. Étude de la nature de la fongitoxicité des huiles essentielles

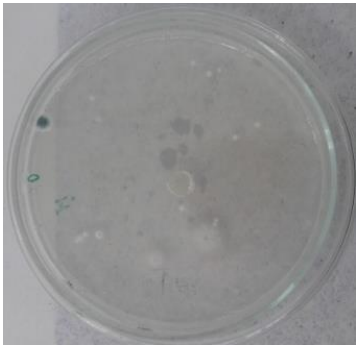
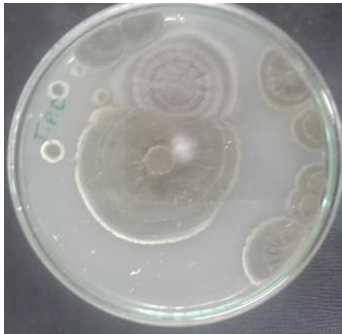
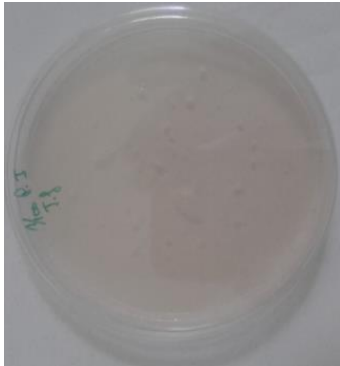
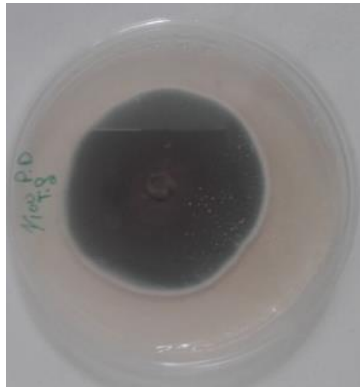
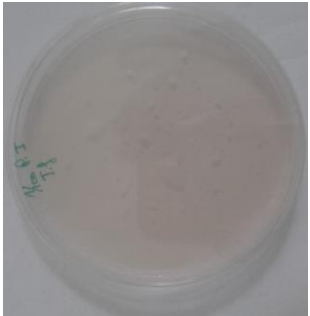
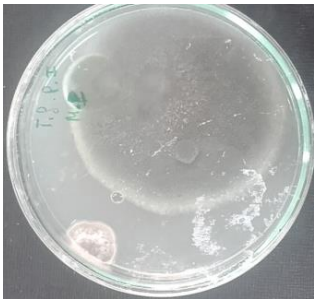
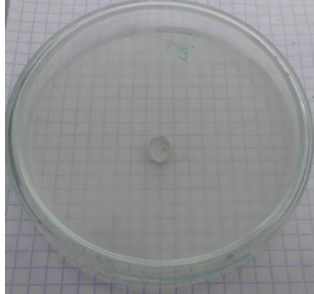

La distinction entre la concentration minimale fongistatique (CMF) et la concentration minimale fongicide ou létale (CML), est déterminée par le transfert des disques mycéliens, à partir des boîtes de pétri, où l'inhibition par les huiles essentielles est complète, dans un nouveau milieu PDA dépourvu de ces essences.

L'effet des HE est fongistatique si la croissance du champignon reprend à nouveau et il est fongicide ou létale s'il n'y a pas de croissance. En effet, le transfert des disques des deux champignons *P. digitatum* et *P. italicum* sur le milieu de culture PDA, dépourvu des huiles essentielles d'*Artémisia herba alba*, ont montré un effet fongicide à une CML de 1/250 v/v pour les deux souches. Alors, que pour les huiles essentielles des deux plantes aromatiques et médicinales : *lavandula hybrida* et de la *Mentha pulegium*, ont un effet fongistatique, contre la croissance mycélienne de *P. digitatum* à une CMF de 1/250 v/v et 1/500 v/v respectivement, la même chose pour *P.italicum* à un effet fongistatique à une CMF de 1/500v/v et de 1/1000v /v respectivement.

Les huiles essentielles de *Thymus vulgaris* ont un effet fongicide contre la croissance mycélienne de *P. digitatum* à une CML de 1/1000 v/v et pour *P. italicum* à une CML de 1/2000v /v.

Les résultats obtenus, dans cette partie d'étude, montrent que les huiles essentielles testées ont présenté un effet à la fois fongicide et fongistatique, chez les deux souches. Cette différence de sensibilité aux huiles essentielles, pourrait être due à certains facteurs, à savoir le type de micro-organismes et leur réaction aux différents composés chimiques des huiles essentielles (Tableau 14). En effet, les phénols qui sont des composants des huiles essentielles de *lavandula hybrida*, *Thymus vulgaris* semblent présenter un effet fongistatique, fongicide respectivement sur la croissance mycélienne.

Tableau 14 : Nature de l'activité antifongique des huiles essentielles des quatre PAM étudiées

Souches	Huile essentielle d' <i>Artemisia herba alba</i>	Huile essentielle de <i>Mentha pulegium</i>	Huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i>	Huile essentielle de <i>lavandula hybrida</i>
<i>Penicillium digitatum</i>	 Fongicide	 Fongistatique	 Fongicide	 Fongistatique
<i>Penicillium italicum</i>	 Fongicide	 Fongistatique	 Fongicide	 Fongistatique

Globalement, les composés aromatiques des huiles essentielles de *lavandula hybrida* et *Thymus vulgaris* possèdent des activités fongistatiques, et fongicides (Dorman et al., 2000). En outre, ces huiles essentielles sont riches en constituants oxygénés, sous forme de cétones mono-terpeniques (pulégone) ou autres possédant une activité à la fois fongicide et fongistatique (Koroch et al., 2007).

Enfin, l'ensemble de ces résultats obtenus "in vitro" ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances de source naturelle biologiquement active. Des essais, complémentaires "in vivo" seront nécessaires et devront confirmer les performances mises en évidence. C'est dans ce cadre que nous avons développé la deuxième partie dont les tests sont réalisés "in vivo".

VIII. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE IN VIVO

Afin de tester l'effet antifongique des huiles essentielles des PAM du *Thymus vulgaris* et de *Mentha pulegium*, *Lavandula hybrida*, et d'*Artemesia herba alba*, un suivi quotidien des diamètres d'inhibition de la croissance des champignons étudiés (*P.italicum* et *P. digitatum*), sur fruits d'agrumes a été effectué pendant dix jours. L'efficacité de chacune des HE testés sur les deux champignons, a été étudiée séparément

1. Effet antifongique des H.E de *Thymus vulgaris*

L'apparition des symptômes des deux champignons (*P.italicum* et *P. digitatum*), sur les fruits témoin (traités à l'eau et au tween) et les concentrations 100, 250, 500 ppm a commencé dès le troisième jour de stockage. Par contre les fruits traités par des concentrations 1000, 2000, 3000 ppm n'ont montré l'apparition de l'infection fongique qu'à partir du quatrième jour.

a. *Penicillium digitatum*

Quant au test *in vivo* des HE du thym utilisé à différentes concentrations sur les fruits d'agrumes, inoculés artificiellement, par les spores de *P. digitatum* a été réalisé. Les résultats obtenus sur le diamètre d'inhibition de la croissance mycélienne sont résumés sur la figure ci-dessous.

Nous avons obtenu une efficacité moyenne sur le développement de *P. digitatum*. Le diamètre d'inhibition augmente avec la concentration testée, il est de l'ordre de 26.2 ; 31.55, 32.21, 49.82, 50.12, 68.66, 80.12 mm pour les concentrations respectives de 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 2000 ppm et 3000 ppm. Par contre, l'utilisation d'imazalil (80%) contrôle positif, a induit un diamètre d'inhibition de 80.12 mm.

Le traitement au tween ne montre aucun effet sur le développement des champignons étudiés.

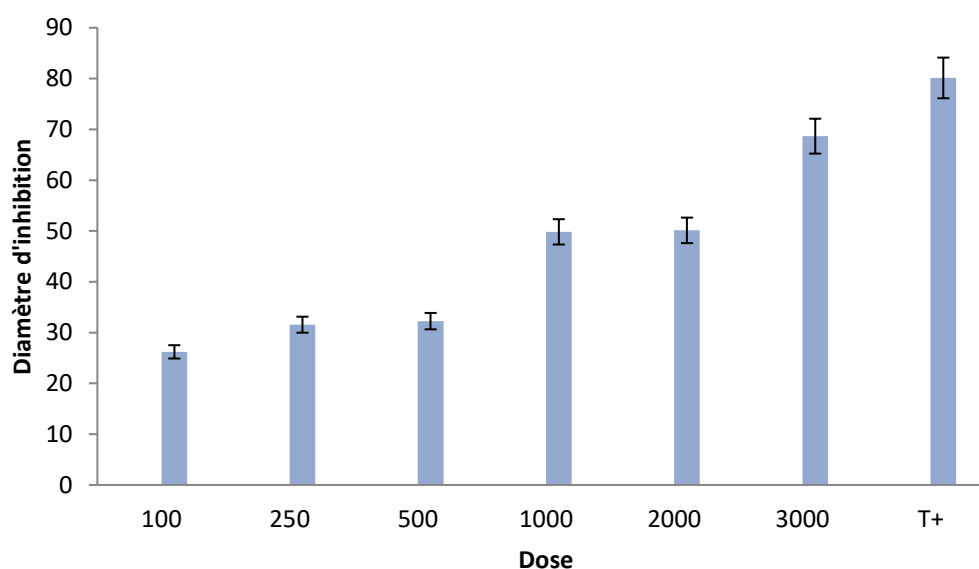


Figure 49 : Effet des différentes concentrations sur le diamètre d'inhibition contre *P. digitatum*

Les huiles essentielles de *Thymus vulgaris* montre un effet très hautement significatif sur la croissance du champignon étudié (ANOVA ; ddl= 8 ; F= 106,7 ; $p \leq 0.001$). Cet effet dépend largement de la concentration utilisée des HE. Ainsi, plus la concentration en huiles essentielles augmente, plus l'inhibition de la croissance fongique est importante. Cette augmentation s'accroît à partir de la concentration 1000 ppm

Le traitement statistiques des résultats (Student Newman) Keuls révèle une homogénéité entre les moyennes des diamètres d'inhibitions des concentrations 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm à un seuil de 0.05. Les moyennes des diamètres d'inhibitions correspondant aux concentrations de 1000 ppm et 2000 ppm présentent aussi une homogénéité. En outre, la moyenne des diamètres d'inhibitions induite par la concentration 3000 ppm est significativement différente des autres concentrations et qui est de même pour le témoin positif.

b. Penicillium italicum

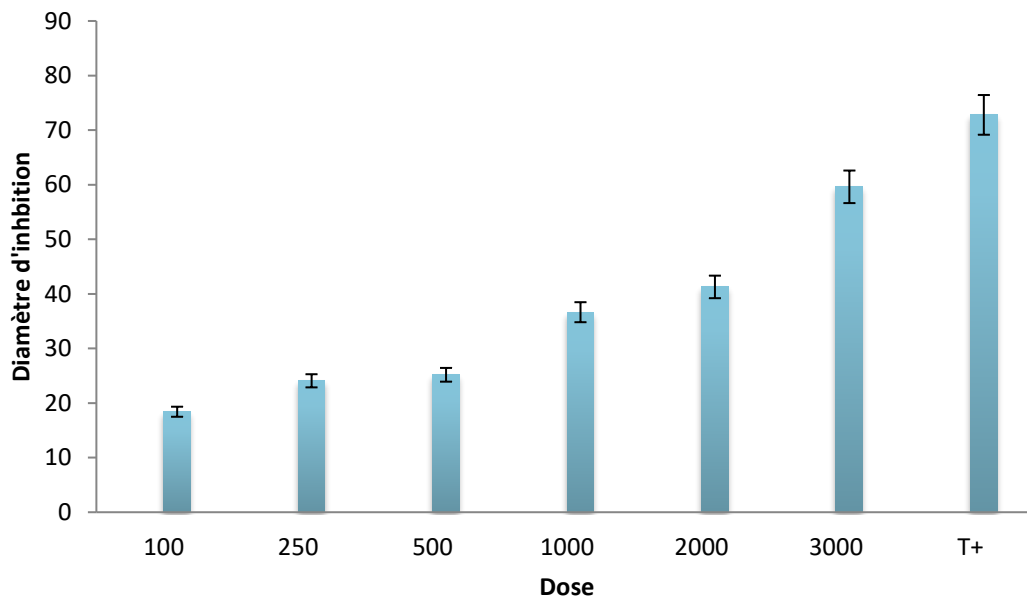


Figure 50 : Effet des différentes concentrations des HE du *thym* sur le diamètre d'inhibition du champignon *P. italicum*

A la lumière de ces résultats, nous avons constaté que les HE du thym ont montré une efficacité importante sur le développement de *Penicillium italicum*, avec des moyennes des diamètres d'inhibitions de 18.41mm, 24.08mm, 25.13 mm, 36.65 mm, 41.28 mm, 59.62 mm respectivement pour les concentrations de 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 2000 ppm et 3000 ppm. En comparaison avec le contrôle positif (Imazalil) ayant donné un diamètre d'inhibition de 72.80 mm et qui se montre plus efficace que les huiles essentielles du thym

Le traitement statistique des résultats (ANNOVA ; ddl= 8 ; F= 76,65 ; $p \leq 0.001$) a permis de déceler un effet hautement significatif de la concentration des HE sur l'inhibition de la croissance fongique de *P. italicum*

L'utilisation du test Newman-Keuls montre l'homogénéité des moyennes des diamètres d'inhibition de la concentration 3000ppm et du témoin positif à un seuil de 0.05, puisqu'elles engendrent à peu près le même effet sur *P. italicum*. Contrairement aux autres concentrations qui ont un effet inhibiteur moins important que le témoin positif l'imazalil.

2. Evaluation de l'effet antifongique des huiles essentielles de la *Menthe pouliot*

L'apparition des symptômes sur les fruits traités pour les deux champignons (*P. italicum* et *P. digitatum*), a commencé dès le troisième jour de stockage pour le témoin traité par l'eau, le témoin traité par le tween et la concentration 100, 250, 500 ppm. Par contre les fruits traités avec des concentrations de 1000, 2000, 3000 ppm, l'apparition de l'infection fongique n'est apparue qu'à partir du sixième jour.

a. *P. digitatum*

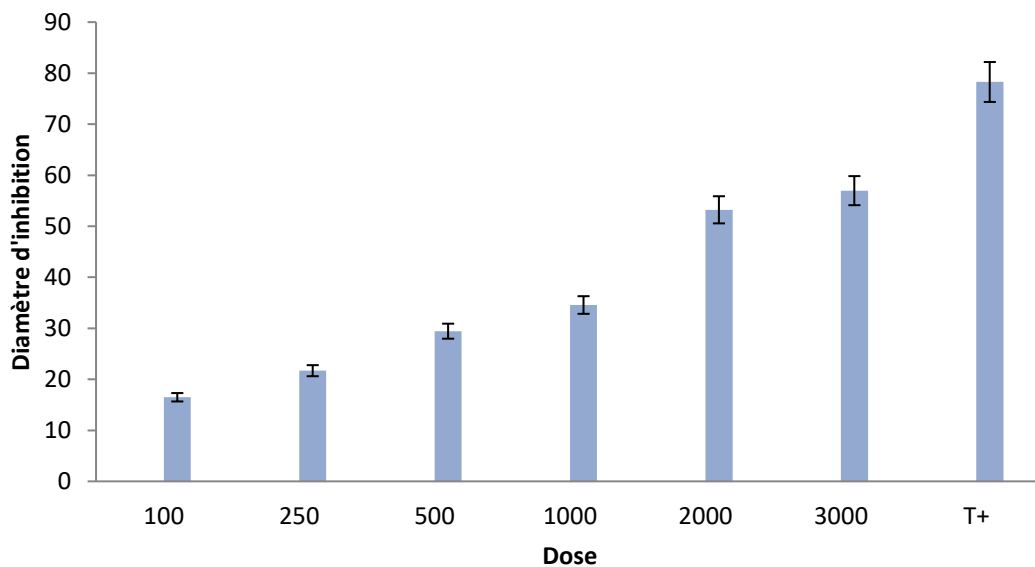


Figure 51 : Effet des HE utilisées à des différentes concentrations sur le diamètre d'inhibition du champignon *P. digitatum*

Nous avons remarqué que les huiles essentielles de la Menthe pouliot exercent un effet relativement important sur la croissance mycélienne du champignon *P. digitatum*, avec des moyennes des diamètres d'inhibition de 16.48mm, 21.69mm, 29.43mm, 34.56mm, 53.22mm, 56.97mm pour les concentrations de 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 2000ppm, 3000 ppm et de l'ordre de 78.27mm pour la moyenne du diamètre d'inhibition du témoin positif.

L'analyse de la variance appliquée sur les résultats obtenus (ANNOVA ; ddl= 8 ; F= 63,6 ; $p \leq 0.001$) montre que l'inhibition de la croissance fongique de *P. digitatum* est significativement dépendante de la concentration des huiles essentielles de la menthe pouliot.

Le test SNK, à un seuil de 0.05 nous a permis de distinguer six sous-groupes (Annexe 3), avec une excellente efficacité très importante correspondantes à des doses de 2000, 3000 ppm, comparable à celle du contrôle positif.

-Sous-groupe 1 : formé par le témoin eau et Témoin tween ;

-Sous-groupe 2 : constitué par les concentrations 100, 250 ppm ;

-Sous-groupe 3 : formé par les concentrations 250et 500ppm ;

-Sous-groupe 4 : constitué par les concentrations 500et 1000ppm ;

-Sous-groupe 5 : constitué par les concentrations 2000 et 3000ppm ;

-Sous-groupe 6 : formé par le contrôle positif (Imazalil) ;

b. *Penicillium italicum* :

Les résultats des moyennes des diamètres d'inhibitions générées par les différentes concentrations des huiles essentielles de *la M. pouliot* sur la croissance du champignon étudié, sont donnés sur la figure ci-dessous. Il ressort clairement que les H.E sont caractérisées par une efficacité excellente sur le développement de *P. italicum*. Les moyennes des diamètres d'inhibitions sont de l'ordre de 32.39mm, 34.78mm, 40.48mm, 56.85mm, 70.14mm, 79.09mm respectivement pour les concentrations de 100, 250, 500, 1000, 2000, 3000 ppm, en comparaison avec le témoin positif (Imazalil) qui a présenté un diamètre d'inhibition de 77.04 mm

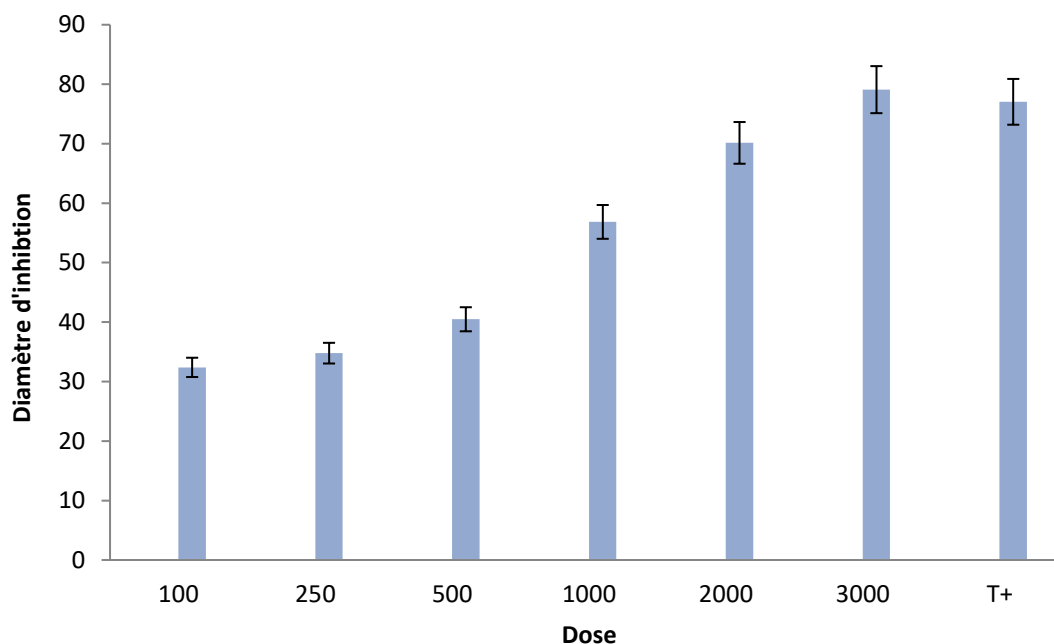


Figure 52 : Effet des différentes concentrations sur le diamètre d'inhibition du champignon *P.italicum*

Il ressort des résultats obtenus que l'inhibition de la croissance fongique de *P. italicum* est significativement dépendante à la concentration des HE de la *menthe pouliot* (ANNOVA ; ddl= 8 ; F= 70.14 ; $p \leq 0.001$). En effet un pouvoir inhibiteur significativement important des essences végétales de la menthe pouliot est constaté par une homogénéité entre les concentrations 2000,3000 ppm et le témoin positif. En ce qui concerne le sous-ensemble 1 (Annexe 3) , il est constitué par les Témoin eau et tween, pour le sous-groupe 2est formé par les doses 100, 250,500 ppm qui montre un effet significatif et enfin le sous-groupe 3 constitué par la concentration 1000ppm.

3. Evaluation de l'effet antifongique des huiles essentielles d'*Artemisia herba alba*

Pour les deux champignons (*P. italicum* et *P. digitatum*), l'apparition des symptômes sur les fruits traités a débuté dès le troisième jour de stockage pour le témoin eau, le témoin tween et pour les concentrations de 100, 250,500 ppm. Par contre les fruits traités par les concentrations 1000, 2000, 3000 ppm n'ont montré l'apparition de l'infection fongique qu'à partir du quatrième jour de stockage.

a. Penicillium digitatum

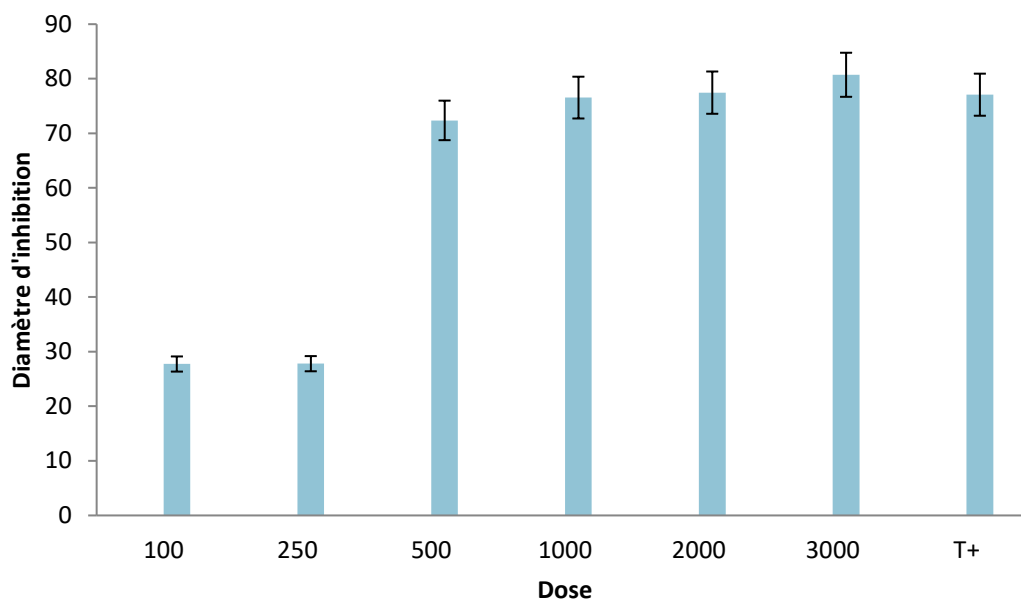


Figure 53 : Effet des différentes concentrations sur le diamètre d'inhibition du champignon *P. digitatum*

Des résultats obtenus, nous avons remarqué que les huiles essentielles d'*Artemisia herba alba* ont montré un effet très efficace à des concentrations de 500 ppm, 1000 ppm, 2000 ppm avec des moyennes des diamètres d'inhibition de 72.37 mm, 76.55mm, 77.46mm, 80.73mm respectivement par rapport au témoin positif ayant une moyenne des diamètres d'inhibition de 77.08 mm.

Nous avons pu montrer que les doses 1000, 2000,3000 ppm ont un effet hautement significatif sur le diamètre d'inhibition de la croissance fongique de *P. digitatum* comme celui du produit de référence, du fait qu'ils montre une homogénéité significatif entre eux (test SNK, $p \leq 0.05$) (Annexe 4).

b. Penicillium italicum

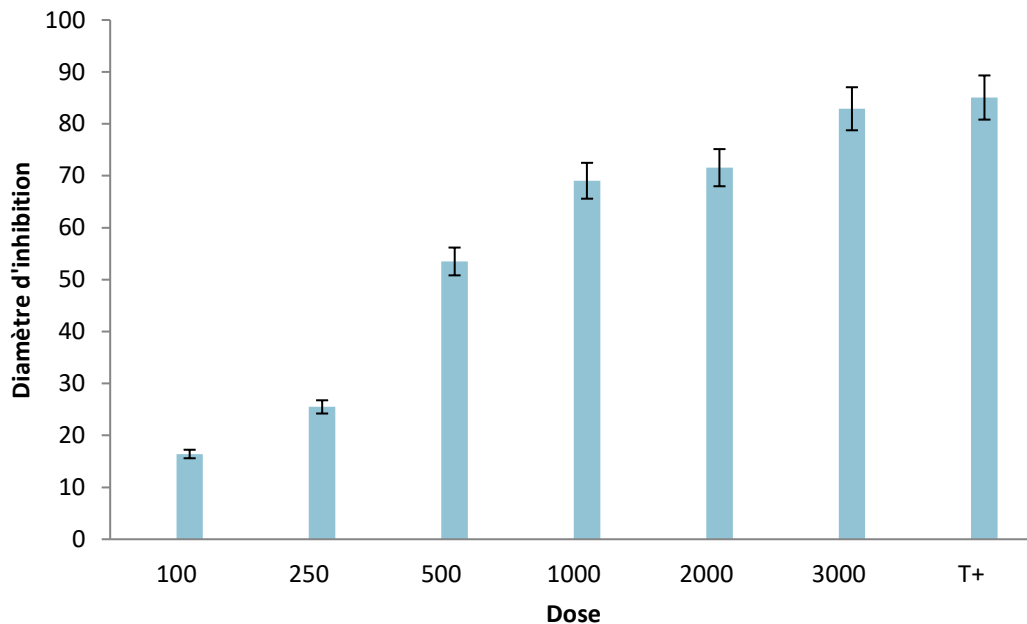


Figure 54 : Effet des différentes concentrations des HE étudiées sur le diamètre d'inhibition du champignon *P.italicum*

Les huiles essentielles d'*Artemisia herba alba* montrent un effet très proche de celui du témoin positif et plus particulièrement pour la concentration 3000ppm. Le diamètre d'inhibition de la croissance mycelienne par les huiles essentielles est très important pour des concentrations supérieures ou égale à 500 ppm (Annexe 4). Celui-ci, diffère significativement par rapport à celui induit par les deux doses de 100 et 250 ppm.

4. Evaluation de l'effet antifongique des huiles essentielles de *Lavandula hybrida*

Pour les deux champignons (*P. italicum* et *P. digitatum*), l'apparition des symptômes sur les fruits traités débute dès le quatrième jour de stockage pour le témoin eau, le témoin tween et la concentration 100, 250 et 500 ppm. Par contre les fruits traités par les concentrations 1000, 2000, 3000 ppm des HE de *lavandula hybrida*, n'ont montré l'apparition de l'infection fongique qu'à partir du cinquième jour.

a. Penicillium digitatum

Les résultats obtenus par les huiles essentielles de *Lavandula hybrida* sur le champignon *P. digitatum*, montrent un effet inhibiteur relativement faible par rapport à celui induit par le témoin positif (imazalil) .

Le diamètre d'inhibition correspond à la plus grande concentration (3000 ppm), est de 39.44 contre à 78.18 mm pour le témoin positif.

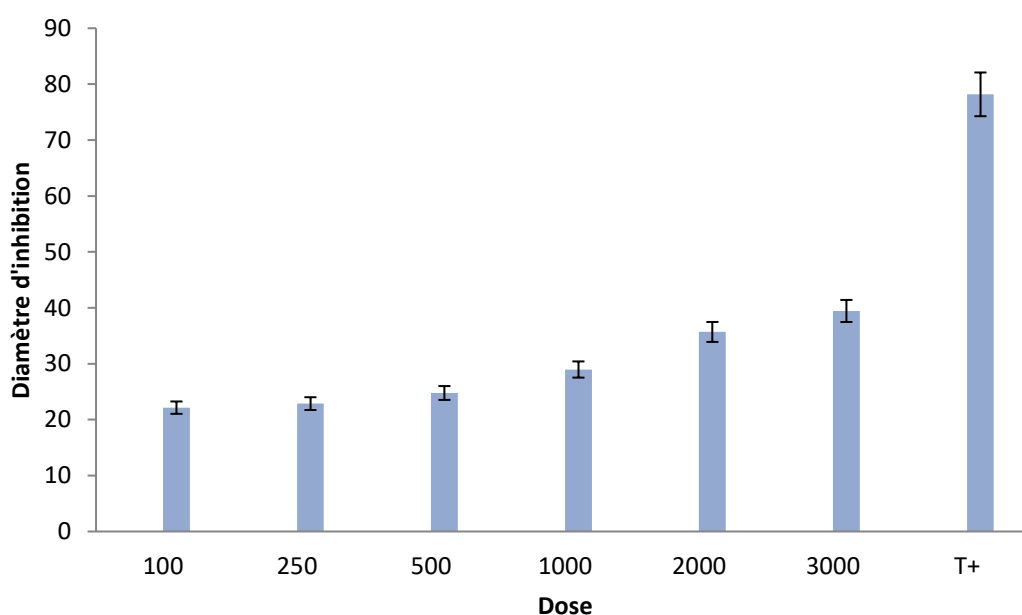


Figure 55 : Effet des différentes concentrations des HE utilisées sur le diamètre d'inhibition du champignon *P. digitatum*

Le traitement statistique des résultats obtenus (ANNOVA ; ddl= 8 ; F= 136,9 ; $p \leq 0.001$) nous ont permis de souligner que l'inhibition de la croissance fongique de *P. digitatum* est significativement dépendante de la concentration des huiles essentielles de *lavandula hybrida* (Annexe 5).

Toutefois, les résultats du test SNK (Annexe 5) à un seuil de 5%, montrent que les doses : 100, 250, 500 et 1000 ppm des huiles essentielles de *Lavandula hybrida* ont un faible effet sur l'inhibition de la croissance fongique du *P. digitatum*. Par ailleurs les concentrations 2000 et 3000 ppm ont un effet plus significatif par rapport aux faibles doses (100, 250, 500

et 1000 ppm). Nous avons bien remarqué que quelque soit les concentrations utilisée des huiles essentielles, le témoin positif reste l'inhibiteur le plus efficace sur la croissance mycelienne du champignon.

b. Penicillium italicum

Contrairement à la réponse de *Penicillium digitatum*, le champignon *Penicillium italicum* décèle une grande sensibilité, vis a vis l'effet des huiles essentielles de *lavandula hybrida* avec des diamètres moyennes d'inhibition de 43.01 mm, 43.63 mm, 66.48 mm respectivement, pour les concentrations 1000 ppm, 2000 ppm, 3000 ppm par rapport au contrôle positif ayant induit un diamètre d'inhibition de 79.45mm.

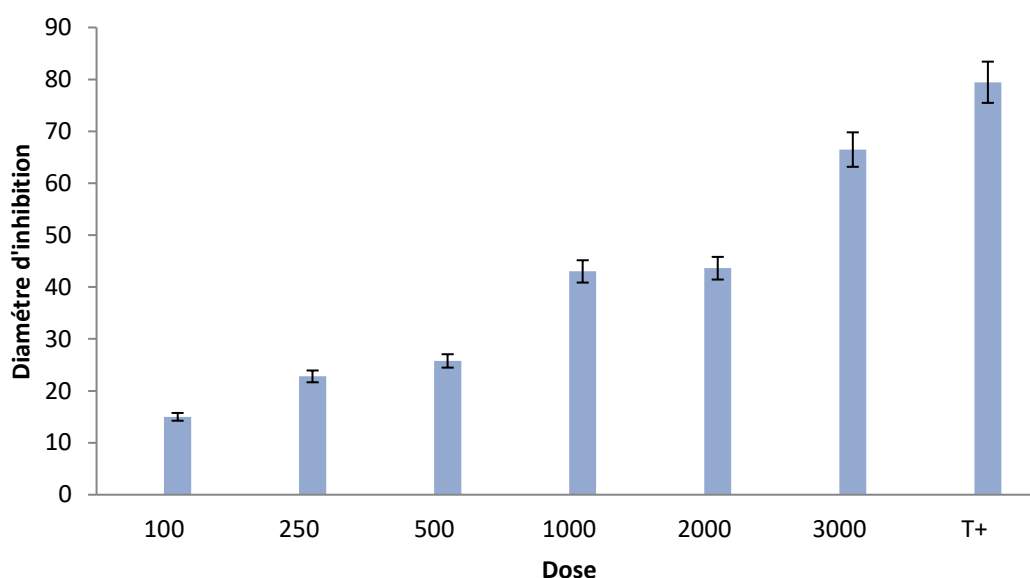


Figure 56 : Effet des différentes concentrations des HE des PAM étudiées

sur le diamètre d'inhibition du champignon *P. italicum*

L'analyse de la variance utilisée dans le traitement des résultats obtenus (ANNOVA ; ddl= 8 ; F= 87.9 ; $p \leq 0.001$) montre que l'inhibition de la croissance fongique de *P. italicum* est significativement dépendante de la concentration des huiles essentielles de *lavandula hybrida*. Autrement dit, l'activité antifongique des huiles essentielles varie en fonction de la dose utilisée. Cependant, l'imazalil reste l'inhibiteur ayant induit un diamètre d'inhibition le plus développé

Bien que les symptômes de pourriture verte aient apparus sur les fruits traités par l'Imazalil 80%, ce dernier reste plus efficace que les huiles essentielles de *Lavandula hybrida*.

Il est à noter que nous avons utilisé d'autres doses, qui sont 4000 ppm et 5000 ppm ayant montré une bonne efficacité au niveau de l'activité antifongique, mais, elles ont provoqué une phytotoxicité sur les fruits traités, qui s'est manifestée par des brûlures, d'où l'utilisation de la concentration 3000ppm.



Figure 57 : Effet phytotoxique des huiles essentielles étudiées sur les fruits en post-récolte

5. Evaluation de l'effet des huiles essentielles sur l'inhibition de la croissance fongique de *P. digitatum*

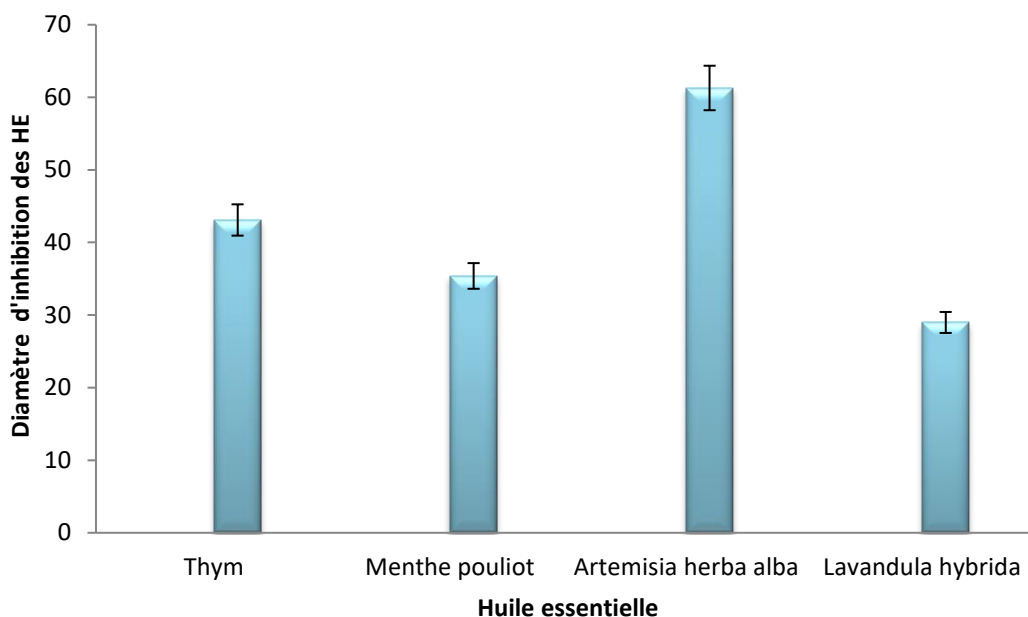


Figure 58 : Effet des huiles essentielles des quatre PAM sur l'inhibition de la croissance fongique de *P. digitatum*

La représentation graphique des résultats obtenus sur l'effet inhibiteur des huiles essentielles des différentes plantes étudiées, nous montre que celles-ci, influence différemment sur la croissance mycelienne du champignon testé. *Artémisia herba alba* se montre la plus importante au niveau de l'activité antifongique, suivie de *Thymus vulgaris*, *Mentha pulegium* et enfin *lavandula hybrida*

Le traitement statistique des résultats obtenus (ANNOVA ; $ddl=3$; $F= 18.34$; $p \leq 0.001$) montre que la sensibilité du champignon dépend largement de la nature de la plante étudiée.

Les résultats du test SNK montrent une homogénéité entre les moyennes des diamètres d'inhibitions engendrés par les huiles essentielles de *Lavandula hybrida* et *Mentha pulegium*, ainsi, que ceux de *Mentha pulegium* et *Thymus vulgaris*. En outre les moyennes des diamètres d'inhibition induits par les HE d'*Artemisia herba alba* présente une différence hautement significatif

6. Effet des huiles essentielles sur l'inhibition de la croissance fongique de *P.italicum*

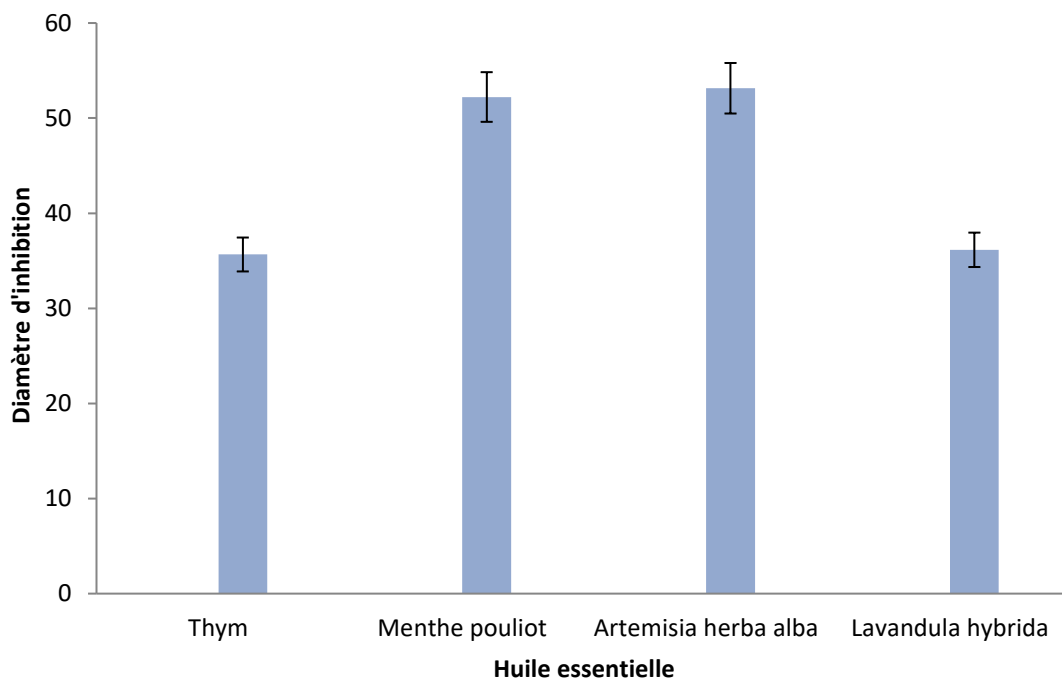


Figure 59 : Effet des huiles essentielles sur l'inhibition de la croissance fongique de *P.italicum*

Parallèlement, les huiles essentielles des PAM étudiés montrent un effet antifongique variable selon la nature des essences utilisées.

Ainsi, les huiles essentielles des deux PAM : *Mentha pulegium* et d'*Artemisia herba alba* se montrent plus efficaces sur l'inhibition de la croissance fongique de *P. italicum*.

A cet égard Belghazi et ses collaborateurs (2002) ont affirmé que les HE de *Mentha pulegium*, dont le composé majoritaire est le pulegone, est dotée d'un pouvoir antifongique important contre *Penicillium* et *Mucor*.

CONCLUSION GENERALE

Durant ces dernières decenies, de nombreuses études ont mis l'accent sur le screening de certaines plantes aromatiques et médicinales, afin de développer de nouveaux composés alternatifs à l'utilisation chimique dans la lutte contre les maladies des fruits d'agrumes en post-récolte (El Mahi et *al.*, 1998 ; Khalouki et *al.*, 2000 ; Hmamouchi et *al.*, 2001 ; Lahlou et *al.*, 2001 ; Arras et Usai, 2001 ; Alilou et *al.*,2007).

Dans la présente étude portant sur l'activité antifongique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques et médicinales et qui sont *Lavandula hybrida*, *Mentha pulegium*, *Artémisia herba alba*, *Thymus vulgaris* sur la croissance mycelienne des champignons *P. italicum* et *P. digitatum* "in vitro" comme "in vivo", en comparaison avec le traitement des deux champignons par un produit chimique "Imazalil", il ressort que la plupart des huiles essentielles testées "in vitro", ont réduit la croissance mycélienne des deux champignons étudiés, et ceci à des degrés variables selon la nature de la plante testée. Ainsi, les huiles essentielles de *Mentha pulegium* (80µl), semblent avoir une inhibition complète de la croissance mycélienne de l'agent pathogène *P. italicum*. Le diamètre de la zone d'inhibition obtenue est de l'ordre de 90 mm, contrairement au traitement chimique, dont le diamètre n'est que de 70mm.

Quant aux autres plantes aromatiques et médicinales testées, l'effet de leurs huiles essentielles est variable en fonction de la concentration utilisée. L'effet peut être ainsi, fongicide et fongistatique. L'effet des huiles essentielles observés sur les champignons pathogènes, pourrait être attribué à leur teneur en métabolites secondaires, connues par leur activité antifongique, comme ceci, a été largement souligné par certains auteurs (Talibi et *al.*, 2012 ; Askrane et *al.*,2011)

Les essais in vitro ont également, décelé une forte efficacité des huiles essentielles de la plante *d'Artémisia herba alba* sur la croissance mycélienne de l'agent pathogène *Penicillium digitatum*. Le diamètre de la zone d'inhibition obtenu est de 80mm pour la dose 80µl. Nous avons également déterminé les concentrations minimales inhibitrices (CMI) relatives aux différentes plantes utilisées. Les plus faibles concentrations minimales

inhibitrices (CMI) ont été enregistrées, avec les huiles essentielles des deux plantes aromatiques et médicinales de *Mentha pulegium* et *Thymus vulgaris*.

Le microorganisme le plus sensible à ces huiles essentielles était *Penicillium italicum* dont, la croissance a été arrêtée à une concentration de 1 /2000 v/v pour *Thymus vulgaris* et 1/1000 v/v pour *Mentha pulegium*, avec une inhibition de la croissance mycélienne des deux agents pathogènes à une concentration 1/250 v/v.

Bien que la réalisation des tests "in vitro" est une très étape importante, et primordiale dans le criblage des plantes médicinales et aromatiques étudiées, sur la base de leur potentiel antifongique, les tests "in vivo" sont également, essentiels et indispensables pour confirmer d'abord, les résultats obtenus "in vitro" et ensuite, mettre au point des préparations dérivées des plantes qui sont susceptibles d'être appliquées à l'échelle semi-commerciale comme ceci a été souligné par certains auteurs (Gorris et Smid, 1995; Tegegne et al., 2008).

Globalement, toutes les huiles essentielles testées ont montré un effet inhibiteur, dont le degré d'efficacité est très variable sur les deux champignons étudiés. Ces essences végétales restent des composées à efficacité variable, selon la concentration utilisée. Le pourcentage de protection est d'autant plus important que la concentration est plus forte, comme l'inhibition efficace de *P. digitatum* obtenue à des fortes concentrations de 1000, 2000 et 3000 ppm des huiles essentielles d'*Artemisia herba alba*. Par contre, à faibles concentrations 100, 250, 500 ppm toutes les huiles ont présenté un diamètre d'inhibition sur la croissance mycélienne du champignon *P. digitatum* relativement faible. En outre les huiles essentielles de *Mentha pulegium* présentent un diamètre d'inhibition modéré pour les concentrations 2000 et 3000 ppm.

En ce qui concerne l'étude antifongique "in vivo", des huiles essentielles des quatre PAM contre *P. italicum*, nous avons pu montrer une inhibition efficace pour les HE d'*Artemisia herba alba* et de *Mentha pulegium* et ceci à des concentrations de 3000, 2000, 1000 ppm. Alors que pour les HE des deux autres plantes : *Thymus vulgaris* et *lavandula hybrida*, une inhibition faible a été induite par les concentrations 100, 250, 500, 1000, 2000 ppm, sauf pour la dose de 3000 ppm, le diamètre d'inhibition est relativement modérée.

Nous pouvons donc, conclure qu'en terme d'efficacité des quatre Plantes aromatiques et médicinales utilisées, les huiles essentielles d'*Artemisa herba alba* à des concentrations de 3000, 2000, 1000 ppm, se sont montrées très efficace, contre les deux champignons *Penicillium digitatum* et *Penicillium italicum*. A concentration de 3000 ppm, les HE d'*artemisia herba alba* ont une activité antifongique plus importante que le témoin positif, avec un diamètre d'inhibition de 82.53 mm, contre 77.08 mm, comme diamètre d'inhibition généré par le produit chimique.

De l'ensemble des résultats obtenus, il ressort que les huiles essentielles des quatre plantes testées, présentent "in vitro" comme "in vivo", une activité inhibitrice très importante sur les deux agents pathogènes *Penicillium digitatum* et *Penicillium italicum*. Cette activité trouve probablement son origine dans la nature de la composition chimique des substances testées.

Cependant, la valeur des huiles essentielles tient à l'intégralité de ses composants et non seulement à ses éléments majoritaires. Ces résultats nous permettraient d'avancer que les plantes aromatiques et médicinales utilisées peuvent être utilisés par ailleurs, comme moyens alternatifs, à l'utilisation chimique dans le traitement des fruits d'agrumes en post-récolte.

A l'issue de ces activités antifongiques des huiles essentielles des quatre plantes aromatiques et médicinales étudiées, nous projetons comme perspectives, leur application dans l'industrie agro-alimentaire et il serait d'une grande importance de :

- Déterminer l'effet combiné des différentes huiles essentielles testées ;
- Effectuer des essais dans des conditions semi-commerciales, en utilisant les huiles essentielles ayant un effet antifongique plus efficace ;
- Enrichir notre collection en plantes aromatiques et médicinales à action antifongique prouvée ;
- Réaliser une domestication de ces PAM afin de protéger la biodiversité et rapprocher le produit biologique de l'utilisateur ;

- Réaliser une étude économique pour évaluer le coût de l'utilisation des huiles essentielles dans la lutte alternative ;
- Etablir des formulations commerciales à base de substances naturelles non néfastes pour la santé humaine et pour l'environnement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abraham A.O. (2010). Integrated use of yeast, hot water and potassium silicate treatments for the control of postharvest green mould of citrus and litchi. Doctoral thesis. University of KwaZulu-Natal, Pietermaritzburg, Republic of South Africa. 216p.
- Abraham A.O, Laing M.D, Bower J.P. (2010). Isolation and *in vivo* screening of yeast and *Bacillus* antagonists for the control of *Penicillium digitatum* of citrus fruit. *Biological Control*, 32-38.
- Adam A. (2008). Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxygénase par des rhizobactéries non-pathogènes. Thèse de Doctorat. Université de Liège. 194 p.
- Adio, AM., (2005). Isolation and structure elucidation of sesquiterpenoids from essential oils of some liverworts (Hepaticae). These for the degree of Dr. Rer. National à l'institut de chimie organique. Université de Hambourg. 280 p.
- Akrout, A., El jani, H., Amouri, S., Neffati, M., (2010). "Screening of Antiradical and Antibacterial Activities of Essential Oils of *Artemisia campestris* L., *Artemisia herba alba* Asso, & *Thymus capitatus* Hoff. Et Link. Growing Wild in the Southern of Tunisia", *Science and technology*, 29-39.
- Akrout, A., Chemli, M., Simmonds, G., Kite, M., Hammami, M., Chreif, I., (2003). "Seasonal variation of the essential oil of *Artemisia campestris* L", *Journal of Essential Oil Research*, 333-336.
- Al-Reza S.M., Rahman A., Ahmed Y., Kang S.C. (2010). Inhibition of plant pathogens *in vitro* and *in vivo* with essential oil and organic extracts of *Cestrum nocturnum* L. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 86-92
- Amarti, F., Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A., Aarab, L., El Ajjouri, M., Chaouch, A., (2010). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. *Biotechnol. Agron.Soc. Environ.* 141-148
- Ameziane N., Boubaker H., Boudyach H., Msanda F., Jilal A., Ait Benaoumar A. (2007). Antifungal activity of Moroccan plants against citrus fruit pathogens. *Agronomy for sustainable development* , 273-277.

- Amiri A. (2004). Contribution a l'étude de l'écologie des *Penicillium spp.* sur fruits à pépins en France, conséquences sur les méthodes de lutte. Thèse de Doctorat. Université PARIS 6. 181 p.
- Anonyme, (2015).. Bilan de la campagne agrumicole. Ministère d'agriculture et de la pêche maritime Rabat. Maroc, 4p.
- Aoudou Y., Léopold T. N., Michel J. D. P., Xavier E. F. et Moses M. C.,(2010). Antifungal properties of essential oils and some constituents to reduce foodborne pathogen. *Journal of Yeast and Fungal Researche*, 1-8.
- Arslan U., Ilhan K., Vardar C., Karabulut O.A. (2009). Evaluation of antifungal activity of food additives against soilborne phytopathogenic fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* ,537-543
- Arras, G., Usai, M., (2001). Fungitoxic activity of twelve essential oils against four postharvest Citrus pathogens: chemical analysis of *Thymus capitatus* (L.) Hofmegg oil and its effect in subatmospheric pressure conditions.*Journal of Food Protection* . , 1025-1029
- Askarne L., Talibi I., Boubaker H., Boudyach E.H., Msanda F., Saadi B., Serghini M.A., Ait Ben Aoumar A. (2012). *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of several Moroccan plants against *Penicillium italicum*, the causal agent of citrus blue mold. *Crop Protection* : 53-58.
- Baser K.H.C. et Buchbauer G., (2010).Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications. Ed. *Taylor and Francis Group*, LLC. United States of America. 994p.
- Barkai-Golan R., (2001). Postharvest diseases of fruits and vegetables development and control, 395p.
- Barmore C., Brown G. (1982). Spread of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* during contact between citrus fruits. *Phytopathology* 72: 116-120.
- Benyad N., (2008). Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines: moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Université Mohammed V. Rabat, 67p.
- Belaiche P., (1979). L'aromatogramme. Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. M.S.A. Editeur, Paris.Tome 1, 204p.
- Belghazi, L., Lahlou, N., Alaoui Ismaili, M., Abousaouiria, T., Habti, N., Tantaoui, Iraki A., Talbi, M., Blaghen, M., Fellat-Zarrouch, K.,(2002). Extraction et analyse par

chromatographie en phase gazeuse de l'huile essentielles de menthe pouliot. Test antifongique. Congrès de Biochimie. Casablanca. Biochimie et santé.

Billerebeck V.G., (2007). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie* : 249-253.

Bousbia N., (2004). Extraction et identification de quelques huiles essentielles (nigelle, coriandre, origan, thym, romarin), étude de leurs activités antimicrobiennes. Thèse de Magistère, option Sciences Alimentaires, Institut National Agronomique, Alger (Algérie), 68p.

Boudjelal A., (2013). Extraction, identification et détermination des activités biologiques de quelques extraits actifs de plantes spontanées (*Ajugaiva*, *Artemisia herba alba* et *Marrubiumvulgare*) de la région de M'Sila, Algérie.thèse doctorat : Biochimie Appliquée. Annaba : Université Badji Mokhtar, 61p.

Boubaker H. (1993). Etude des problèmes phytosanitaires des fruits d'agrumes en post-récolte. Thèse de troisième cycle. University Cadi Ayyad, Faculté des sciences Semlalia, Marrakech. 117 p.

Bruneton, J., (1993). Phytochimie et pharmacognosie des plantes médicinales, éditions Techniques et documentations Lavoisier. 915 p

Binet, P., Brunel, J.P., (1967). Physiologie végétale. Tome II. Edit., Doin

Brown G.E., Ismail M.A. et Clay C., (1995). Green mold in fact sheets on postharvest diseases of citrus. Florida dept. of citrus, *Lakeland*, FL.

Bajpai V.K., Shukla S., Kang S.C. (2008). Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of *Silene armeria* L. *Bioresource Technology* 99(18): 8903-8908.

Bansod S. et Rai M., (2008). Antifungal Activity of Essential Oils from Indian Medicinal Plants Against Human Pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. *World Journal of Medical Sciences* 3: 81-88.

Bellakhdar J. (1997) La Pharmacopée Marocaine xTraditionnelle : Médecine arabe ancienne et savoirs populaires, *Ibis Press*. pp. 764.

Brown G.E., (1984). Efficacy of citrus Postharvest fungicides Applied in water or Resin solution water wax. *Plant Disease* 68 : 415-418.

Brown G.E., (1987). Decay control - Fungicide Applications Postharvest Pathology course. University of Florida - Gainesville.

- Brown G.E., (1988). Efficacy of guazatine for control of postharvest decays of oranges. *Plant dis* 72: 691-694.
- Couey H.M.,(1989). Heat treatment for control of postharvest diseases and insect pests of fruits. *HortScience* 24: 198-202.
- Cook R.J., Baker K.F. (1983). The nature and practice of biological control of plant pathogens, APS Press, St. Paul, MN. pp. 539.
- Chalutz E., Cohen E., Weiss B. et Wilson C.L., (1988). Biocontrol of postharvest diseases of citrus fruit by microbial antagonists. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 3: 1467 – 1470.
- Colombo A. (2004). La culture des agrumes, *De Vecchi*. pp. 142.
- CGA. (2007) Citrus Growers Association. Key Industry statistics.
- Const J.A. et Benekc E.S., (1968).Laboratory manual for introductory mucology. Brugess publishing company, 199 p.
- Charchari S., Dahoun A., Bachi F., Benslimani A. (1996). *In vitro* antimicrobial of essential oils of *Artemisia herba-alba* and *Artemisia judacia* from Algeria. *Rivista-Italiana-EPPOS*. 18,3-6.
- Caillard, J., (2003). Les plantes, des usines chimiques en miniature. Dossier de ressources documentaires. CRDP Midi-Pyrénées. 6 p.
- Colinew.wright., (2002). *Artemisia*. Ed.Taylor, france. 280 p.
- Cohen E. et Schiffman-nadel M., (1978).Effect of different chemical compounds on *Phytophthora citrophthora* in vitro and citrus fruits. *Plant Disease* 62: 388 - 389.
- Chebli B., Achouri M., Idrissihassani L.M. et Hmamouchi M., (2003).Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr, J. *Ethnopharmacol* 89: 165-169.
- Carson C.F., Rilley T.V. et Bosque F., (2002).Antimicrobial activity of the major components of essential oil of *Malaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Bacteriology* 78:264-269.
- Dorman H.J.D. et Deans S.G., (2000).Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88 : 308-316.
- Davidson P.M., (1997). Methods for testing the efficacy of food antimicrobial. *Food Technology* 43:148-155.
- De Corato U., Maccioni O., Trupo M., Di Sanzo G. (2010). Use of essential oil of *Laurus nobilis* obtained by means of a supercritical carbon dioxide technique against post harvest spoilage fungi. *Crop Protection* 29(2): 142-147.

- Deferera, D.J., Ziogas, B.N., Polissiou, M.G. *J. Agric (2000). Food. Chem.* 48(6) 2576-2581
- Billerbeck De, VG., (2007). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*, 5 (5), 249-253.
- Domsch K.H., Gams W., Anderson T.-H. (1980). *Compendium of soil fungi*, Academic Press, London. pp. 540-611.
- Davis R.M., (1982). Control of phytophthora root and food rot of citrus with systemic fungicides metalaxyl and phosethyl aliminium. *Plant dis.* 66, n°3: 218-220.
- 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(2): 97-101.
- Didi Cheik R., (1991). Influence de l'origine des fruits et des traitements chimiques sur l'incidence des maladies de conservation des agrumes. Mémoire de 3ème cycle Agronomie. IAV. Hassan II. Rabat, 124 p.
- Eckert J.W. et Ogawa, J.M., (1985). The chemical control of postharvest diseases: subtropical and tropical fruits. *Annu. Rev. Phytopathol* 23: 421-454.
- Eckert, J.W. et Brown, G.E., (1986). Postharvest citrus diseases and their control. Fresh citrus fruit, A.V.I. publishing Co., U.S.A., 315 – 360 Symposium on Tropical Fruit in International Trade 269. pp. 477-494.
- Eckert J.W., Eaks I.L. (1989). Postharvest Disorders and Diseases of Citrus Fruits, The Citrus Industry: *Crop protection*, postharvest technology, and early history of citrus research in California. pp. 179-260.
- Eckert J.W. et Kolbezen M.J., (1977). Influence of formulation and application method on the effectiveness of benzimidazole fungicides for controlling postharvest diseases of citrus fruits. *Neth. J. Plant Pathol* 83 (suppl. I): 343 - 352.
- Eckert J. (1989). Recent developments in the chemical control of postharvest diseases. *Fruit Belge* 60(440): 242-248.
- Eckert J.W. et Sommer N.F., (1967). Control of fruits and vegetables by postharvest treatment. *Annu. Rev. Phytopathology* 5: 391- 432.
- El-Bouhairi H., (1992). Etude des pourritures à *Penicillium* spp. des fruits d'agrumes dans le Sous. Mémoire de 3eme cycle agronomie. IAV. Hassan 2. Campus d'Agadir
- Eilenberg J., Hajek A., Lomer C. (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl* 46: 387-400.

- ER-Raki S. (2007). Estimation des besoins en eau des cultures dans la région de Tensift AL Haouz: Modélisation, Expérimentation et Télédétection. Thèse de Doctorat. Université Cadi Ayyad. 128 p.
- El Ajjouri, M., Satrani, B., Ghanmi, M., Aafi, A., Farah, A., Rahouti, M., Amarti, F., Aberchane, M., (2008). Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* Pomel et *Thymus capitatus* (L.) Hoffm. & Link contre les champignons de pourriture du bois d'oeuvre. *Biotechnol. Agron. Soc.* 12 (4), 345-351.
- El idrissi S.R., (2007). Valorisation de *Thymus zygis* du moyen atlas Marocain : extraction, identification et caractérisation. Thèse de troisième cycle, Université Moulay Ismail. Meknès, 75p.
- El Mahi, M., Essassu, EM., Hmamouchi, M., (1998). Etude de l'activité antimicrobienne et antibilharienne du *Zizyphus vulgaris*. *Fitoterapia*. 68, 284-88.
- Felice S., N. Francesco, A.A. Nelly, B. Maurezio & H. Werner, (2004) Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Achillea falcata* L. *Flav. Fragr. J.*, 20 (3), 291 - 294.
- Ferchichi A., chaieb C., ferjani e, (2004). Caractérisation de la variabilité du comportement phytologique de certaines populations d'*Artemisia herba-alba* du sud tunisien. *CIHEMA*. vol.(62):211- 216p.
- Fellah, M. Romdhane, M. Abderraba, (2006). Extraction et étude des huiles essentielles de *la Salvia officinalis*. l cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie 16(2), 193-202. *Journal de la société algérienne de chimie*.
- FAOSTAT. (2013). Division de la statistique
- 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.
- Gmitter F.G., Hu X. (1990). The possible role of Yunnan, China, in the origin of contemporary Citrus species (*Rutaceae*). *Economic Botany* 44(2): 267-277.
- Ghanmi M., B. Satrani, A. Aafi, M.R. Isamili, H. Houti, H. El Monfalouti, K.H. Bencheqroun, M. Aberchane, L. Harki, A. Boukir, A. Chaouch, Z. Charrouf. (2010). Effet de la date de récolte sur le rendement, la composition chimique et la bioactivité des huiles essentielles de l'armoise blanche (*Artemisia herba-alba*) de la région de Guercif (Maroc oriental). *Phytothérapie* 8, 295 - 301.

- Ghfir, B., Dargent, R., (1995). Activité antifongique de l'huile essentielle d'*Hyssopus officinalis* sur *Aspergillus fumigatus* (Fresenius): Conséquences cytologiques et biochimiques. Thèse de doctorat. Université de Toulouse 3. Toulouse, France, 213 p.
- Garg, SC., Siddiqui, N., (1992). Antifungal activity of some essential oil isolates. *Pharmazie* 47 (6), 467 - 468.
- Gharabi Z. Sand RL., (2008). *Artemisia herba alba* asso. A guide to Medicinal Plants in North Africa: 49-49.
- Gorris L., Smid E. (1995). Crop protection using natural antifungal compounds. *Pesticide Outlook* 6:20-24.
- Gutter Y., Schachani M., Schiffman-nadel M. et Dinoor A., (1981). Biological aspects of citrus molds tolerant to benzimidazole fungicides. *Phytopathology* 71: 810 - 811.
- Hassania K. Bencheqron, Mohamed Ghanmi, Badr Satrani, Abderrahman Aafi et Abdelaziz Chaouch (2012). Activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Artemisia mesatlantica*, plante endémique du Maroc. p. 4 – 21.
- Hmamouchi, M., Hmamouchi, J., Zouhdi, M., Bessiere, JM., (2001). Chemical composition properties of essential oils of five Moroccan *Pinaceae*. *Journal of essential oil research*. 13, 298-302.
- Hmiri S., Mohamed Rahouti, Zakaria Habib, Badr Satrani, Mohamed Ghanmi et Mustapha EL Ajjouri, (2011). Evaluation du Potentiel Antifongique des Huiles Essentielles de *Mentha Pulegium* et d'eucalyptus *Camaldulensis* dans la Lutte Biologique Contre les Champignons Responsables de la Détérioration des Pommes en Conservation. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, Vol. 80, p.824 – 836.
- Hussain A.I., Anwar F., Chatha S.A.S., Jabbar A., Mahboob S. et Nigam P.S., (2010). *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology* 41: 1070-1078.
- Holmes G.J., Eckert J.W., Pitt J.I., (1994). Revised description of *Penicillium ulaiense* and its role as a pathogen of citrus fruits. *Pathology* 84: 719-727.
- Hadizadeh I., Peivastegan B. et Hamzehzarghani H., (2009). Antifungal Activity of Essential Oils from Some Medicinal Plants of Iran against *Alternaria alternata*. *American Journal of Applied Sciences* 6: 857-861.

- Hao W., Li H., Hu M., Yang L., Rizwan-ul-Haq M. (2011). Integrated control of citrus green and blue mold and sour rot by *Bacillus amyloliquefaciens* in combination with tea saponin. *Postharvest Biology and Technology* 59(3): 316-323
- Isman M.B., Machial C.M., et Bainard L.O., (2006). Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. *Rev. Entomol* (ed) 51: 45-66
- Chaumont J.P & Leger. C (2001). Composition chimique and activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Aeollanthus pubescens* Benth.acclimatée au Togo. *Comptes Rendus Chimie*. 7:1107-1111.
- Janisiewicz W. (1987). Postharvest biological control of blue mold on apples. *Phytopathology* 77(3): 481-485.
- Janisiewicz W.J., Korsten L. (2002). Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual review of phytopathology* 40(1): 411-441.
- Jaouadi I. (1990). Etude des associations des agents de pourritures sur fruits de Citrus, *P. digitatum*, *P. italicum*, *Geotrichum candidum*, *Phytophthora citrophthora* et efficacité comparée des fongicides couramment utilisés au niveau du drencher. 56 p.
- Karabulut O.A., Romanazzi G., Smilanick J.L., Lichter A. (2005). Postharvest ethanol and potassium sorbate treatments of table grapes to control gray mold. *Postharvest biology and technology* 37(2): 129-134.
- Kanan G.J.M., Al-Najar R.A.W.K. (2009). *In Vitro* and *In Vivo* Activity of Selected Plant Crude Extracts and Fractions Against *Penicillium Italicum*. *Journal of Plant Protection Research* 49(4): 341-352.
- Kalembe, D., Kunicka, A., (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10, 813-829.
- Karaman S; Digrak M; Ravid Ua; Ilcim A. (2001). Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* celak from turkey. *j ethnopharmacol.* 76 : 183-6.
- Kulevanova S; Panovska Tk. (2002). Inhibition of thermal autooxidation of lard by antioxidative action of *Thymus extracts*. *acta pharm.*52 :29-35.
- Kuramoto T., (1976). Résistance to benomyl and thiophanate- methyl in strains of *P. digitatum* and *P. italicum* in Japan. *Plant Disease, Repr.*, 60 : 168 - 172.
- Koroch A., H.R. Juliani & J.A. Zygodlo, (2007).- Bioactivity of essential oils and their components. *In: Flavours and Fragrances Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. R.G. Berger (ed.), Berlin. Springer- Verlag, 87-11.

- Khalouki, F., Hmamouchi, M., Younes, C., Soulimani, R., Bessiere, JM., Essassi, M., (2000). Antimicrobial and molluscicidal activities of essential oil of *Chrysanthemum viscidhirtum*. *Fitoterapia*. 71, 413-16.
- Khia A , Ghanmi M , Satrani B , (2014) I. *Phytothérapie*, 341-47
- Kumar A., Shukla R., Singh P., Prasad C.S., Dubey N.K. (2008) Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation of food commodities. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 9(4): 575-580.
- LAIB I. (2012). Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* : application aux moisissures des légumes secs. *Revue « Nature & Technologie »* 7 :44-52.
- Lis-Balchin M., (2002). Lavender : the genus *Lavandula*. *Taylor and Francis, London*, 37-50, 155-200.
- Lorenzo D., Paz D., Dellacassa E., Davies P., Vila R., Canigueral S., (2002). Essential Oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. *Bras. Arch. Boil. Technol*45 (4): 519–524.
- Laghchimi, M. Znini, L.Majidi, F. Renucci, A. El Harrak, J. Costa (2014) Composition chimique et effet des phases liquide et vapeur de l'huile essentielle de *Lavandula multifida* sur la croissance mycélienne des moisissures responsables de la pourriture de la pomme *J. Mater. Environ. Sci.* 1770-1780.
- Lahlou, M., Berrada, R., Agoumi, A., Hmamouchi, M., (2001). The potential effectiveness of essential oils in the control of human head lice in Morocco. *International journal of Aromatherapy*. 10 (3-4), 108-28.
- Lahlou, M., Berrada, R., Hmamouchi, M.,(2001). Molluscicidal activity of thirty essential oils on *Bilinus truncates*. *Thérapie*.
- Lahlou N., K. Mouchid, T. Aboussaouira, N. Habti, L. Belghazi, K. Fellat-Zarrouk, A. Tantaoui-Elaraki, A.Rachidai & M.M. Ismaili-Alaoui, (2005). Étude de l'acutotoxicité de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* : essais biologiques variés. *Les cahiers de la recherche, série A* (6), 7-16.
- Leelasuphakul W., Hemmanee P., 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(1): 113-121.
- Loussert R., (1989). Les agrumes Tome 2 : Productions techniques agricoles méditerranéennes. *Editions scientifiques universitaire Beyrouth-Liban*, 157 p.
- Laville E. (1974). La pourriture des agrumes due à *Geotrichum candidum* Link var. *citri-aurentii* (Ferr.). *Fruits* 29(1): 35-38.
- Laville E. (1971). Évolution des pourritures d'entreposage des agrumes avec l'utilisation de nouveaux fongicides de traitements après récolte. *Fruits* 26: 301-304.
- Lima G., Ippolito A., Nigro F., Salerno M. (1997). Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. *Postharvest Biology and Technology* 10(2): 169-178.
- Lurie S. (1998) Postharvest heat treatments. *Postharvest Biology and Technology* 14(3): 257-269.
- Lacoste, E., Chaumont, JP., Mandin, D., Plumel, MM., Matos, F., (1996). Les propriétés antiseptiques de l'huile essentielle de *Lippia sidoides* Cham. Application à la microflore cutanée. 54 (5), 228-230.
- Leroux P. et Cavelier N., (1983). Modes d'action des produits agissant sur les stérols des champignons et phénomènes de résistance. *Phytoma défense des cultures*, Mars 9 -14.
- Mohamed N.H., El-Hadidy A.M. (2008). Studies of biologically active constituents of *Verbascum eremobium* Murb. and its inducing resistance against some diseases of cucumber. *Egypt. J. Phytopathol* 36: 133-150.
- Marquenie D., Lammertyn J., Geeraerd A.H., Soontjens C., Van Impe J.F., Nicolai B.M., Michiels C.W. (2002.) Inactivation of conidia of *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructigena* using UV-C and heat treatment. *International Journal of Food Microbiology* 74(1–2): 27-35.
- Maach, A., Jemali, A., (1986). Etude des caractéristiques physico-chimiques des HE de deux plantes aromatiques cultivées au Maroc : Menthe Naa Naa Abdi, Coriandre. Bulletin de l'IAV Hassan II, Rabat, Maroc.
- Montesinos-Herrero C., del Río M.A., Pastor C., Brunetti O., 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., Smilanick J.L., Tebbets J.S., Walse S., Palou L. (2011). Control of citrus postharvest decay by ammonia gas fumigation and its influence on the efficacy of the fungicide imazalil. *Postharvest Biology and Technology* 59(1): 85-93.
- Montesinos E., Bonaterra A., Moselio S. (2009) .Pesticides, microbial, *Encyclopedia of microbiology*, Academic Press, Oxford, UK. pp. 110-120.
- Meziane H., Gavriel S., Ismailov Z., Chet I., Chernin L., Höfte 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(2): 125-133.
- Mayachiew P. et Devahastin S., (2008).Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *Food Science and Technology* 41: 1153-1159.
- Mohammedi Z., Bachik S. et Belkaroube N., (2010).Potentiel antifongique et antiaflatoxinogène des huiles essentielles d'une plante endémique *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut. *Les technologies de laboratoire 5* : 10-15.
- El Ajjouri M., Satrani B., Ghanmi M., Aafi A., Farah A., Rahouti M., Amarti F., Aberchane. M. (2008). Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* pomel et *Thymus capitatus* (L.) hoffm. Et link contre les champignons de pourriture du bois d'oeuvre. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12(4): 345-351.
- Morras P. et Chapon J.F., (1983). Entreposage et conservation des fruits et légumes frais. Guide pratique de l'utilisation du froid. CTIFL, Paris, 245 p.
- Mc Cornack .A. et Brown G.E., (1977). Decay control of Florida citrus fruits with imazalil. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 90 : 141 – 144.
- Obagwu J., Korsten L. (2003). Control of Citrus Green and Blue Molds with Garlic Extracts. *European Journal of Plant Pathology* 109(3): 221-225.
- Onions A. (1966). *Penicillium digitatum*. Descriptions of Fungi and Bacteria, IMI Descriptions of Fungi and Bacteria. *CAB International, UK*, p. 99(10).
- Obagwu J., Korsten L. (2003). Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. *Postharvest Biology and Technology* 28(1): 187-194.
- Olanya O. M. et Larkin R. P., (2006).Efficacy of essential oils and biopesticides on *Phytophthora infestans* suppression in laboratory and growth chamber studies. *Biocontrol Science and Technology* 16: 901-917.

- Ouraini D., Agoumi A., Ismaili-Alaoui M., Alaoui K., Cherrah Y., Alaoui M.A. et Belabbas M.A., (2007), Activité antifongique de l'acide oléique et des huiles essentielles de *Thymus saturejoides* L. et *Mentha pulegium* L., comparée aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques, *Phytothérapie* 1 : 6-14.
- Özcan M. et Chalchat J.C., (2004). Aroma profile of *thymus vulgaris* L. Growing wild in turkey. *Bulg. J. Plant Physiol* 30: 68–73.
- Obeidat M., Shatnawi M., Al-alawi M., Al-Zu'bi E., Al-Dmooor H., Al-Qudah M., El-Qudah J., Otri I. (2012) Antimicrobial activity of crude extracts of some plant leaves. *Research Journal of Microbiology* 7: 59-67.
- Pottier G., (1981) : *Artemisia herba-alba*. Flore de la Tunisie : angiospermes-dicotylédones gamopétales. 1012p.
- Padrini F., Lucheroni M.T., (1996). Le grand livre des huiles essentielles-guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences et l'aromassage énergétique avec plus de photographies. Edition de Vecchi, Paris, 11- 111.
- Pelser T., (1988). Recommendations of control of postharvest decay of citrus fruits. S.A.CO. Operative citrus exchange limited Pretoria.
- Palou L., Smilanick J.L., Usall J., Viñas I. (2001). Control of postharvest blue and green molds of oranges by hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate. *Plant disease* 85(4): 371-376.
- Palou L., Usall J., Muñoz J.A., Smilanick J.L., Viñas I. (2002). Hot water, sodium carbonate, and sodium bicarbonate for the control of postharvest green and blue molds of clementine mandarins. *Postharvest biology and technology* 24(1): 93-96.
- Palou L., Montesinos-Herrero C., Del Río M. (2008). Short-term CO₂ exposure at curing temperature to control postharvest green mold of mandarins. In: Proceedings of the XXVII International Horticultural Congress IHC 2006, Acta Horticulturae 2008.
- Palou L., Smilanick J.L., Crisosto C.H. (2009). Evaluation of food additives as alternative or complementary chemicals to conventional fungicides for the control of major postharvest diseases of stone fruit. *Journal of Food Protection* 72(5): 1037-1046.
- Palou L., Smilanick J.L., Droby S. (2008). Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue moulds. *Stewart Postharvest Review* 4(2) : 1-16.

- Plaza P., Usall J., Torres R., Abadias M., Smilanick J.L., Vinas I. (2004). The use of sodium carbonate to improve curing treatments against green and blue moulds on citrus fruits. *Pest Management Science* 60(8) : 815-821.
- Punja Z.K., Gaye M.M. (1993). Influence of postharvest handling practices and dip treatments on development of black root rot on fresh market carrots. *Plant disease* 77(10): 989-995.
- Plaza P., Usall J., Smilanick J.L., Lamarca N., Vinas I. (2004). Combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and curing treatments to control established infections of *Penicillium digitatum* on lemons. *Journal of Food Protection* 67(4): 781-786.
- Qjidaa, S., Selouane, A., Zouhair, S., Bouya, D., Decock, C. and Amina Bouseta. (2014). In vitro effect of pyriméthanil on the fungal growth of ochratoxigenic and no-ochratoxigenic species of *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus foetidus* isolated from Moroccan grape. *South Asian J exp Biol*; 4(2): 76-84.
- Reddy M.V.B., Angers P., Gosselin A. et Arul J., (1998). Antifungal activity of *Thymus vulgaris* essential oil. *Photochemistry* 47(8): 1515-1520.
- Robert-Demuet S., (1995). Méthodes de dilutions. In antibiotiques et antibiogrammes. Montréal-Canada, 131-137.
- Remmal A., (1993). Improved method for determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *J. Essent. Oils Res.*, 5(2), 179-184.
- Rodrigues F.Á., Vale F.X., Datnoff L.E., Prabhu A.S., Korndörfer G.H. (2003) Effect of rice growth stages and silicon on sheath blight development. *Phytopathology* 93(3): 256-261.
- Regnier T., Combrinck S., Plooy W.d., Botha B. (2010). Evaluation of *Lippia scaberrima* essential oil and some pure terpenoid constituents as postharvest mycobiocides for avocado fruit. *Postharvest Biology and Technology* 57(3) : 176 - 182.
- Sisti M., De Santi M., Fraternali D., Ninfali P., Scoccianti V., Brandi G. (2008) Antifungal activity of *Rubus ulmifolius* Schott standardized *in vitro* culture. *LWT - Food Science and Technology* 41(5): 946 - 950.
- Smilanick J.L., Sorenson D. (2001). Control of postharvest decay of citrus fruit with calcium polysulfide. *Postharvest Biology and Technology* 21(2) : 157 - 168.
- Sholberg P.L. (1998). Fumigation of Fruit with Short-Chain Organic Acids to Reduce the Potential of Postharvest Decay. *Plant Disease* 82(6): 689-693.

- Spotts R., Cervantes L. (1986). Populations, pathogenicity, and benomyl resistance of *Botrytis* spp., *Penicillium* spp., and *Mucor piriformis* in packinghouses. *Plant Disease* 70(2): 106-108.
- Stevens C., Khan V.A., Lu J.Y., Wilson C.L., Pussy P.L., Kabwe M.K., Mafolo Y., Liu J., Chalutz E., et Droby S., (1994). Réduction of storage rots of fruits and vegetables by combining UV-c application and biocontrol strategies. *Phytopathology* vol.84 N° 10: 1152-1153.
- Spiegel-Roy P., Goldschmidt E.E. (1996). The biology of Citrus, Cambridge University Press, 239 p.
- Serrano M. A., Martinez-Romero D., Guillén F., Valverde J. M., Zapata P. J., Castillo S et Valero D. (2008). The addition of essential oils to MAPas a tool to maintain the overall quality of fruits. *Trends in food science and technology*. 19, 464-471.
- Svoboda, KP., Hampson, JB., (1999). Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Acotland, UK., KA6 5HW.
- Sousa, EMBD. Chiavone-Filho, O., Moreno MT., Silva, DN., Marques MOM. Meireles, MAA., (2002). Experimental results for the extraction of essential oil from *Lippia sidoides* Cham using pressurized carbon dioxide. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 19 (02), 229-241.
- Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A, Aafi, A., Fougrach, H., Boukhriss, B., Boustia, D., Talbi, M., (2007). Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus* Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. 146, 85-96.
- Satrani B., (2001). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Satureja calaminthe* et *Satureja alpina* du Maroc. *Ann. Falsif. Expert. Chim.*, 94(956), 241-250.
- Satrani B.; Ghanmi M.; Farah A. (2008). Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *cladanthus mixtus*. Bull soc pharm (Bordeaux) .146 : 85-96
- Chericoni S., Flamini G. , Campeol E. , Luigi P.C ; Morelli I. (2004), Biochemical Systematics and Ecology: GC-MS analyses of the essential oil from the aerial parts of *Artemisia verlotiorum*: variability during the year. Volume 32 (4), 423-429.
- Salah-Fatnassi, BK., Salim-Bannour, A., Harzallah-Skhiri, F., Mohamed-Ali, M., Mighri, Z., Chaumont, JP., Aouni, M., (2010). Activités antivirale et antioxydante *in vitro* d'huiles

essentielles de *Thymus capitatus* (L.) Hoffmans. & Link de Tunisie. *Acta Botanica Gallica*. 157 (3), 433-444.

- Shukla, HS., Dubey, P., Chaturvedi, RV., (1989). Antiviral properties of essential oils of *Foeniculum vulgare* and *Pimpinella anisum* L. *Plant Pathology*. Agronomie. 9, 277-279.
- Smid E.J., Y. de Witte & L.G.M. Gorris, (1995). Secondary plant metabolites as control agents of postharvest *Penicillium* rot on tulip bulbs. *Postharvest Biol. Technol.*, 6, 303-312.
- Salido, S., Valenzuela, L.R., Altarejos, J., Nogueras, M., Sanchez, A., Cano, E. (2004), Composition and infraspecific variability of *Artemisia herba-alba* from southern Spain, *Biochem. Syst. Ecol*, 265 - 277.
- Samson, R.A., E.S. Hoekstra & J.C. Frisvad, (2004). Introduction to food and airborne fungi, 7th éd. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, 390 p.
- Soylu E.M., Kurt S., Soyly S. (2010). *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *International Journal of Food Microbiology* 143(3) : 183 - 189.
- Thompson, J.D., Chalchat, J.C., Michet, A., Linhart, Y.B., Ehlers, B. (2003), Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes, *J. Chem. Ecol.*, 859-880.
- Trombetta D; Saija A; Bisignano G; et al. (2002) .Study on the mechanisms of the antibacterial action of some α , β unsaturated aldehydes. *Lett appl microbiol*. 35 : 285-90.
- Tkachenko KG., (2006). Antiviral activity of the essential oils of some *Heracleum* L. species. *Journal of Herbs, Spices. Medicinal plants*. 12 (3), 1-12.
- Tchoumboungang, F., Jazet Dongmo, PM., Sameza, ML., Nkouaya Mbanjo, EG., Tiako Fotso, BR., Amvam Zollo, PH., Menut, C., (2009). Activité larvicide sur *Anopheles gambiae* Giles et composition chimique des huiles essentielles extraites de quatre plantes cultivées au Cameroun. *Biotechnol. Agron. Soc*. 13 (1), 77-84.
- Talibi I., Askarne L., Boubaker H., Boudyach E.H., Msanda F., Saadi B., AIT Ben Aoumar A. (2012). Antifungal activity of some Moroccan plants against *Geotrichum candidum*, causal agent of postharvest citrus sour rot. *Crop Protection* 35: 41-46.

- Tripathi P., Dubey N.K. (2004). Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 32(3):235-245.
- Talibi I., Askarne L., Boubaker H., Boudyach E.H., Msanda F., Saadi B., Ait Ben Aoumar A. (2012). Antifungal activity of Moroccan medicinal plants against citrus sour rot agent *Geotrichum candidum*. *Letters in Applied Microbiology* 55(2): 155-61.
- Tuset J.J., (1984). Postharvest citrus diseases in Spain: problems and solutions. *Proc. Int. soc. Citriculture Vol 1: 818-820.*
- Tuset J.J. , Piquer J., Garcia J., Martinez J.M. et Roco M., (1981).Activity of imidazol fungicide to control postharvest citrus decay . *Proc. Int .Soc .Citricult 2 : 784-787 .*
- Taqarort N. (2008). Recherche de moyens de lutte contre *P. digitatum*, agent de la pourriture verte des agrumes. Thèse de Doctorat. Université Ibn Zohr, Agadir. 160 p.
- 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(12): 3031-3038.
- Tayel A., El-Baz A., Salem M., El-Hadary M. (2009). Potential applications of pomegranate peel extract for the control of citrus green mould. *Journal of Plant Diseases and Protection* 116(6): 252-256.
- Tegegne G., Pretorius J., Swart W. (2008). Antifungal properties of *Agapanthus africanus* L. extracts against plant pathogens. *Crop Protection* 27(7): 1052-1060.
- Valnet, J., (2005). L'aromathérapie. Ed. Maloine S.A. ISBN : 2-253-03564-5.
- Wang S.-L., Lin T.-Y., Yen Y.-H., Liao H.-F., Chen Y.-J. (2006). Bioconversion of shellfish chitin wastes for the production of *Bacillus subtilis* W-118 chitinase. *Carbohydrate research* : 2507-2515.
- Wang S.-L., Shih I.-L., Liang T.-W., Wang C.-H. (2002). Purification and characterization of two antifungal chitinases extracellularly produced by *Bacillus amyloliquefaciens* V656 in a shrim and crab shell powder medium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* : 2241-2248.
- Wang W., Ben-Daniel B., Cohen Y. (2004) Control of plant diseases by extracts of *Inula viscosa*. *Phytopathology* : 1042-1047.

- Wilson C.L., Chalutz E. (1989). Postharvest biological control of *Penicillium* rots of citrus with antagonistic yeasts and bacteria. *Scientia Horticulturae* : 105-112.
- Wilson C.L., Wisniewski M.E., Biles C.L., Mc Laughlin R., Chalutz E., et Droby S., (1991). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: alternatives to synthetic fungicides. *Crop protection*: 172 -177.
- Wardowski W.F. et Brown G.E., (1993). Postharvest decay control recommendations for Florida citrus fruits UF/IFAS.
- Webber H.J. (1967) History and development of the citrus industry, in: W. Reuther, et al. (Ed.), the citrus industry. 1. History world distribution, botany and varieties, University of California Press, Berkeley, Etats-Unis. pp. 1-39.
- Wiley, (1966). Introductory mycology second edition. Printed in the USA. 613p.
- Wild B.L. (1981) Resistance of fungi to fungicides, Proceedings of a Postharvest Horticultural Workshop Brisbane. p. 131-139.
- Youssef K., Ligorio A., Sanzani S.M., Nigro F., Ippolito A. (2012) Control of storage diseases of citrus by pre-and postharvest application of salts. *Postharvest Biology and Technology* 72: 57-63.

Annexes

Annexe 1 : Milieu de culture

Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato extrait de pomme de terre 4 g

D-glucose 20 g

Agar bactériologique 15 g

Eau distillée : 1000 ml

Annexe 2 : Tests statistique des huiles essentielles de *Thymus vulgaris*

test de l'effet de la concentration d'HE du thym sur la croissance de *P. digitatum*

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	30521,791	8	3815,224	106,679	,000
Intra-groupes	1287,488	36	35,764		
Total	31809,278	44			

Seuil de signification 0.05

Test SNK pour la comparaison multiple des moyennes d'inhibition de la croissance de *P. digitatum*
par les différentes concentrations d'huile essentielle du thym

Dose		N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05				
			1	2	3	4	5
Student- Newman- Keuls ^a	Te	5	0,0000				
	Tw	5	0,0000				
	100,00	5		26,1920			
	250,00	5		31,5520			
	500,00	5		32,2180			
	1000,00	5			49,8140		
	2000,00	5			50,2120		
	3000,00	5				68,6640	
	T+	5					80,1200
	Signification		1,000	,262	,917	1,000	1,000

Test de l'effet de la concentration d'HE du thym sur la croissance de *P. italicum*

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	26600,566	8	3325,071	76,640	,000
Intra-groupes	1561,877	36	43,385		
Total	28162,444	44			

Test SNK pour la comparaison multiple des moyennes d'inhibition de la croissance de *P.italicum*
par les différentes concentrations d'huile essentielle du thym

Dose	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5		
Student-Newman-Keuls ^a	Te	5	0,0000					
	Tw	5	0,0000					
	100,00	5		18,4180				
	250,00	5		24,0860				
	500,00	5		25,1380				
	1000,00	5			34,6520			
	2000,00	5				46,6820		
	3000,00	5						65,0280
	T+	5						72,8000
	Signification		1,000	,253	1,000	1,000		,070

Annexe 3 : Test statistique de l'effet des huiles essentielles de *Mentha pulegium*

12Test de l'effet de la concentration d'huile essentielle de la Menthe pouliot sur la croissance de *P. digitatum*

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	28113,776	8	3514,222	63,527	,000
Intra-groupes	1991,465	36	55,318		
Total	30105,241	44			

Test SNK pour la comparaison multiple des moyennes d'inhibition de la croissance de *P. digitatum* par les différentes concentrations d'huile essentielle de la menthe pouliot

Dose	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Te	5	0,0000					
Tw	5	0,0000					
100,00	5		16,4820				
250,00	5		21,6900	21,6900			
500,00	5			29,4320	29,4320		
1000,00	5				34,5640		
2000,00	5					53,2260	
3000,00	5					56,9760	
T+	5						78,2700
Signification		1,000	,276	,109	,283	,431	1,000

Test de l'effet de la concentration d'huile essentielle de la Menthe pouliot sur la croissance de *P. italicum*

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	36401,350	8	4550,169	70,140	,000
Intra-groupes	2335,407	36	64,872		
Total	38736,758	44			

Test SNK pour la comparaison multiple des moyennes d'inhibition de la croissance de *P.italicum* par les différentes concentrations d'huile essentielle de la menthe pouliot

Dose	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Student-Newman-Keuls ^a					
Te	5	0,0000			
Tw	5	0,0000			
100,00	5		32,3920		
250,00	5		34,3940		
500,00	5		40,4820		
1000,00	5			56,8540	
2000,00	5				70,1460
T+	5				77,0400
3000,00	5				79,0980
Signification		1,000	,264	1,000	,198

Annexe 4 : Tests statistiques d'effet in vivo des huiles essentielles d'*Artemisia herba alba*

Test de l'effet de la concentration d'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* sur la croissance de *P. digitatum*

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	49772,137	8	6221,517	176,336	,000
Intra-groupes	1270,161	36	35,282		
Total	51042,298	44			

Test SNK pour la comparaison multiple des moyennes d'inhibition de la croissance de *P. digitatum* par les différentes concentrations d'huile essentielle d'*Artemisia herba alba*

Dose	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Student-Te	5	0,0000			
Newman-Tw	5	0,0000			
Keuls ^a 100,00	5		27,7400		
250,00	5		27,8080		
500,00	5			70,6740	
T+	5			77,0800	77,0800
2000,00	5			77,4640	77,4640
1000,00	5				81,5620
3000,00	5				82,5300
Signification		1,000	,986	,182	,477

Test de l'effet de la concentration d'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* sur la croissance de *P. italicum*

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	46480,174	8	5810,022	112,375	,000
Intra-groupes	1861,281	36	51,702		
Total	48341,455	44			

Test SNK pour la comparaison multiple des moyennes d'inhibition de la croissance de *P.italicum* par les différentes concentrations d'huile essentielle d'*Artemisia herba alba*

Dose	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Student-Te	5	0,0000				
Newman-Tw	5	0,0000				
Keuls ^a 100,00	5		19,9660			
250,00	5		25,4920			
500,00	5			53,5020		
1000,00	5				65,4460	
2000,00	5				71,5640	
3000,00	5					82,9120
T+	5					85,0700
Signification		1,000	,232	1,000	,187	,638

Annexe 5: resultats des Tests statistiques d'effet in vivo des essences de *Lavandula hybrida*

Test de l'effet de la concentration d'huile essentielle de *Lavandula hybrida* sur la croissance de *P.digitatum*

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	21739,475	8	2717,434	136,840	,000
Intra-groupes	714,905	36	19,858		
Total	22454,380	44			

Test SNK pour la comparaison multiple des moyennes d'inhibition de la croissance de *P. digitatum* par les différentes concentrations d'huile essentielle de *Lavandula hybrida*

Dose	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05				
		1	2	3	4	
Student- Newman- Keuls ^a	Te	5	0,0000			
	Tw	5	0,0000			
	100,00	5		22,1560		
	250,00	5		22,8760		
	500,00	5		24,7760		
	1000,00	5		28,9720		
	2000,00	5			35,6940	
	3000,00	5			39,4420	
	T+	5				78,1800
	Signification		1,000	,092	,192	1,000

Test de l'effet de la concentration des HE de *Lavandula hybrida* sur la croissance de *P. italicum*

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	30729,115	8	3841,139	87,899	,000
Intra-groupes	1573,176	36	43,699		
Total	32302,291	44			

Test SNK pour la comparaison multiple des moyennes d'inhibition de la croissance de *P.italicum* par les différentes concentrations d'huile essentielle de *Lavandula hybrida*

Dose	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	
Student- Newman- Keuls ^a	Te	5	0,0000					
	Tw	5	0,0000					
	100,00	5		15,0040				
	250,00	5		23,0140	23,0140			
	500,00	5			25,7720			
	1000,00	5				43,0180		
	2000,00	5				43,6320		
	3000,00	5					66,4820	
	T+	5						79,4500
	Signification		1,000	,063	,514	,884	1,000	1,000

Annexe 6 : Effet des huiles essentielles sur l'inhibition de la croissance de *P. digitatum*

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	17592,402	3	5864,134	18,336	,000
Intra-groupes	37097,607	116	319,807		
Total	54690,009	119			

Test SNK pour la comparaison multiple des moyennes d'inhibition de la croissance de *P. digitatum* par les différentes huiles essentielles

HE	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05			
		1	2	3	
Student- Newman- Keuls ^a	Lavandula hybrida	30	28,9860		
	Menthe pouliot	30	35,3950	35,3950	
	Thym	30		43,1087	
	Artemisia herba alba	30			61,2963
	Signification		,168	,098	1,000

Annexe 7 : Effet des huiles essentielles sur l'inhibition de la croissance de *P.italicum*

	Somme des carrés	ddl	Moyenne des carrés	F	Signification
Inter-groupes	8460,090	3	2820,030	6,608	,000
Intra-groupes	49500,620	116	426,729		
Total	57960,709	119			

Test SNK pour la comparaison multiple des moyennes d'inhibition de la croissance de *P.italicum* par les différentes huiles essentielles

HE	N	Sous-ensemble pour alpha = 0.05		
		1	2	
Student-Newman-Keuls ^a	Thym	30	35,6673	
	Lavandula hybrida	30	36,1537	
	Menthe	30		52,2277
	Artemisia herba alba	30		53,1470
	Signification		,928	,863