

Effet des huiles essentielles sur la croissance diamétrale des moisissures responsable de la pourriture des fruits d'agrumes au Maroc

Khaled ATTRASSI

Laboratoire de Recherche en Éducation, Environnement & Santé (ÉES), Centre Régional des Métiers de l'Éducation et de la Formation (CRMEF) Rabat-Salé-Kenitra, Maroc. attrassi2@yahoo.fr

Received .. / .. /

Accepted .. / .. /

Résumé—La recherche de nouveaux produits phytosanitaires d'origine naturelle présentant moins de danger pour la santé humaine et à l'environnement est devenue une nécessité. Les huiles essentielles (HE), produites par certaines plantes possèdent des propriétés antimicrobiennes, peuvent contribuer à la lutte biologique contre la pourriture des fruits d'agrumes en conservation.

Ainsi, nous avons isolées et identifiées à partir des fruits d'oranges pourris en conservation quatre espèces de *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum*, *Acremonium sp.* et d'*Aspergillus niger*; ensuite l'activité antifongique des HE a été testée par les techniques de contact direct à montré une forte efficacité vis-à-vis de tous les champignons testés.

MOTS- CLES : Agrumes, activité antifongique, huiles essentielles, moisissures.

I. INTRODUCTION

L'agrumiculture est classée parmi les principales cultures fruitières dans le monde entier ainsi qu'au Maroc, cette importance est attribuée au rôle majeur que joue cette culture au niveau économique ; la grande qualité nutritive des agrumes et leur richesse en vitamines, ainsi que les conditions pédoclimatiques favorables donnent tous une raison de plus pour le développement de cette culture au Maroc [1].

Les agrumes sont exposées à diverses maladies et troubles dans les stations de conservation en post-récolte qui causent de nombreuses pertes économiques ; les principales infections qui menacent la

conservation des agrumes sont les champignons qui se développent dans les chambres froides [2].

Récemment, de nombreuses études ont été menées dans le domaine de la conservation des fruits en post-récolte et la lutte contre les agents de détérioration dans le but de substituer les produits chimiques par d'autres produits biologiques, non moins efficaces que les premiers ; parmi les produits de substitution envisagés, les huiles essentielles extraites de certaines plantes ont montré un pouvoir antifongique et antibactérien très remarquable [3].

Les huiles essentielles (HE) sont un ensemble de composés volatils et odorants extrait des tissus de certaines plantes ; ce sont des composés plus ou moins complexes, qui renferment un mélange de molécules comme les terpènes, les phénols, les méthyl-éthers, les oxydes, les esters, les cétones, ... [4]; elles se forment chez certaines plantes comme produits du métabolisme secondaire [5]. Les HE sont impliqués principalement par les plantes dans les stratégies de défense contre les organismes pathogènes [6].

Les HE sont présents dans différentes organes de la plante, variant d'une espèce à l'autre selon la zone productrice du végétal [7]. Elles sont en générale accumulées dans des cellules isolées et elles se caractérisent

Revue de l'Entrepreneuriat et de l'Innovation

par leur teinte souvent jaune et leurs parois épaisses [8]. Les HE sont produits en faibles quantités chez les plantes (0,01 à 5% de leurs poids) [9].

Le rôle des HE en général reste obscur, pourtant elles peuvent avoir une action sur les plantes aromatiques elles-mêmes, et aussi sur les consommateurs de la chaîne alimentaire. Elles peuvent agir comme guide de pollinisation, grâce à leurs fortes odeurs qui attire les insectes pollinisateurs, comme elles ont un effet répulsif en empêchant l'approche des ravageurs [10].

La présente étude se propose de tester l'activité antimicrobienne des HE d'un thym et de la menthe pouliot pour l'inhibition de quelques moisissures responsables de la pourriture d'oranges. Cette investigation nécessite l'isolement des moisissures, leur identification et l'étude *in vitro* de l'activité antifongique de ces HE.

II. MATERIEL ET METHODES

Isolement et identification des espèces fongiques

Des oranges pourries provenant des chambres froides de la région Kenitra sont désinfectées préalablement à l'alcool 75°. Les fragments présentant des lésions ont été par la suite découpés et déposer au centre des boîtes de Petri contenant le milieu PDA additionné de chloramphénicol.

Une fois les colonies fongiques sont bien développées, un fragment de chaque colonie est repiqué plusieurs fois dans de nouvelles boîtes de PDA afin d'obtenir des cultures pures. Des préparations microscopiques sont préparées à partir des cultures pures et observées sous microscope optique. Le montage se fait dans une goutte d'eau distillée. La détermination des espèces fongiques isolées a été réalisée en se basant sur leurs caractères morphologiques et

microscopiques (Samson et *al.*, 2004.). Les images sont prises à l'aide d'un microscope optique (Leica DM750 équipé d'une caméra intégrée).

Caractères physico-chimiques des huiles essentielles

Malgré le grande polymorphisme qui existent au niveau du profil chimique chez les HE, elles présentent pas mal de propriétés physiques communes, à savoir :

✓ elles sont le plus souvent liquides à température basse ou ambiante, à température élevée, sont volatiles et perdent rapidement leurs propriétés [11].

✓ elles sont souvent incolores à jaune pâle [9].

✓ Elles possèdent généralement une densité inférieure à celle de l'eau.

✓ elles présentent un indice de réfraction élevée.

✓ elles sont solubles dans les solvants organiques usuels, dans les graisses (liposolubles), et dans les alcools ; elles sont peu solubles dans l'eau [9].

✓ leur point d'ébullition se situe entre 60 et 240°C [11].

✓ très sensibles à l'oxydation, comme elles peuvent se polymériser pour former des produits résineux, ce qui limite leurs conservation [7].

✓ elles possèdent un grand pouvoir de diffusion et de pénétration [9].

Mode d'action des huiles essentielles

Le mode d'action des HE est principalement lié au profil chimique des constituants de chaque HE, et qui est largement diversifié [12 ; 24 ; 13]. Plusieurs auteurs [14 ; 15 ; 16] ont affirmé que l'activité antimicrobienne des HE est le résultat de la combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires.

Plusieurs études ont été consacrées à l'activité antibactérienne des HE et elles ont révélé que les substances agissent par

Revue de l'Entrepreneuriat et de l'Innovation

dégradation de la paroi cellulaire [17 ; 18], endommagement de la membrane cytoplasmique [19 ; 20 ; 21], endommagement des protéines membranaires [28 ; 23], relargage du contenu cellulaire [17 ; 24 ; 25], coagulation du cytoplasme [26] et par épuisement de la force motrice de proton [23 ; 27].

Les composés terpéniques des HE et plus précisément leurs groupements fonctionnels tels que les phénols et les aldéhydes réagissent avec les enzymes membranaires et dégradent la membrane plasmique des levures [28].

Des bactéries de *Listeria monocytogenes* exposées à des HE de *Thymus x-porlock* ont été mises en observation sous microscope électronique à transmission et cela a élucidé une diminution remarquable de la taille des bactéries [29].

D'autres études ont été portées sur l'effet direct des constituants des HE sur des microorganismes et elles ont révélé que des concentrations sublétales du carvacrol et du thymol (0,3 et 0,15 µL/mL) inhibent l'activité enzymatique de la coagulase et la lipase chez *Staphylococcus aureus* entraînant une suppression totale de la production d'entérotoxine et une diminution de la tolérance au sel, ainsi que des déformations cellulaires ce qui affirme des propriétés anti-staphylocoques du carvacrol et du thymol [30].

Chez les bactéries et plus précisément chez *Bacillus cereus*, le carvacrol agit en augmentant la perméabilité de la membrane plasmique, entraînant une fuite de protons, qui provoque la chute de la force protomotrice et donc de la synthèse d'ATP. Cette information est confirmée par la mesure du gradient de pH à travers la membrane plasmique. En plus de limiter la croissance, le carvacrol est capable d'inhiber la production de toxines chez *Bacillus cereus*. [27] cité par [13].

Un autre paramètre est très important quand on cible le mode d'action des HE,

c'est le type de microorganismes. En général, les bactéries Gram⁺ sont moins résistantes que les Gram⁻ et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire [31 ; 16] cité par [13]. Ainsi, la membrane extérieure des Gram⁻ est plus hydrophile que celle de Gram⁺, grâce à sa riche en lipo-polysaccharides et en glycoprotéines, ce qui empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer. Néanmoins, certains composés phénoliques de bas poids moléculaire comme le thymol et le carvacrol peuvent adhérer à ces bactéries par fixation aux protéines et aux lipopolysaccharides membranaires grâce à leurs groupes fonctionnels et atteindre ainsi la membrane intérieure [32].

a- Le Thym (Thymus sp.)

Le thym est une sorte d'arbrisseaux ou arbustes odorants appartiennent aux plantes aromatiques médicinales (PAM) et dont l'air de répartition se situe dans plusieurs régions du bassin méditerranéen. Le thym est classé dans la famille des Lamiacées. Ce genre est présent au Maroc sous forme de plusieurs espèces [33].

Chez le thym, les HE sont extraites principalement à partir des feuilles et des sommités fleuries [34]. La synthèse des HE a lieu dans les poils sécréteurs.

Propriétés chimiques des huiles essentielles de Thymus sp.

Les HE sont classées en trois groupes : les HE hydrocarbonées, oxygénées et sulfurées [35]. Les HE hydrocarbonées renferment plus de terpènes, tels que le thymène, le terpinène, le cymène, le limonène, les sesquiterpènes, etc., exemple des HE du thym ; les HE oxygénées, par exemple les HE de la menthe et les HE sulfurées qu'on trouve plutôt chez plusieurs espèces de la famille des Crucifères (moutardes, choux, etc.), mais aussi chez quelques espèces de la famille des Liliacées [34].

Revue de l'Entrepreneuriat et de l'Innovation

Les HE du thym sont riches en phénol, 30 à 40% de thymol et 5 à 15% de carvacrol, qui sont responsables de leurs activités bactéricide, fongicide, vermicide, etc. Elles sont également riches en monoterpènes (cymène, limonène, terpinène) les HE de thym renferment aussi des tanins, des flavonoïdes, des triterpènes et des acides phénoliques, elles possèdent aussi du lithium à faible dose [36].

Les analyses chimiques des HE d'un grand nombre d'espèces du genre *Thymus* d'origine marocaine, espagnole et turque ont montré que la composition et le pourcentage des constituants change d'une huile à l'autre, mais les principaux constituants de la majorité de ces huiles sont : thymol, linalol, carvacrol, 1,8-cinéole, α -pinène, β -pinène, limonène, γ -terpinène, α -terpinène, camphène, caryophyllène, camphre, β -myrcène, bornéol, p-cymène et α -terpinéol [37 ; 38].

b- La Menthe Pouliot (Mentha pulegium)

La menthe pouliot est une plante vivace herbacée appartenant à la famille des Lamiacées, comme elles ont tendance à l'hybridation d'où l'existence de plusieurs variétés, ce sont des plantes aromatiques utilisées dans plusieurs domaines, alimentaire, parfumerie et en pharmacie [39].

Chez la menthe, les HE sont contenues dans les feuilles [39] où leur synthèse se fait dans les poils sécréteurs développés à partir des cellules épidermiques [9].

Propriétés chimiques des HE de M. pulegium

L'HE de la menthe pouliot est en général un liquide jaune, d'odeur très forte, et dont la composition chimique est très diversifiée, où on peut citer des cétones [39], des polyphénols totaux, des flavonoïdes ainsi que des tanins [40].

Le principal composant de l'essence de *M. pulegium* est la pulégone, alors qu'ils

existent d'autres constituants non moins importants que ce dernier, à savoir : menthol, limonène, dipentène, piperitone, piperiténone, isomenthone, menthone, α -terpineol et 1,8-cinéole. Ainsi l'essence de la menthe pouliot est caractérisée par l'abondance des monoterpènes oxygénés (α et β -pinène, camphène, sabinène, α -terpinène et myrcène) [41 ; 42 ; 43].

L'essence de *M. pulegium* possède un pouvoir antifongique contre différentes moisissures, à savoir : *Penicillium* et *Mucor* ; de même ces huiles ont montré une activité insecticide contre les ravageurs des céréalières, et particulièrement contre les adultes de *Sitophilus oryzae* ; cette HE a montré aussi un effet parasiticide puissant et ceci revient à la présence de la pulégone (69,26%) [44 ; 45 ; 46].

Effet des huiles essentielles sur la croissance diamétrale des moisissures.

L'effet des huiles essentielles sur la croissance des moisissures est déterminé à l'aide des techniques du contact direct.

La technique du contact direct

Pour évaluer l'activité antifongique par la méthode de contact direct sur milieu gélosé. L'HE testée doit être incorporée, à différentes concentrations, dans le milieu gélosé. Après solidification, le milieu estensemencé par les souches fongiques et incubé pendant un certain temps dans un incubateur à 25°C [47] (Figure1).

Revue de l'Entrepreneuriat et de l'Innovation

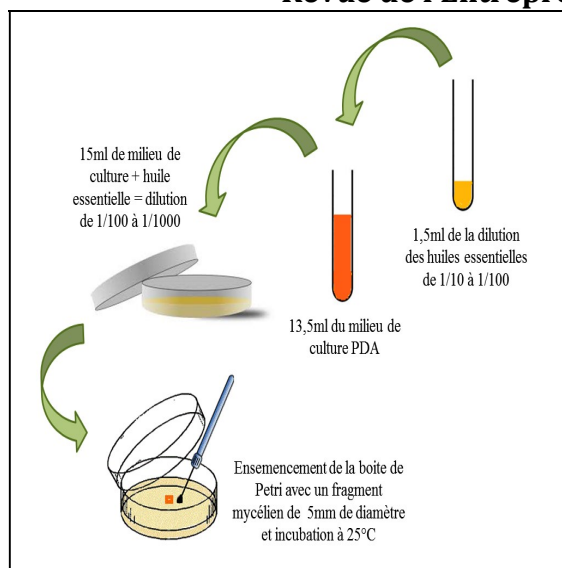


Figure 1: Description schématique de la technique de contact direct.

Préparation des dilutions

Vu la non miscibilité des HE à l'eau et par conséquent au milieu de culture, une répartition homogène est réalisée grâce à une solution d'agar à 0,2% (SA) afin de mettre en émulsion ces composés. Ce qui a pour avantage l'incorporation de ces HE dans le milieu de culture sans avoir recourt à un diluant étranger ; en outre, l'agar choisi est couramment utilisé en microbiologie et ne présente pas d'effets secondaires connus.

Préparation de la solution mère

La solution mère (SM) est au 1/25^{ème}, elle correspond à la première concentration de la gamme des dilutions. Elle est préparée de la façon suivante : un volume de 2,4 ml de l'HE à tester est ajouté aseptiquement à 57,3 ml d'eau gélosée à 0,2% (SA) stérilisée auparavant à l'autoclave (120°C) pendant 20 min. La solution obtenue est agitée vigoureusement au vortex pendant quelques minutes pour disperser l'huile.

Préparation des dilutions successives de la solution mère

Les dilutions successives sont également réalisées dans des solutions d'agar à 0,2%. A partir de la solution mère, nous avons

procédé à des dilutions successives pour obtenir les dilutions au 1/10^{ème}, 1/50^{ème} et 1/100^{ème}. Leurs concentrations sont préparées de la façon suivante :

- Solution au 1/10 : 7 ml de l'huile essentielle + 63 ml SA,
- Solution au 1/50 : 50 ml de la solution mère au 1/25 + 50 ml SA,
- Solution au 1/100 : 32 ml de la dilution 1/50 + 32 ml SA.

Préparation des milieux de cultures contenant les différentes concentrations d'HE

Sous la hotte à flux laminaire, 1,5 ml des diverses dilutions préparer (1/10, 1/50, 1/100) sont ajoutés aseptiquement à des tubes à essai contenant chacun 13,5 ml de milieu de culture PDA à 39 g/l, stérilisés et maintenu en surfusion à 45°C dans un bain-marie, de façon à obtenir les dilutions finales des HE de 1/100, 1/500 et 1/1000.

A l'aide d'un vortex, les tubes renfermant le milieu de culture additionné d'HE sont agités avant d'être coulés dans les boîtes de Petri, à raison de trois répétitions par champignon et par concentration.

Des témoins ont été également préparés, ils contiennent à la place des dilutions des HE 1,5 ml de la solution d'eau gélosée à 0,2% (SA) et 13,5 ml de milieu de culture.

Ensemencement et incubation des cultures

A l'aide d'un scalpel stérile, des fragments de cultures fongiques d'environ 0,5 cm sont prélevés à partir de cultures, en pleine croissance, âgées de 7 à 10 jours ; ces fragments sont ensuite déposés aseptiquement aux centres des boîtes de Petri préparées précédemment avec les dilutions désirées.

Les boîtes de Petri ensemencées sont ensuite fermées hermétiquement avec du Parafilm, avant d'être incubées dans une étuve à 25°C et à l'obscurité.

Revue de l'Entrepreneuriat et de l'Innovation

III. ANALYSES STATISTIQUES

Le traitement statistique des données est réalisée par le logiciel

XLSTAT, avec le test "Duncan " au seuil de 5%.

IV. RESULTATS ET DISCUSSION

Efficacite de la technique de contact direct

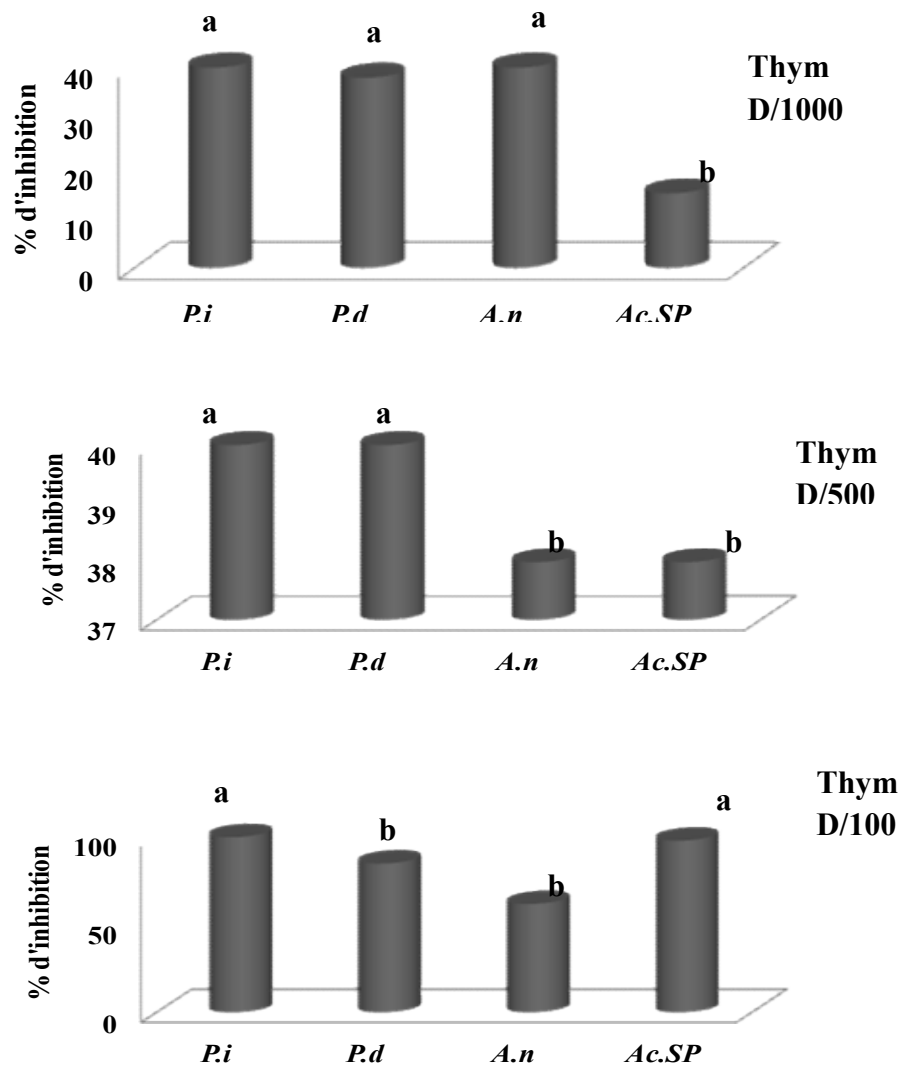


Figure 2: Résultats du 7ème jour de culture des moisissures confrontés aux HE d'un thym avec la technique de contact direct.

Revue de l'Entrepreneuriat et de l'Innovation

La confrontation directe des HE du thym avec les moisissures testées ne donne pas la même efficacité obtenue avec la

confrontation atmosphérique ; ainsi la différence de sensibilité des souches vis-à-vis les HE est plus grande en contact direct qu'en micro-atmosphère.

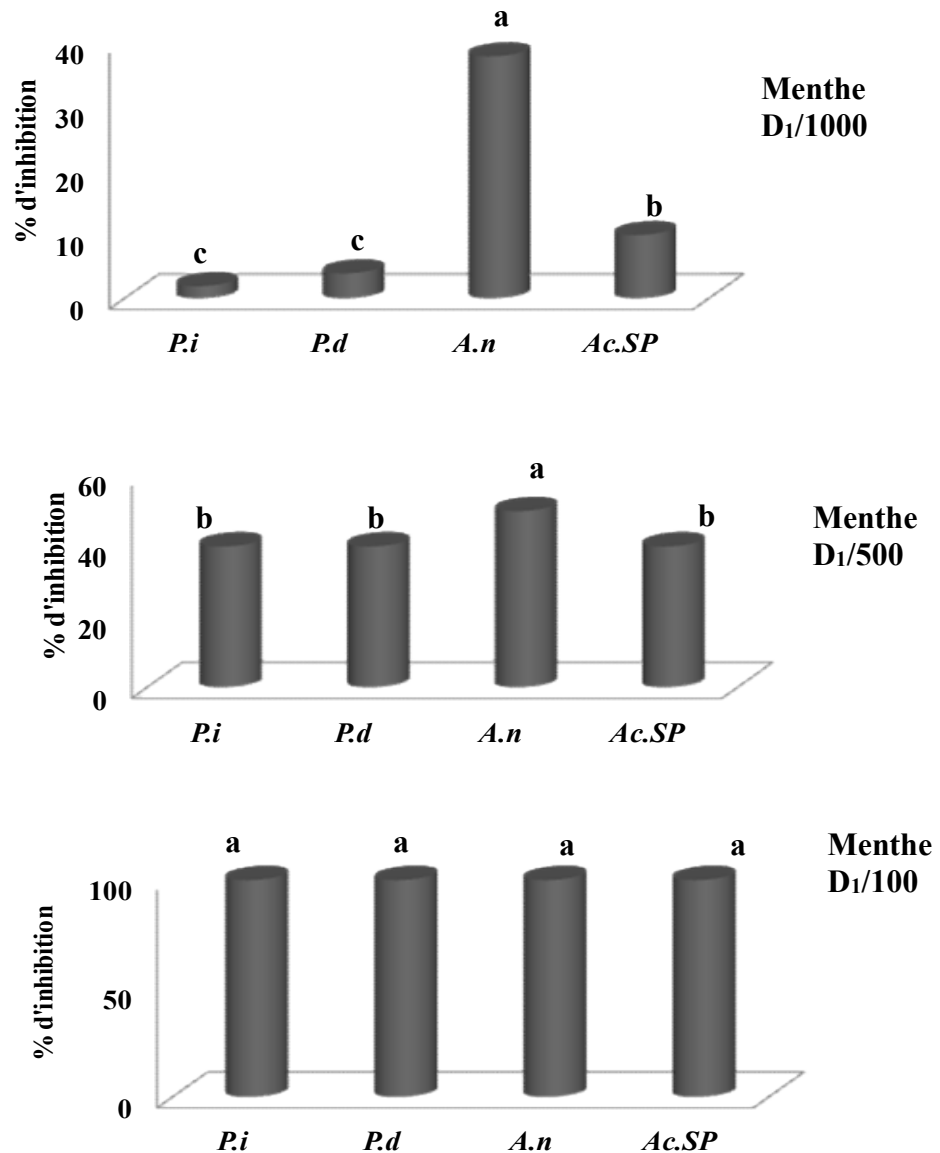


Figure 3: Résultats du 7^{ème} jour de culture des moisissures confrontés aux HE de la menthe pouliot avec la technique de contact direct.

l'Entrepreneuriat et de l'Innovation

L'efficacité de la confrontation atmosphérique est évidente aussi avec la menthe pouliot que chez le thym, alors qu'il paraît aussi bien à partir des deux figures 2 et 3 que la sensibilité des souches à la même HE diffère avec la méthode appliquée.

Le pouvoir antifongique des HE de *M. pulegium* et d'un thym a été étudié vis-à-vis de dix isolats fongiques attaquant les agrumes en post-récolte en utilisant deux techniques différentes à savoir, le contact direct et la matmosphère ; les résultats de cette étude montrent que la technique de matmosphère est la plus efficace et qu'est donnée des résultats satisfaisants avec les deux HE.

Les HE de *M. pulegium* et d'un thym, dans leurs totalités ou seulement de leurs parties volatiles, ont exercé une forte activité fongistatique contre toutes les moisissures testées. Ces résultats corroborent ceux d'autres travaux sur le pouvoir antifongique des HE de la menthe pouliot et du thym ; en effet, l'équipe d'Amalich et al. [48] a montré en 2016 que l'HE de *M. pulegium* inhibe la croissance de certaines espèces d'*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. et *Rhizopus* sp. à partir de la dilution 1/1000 qui a été préparée précédemment à partir d'un volume d'huile essentielle au rapport 1/9 (v / v) (HE / agar 0.2. De même, Abd El Azim et al. (2014) [49] ont obtenu une inhibition totale de la croissance de certains *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. et *Trichoderma* sp. Avec deux volumes (0.1ml et 0.3ml) d'une HE de la *M. pulegium* concentrée à (10 mg/1 ml) (0.1 et 0.3 sont des volumes d'HE, et (10mg/1ml) c'est la concentration des HE).

Par ailleurs, Louhibi et al. (2013) [50] ont rapporté que l'HE de *M. pulegium* est plus efficace que celle de *Thymus vulgaris* contre *P. digitatum* et *P. italicum* en utilisant la méthode de l'aromatogramme. Alors qu'avec un volume de 80µl l'inhibition est totale avec l'essence de *M. pulegium* contre 80% d'inhibition avec *T. vulgaris*.

Plusieurs travaux ont rapporté que de nombreuses espèces de thym sont pourvues d'une forte activité antifongique. Ainsi, Boubaker et al. (2016) [51] ont montré la sensibilité de *P.*

digitatum, *P. italicum* et *Geotrichum citri-aurantii* à l'HE de *Thymus leptobotrys* et *T. riatarum* à 1000 µl/l en utilisant la méthode de contact direct. De même, Haddouchi et al. (2009) [52] ont aussi prouvé l'activité antifongique de l'HE de *Thymus fontanes* vis-à-vis d'*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer*, *Candida albicans* et *Penicillium* spp. par l'obtention d'une inhibition totale à la concentration de 46µg/ml en utilisant la technique de contact direct.

Cependant l'efficacité des HE de la menthe pouliot et du thym n'a jamais été testée sur les espèces d'*Acremonium*, alors que d'autres HE ont montré une forte activité inhibitrice contre ces moisissures ; on peut citer dans ce cadre, le travail de Baâtour et al. (2015) [53] qui a montré que l'HE d'*Origanum majorana* a une activité antifongique intéressante contre *Acremonium strictum* à 80µl de la substance volatile. De même, Racowski et al. (2016) [54] ont testé l'activité antifongique des HE de l'origan, du laurier et du romarin contre le champignon phytopathogène *Acremonium* sp. isolé de la tomate ; leurs résultats ont prouvé que les trois HE avaient une activité inhibitrice efficace contre ce champignon et que l'origan était le plus efficace en donnant une inhibition totale à la dilution de 20%.

V. CONCLUSION

Le présent travail entre dans le cadre de la recherche de nouveaux produits naturels ayant un pouvoir antifongique contre les moisissures de détérioration des agrumes en post-récolte, ainsi que la comparaison de l'efficacité de ces produits avec celle des fongicides chimiques utilisés dans ce domaine.

Les agrumes sont riches en eau et en sucres facilement métabolisables par les moisissures. Dans la première partie de ce travail nous avons procédé à l'isolement de quelques moisissures responsables de la détérioration des agrumes ; les résultats de leur identification nous a permis de

l'Entrepreneuriat et de l'Innovation

reconnaitre les espèces suivants : *P. italicum*, *P. digitatum*, *Aspergillus niger* et *Acremonium sp.*, qui se sont révélés tous capables de provoquer des pourritures chez les agrumes.

Pour bien se développer, les champignons exigent des températures d'incubation et des milieux de culture de composition chimique convenables. Ces deux facteurs influencent les étapes de leur cycle de développement. Les champignons étudiés se développent bien sur le milieu PDA ; de même la température 20-25°C influence sur le développement de ces moisissures. Ainsi, nous avons étudié l'activité antifongique des huiles essentielles de la menthe pouliot et du thym vis-à-vis des moisissures isolées. Les résultats obtenus montrent que les deux HE donnent des résultats satisfaisants sur la croissance diamétrale des quatre moisissures, avec une légère différence au niveau de l'efficacité avec leurs fractions volatiles.

VI. EFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Benaissat F. ; 2015; la caractérisation de la sensibilité des variétés d'agrumes aux pourritures en post-récolte ». Université Sidi Mohammed Ben Abdellah , Faculté des Sciences et Techniques.
- [2] Chapot H. et Cassin J., 1961; MALADIES ET TROUBLES DIVERS AFFECTANT LES CITRUS AU MAROC; Al Awamia I, pp. 107 à 142.
<http://webagris.inra.org.ma/doc/awamia/00105.pdf>.
- [3] Bessedik M. L., Khenfer B., 2015; Etude de l'activité antifongique des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* et *Thymus algeriensis* contre quelques champignons phytopathogènes des palmiers dattier (*Phoenix dactylifera* L) ; Master Académique ; UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie ; 51p.
- [4] Bouguerra A., 2012; Etude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de *Foeniculum vulgare* Mill. Consulté le 23 juin 2017.
<http://archives.umc.edu.dz/bitstream/handle/123456789/12505/BOU6092.pdf?sequence=1>.
- [5] Alilou H., 2012; Etude phytochimique et antifongique de deux plantes du Sud du Maroc: *Asteriscus graveolens* subsp. *odorus* (Schousb.) Greuter et *Asteriscus imbricatus* (Cav.) DC. »
<http://toubkal.imist.ma/handle/123456789/9499>
- [6] Csesk J. et Kaufman P.B., 1999; How and why these compound are synthesized by plants. Natural products from plants. CRC press. Boca Raton FL. Pp : 37-90.
- [7] Lakhdar L., 2015; Evaluation de l'Activité Antibactérienne d'Huiles Essentielles Marocaines sur *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*: étude *in vitro* ; Thèse ; Faculté de Médecine Dentaire de Rabat Centre d'Etudes Doctorales des Sciences de la Vie et de la Sante; 163p.
- [8] Benayad N.; 2013; Évaluation de l'activité insecticide et antibactérienne des plantes aromatiques et médicinales Marocaines: Extraction de métabolites secondaires des champignons endophytiques isolés de plantes marocaines et activité anticancéreuse.
<http://toubkal.imist.ma/handle/123456789/9946>.
- [9] Benbouali M. ; 2016; Valorisation des extraits de plantes aromatiques et médicinales de : *Mentha rotundifolia* et *Thymus vulgaris*. Université Hassiba BEN BOUALI – CHLEF. Faculté des Sciences & Sciences de l'ingénieur. Département de Génie des procédés.
- [10] Samson R.A., Hoekstra E.S. and Frisvad J.C., 2004; Introduction to Food- and Airborne Fungi. Sixth edition. CBS, Utrecht, The Netherlands.

l'Entrepreneuriat et de l'Innovation

- [11] Faiza S., 2007; Extraction de l'huile essentielle de thym : *Thymus numidicus kabylica* ; mémoire de master ; Université M'hamed Bougara-Boumerdes Faculté des hydrocarbures et de la chimie ; 102p.
- [12] Harkenthal, M., Reichling, J., Geiss, H. K. and Sailer, R., 1999; Comparative study on the in-vitro antibacterial activity of Austrian tea tree oil, cajuput oil, niaouli oil, manuka oil, kamuka and eucalyptus oil. *Pharmazie*. 54(6): 460-463.
- [13] Zenasni L., 2014; Etude de polymorphisme chimique des huiles essentielles de *Thymus satureioides* Coss et d'*Origanum compactum* Benth et du genre *Nepeta* et évaluation de leur propriété antibactérienne ; thèse ; Université Mohammed V Agdal Faculté des Sciences Rabat ; 155p.
- [14] Skandamis P., Koutsoumanis K., Fasseas K., Nychas G.-J.E., 2001; Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. *Italian Journal of Food Science* 13 (1), 65–75.
- [15] Carson C.F., Mee B.J. and Riley T.V., 2002; Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 1914–1920.
- [16] Burt S.; 2004; Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223-253.
- [17] Helander I. M., Alakomi H. L., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E. J., Gorris L. G. M. & von Wright A., 1998; Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *J Agric Food Chem* 46, 350–3595.
- [18] Thoroski J., Blank G., Biliaderis C., 1989; Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus* *J Food Prot*, 52 (6) (1989), pp. 399-403
- [19] Sikkema J., de Bont J.A.M. & Poolman B., 1994; Intercalations of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J Biol Chem* 269, 8022–8028.
- [20] Oosterhaven K., Hartmans K.J., Scheffer J.J.C., 1995; Inhibition of potato sprout growth by carvone enantiomers and their bioconversion in sprouts. *Potato Res.*, 38: 219-230.
- [21] Ultee A., Bennik M.H. & Moezelaar R., 2002; The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 1561–1568.
- [22] Juven B.J., Kanner J., Schved F. & Weisslowicz H., 1994; Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Bacteriol.* 76, 626-631.
- [23] Ultee A., Kets E.P.W. & Smid E.J., 1999; Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *J. Appl. Microbiol.*, 65(10): 4606-4610.
- [24] Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R. et Wyllie S.G., 2000; The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* .vol: (88)170-175.
- [25] Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P. & Nychas G.J.E., 2001; A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.*, 91, 453-462.
- [26] Marjoram, 2011; AYUS, Ätherische Öle und Naturrohstoffe GmbH Essential Oils and Natural Products Ltd; *Thymus mastichina*; 2011 – Ch : 1009114.
- [27] Ultee A. & Smid E.J., 2001; Influence of carvacrol on growth and toxin production by

l'Entrepreneuriat et de l'Innovation

- Bacillus cereus*. Int. J. Food Microbiol., 64(3), 373-378.
- [28] Glordani R. Kaloustian J., 2006; action anticandidosique des huiles essentielles : leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques- phytothérapie : Vol. 3 ; Pp 121-124. 2006
- [29] Rasooli I., Rezaei M.B. & Allameh A., 2006; Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. Int. J. Infect. Dis. 10: 236-241.
- [30] Souza E.L., Oliveira C.E.V., Stamford T.L.M., Conceição M.L. & Gomes Neto N.J., 2013; Influence of carvacrol and thymol on the physiological attributes, entérotoxine production and surface characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. Braz. J. Microbiol., 44 (1), 29-35.
- [31] Zomorodian K., Saharkhiz M.J., Shariati S., Pakshir K., Rahimi M. J. & Khashei R., 2012; Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Essential Oils from *Nepeta cataria* L. against Common Causes of Food-Borne Infections. ISRN Pharm. 1-6.
- [32] Dorman H. J. & Deans S.G., 2000; Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plants volatile oils. J. Appl. Microbiol. 88(2): 308-316.
- [33] Benabid A. ; 2000 ; Flore et écosystème du Maroc. 2valuation et présentation de la biodiversité. Edition *Ibis Press*, Paris, France. P. 159-161.
- [34] Chikhoun A., 2007; Huiles essentielles de thym et d'origan étude de la composition chimique, de l'activité antioxydante et antimicrobienne, mémoire de master en agronomie ; institut national agronomique El-Harrache, Alger, 151 p.
- [35] Le louarn P., 1994, Guide pratique de l'aromathérapie : Mieux être, mieux vivre par l'aromathérapie. Ed. De Vecchis S.A., Paris, 138.
- [36] Robert S., 1994; Notes de cours. Chimie organique 1. Département de chimie-biologie, université de Québec.
- [37] Jeannot V., 2003; AYUS; Ätherische Öle und Naturrohstoffe GmbH, Essential Oils and Natural Products Ltd; *Thymus mastichina*; 2010 – Ch : 12896.
- [38] Customer D., 2012; AYUS; Ätherische Öle und Naturrohstoffe GmbH Essential Oils and Natural Products Ltd; *Thymus zygis*; 2850 – 1010477.
- [39] Lahrech K., 2010; Extraction et analyses des huiles essentielles de *menthe pulegium* L. et de *Saccocalyx satureioides* ; Tests d'Activités antibactériennes et antifongiques ; mémoire de magister; Université d'Oran Es-Sénia, Faculté des sciences; 90p.
- [40] Hajlaoui H., Trabelsi N., Noumi E., Snoussi M., Fallah H., Ksouri R., et Bakhrouf A., 2009; Biological Activities of the Essential Oils and Methanol Extract of Two Cultivated Mint Species (*Mentha Longifolia* and *Mentha Pulegium*) Used in the Tunisian Folkloric Medicine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25 (12): 2227-38. doi:10.1007/s11274-009-0130-3.
- [41] Boukhebt H. Chaker A. N., Belhadj H., Sahli F., Ramdhani M., Laouer H., et Harzallah D.; 2011; Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. *Der Pharmacia Lettre* 3 (4): 267–275.
- [42] Sbayou H., Ababou B., Boukachabine K., Manresa A., Zerouali K. and Amghar S., 2014; Chemical Composition and Antibacterial Activity of *Artemisia herba-alba* and *Mentha pulegium* Essential Oils ; Journal of Life Sciences, ISSN 1934-7391, USA; January 2014, Vol. 8, No. 1, pp. 35-41.

l'Entrepreneuriat et de l'Innovation

- [43] Khosravi Zanjani M. A., Mohammadi N., Zojaji M., Bakhoda H., 2015; Chemical Composition of the Essential Oil of *Mentha pulegium* L. and its Antimicrobial Activity on *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis* and *Zygosaccharomyces rouxii* ; *Journal of Food Biosciences and Technology*, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Vol. 5, No. 2, 31-40.
- [44] Raymond M., 2005; L'aromathérapie chez le nourrisson et le petit enfant ; thèse d'état ; Université de Nantes, Faculté de Pharmacie ; 101p.
- [45] Belghazi L., Lahlou N., Ismaili M.A., Aboussaouira T., Habti N., Tantaoui Iraki A., Talbi M., Blaghen M. and Fellat-Zarrouk K., 2002; Extraction et analyse par chromatographie en phase gazeuse de l'huile essentielle de la Menthe pouliot - test antifongique. Congrès de biochimie, Casablanca, pp. 38-40.
- [46] Zekri N., Amalich S., Boughdad A., El Belghiti M.A., et Zair T., 2013; Phytochemical study and insecticidal activity of *Mentha pulegium* L. oils from Morocco against *Sitophilus Oryzae*. *Mediterranean Journal of Chemistry* 2 (4): 607-19. doi:10.13171/mjc.2.4.2013.08.11.23.
- [47] Tantaoui-Elaraki A., Lattaoui N., Benjilali B. & Errifi A., 1992; Antimicrobial activity of four chemically different essential oils. *Rivista Italiana E.P.P.O.S.* 6, p.13-22.
- [48] Amalich S., Zerkani H., Cherrat A., Soro N'Dédianhoua K., Bourakhouadar M., Mahjoubi M., EL Hilaliand F. and Zair T., 2016; Study on *Mentha pulegium* L. from M'rirt (Morocco):Antibacterial and antifungal activities of a pulegone-rich essential oil; *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(5):363-370.
- [49] Abd El Azim M. , El-Mesallamy A., Safaan S., Hussein S., Abd El Maksoud M., 2014; Chemical composition and antimicrobial activities of the volatile oil of *Mentha-pulegium* (*Labiatae*) NPAIJ, 10(5), 2014 [131-135].
- [50] Louhibi S., Amiri S., Elghadraoui L., 2013; Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils, *thymus vulgaris* L. and *Mentha L. pulegium* Against the Major Post Harvest Diseases of Citrus in Morocco; *International Journal of Science and Research (IJSR)* ISSN (Online): 2319-7064
- [51] Boubaker H., Karim H., El Hamdaoui A., Msanda F., Leach D., Bombarda I., Vanlout P., Abbad A., Boudyach E.H., et Ait Ben Aoumar A.; 2016; Chemical Characterization and Antifungal Activities of Four Thymus Species Essential Oils against Postharvest Fungal Pathogens of Citrus. *Industrial Crops and Products* 86 (août): 95-101. doi:10.1016/j.indcrop.2016.03.036.
- [52] Haddouchi F., Lazouni H.A., Meziane A. et Benmansour A., 2009; Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie* 5 (2). <http://www.ajol.info/index.php/afsci/article/view/61738>.
- [53] Baâtour O., Aouadi M., Dhieb C., Abbassi M. S., Sadfi N., Ben Nasri -Ayachi M., 2015; Screening for antifungal activity polyphenol content of *Origanum majorana* L. essential oil treated and non-treated with salt; *International Journal of Advanced Research* (2015), Volume 3, Issue 5, 570-574.
- [54] Racowski I., Foramiglio V. L., Teodoro J. A., Freire V. T., 2016; Antifungal Activity of Infusions from Fresh Oregano, Laurel and Rosemary Leaves and Their Commercial Essential Oils against *Acremonium* sp.; *Journal of Microbiology Research* 2016, 6(2): 35-39.