

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE M'SILA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE MICRO
BIOLOGIE ET BIOCHIMIE
N° :.....



DOMAINE : SCIENCES DE LA
NATURE ET DE LA VIE
FILIERE : SCIENCES ALIMENTAIRES
OPTION : QALITE DES PRODUITS
ET SECURITE ALIMENTAIRE

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de
Master Professionnelle

Par :

CHAKER Meryem

MENCHI Salima

NEGUEZ Meryem

Intitulé

Application de composés d'origine végétale pour
contrôler l'altération fongique et la production de
mycotoxines dans les denrées alimentaires.

Soutenu le 21/06/2023 devant le jury d'examen

Dr. SELLOUM Mounir	MCB	Université de M'Sila	Président.
Dr. BEN MIRI Yamina	MCB	Université de M'Sila	Promotrice.
Dr. ARIECH Mounira	MCA	Université de M'Sila	Examinatrice.

Année Universitaire : 2022/2023

Remerciements

*En premier lieu et avant tout je tiens à remercier DIEU le tout puissant qui nous a donné le courage, la patience et la force de terminer ce travail. Ce travail a été réalisé sous la direction de **Dr. BEN MIRI Yamina**. Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude pour nous avoir encadrés pendant la durée de ce travail, pour sa confiance, sa gentillesse, son encouragement, son soutien qu'il nous a accordé, pour ses remarques pertinentes et son optimisme. Nous sommes reconnaissantes pour le temps qu'elle nous a consacré, et toutes les opportunités qu'elle nous a offertes au cours de ce travail.*

Nous remercions également les membres du jury d'avoir consacré leur temps à la lecture de ce manuscrit, et d'accepter de juger et d'évaluer ce travail Enfin nous tenons à exprimer nos profonds remerciements à tous ceux qui nous en soutenu de près ou de loin pour la réalisation de ce travail.

Dédicace

Nous dédions ce Travail

A ceux qui nous ont donné sans rien en retour, à ceux qui nous ont encouragé et soutenu dans nos moments les plus difficiles, et ceux à qui nous devons tant :

A l'âme de la grand-mère Hadda

Puisse dieu vous avoir en sa sainte miséricorde et que ce travail soit une prière pour votre âme

A nos chers parents, nos chers frères, nos chères sœurs, nos enfants, nos neveux et nos nièces

Nous dédions cette thèse pour vos attentions particulières, vos prières et votre amour inconditionnel, merci pour tout

Table des matières

Remerciement

Dédicace

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Résumé

Abstract

ملخص

Introduction..... 1

Synthèse bibliographique

I. Inconvénients des fongicides synthétiques 5

II. Agents de conservation chimiques à faible impact 6

III. Les plantes comme antifongiques naturels 7

III.1. Extraits de plantes et huiles essentielles 7

III.2. Composition chimique des extraits végétaux et des huiles essentielles..... 13

III.3. Mode d'action des extraits végétaux 17

III.4. Influence des facteurs environnementaux 21

IV. Effets sur la production de mycotoxines..... 23

V. Essais *in vivo* 29

VI. Traitements combinés 34

VII. Développements récents 37

VII.1. Extraction par fluide supercritique (EFS)..... 37

VII.2. Films comestibles et encapsulation 38

VII.3. Emballage actif 40

Conclusion générale 44

Références bibliographiques 46

HE : Huile essentielle.

P/D : Pas disponible.

MO : Microscopie optique.

MET : Microscope électronique à transmission.

MEB : Microscope électronique à balayage.

AW : Activité d'eau.

T : Temperature.

AC : Acide.

OTA :Ochratoxine A.

AFB1 : Aflatoxine B1.

ZEA : Zearalenone.

DON : Deoxynivalenol.

FB1 : Fumonisine B1.

EP : Extrait de plante.

MEA : Gélose à l'extrait de Malt-agar.

KcL : Chlorure de potassium.

PDA : Potato dextrose agar.

NaCL : Chlorure de sodium.

MAP : Modified atmosphere of Low O₂ and high CO₂.

EFS : Extraction par fluide supercritique.

Tableau 1. Extraits de plantes et HEs testés pour leur pouvoir antifongique.....	12
Tableau 2. Extraits de plantes et HEs rapportés comme inhibiteurs de la synthèse des mycotoxines.....	24
Tableau 3. Effets antifongique des extraits d'origine végétale <i>in vivo</i>	30

La dégradation des aliments par les moisissures d'altération entraîne des pertes économiques considérables et constitue un risque pour la santé des consommateurs, en raison de la production potentielle de mycotoxines par les moisissures. L'utilisation indiscriminée d'antifongiques synthétiques a conduit au développement de souches résistantes, qui a nécessité l'utilisation de concentrations plus élevées, et qui a conduit à l'augmentation des résidus toxiques dans les produits alimentaires. De nombreuses études ont démontré que les extraits de plantes contiennent divers composants bioactifs capables de contrôler la croissance des moisissures. Les métabolites produits par les plantes sont une alternative prometteuse car les plantes génèrent une grande variété de composés, soit dans le cadre de leur développement, ou bien comme une réponse à un stress ou à une attaque pathogène. L'objectif de ce travail est de résumer les résultats de la littérature sur les expériences *in vitro* et *in vivo* concernant les effets des produits d'origine végétale pour contrôler la croissance fongique. Les données issues des travaux de recherche sur le mode d'action de ces métabolites à l'intérieur de la cellule fongique et l'influence des facteurs abiotiques externes tels que le pH et la température. En outre, une analyse sur comment le facteur stress dérivé de la présence d'extraits de plantes et d'huiles essentielles affecte le métabolisme secondaire de la moisissure, spécifiquement la synthèse des mycotoxines est développé. Finalement, l'efficacité de l'utilisation de composés d'origine végétale en combinaison avec d'autres antimicrobiens naturels et son application dans les aliments en utilisant les nouvelles technologies est discutée.

Mots-clés : Antifongique ; extraits de plantes ; huiles essentielles ; aliments.

Food decay by spoilage fungi causes considerable economic losses and constitutes a health risk for consumers due to the potential for fungi to produce mycotoxins. The indiscriminate use of synthetic antifungals has led to the development of resistant strains which has necessitated utilization of higher concentrations, with the consequent increase in toxic residues in food products. Numerous studies have demonstrated that plant extracts contain diverse bioactive components that can control mould growth. The metabolites produced by plants are a promising alternative because plants generate a wide variety of compounds, either as part of their development or in response to stress or pathogen attack. The aim of this work is to summarize the results from the literature on *in vitro* and *in vivo* experiments regarding the effects of plant-derived products for controlling fungal growth. Data from research work on the mode of action of these metabolites inside the fungal cell and the influence of abiotic external factors such as pH and temperature are also covered in the present review. Furthermore, an analysis on how the stress factor derived from the presence of plant extracts and essential oils affects secondary metabolism of the fungus, specifically mycotoxin synthesis, is developed. Finally, the effectiveness of using plant-derived compounds in combination with other natural antimicrobials and its application in food using novel technologies is discussed.

Keywords : Antifungal ; Plant extracts ; Essential oils ; Food.

يتسبب تلوث الغذاء بفطريات التلّف في خسائر اقتصادية كبيرة ويشكل مخاطر صحية للمستهلكين بسبب احتمالية إنتاج الفطريات للسموم الفطرية. أدى الاستخدام العشوائي لمضادات الفطريات الاصطناعية إلى تطوير سلالات مقاومة مما استلزم استخدام تركيزات أعلى ، مع ما يترتب على ذلك من زيادة في المخلفات السامة في المنتجات الغذائية. أظهرت العديد من الدراسات أن المستخلصات النباتية تحتوي على مكونات نشطة بيولوجيًا متنوعة يمكنها التحكم في نمو العفن. تعتبر المستقلبات التي تنتجها النباتات بديلاً واعدًا لأن النباتات تولد مجموعة متنوعة من المركبات ، إما كجزء من تطورها أو استجابة للإجهاد أو هجوم العوامل الممرضة. الهدف من هذا العمل هو تلخيص نتائج الدراسات حول التجارب في المختبر والحي فيما يتعلق بتأثيرات المنتجات المشتقة من النبات للتحكم في نمو الفطريات. تمت تغطية البيانات المستمدة من العمل البحثي حول طريقة عمل هذه المستقلبات داخل الخلية الفطرية وتأثير العوامل الخارجية اللاأحيائية مثل الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة في المراجعة الحالية. علاوة على ذلك ، تم تطوير تحليل حول كيفية تأثير عامل الإجهاد المشتق من وجود المستخلصات النباتية والزيوت الأساسية على التمثيل الغذائي الثانوي للفطر ، وتحديدًا تخليق السموم الفطرية. أخيرًا ، تمت مناقشة فعالية استخدام المركبات المشتقة من النباتات جنبًا إلى جنب مع مضادات الميكروبات الطبيعية الأخرى وتطبيقها في الغذاء باستخدام تقنيات جديدة.

الكلمات المفتاحية: مضاد للفطريات؛ المستخلصات النباتية؛ الزيوت الأساسية؛ غذاء.

Introduction générale

De nombreux ravageurs et maladies s'attaquent aux cultures vivrières dans le monde entier, la plupart d'entre elles sont liées à des maladies fongiques pathogènes. A l'échelle mondiale, les pertes post-récolte ont été estimées à 50 % et une grande partie de ces pertes sont dues à des infections mycelienne et bactériennes (**Magro et al., 2006**).

Les moisissures sont des agents biologiques omniprésents capables de coloniser les aliments en raison de leur capacité à synthétiser une grande variété d'enzymes hydrolytiques, elles provoquent des troubles pathologiques chez les plantes, entraînant des pertes économiques considérables pour les producteurs de denrées alimentaires. Les fruits et les légumes sont très sensibles à l'altération par les moisissures, à la fois dans les champs et pendant le stockage post-récolte, les genres significants comprennent *Pythium*, *Phytophthora*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Geotrichum*, *Sclerotinia* et *Rhizoctonia spp* (**Prakash et al., 2015**).

La croissance fongique sur les fruits et les légumes frais est responsable de la détérioration des aliments, et de nombreuses maladies végétales, qui entraînent des pertes économiques considérables (**Ben Miri et al., 2023**).

La croissance des moisissures dépend de facteurs abiotiques tels que le pH, l'activité de l'eau (aw), la concentration de solutés, la température, l'atmosphère, le temps, etc. Cependant, les conditions de température et d'aw sont les principales variables qui déterminent le développement des moisissures (**Mahlo et al., 2010**).

En plus de provoquer des maladies chez les plantes, de nombreuses espèces de *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* et *Alternaria* peuvent également synthétiser des mycotoxines, ces composés sont dangereux pour la santé animale et humaine car ils peuvent être létaux, cancérigènes, mutagènes, toxiques et immunosuppresseurs, ou peuvent imiter les œstrogènes, leur activité dépend du type de toxines et de leur concentration dans les aliments. L'inquiétude concernant ces risques chimiques sont de plus en plus préoccupantes en raison du large éventail de types d'aliments susceptibles d'être affectés et de la variabilité de la gravité des symptômes causés. La présence de mycotoxines dans les aliments est associée à un inoculum fongique sur des substrats prédisposés. Les mycotoxines peuvent être produites avant et après la récolte et leurs niveaux peuvent augmenter pendant la manipulation et le stockage après la récolte. La prévention de la croissance fongique est donc un moyen efficace de prévenir l'accumulation de mycotoxines (**Lee et al., 2007**).

Les mycotoxines peuvent atteindre les consommateurs soit par contamination directe des produits végétales ou des produits qui en sont issus, soit par le "transfert" des mycotoxines et de leurs métabolites dans les tissus animaux, le lait et les œufs après l'ingestion des aliments contaminés. En

outre, ce risque subsiste dans les denrées alimentaires transformées, car ces métabolites ne sont pas éliminés par les procédés industriels normaux (**Naeini *et al.*, 2010**).

Le risque pourrait augmenter si les fruits ou les plantes moisies sont utilisés dans les sous-produits transformés. L'inhibition de la croissance fongique dans les cultures, les fruits et les légumes frais est donc nécessaire pour réduire les risques pour la santé humaine et animale (**Souza *et al.*, 2005**).

Il est important de noter que l'inhibition partielle de la croissance fongique, comme la réduction du taux de croissance fongique, pourrait favoriser la production de mycotoxines, en tant que réponse de la moisissure au stress (**Kedia *et al.*, 2015**).

L'objectif de ce travail est de résumer les résultats de la littérature sur les expériences *in vitro* et *in vivo* concernant les effets des produits d'origine végétale pour contrôler la croissance fongique.

Synthèse bibliographique

1. Inconvénients des fongicides synthétiques

La première étape de la lutte contre la contamination fongique est l'application de fongicides sur le terrain. Les fongicides peuvent être appliqués après la récolte, à condition qu'ils n'affectent pas négativement l'apparence ou la qualité des produits traités (Amiri *et al.*, 2008).

Les produits chimiques antimicrobiens tels que les benzimidazoles (par exemple le thiabendazole), les hydrocarbures aromatiques (par exemple, l'ortho-phénylphénate de sodium) et les inhibiteurs de la biosynthèse des stérols (par exemple l'imazalil un inhibiteur de la déméthylation des stérols) sont utilisés depuis des décennies pour lutter contre les maladies des plantes en agriculture. Plus récemment, deux fongicides, chacun ayant un mode d'action différent, sont devenus importants sur le marché : le pyriméthanil (anilinopyrimidine) et le fludioxonil (phénylpyrrole). L'utilisation excessive et sans discernement de fongicides dans les cultures a été l'une des principales causes du développement de populations pathogènes résistante, entraînant l'utilisation de concentrations plus élevées de ces antifongiques et l'augmentation conséquente des résidus toxiques dans les produits alimentaires (par exemple, la résistance acquise par *Penicillium italicum* et *P. digitatum* à de nombreux fongicides synthétiques couramment utilisés sur les agrumes (Fogliata *et al.*, 2001).

Certains de ces composés ne sont pas biodégradables et peuvent donc s'accumuler dans le sol, les plantes et l'eau, et par conséquent affecter l'homme à travers la chaîne alimentaire. Bien que les traitements chimiques aient été considérés comme le moyen le moins cher et les plus efficaces pour prévenir les maladies post-récolte, le développement de micro-organismes résistants a réduit leur efficacité.

Le type et la concentration des fongicides autorisés pour l'application après la récolte sont limités en raison de leur longue période de dégradation et de leurs effets potentiels, sur les aliments et la santé humaine (cancérogène, tératogène, toxicité résiduelle élevée et aiguë, déséquilibre hormonal et spermatotoxicité). En raison de ces effets indésirables, des études récentes ont abouti à la l'annulation de l'homologation de certains des fongicides les plus efficaces.

En outre, l'inquiétude du public concernant la contamination des aliments par des résidus de fongicides a augmenté de manière significative, compte tenu de tous ces facteurs, le développement de nouvelles alternatives sûres et biodégradables qui sont à la fois efficaces et économiquement viables.

2. Agents de conservation chimiques à faible impact

Ces dernières années, les préférences des consommateurs se sont orientées vers des aliments contenant moins de conservateurs chimiques et présentant des caractéristiques plus fraîches et naturelles. Les sels d'acides faibles, tels que le benzoate de sodium et le sorbate de potassium, peuvent inhiber la croissance de plusieurs champignons pathogènes après la récolte. L'utilisation de ces composés pour l'inhibition fongique présente plusieurs avantages, tels que leur faible toxicité pour les mammifères, un large spectre d'activité et une grande facilité d'utilisation et un coût relativement faible, cependant de fortes concentrations de ces composés sont nécessaires pour inhiber la croissance fongique, ce qui entraîne des modifications organoleptiques potentielles, par exemple le propionate de calcium a complètement inhibé la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* à une concentration de 5 % (p/v) (**Droby et al., 2003**).

L'acide benzoïque, l'un des antimicrobiens les plus largement utilisés, est autorisé à des niveaux allant jusqu'à 0,1 % (**Jay, 2000**), il est couramment appliqué sous forme de benzoates de sodium, en raison de leur plus grande solubilité des sels. En général, l'activité inhibitrice optimale se produit à un pH faible car les conditions d'acidité favorisent la forme non dissociée de la molécule qui traverse librement la membrane plasmique de la cellule cible, à l'intérieur de cette dernière, la molécule se dissocie en raison d'un pH plus élevé, on pense que l'action conservatrice est due à une accumulation d'anions et de protons à l'intérieur de la cellule (**Brul et Coote, 1999 ; Jay, 2000**).

La diminution du pH cytoplasmique due à l'entrée de l'état non dissocié du composé peut provoquer la rupture de certaines réactions métaboliques du micro-organisme, de la membrane cytoplasmique et la mort cellulaire. D'autres composés fréquemment utilisés pour leur activité fongistatique sont les antioxydants butylhydroxyanisole (BHA), propylparaben (PP) et le butylhydroxytoluène (BHT) (**Shukla et al., 2012**).

Comme l'acide benzoïque, ils sont généralement reconnus comme sûrs (GRAS) par la Food and Drug Administration (FDA), qui autorise également leur utilisation en tant qu'agents antimicrobiens dans les aliments.

Le Codex Alimentarius (2006) ou code alimentaire a fixé la dose maximale d'utilisation d'un ou de plusieurs antioxydants, l'utilisation pour les antioxydants simples ou multiples est de 200 µg/g sur la base du poids de la graisse ou de l'huile. En outre la nisine, la monolaurine et la lactopéroxydase sont des exemples de conservateurs "naturels", mais ils présentent plusieurs limites, notamment un spectre d'activité limité, des coûts d'application élevés, l'émergence potentielle de souches résistantes et leurs impacts sur les propriétés organoleptiques des aliments.

L'application du concept de la technologie hurdle, c'est-à-dire l'utilisation de plusieurs facteurs de conservation à des niveaux inférieurs, pourrait permettre de réduire les risques de contamination. L'utilisation de composés antimicrobiens d'origine naturelle en combinaison avec des traitements et additifs chimiques a été largement étudié récemment, le produit alimentaire traité sera microbiologiquement sûr et conservera ses propriétés sensorielles, nutritionnelles et économiques.

De nouvelles techniques telles que la haute pression, la nanotechnologie, l'irradiation, etc, sont de plus en plus utilisées, tandis que de nouveaux ingrédients dotés de propriétés fonctionnelles contribuent à améliorer les aliments sains.

3. Les plantes comme antifongiques naturels

3.1. Extraits de plantes et huiles essentielles

Afin de réduire l'utilisation de fongicides chimiques synthétiques dans l'alimentation, plusieurs traitements alternatifs ont été étudiés. Les métabolites produits par les plantes sont une alternative prometteuse car les plantes produisent une grande variété de composés, soit dans le cadre de leur développement, soit en réponse à un stress ou à une attaque de pathogènes. Ces dernières années, ils ont suscité un intérêt croissant en raison de leur statut relativement sûr (beaucoup d'entre eux sont considérés comme GRAS par la FDA), ils sont facilement décomposables, respectueux de l'environnement et non phytotoxiques.

Il a été prouvé que les extraits de plantes obtenus à l'aide de différents solvants et d'huiles essentielles (HEs) sont riches en composés potentiellement bioactifs, tels que les phytoalexines. Plusieurs d'entre eux sont connus pour leur activité antimicrobienne pour la protection des plantes, les flavonoïdes, les isoflavonoïdes, tanins, cumarins, glycosides, terpènes, phénylpropanes et acides organiques.

Les HEs sont des liquides huileux aromatiques obtenus par hydrodistillation du matériel végétal (tissus entiers ou graines) et sont généralement des mélanges de plusieurs composants.

Les HEs et les extraits de plantes ont l'avantage potentiel d'être bioactives en phase vapeur, une caractéristique qui les rend aussi intéressantes en tant que fumigants possibles pour la protection des produits stockés, leur activité antimicrobienne inhérente est généralement liée à la structure chimique de leurs composants, à la concentration dans laquelle ils sont présents et à leurs interactions, qui peuvent influencer sur leur activité bioactive. Ils peuvent également contenir divers composés antioxydants tels que des polyphénols, des phénols, flavonoïdes, etc., dont on pense qu'ils sont à l'origine de leurs propriétés antimicrobiennes.

Le fait qu'ils soient constitués d'une grande variété de composés leur confère d'autres avantages, comme avoir différents modes d'action en fonction du composé impliqué, ce qui leur permet de s'attaquer différents genres de moisissures et d'empêcher le développement d'une résistance par l'agent pathogène. De nombreuses recherches ont été menées dans ce domaine au cours des dernières années, *Aspergillus* et *Fusarium* sont les genres fongiques les plus couramment utilisés pour tester les HEs et les extraits de plantes, suivis par *Penicillium* et d'autres genres phytopathogènes.

L'huile de *Chenopodium ambrosioides* a inhibé la croissance mycélienne de deux souches aflatoxigènes d'*A. flavus* à 100 µg/ml, cette huile a également inhibé la croissance d'*A. fumigatus*, *Botryodiplodia theobromae*, *F. oxysporum*, *Phythium debaryanum* et *Sclerotium rolfsii* (Kumar et al., 2007).

L'HE de *Peumus boldus* était active contre *A. niger*, *A. flavus* et *Fusarium spp* (Souza et al., 2005).

L'extrait aqueux de camomille (*Anthemis nobilis L.*) et la malva (*Malva sylvestris L.*) à 0,92 et 0,6 g/ml, respectivement, ont inhibé la croissance de quatre moisissures testés : *A. candidus*, *A. niger*, *Penicillium sp* et *F. culmorum*, le malva étant le plus efficace, car une concentration plus faible était nécessaire pour l'inhibition fongique (Magroet et al., 2006).

Dans les travaux de recherche, les HEs de citron, d'orange, de mandarine et de pamplemousse obtenues par pression à froid de l'écorce ont montré, aux concentrations testées la capacité de réduire ou d'inhiber la croissance de *P. chrysogenum*, *P. verrucosum*, *A. niger* et *A. flavus*. Pour *A. niger* et *A. flavus*, l'inhibition a été obtenue lorsqu'une concentration de 0,94 % de l'une ou l'autre des HEs. La réduction maximale de *P. verrucosum* et *P. chrysogenum* a été observée avec l'HE de pamplemousse. L'HE d'orange a été la plus efficace contre *A. niger*, tandis que l'HE de mandarine a été le meilleur inhibiteur d'*A. flavus* (Viuda-Martos et al., 2008).

Les HEs obtenues à partir de *Carum carvi*, *Cymbopogon nardus*, *Pelargonium roseum*, *Pimenta dioica* et *Thymus vulgaris* étaient efficaces contre la croissance des espèces fongiques cibles *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *P. expansum*, *P. brevicompactum*, *A. flavus* et *A. fumigatus* (Zabka et al., 2009).

L'HE d'*Eucalyptus globulus* était clairement inhibitrice vis-à-vis des espèces fongiques testées, *A. flavus* et *A. parasiticus*, à la fois dans les essais volatils par contact et dans l'espace de tête (Vilela et al., 2009).

Parmi les moisissures testés ; *A. niger* et *Penicillium spp*, se sont révélés sensibles à l'extrait éthanolique brut de *Thevetia peruvol*, enregistrant une réduction de la croissance de 50 %, une réduction considérable de la sporulation a également été enregistrée (**Ravikumar Patil et al., 2007**).

L'huile volatile de feuille de cannellier a été prouvée d'être efficace à 100 % contre *A. niger*, *A. flavus*, *F. moniliforme*, *F. graminearum*, *P. citrinum* et *P. viridicatum* (**Singh et al., 2007**).

Les activités fongitoxiques des HEs de *Bidens pilosa* (une plante largement répandue dans les régions subtropicales et tropicales) ont été testées dans les régions subtropicales et tropicales du monde contre *Fusarium spp*, ils ont constaté que *F. solani* était l'espèce la plus supprimée, suivie de *F. oxysporum* (**Deba et al., 2008**).

Des sensibilités variables aux propriétés anti-*Fusarium* ont été observée dans cinq HEs d'herbes qui sont depuis longtemps utilisées comme épices ou d'importantes sources médicinales en Iran, soulignant la variabilité des effets antifongiques contre différents isolats de *Fusarium* (**Naeini et al., 2010**).

L'activité anti-*Fusarium* la plus élevée a été observée dans l'HE de *Cuminum cyminum* et de *Zataria multiflora* contre les isolats non toxigènes (*F. solani* et *F. oxysporum*) et toxigènes (*F. verticillioides*, *F. poae* et *F. equiseti*) étudiés respectivement (**Naeini et al., 2010**).

Une autre étude contre *Fusarium spp* a été réalisée et qui a évalué 37 HEs, cinq d'entre eux (citronnelle, cannelle, clou de girofle, palmarosa et origan) ont montré une activité antifongique, même si les huiles d'origan et de palmarosa étaient moins efficaces pour contrôler la croissance des espèces de *Fusarium* que les huiles de citronnelle, de clou de girofle et de cannelle, elles ont significativement inhibé la croissance dans les différentes conditions testées (concentration de l'huile 0-1000 µg/ml ; temperature 20-30 °C et aw 0,95-0,995). Il est important de noter qu'il n'y a pas eu de signification interspécifique dans les réponses aux huiles, ce qui suggère que les huiles essentielles peuvent être une bonne alternative avec un large spectre d'application (**Velluti et al., 2004**).

Le sater (*Satureja hortensis*) montrait une activité fongistatique considérable contre les pathogènes *Rhizoctonia solani*, *F. oxysporum sp. tulipae*, *B. cinerea* et *A. citri*, suivi dans l'efficacité de l'herbe à décaper (*Echinophora tenuifolia*) et l'hydrolat de cumin (*C. cyminum*) (**Boyras et Özcan 2005**).

Le genre *Alternaria* contient plusieurs espèces pathogènes et toxicogènes et est également fréquemment utilisé comme cible pour les essais d'inhibition, pour cette raison, les chercheurs ont

étudié la capacité de cinq HEs à inhiber *A. alternata* ; L'huile de cassia était la plus active, suivie de l'huile de thym.

Tous les extraits aqueux obtenus à partir des feuilles de vingt espèces végétales de l'Inde à une concentration de 10 % ont été efficaces pour l'inhibition de la croissance radiale d'*A. solani*.

L'extrait de feuilles de *Zimmu* (*Allium cepa* L. × *Allium sativum* L.) était le plus efficace pour l'inhibition de la croissance mycélienne d'*A. solani* (87,5 %), suivi par *Datura metel* L., *Ocimum sanctum* L. et *Vinca rosea* L. Avec des taux d'inhibition respectivement 78,5, 76,5 et 76,5 % (**Feng et Zheng 2007**).

Le taux d'inhibition le plus élevé a été représenté par *Artemisia dubia* (64,44 %), suivie de *T. linearis* (60,00 %), *Nardostachys grandiflora* (57,77 %), *Juniperus recurva* (42,22 %), *Artemisia gmelinii* (33,33 %) et *Zanthoxylum marmatum* (8,88 %) à une concentration d'HE de 10 µl/ml contre *A. brassicicola* (**Latha et al., 2009**).

Dans une étude, ils ont évalué l'activité antifongique de trois espèces de *Flourensia* ; *F. microphylla* a inhibé *Alternaria* sp. de 42,5 % à 10 µl/l, atteignant 76,8 % d'inhibition à 100 µl/l (**Parajuli et al., 2005**).

La croissance mycélienne de *R. solani* a été inhibée de 20 % à 10 µl/l ; ce comportement était similaire pour les trois extraits. L'inhibition a atteint 100 % à 1000 µl/l pour *F. cernua* et *F. retinophylla*, mais pour *F. microphylla* elle a été atteinte à 1500 µl/l. *F. oxysporum* a été inhibé de 48,5 % à 10 µl/l et *F. microphylla* présentait l'inhibition la plus élevée à cette concentration (**Jasso de Rodríguez et al., 2007**).

Le large spectre de fongitoxicité de l'extrait aqueux d'*Adenocalymma* a été rapporté un an plus tard (**Shukla et al., 2008**).

La plupart des moisissures traitées étaient sensibles à une concentration de 10 mg/ml de l'extrait modifié sur un milieu gélosé Czapek Dox, avec une inhibition complète de la germination des spores, après 7 jours d'incubation à 28 °C, parmi eux ; *A. niger*, *A. flavus* et *Cladosporium cladosporioides* se sont révélés les plus résistants. Les souches fongiques les plus sensibles étaient *Mucor* sp., *Dreschlera* sp. et *F. roseum* (**Shukla et al., 2008**). D'autres genres largement étudiés sont les agents pathogènes *Phytophthora* et *Botrytis* (**Soylu et al., 2006**).

Ces études ont montré que les huiles d'origan, de thym et de fenouil inhibaient complètement la croissance de *P. infestans* à 6,4 µg/ml, tandis que la croissance mycélienne était complètement

inhibée par les HEs de romarin et de lavande à 12,8 et 12,5 µg/ml respectivement. Les HEs utilisées dans cette étude ont également affecté la formation de sporanges, en particulier l'huile d'origan, toutes les HEs des parties aériennes de l'origan, de la lavande et du romarin ont inhibé la croissance de *B. cinerea* de manière dose-dépendante (Soylu *et al.*, 2010). Le **tableau 1** résume les résultats présentés dans cette section.

Tableau 1. Extraits de plantes et HEs testés pour leur pouvoir antifongique.

Plante (nom scientifique)	Moississure testé	Références
<i>Adenocalymma alliaceum</i>	<i>A.flavus</i> , <i>C.cladosporioides</i> , <i>Mucor</i> sp., <i>Dreschlera</i> sp. et <i>F. roseum</i>	Shukla <i>et al.</i> (2008)
<i>Allium cepa</i> L.× <i>Allium Sativum</i> L.	<i>A.solani</i>	Latha <i>et al.</i> (2009)
<i>Anthemis nobilis</i> L.	<i>A. candidus</i> , <i>A.niger</i> , <i>Penicillium</i> sp.	Magro <i>et al.</i> (2006)
<i>Artemisiadubia</i>	<i>Alternaria brassicicola</i>	Paraguli <i>et al.</i> (2005)
<i>Artemisiagmelinii</i>	<i>A. brassicicola</i>	Paraguli <i>et al.</i> (2005)
<i>Bidenspilosa</i>	<i>F.oxysporum</i> and <i>F.solani</i>	/
<i>Carumcarvi</i>	<i>F.oxysporum</i> , <i>F.verticillioides</i> , <i>P.expansum</i> , <i>P.brevicompactum</i> , <i>A.flavus</i> et <i>A. fumigatus</i>	Zabka <i>et al.</i> (2009)
<i>Cassiafistula</i>	<i>A. alternata</i>	Feng et Zheng (2007)
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	<i>A.flavus</i> , <i>A.fumigatus</i> , <i>Botryodiplodia theobromae</i> , <i>F.oxysporum</i> , <i>P.debaryanum</i> et <i>S.rolfsii</i>	Kumar <i>et al.</i> (2007)
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	<i>A.niger</i> , <i>A.flavus</i> , <i>F.moniliforme</i> , <i>F.graminearum</i> , <i>Fusarium</i> spp, <i>P.citrinum</i> et <i>P. viridicatum</i>	Singh <i>et al.</i> (2007), Velluti <i>et al.</i> 2004)
<i>Citrus limon</i> L.	<i>P.chrysogenum</i> , <i>P.verrucosum</i> , <i>A.niger</i> et <i>A.flavus</i>	Viuda-Martos <i>et al.</i> (2008)
<i>Citrus paradisi</i> L.	<i>P.chrysogenum</i> , <i>P.verrucosum</i> , <i>A.niger</i> et <i>A.flavus</i>	Viuda-Martos <i>et al.</i> (2008)
<i>Citru sreticulata</i> L.	<i>P.chrysogenum</i> , <i>P.verrucosum</i> , <i>A.niger</i> et <i>A.flavus</i>	Viuda-Martos <i>et al.</i> (2008)
<i>Citrus sinensis</i> L.	<i>P.chrysogenum</i> , <i>P.verrucosum</i> , <i>A.niger</i> et <i>A.flavus</i>	Viuda-Martos <i>et al.</i> (2008)
<i>Cuminum cyminum</i>	<i>F.solani</i> , <i>F.oxysporum</i> , <i>F.oxysporum</i> sp., <i>F.verticillioides</i> , <i>F. paae</i> , <i>F. equisti</i> <i>R. solani</i> et <i>A. citri</i>	Naeini <i>et al.</i> (2010) Boyras et Özcan (2005)
<i>Cymbopogon nardus</i>	<i>F.oxysporum</i> , <i>F.verticillioides</i> , <i>P.expansum</i> , <i>P.brevicompactum</i> , <i>A. flavus</i> et <i>A.fumigatus</i>	Zabka <i>et al.</i> (2009)
<i>Cymbopogon</i> spp	<i>Fusarium</i> spp	Velluti <i>et al.</i> (2004)
<i>Daturametel</i> L.	<i>A.solani</i>	Latha <i>et al.</i> (2009)
<i>Echinophora tenuifolia</i>	<i>R.solani</i> , <i>F. oxysporum</i> sp. <i>B.cinerea</i> et <i>A.citri</i>	Boyras et Özcan (2005)
<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>A.flavus</i> et <i>A.parasiticus</i>	Vilela <i>et al.</i> (2009)
<i>Flourensia cernua</i>	<i>Alternaria</i> sp., <i>F.oxysporum</i> et <i>R.solani</i>	Jasso de Rodríguez <i>et al.</i> (2007)
<i>Flourensia microphylla</i>	<i>Alternaria</i> sp., <i>F.oxysporum</i> et <i>R.solani</i>	Jasso de Rodríguez <i>et al.</i> (2007)
<i>Flourensia Retinophylla</i>	<i>Alternaria</i> sp., <i>F.oxysporum</i> et <i>R.solani</i>	Jasso de Rodríguez <i>et al.</i> (2007)
<i>Foeniculum vulgare</i>	<i>Phytophthora infestans</i>	Soylu <i>et al.</i> (2006)
<i>Juniperus recurva</i>	<i>A.brassicicola</i>	Parajuli <i>et al.</i> (2005)
<i>Lavandula stoechas</i> subsp. <i>stoechas</i>	<i>P.infestans</i> et <i>B.cinerea</i>	Soylu <i>et al.</i> (2006) Soylu <i>et al.</i> (2010)

<i>Malva sylvestris</i> L.	<i>A.candidus</i> , <i>A.niger</i> , et <i>Penicillium</i> sp	Magro <i>et al.</i> (2006)
<i>Nardostachys grandiflora</i>	<i>A.brassicicola</i>	Parajuli <i>et al.</i> (2005)
<i>Ocimum sanctum</i> L.	<i>A.solani</i>	Latha <i>et al.</i> (2009)
<i>Origanum syriacum</i> var. <i>bevanii</i>	<i>P.infestans</i> et <i>B.cinerea</i>	Soylu <i>et al.</i> (2006), Soylu <i>et al.</i> (2010)
<i>Pelargoniumroseum</i>	<i>F.oxysporum</i> , <i>F.verticillioides</i> , <i>P.expansum</i> , <i>P.brevicompectum</i> , <i>A. flavus</i> et <i>A.fumigatus</i>	Zabka <i>et al.</i> (2009)
<i>Peumus boldus</i>	<i>A.niger</i> , <i>A.flavus</i> et <i>Fusarium</i> spp.	Souza <i>et al.</i> 2005)
<i>Pimenta dioica</i> L.	<i>F.oxysporum</i> , <i>F.verticillioides</i> , <i>P.expansu</i> <i>m</i> , <i>P.brevicompectum</i> , <i>A. flavus</i> et <i>A.</i> <i>fumigatus</i>	Zabka <i>et al.</i> (2009)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>P.infestans</i> et <i>B.cinerea</i>	Soylu <i>et al.</i> (2006) ;Soylu <i>et al.</i> (2010)
<i>Satureja hortensis</i>	<i>R.solani</i> , <i>F. oxysporum</i> sp. <i>tulipae</i> , <i>B.cinerea</i> et <i>A. citri</i>	Boyras et Özcan (2005)
<i>Syzygium aromaticum</i>	<i>Fusarium</i> spp.	Velluti <i>et al.</i> (2004)
<i>Thevetiaperuviana</i>	<i>A.niger</i> et <i>Penicillium</i> spp.	Ravi kumar Patil <i>et al.</i> (2007)
<i>Thymbras picata</i> subsp <i>.spicata</i>	<i>P.infestans</i>	Soylu <i>et al.</i> (2006)
<i>Thymus linearis</i>	<i>A.brassicicola</i>	Parajuli <i>et al.</i> (2005)
<i>Thymus vulgaris</i>	<i>F.oxysporum</i> , <i>F.verticillioides</i> , <i>P.expansu</i> <i>m</i> , <i>P.brevicompectum</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A.</i> <i>alternate</i> et <i>A. fumigatus</i>	Zabka <i>et al.</i> (2009) ; Feng et Zheng (2007)
<i>Vinca rosea</i> L.	<i>A.solani</i>	Latha <i>et al.</i> (2009)
<i>Zanthoxylum armatum</i>	<i>A.brassicicola</i>	Parajuli <i>et al.</i> (2005)
<i>Zatariam ultiflora</i>	<i>F.solani</i> , <i>F.oxysporum</i> , <i>F.verticillioides</i> , <i>F.poeae</i> et <i>F.equiseti</i>	Naeini <i>et al.</i> (2010)

3.2. Composition chimique des extraits végétaux et des huiles essentielles

Le potentiel des extraits de plantes à inhiber la croissance fongique dépend de leur composition, en outre, leur efficacité varie en fonction de la nature du solvant utilisé pour l'extraction, en général, il est bien connu que les solvants polaires ont une meilleure capacité de pénétration que les solvants non polaires, ils sont donc censés extraire une plus grande variété de composés du tissu végétal que les solvants non polaires.

Des chercheurs ont constaté que l'acétone et le méthanol sont les meilleurs solvants pour l'extraction de composés antifongiques à partir d'*Hypericum linarioides* (Cakir *et al.*, 2005), d'autres ont conclu que l'acétone était le meilleur solvant, extrayant une plus grande quantité de matière (entre

8 et 12 %) des différentes plantes analysées, dont *Breonadia salicina* et *Olinia ventosa* ont eu les rendements les plus élevés, cela suggère que les composés avec une polarité intermédiaire ont l'activité la plus élevée, ce qui pourrait être lié à l'absorption des composés par les cellules fongiques, d'autres raisons justifient le choix de l'acétone comme solvant d'extraction, comprennent sa volatilité, sa miscibilité avec des solvants polaires et non polaires et sa toxicité relativement faible. Outre le solvant d'extraction, la partie de la plante à partir de laquelle l'extrait est obtenu joue un rôle important (**Mahlo et al., 2010**).

Différents résultats ont été présentés par des chercheurs en tenant compte de ces facteurs dans leurs travaux, les extraits les plus actifs correspondent aux racines d'*Acalypha gaumeri* et *Croton chichenensis* (plantes indigènes de la péninsule de Yucatan) qui étaient actives contre les quatre pathogènes évalués (*A. tagetica*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *F. oxysporum* et *Rhizopus sp.*), suivies par les feuilles d'*Ambrosia hispida*, *Trichilia minutiflora*, *Vitex gaumeri* et la tige de *Randia obcordata*. Les résultats ont indiqué un large spectre d'activité uniquement pour l'extrait éthanolique des racines de *C.chichenensis*, avec l'effet inhibiteur le plus important contre les plantes pathogènes testés (**Gamboa-Angulo et al., 2008**).

Différentes techniques de fractionnement des extraits bruts de plantes ont été étudiées afin d'isoler leurs principes actifs. La fraction d'acétate d'éthyle d'un extrait méthanolique de *Galla rhois* à une concentration de 2000 ppm présentait une bonne activité antifongique contre six organismes de maladies végétales : *Magnaporthe grisea*, *B. cinerea*, *Phytophthora infestans*, *Puccinia recondita* et *Erysiphe graminis*, aucune activité antifongique a été observée contre tous les microorganismes phytopathogènes avec les fractions d'hexane, de chloroforme, et de l'eau. Le fractionnement bio-guidé de la plante entière de l'extrait de *G. rhois* a permis d'obtenir deux principes actifs qui ont été identifiés comme des phénoliques qui sont le gallate de méthyle et l'acide gallique (**Ahn et al., 2005**).

Le fractionnement bio-guidé a permis d'optimiser l'activité des extraits de *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* et *T. vulgaris*, des augmentations de 70 à 95 % ont été enregistrées à partir des fractions par rapport à l'huile essentielle complète. En général, les fractions les plus actives ont été obtenues avec 100 % d'hexane et les fractions modérément actives avec 95-5 (v/v) hexane-acétate d'éthyle comme systèmes de solvants.

Les fractions obtenues avec d'autres systèmes de solvants (85-15, 75-25, 50-50, 25-75 acétate d'hexane-éthyl (v/v) et 100% d'acétate d'éthyle) n'ont pas montré aucune activité antifongique (**Nguefack et al., 2009**).

En analysant des extraits de *Mimusops elengi*, une activité antifongique significative a été observée dans l'extrait aqueux et l'extrait de méthanol, suggérant que le principe actif est de nature polaire et concluant que le principe actif est de nature alcaloïde. La fraction alcaloïde était très efficace contre les espèces *Drechslera*, *Aspergillus* et *Penicillium*, avec plus de 85 % d'inhibition, tandis que *Fusarium* a enregistré des réponses variées. L'inhibition maximale a été observée à 50 ppm de fraction alcaloïde par rapport aux fongicides synthétiques testés aux concentrations recommandée (2000 ppm) (Satish *et al.*, 2008).

De même, les HEs sont constituées de nombreux composés volatils différents et leur composition varie d'une espèce à l'autre (Feng et Zheng., 2007).

Ces différences de composition liées à la variété, les pratiques agronomiques sont également susceptibles d'influencer les propriétés antimicrobiennes des HEs, car ces facteurs contribuent à la fois à la rentabilité et aux concentrations relatives des ingrédients (Delaquis *et al.*, 2002).

Des scientifiques ont travaillé avec des composés phénoliques et ont conclu que le type de structure phénolique est plus important que la concentration, il a été démontré que les molécules comportant un groupe hydroxyle et un système d'électrons délocalisés dans la structure du cycle phénolique ont une activité élevée. Il a également été démontré que les HEs peuvent également avoir des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires. Les huiles volatiles sont un mélange complexe de composés, principalement des monoterpènes, des sesquiterpènes et leurs dérivés oxygénés (alcools, aldéhydes, esters, éthers, cétones, phénols et oxydes). Parmi les autres composés volatils figurent les phénylpropènes et les substances spécifiques contenant du soufre ou de l'azote (Dos Santos Oliveira et Badiale Furlong, 2008).

Le thymol, eugénol, anéthole, menthol, citral, pinènes, isothiocyanates, cinnamaldhydes, carvacrol, carvone, acides benzoïques, acides phénoliques et flavones sont des substances phytochimiques qui ont fait l'objet d'études approfondies sur leur spectre antimicrobien, pour différentes espèces bactériennes et fongiques, par exemple l'eugénol (C₁₀H₁₂O₂) est un composé phénolique extrait principalement des bourgeons et des feuilles du clou de girofle (*Eugenia caryophyllata* Thumb) et de la cannelle, constituant le composé phénolique le plus important de l'huile de clou de girofle (85 à 95 %), en plus de l'iso-eugénol et du méthyleugénol, ce composé a été largement étudié pour ses propriétés antimicrobiennes, extraites de divers substrats et testées contre une grande variété de micro-organismes (Souza *et al.*, 2005).

L'eugénol, extrait comme composant principal de l'HE de *Piper betle* var. *magahi*, était plus efficace en tant qu'inhibiteur de la croissance fongique et aflatoxine que l'HE entière. Ils ont suggéré

que les autres composants de l'huile agissaient en synergie dans le sens négatif et réduisaient l'activité de l'eugénol (**Prakash et al., 2010**). D'autre part, il a été signalé qu'*A. niger* était la seule souche de moisissure parmi tous les champignons testés à présenter une résistance à l'eugénol à toutes les concentrations (**Souza et al., 2005**).

Dans ce domaine, de nombreuses recherches ont été menées pour tenter d'isoler les composés responsables de l'activité biologique, l'HE d'*Eucalyptus teretecornis* a été soumise à la PTLC pour l'isolement de molécules pures, en utilisant l'analyse GC/MS, ils ont trouvé que les molécules bioactives correspondant à deux fractions étaient les terpénoïdes oxygénés β -fenchol et α -eudesmol, et ont démontré le potentiel antifongique de ces composés de l'HE d'*E. teretecornis* contre *A. alternata* (**Guleria et al., 2012**).

Le capsantal, un mélange naturel de caroténoïdes contenant de la capsanthine et de la capsorubine, a été testé contre des isolats d'*Aspergillus* produisant de l'OTA, Son ajout a entraîné une augmentation des phases de latence à 15 °C pour toutes les souches testées, *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* et *A. tubingensis*, alors que les taux de croissance sont restés relativement constants. Cependant, à 25 °C, l'ajout de capsantal a entraîné une réduction des taux de croissance, avec des phases de latence plutôt constantes (**Santos et al., 2010**).

Il est difficile d'établir une corrélation entre l'activité fongitoxique et un seul composé ou une seule classe de composés, par exemple, ils ont testé l'HE d'*E. globulus* et son composé principal, le 1,8-cinéole, contre *A. flavus* et *A. parasiticus* et ont constaté que l'activité antifongique de la molécule isolée était incomplète et ne montrait des effets qu'à la plus forte concentration testée, ce qui pourrait indiquer que le principal composant de l'huile n'est pas le seul responsable de la limitation de la croissance fongique.

Les extraits de plantes sont constitués d'une grande variété de composés chimiques, ce qui rend difficile l'établissement d'une relation entre un composé et une cible unique dans la cellule. Il est prouvé que même des composants mineurs jouent un rôle essentiel dans l'activité antimicrobienne, et il semble que les effets inhibiteurs sont le résultat de leur action synergique. Ainsi, les risques de développement d'une résistance chez les champignons après l'application de l'extrait végétal seraient réduits, et le spectre des organismes sensibles à son action serait plus large. En outre, les étapes de purification des composés impliqueraient des coûts plus élevés, de sorte que les extraits de plantes entières semblent plus prometteurs en termes d'application commerciale que les composés individuels (**Vilela et al., 2009**).

3.3. Mode d'action des extraits végétaux

Les mécanismes d'action des composés actifs des extraits de plantes ne sont pas encore complètement compris. Cependant, il y a trois aspects sur lesquels la plupart des auteurs s'accordent pour attribuer leur fonction inhibitrice :

- a. La présence de groupes OH capables de former des liaisons hydrogène qui ont des effets sur les enzymes, en modifiant une variété de fonctions intracellulaires.
- b. L'action sur la morphologie des moisissures grâce à des interactions avec les enzymes membranaires, ce qui entraîne la perte de rigidité et l'intégrité de la membrane plasmique.
- c. Des changements dans la perméabilité des membranes cellulaires, la granulation du cytoplasme et rupture de la membrane cytoplasmique.

Ces trois aspects sont extrêmement liés.

L'hydrophobie de ces composés leur permet de traverser la membrane cellulaire et interagir avec les composés de la cellule, ils peuvent donc affecter à la fois la membrane et le cytoplasme et les enzymes intracellulaires. Il a été suggéré que certains composés hydrophobes présents dans les extraits de plantes pourraient modifier la perméabilité de la membrane microbienne pour les cations tels que H⁺ et K⁺, et pourraient ainsi provoquer un changement dans le flux des protons, modifiant le pH cellulaire et affectant la composition chimique des cellules et leur activité.

La capacité des composés hydrophobes à se répartir ou à se dissoudre dans la phase lipidique de la membrane cytoplasmique est la clé de leur activité, mais une plus grande solubilité ne signifie pas toujours une plus grande action antimicrobienne.

La perte de perméabilité différentielle de la membrane cytoplasmique est généralement considérée comme la cause de la mort cellulaire, car elle peut entraîner un déséquilibre de la pression osmotique intracellulaire, rupture des organites intracellulaires, fuite du contenu cytoplasmique et finalement la mort cellulaire.

L'interaction avec les membranes cellulaires peut également conduire à la fuite de certains composants cellulaires, y compris l'ATP, la principale molécule de stockage d'énergie.

Les composés phénoliques sont connus pour altérer la perméabilité des cellules microbiennes, permettant la perte de macromolécules de l'intérieur. Ils pourraient également interagir avec les protéines membranaires, provoquant une déformation de leur structure et de leur fonctionnalité (**Fung et al., 1977**).

D'autres phénomènes, ils peuvent entraîner un dysfonctionnement de la membrane et une perturbation ultérieure, notamment les actions suivantes : dissipation des deux composantes de la force motrice des protons (gradient de pH et potentiel électrique) ; interférence avec le système de production d'énergie (ATP) dans la cellule ; inhibition des enzymes ; et prévention de l'utilisation des substrats pour la production d'énergie (Coutinho de Oliveira *et al.*, 2011 ; El-Mogy et Alsanis, 2012).

Ces actions aboutissent à l'inhibition de la germination, la suppression de la croissance mycélienne et l'élongation du tube germinatif, de sorte qu'il a été suggéré que l'action du composé végétal pourrait être liée à la perception/transduction des signaux impliqués dans le passage du développement végétatif au développement reproductif. Il a été rapporté qu'en présence des extraits de méthanol de *Cinnamomum cassia*, les cultures d'*A. niger*, *B. cinerea*, *F. moniliforme*, *Glomerella cingulata* et *Phyllosticta caricae* présentaient un temps de latence prolongé, et en observant la morphologie des cellules fongiques au microscope optique, ils ont conclu que l'effet inhibiteur des extraits de plantes sur la croissance fongique était dû à l'inhibition de la croissance des mycéliums et de la germination des spores (Lee *et al.*, 2007).

Des changements ultra-structuraux ont été notés au MET dans la paroi cellulaire d'*A. flavus* et dans le cytoplasme d'*A. flavus* lorsque des matériaux fongiques obtenus à partir d'une culture cultivée pendant 5 jours ont été traités avec de l'huile d'*Ageratum conyzoides*, les principaux changements pathologiques ont été observés sur le système endomembranaire, principalement la membrane plasmique, et les organites membranaires, en particulier les mitochondries. La membrane plasmique des cellules traitées par la moisissure a perdu son aspect linéaire, devenant rugueuse et villiforme avec des invaginations de vésicules et parfois un découplage de la membrane plasmique de la paroi cellulaire. Les couches fibrillaires ont progressivement perdu leur constitution, finissent par se détacher de la paroi cellulaire et dans les cellules traitées avec des concentrations d'huile plus élevées, elles ne se déposent pas sur la paroi cellulaire. Les mitochondries ont souffert d'une perturbation de la structure interne, avec une diminution de la polarisation des crêtes des cristaux mitochondriaux. Ces résultats montrent que l'huile essentielle d'*A. conyzoides* traverse non seulement la paroi cellulaire, mais aussi la membrane plasmique, interagit avec les structures membranaires des organites cytoplasmiques (Nogueira *et al.*, 2010).

L'observation par MET a également été utilisée pour analyser l'effet de l'exposition d'*A. niger* à des niveaux de CMI des huiles de *T. eriocalyx* et *T. x-porlock*, de graves dommages ont été constatés au niveau de la paroi cellulaire, de la membrane cellulaire et des organites cellulaires ; le

mycélium exposé à l'huile de thym a montré des changements morphologiques dans les hyphes, une perturbation de la membrane plasmique et une destruction des mitochondries.

A.niger exposé à 250 ppm d'HE de *T. x-porlock* a présenté un pliage de la cellule, une absence de cytoplasme, une membrane nucléaire endommagée et une perte d'intégrité et de rigidité de la paroi cellulaire, les auteurs ont conclu que ces modifications de la structure cytologique peuvent être attribuées à l'interférence de l'HE avec les enzymes responsables de la synthèse de la paroi (**Rasooli et al., 2006**).

L'effet des HEs obtenues à partir des parties aériennes de plusieurs plantes aromatiques, telles que l'origan (*O. syriacum var. bevanii*), le thym (*Thymbra spicata subsp. spicata*), la lavande (*L. stoechas subsp. stoechas*), le romarin (*R. officinalis*), le fenouil (*F. vulgare*) et le laurier (*L. nobilis*) été étudié contre l'agent du mildiou de la tomate *Phytophthora infestans*, sous l'influence des huiles, la croissance du champignon a été supprimée et des changements morphologiques des hyphes ont été observés à l'aide de (MEB), ces observations sur les hyphes pathogènes, exposés à la fois à la phase volatile (vapeur d'huile essentielle) et à la phase de contact (milieu de culture amendé avec les différentes concentrations des huiles, ont révélé des altérations morphologiques considérables dans les hyphes, telles que la coagulation cytoplasmique, les vacuolisations, le flétrissement des hyphes et la fuite des protoplastes.ils ont conclu que les changements généraux dans la morphologie des hyphes pouvaient être dus à la perte d'intégrité de la paroi cellulaire et à la perméabilité de la membrane plasmique (**Soylu et al., 2006**), une expérience similaire dans laquelle, ils ont testé les mêmes HEs contre l'agent de la maladie de la pourriture grise de la tomate, *B. cinerea*, là encore, les observations au MEB des hyphes fongiques exposés aux concentrations les plus efficaces d'huiles volatiles ainsi qu'à la phase de contact ont montré des changements dégénératifs dans la morphologie des hyphes par rapport aux hyphes épais, allongés et à la surface lisse des plaques de contrôle, l'absence totale de conidiation a également été observée dans les boîtes de Petri traitées à l'huile (**Soylu et al., 2010**).

Selon une étude, à 2 µl/ml d'HE de *C. jensenianum*, la membrane plasmique d'une souche d'*A. flavus* est devenue rugueuse avec un repliement continu dans le cytoplasme et chargée de petits lomasomes, une diminution de la matrice cytoplasmique a également été observée, ils ont montré que certaines mitochondries présentaient une perturbation importante de la structure interne avec une diminution des cristaux mitochondriaux (**Tian et al., 2012**).

Les dommages à l'ultra structure cellulaire se sont aggravés lorsque la concentration d'huile a été doublée, des altérations majeures ont été observées, notamment une vacuolisation massive du cytoplasme avec fusion des vacuoles, l'apparition de nombreux lomasomes avec repliement, et le détachement de la membrane plasmique de la paroi cellulaire, les couches fibrillaires ont

progressivement perdu leur intégrité, devenant plus minces et finissant par ne plus se déposer sur la paroi cellulaire, la membrane plasmique est également repliée en de nombreux endroits, La matrice cytoplasmique et certains organites cytoplasmiques, tels que les granules denses en électrons, étaient absents (**Tian et al., 2012**).

En outre, les mitochondries ont subi une grave perturbation de leur structure interne avec une lyse complète, les résultats ont montré que la teneur en ergostérol (mesurée à 282 nm) dans la membrane plasmique d'*A. flavus* était significativement réduite par les différentes concentrations d'huile essentielle, Une diminution dose-dépendante de la production d'ergostérol a été observée lorsque les isolats étaient cultivés en présence de l'HE (**Tian et al., 2012**). Les auteurs ont donc conclu que cette HE exerce son effet directement sur la membrane plasmique sans endommager de manière évidente la paroi cellulaire, contrairement aux travaux de recherche discutés précédemment.

Les principales altérations morphologiques chez *A.niger* après avoir été exposé à l'HE de *Matricaria chamomilla L.*, se sont produites dans le système endo-membranaire, affectant principalement la membrane plasmique et les organites membranaires tels que les mitochondries, les premiers changements dans les compartiments fongiques en présence de la plus faible concentration d'huile essentielle de *M. chamomilla* testée (15,62 µg/ml) ont été la vacuolisation du cytoplasme, la dégradation précoce des granules denses en électrons, le pliage et le détachement de la membrane plasmique de la paroi cellulaire (**Tolouee et al., 2010**).

En présence de 250 µg/ml de l'huile végétale, où la croissance fongique a été inhibée à 41%, les changements morphologiques ont progressé en affectant les structures membranaires du cytoplasme, à cette concentration, les principales altérations ont été la perturbation de la membrane plasmique accompagnée de la formation de petites vésicules (lomasomes) entre la membrane plasmique et la paroi cellulaire, l'autolyse complète, la désorganisation et l'épuisement du cytoplasme hyphalique et des organites membranaires, y compris les noyaux, le réticulum endoplasmique et les mitochondries, semblent être responsables de la mort cellulaire (**Tolouee et al., 2010**).

D'après les observations par MET, ils ont révélé que la membrane plasmique et les structures membranaires du cytoplasme hyphal, en particulier les mitochondries, étaient les principales cibles de l'huile végétale.

D'après les observations par MEB, pour la moisissure exposée à 1000 µg/ml d'huile végétale, l'effondrement et le pliage des hyphes entiers et l'inhibition complète de la production de conidies étaient les changements morphologiques observés (**Tolouee et al., 2010**).

En conclusion, il est prouvé que les composés végétaux sont capables d'effondrer les parois cellulaires et les membranes plasmiques, de les traverser et d'affecter plusieurs fonctions intracellulaires, ce qui perturbe le développement normal du mycélium.

3.4. Influence des facteurs environnementaux

Dans le contrôle de la croissance fongique, les facteurs environnementaux sont des éléments très importants à prendre en compte, comme nous l'avons déjà mentionné, la température et l'activité de l'eau (a_w) affectent le développement fongique, en l'améliorant ou en l'inhibant, en fonction des conditions du milieu et du microorganisme impliqué, ces facteurs peuvent également influencer la stabilité des activités antifongiques des extraits de plantes.

D'autres facteurs environnementaux peuvent influencer leur activité, tels que le pH, les lipides qui peuvent diminuer l'activité des composés hydrophobes, et les protéines qui peuvent lier certains composés en réduisant leur activité. Plusieurs antimicrobiens (sorbate de potassium, benzoate de sodium, bisulfite de sodium, carvacrol, citral, eugénol, thymol et vanilline) ont été testés, et l'analyse statistique a montré que la concentration en antimicrobiens, l' a_w , le pH et leurs interactions affectaient significativement le taux de croissance radiale d'*A. flavus* (López-Malo *et al.*, 2005).

En fonction de l' a_w et du pH, l'augmentation de la concentration antimicrobienne a légèrement réduit (ou n'a pas affecté) le développement fongique jusqu'à une concentration critique, où la croissance radiale a été radicalement réduite ou la croissance de la moisissure a été arrêtée, des différences importantes ont été observées entre les antimicrobiens ; les antimicrobiens naturels étant, en général, moins dépendants du pH que les conservateurs chimiques (López-Malo *et al.*, 2005).

Toutes les concentrations testées d'HEs de boldus (*P. boldus* Mol), de thym de montagne (*Hedeoma multiflora* Benth) et de poleo (*Lippia turbinata* var. *integrifolia*) ont inhibé la croissance fongique des quatre isolats d'*Aspergillus* section *Flavi* étudiés à 0,955 et 0,900 a_w , tandis que l'anis (*Pimpinella anisum* L.) et le clou de girofle (*Syzygium aromaticum* L.) ont montré une activité inhibitrice mineure dans ces conditions (Bluma et Etcheverry 2008).

À une a_w plus élevée du substrat (0,982), les augmentations du taux d'inhibition des HEs étaient plus prononcées avec des concentrations testées plus élevées (2000 et 3000), à 0,955 a_w , seules les HEs d'anis et de clou de girofle ont augmenté leur activité antifongique à mesure que la concentration d'HEs augmentait, une concentration plus faible a été étudiée à 0,900 a_w , et le taux de croissance a été réduit entre 33-54% et de 31-100% par les HEs d'anis et de clou de girofle, respectivement (Bluma et Etcheverry 2008).

Des chercheurs ont étudié l'efficacité des HEs de boldo, poleo, clou de girofle, anis et thym contre l'agrégat d'*A. niger* et la croissance d'*A. carbonarius* sur la gélose à l'extrait de farine d'arachide dans différentes conditions d' a_w (0,98, 0,95, 0,93), ils ont constaté qu'une diminution de l' a_w du milieu, en combinaison avec des doses sub-inhibitrices d'HE d'anis, stimulait le taux de croissance de la plupart des souches étudiées, tandis que l'HE de poléo produisait les taux d'inhibition les plus faibles à l' a_w la plus élevée (**Passone et al., 2012**).

Dans l'essai de volatilisation de l'espace de tête (l'HE n'est pas en contact direct avec le milieu de culture), il a été constaté que la combinaison de fractions volatiles d'HE et d'une faible a_w augmentait les effets antifongiques sur le taux de croissance de toutes les souches ochratoxigènes, l'HE de boldo étant la plus efficace (**Passone et al., 2012**).

L'effet de deux extraits de plantes sur la croissance de plusieurs espèces de *Fusarium* et d'*Aspergillus* a été étudié, en utilisant des conditions de T° et d' a_w similaires à celles qui se produisent dans les céréales aux stades pré et post-recolte, en général aucune croissance n'a été observée lors de l'application de l'extrait éthanolique d'*Equisetum arvense* à 3% par aucun des isolats dans toutes les conditions étudiées (**Gracia et al., 2011**).

Lorsque l'extrait d'*E. arvense* à 2-3% a été ajouté au milieu, la croissance d'*A. flavus* et *A. parasiticus* a été significativement retardée, Dans un milieu de 3% de *Stevia rebaudiana*, la croissance a diminué significativement sauf à 0,090-0,93 a_w / 30°C et à 0,93 a_w / 25°C où la croissance était similaire au témoin, alors que *S. rebaudiana* à 2% n'avait que peu ou pas d'effet *A. carbonarius* et *A. westerdijkiae* (**Gracia et al., 2011**).

Lorsque *A. carbonarius* et *A. westerdijkiae* ont été inoculés dans un milieu contenant 3% d'extrait d'*E. arvense*, la croissance a été significativement réduite dans toutes les conditions étudiées (**Gracia et al., 2011**).

Avec l'extrait de *S. rebaudiana*, la croissance a été favorisée pour toutes les conditions testées, à l'exception de 0,85 a_w à toutes températures testées (**Gracia et al., 2011**). La croissance d'*A. westerdijkiae* en présence de l'extrait d'*E. arvense* à 2% a également diminuée entre 37 et 100% (**Gracia et al., 2011**). D'autre part, la variation de la température avait très peu d'effets sur l'activité des huiles essentielles testées contre les isolats de *Fusarium* (**Velluti et al., 2004**).

L'activité de l'eau (a_w) n'a plus montré d'effet significatif sur l'efficacité de ces huiles, avec seulement une légère augmentation de leur activité au plus faible a_w testé (**Velluti et al., 2004**). L'influence du pH a été étudiée en utilisant l'HE d'*O. gratissimum* qui était plus active à pH égale à

9, où la croissance d'*A. ochraceus*, de *P. expansum* et de *P. verrucosum* a été significativement réduite (Nguefack *et al.*, 2009). L'activité de la même huile à pH égale à 3 était plus élevée que celle enregistrée à pH 6, mais elle n'était pas statistiquement significative (Nguefack *et al.*, 2009). Les auteurs ont lié l'activité antifongique élevée d'*O. gratissimuma* à sa teneur en thymol et en γ -terpinène.

4. Effets sur la production de mycotoxines

En ce qui concerne la santé humaine, la principale question à prendre en compte est la capacité des champignons à synthétiser des mycotoxines. Le contact avec des extraits de plantes ou des huiles essentielles peut favoriser la production de métabolites secondaires par les champignons, il est donc essentiel d'analyser chaque cas individuellement.

L'inhibition partielle de la croissance fongique ne peut être corrélée à l'inhibition de la production de mycotoxines, car cette activité fongistatique pourrait déclencher le métabolisme secondaire en réponse au stress. Les résultats les plus pertinents des travaux de recherche sur l'inhibition des mycotoxines par les composés végétaux sont présentés dans le **tableau 2**.

Tableau 2. Extraits de plantes et HEs rapportés comme inhibiteurs de la synthèse des mycotoxines.

Toxine	Espèce fongique	Materiel vegetal	Composés actifs	Référence
Aflatoxine B1	<i>A. flavus</i>	HE de <i>Chenopodium ambrosioides</i>	ND Eugenol	Kumar <i>et al.</i> (2007) ; Reddy <i>et al.</i> (2009)
		HE d' <i>Ocimum sanctum</i> HE de <i>Cicuta virosa</i> HE de <i>Cinnamomum jensenianum</i>	ND	Tian <i>et al.</i> (2011) Tian <i>et al.</i> (2011)
	<i>A. parasiticus</i>	Extrait méthanolique de <i>Ephedra major</i>	Flavonoïdes (quercetin)	Bagheri-Gavkosh <i>et al.</i> (2009)
	<i>A. flavus</i> et <i>A. parasiticus</i>	HE d' <i>Eucalyptus globulus</i> <i>Pèumus boldus</i> , <i>Lippia turbinata</i> , <i>Syzygium aromaticum</i> et HE de <i>Hedeoma multiflora</i>	ND ρ -Cimene, α -terpinolene, carvacrol, anethol, eugenol	Vilela <i>et al.</i> (2009) Bluma et Etcheverry (2008)
Aflatoxine B1 et B2	<i>A. flavus</i>	Pulpe et peu de banane; orange, aubergine et l'extrait méthanolique du pulpe de pomme de terre	Composés phenoliques	dos Santos Oliveira et Badiale Furlong (2008)
Aflatoxine B1 et G1	<i>A. parasiticus</i> et <i>A. flavus</i>	HE de <i>Betula alba</i>	Syringate de methyle	Jermnak <i>et al.</i> (2012)
Ochratoxine A	<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	HE de <i>P. boldus</i> et <i>S. aromaticum</i>	α -Terpinolene, α - terperpine, eugenol, α - cariofilene	Passone <i>et al.</i> (2012)
Zearalenone et deoxynivalenol	<i>Fusarium graminearum</i>	HE de <i>S. aromaticum</i>	Eugenol	Marín <i>et al.</i> (2004)
Fumonisine B1	<i>F.verticillioies</i>	–	Thymol, carvacrol, et isoeugenol	Dambolena <i>et al.</i> (2011)

ND. Non déterminé.

Les aflatoxines sont les toxines fongiques les plus nocives connues ; l'aflatoxine B1 est incluse dans le groupe 1 (considéré comme ayant suffisamment de preuves de cancérogénicité chez l'Homme) par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC, 2002).

En conséquence, de nombreuses recherches ont été menées sur le potentiel des antifongiques naturels à inhiber la croissance des moisissures aflatoxinogènes ou de réprimer la biosynthèse des mycotoxines, les chercheurs ont montré que les extraits méthanoliques des parties aériennes et des racines d'*Ephedra majeure* inhibaient la production d'AFB1 par *A. parasiticus*, tandis que l'HE des parties aériennes de la plante ne présentait aucun effet sur sa biosynthèse (Bagheri-Gavkosh *et al.*, 2009).

Les auteurs ont attribué l'inhibition de la croissance d'*A. parasiticus* et la production d'AFB1 à la présence de composés flavonoïdes tels que l'acide p-coumarique et la quercétine dans les extraits végétaux (**Bagheri-Gavkosh et al., 2009**).

Les auteurs ont noté que la production d'aflatoxines B1 et B2 par *A. flavus* était inhibée en présence d'extraits méthanoliques de pulpe et d'écorce de bananes, d'orange, d'aubergine et de pulpe de pomme de terre.

Cependant, ces auteurs ont constaté qu'en présence des extraits de pulpe de banane et de pulpe de pomme de terre, *A. flavus* produisait de l'aflatoxine B2, qui n'a pas été détectée dans le contrôle. Comme c'est déjà mentionné, une telle production secondaire peut être une réponse de défense du champignon (**dos Santos Oliveira and Badiale Furlong, 2008**).

L'huile de *C. ambrosioides* a complètement inhibé la production d'aflatoxine B1 produite par *A. flavus* à 10 µg/ml (**Kumar et al., 2007**).

Les huiles de *Thymus eriocalyx* et de *T. x-porlock* ont sévèrement inhibé la croissance d'*A. parasiticus*, tandis que la production d'aflatoxines a été significativement inhibée à des dilutions fongistatiques des deux huiles. Cependant, l'huile de *T. eriocalyx* a exercé des effets antifongiques et antitoxigènes plus importants que celle de *T. x-porlock*, Les auteurs ont suggéré que la présence de thymol dans les huiles peut être le responsable, au moins en partie des résultats obtenus (**Rasooli et Abyaneh, 2004**).

L'inhibition de la production d'aflatoxine B1 par *A. flavus* et *A. parasiticus* en présence d'HE d'*E. globulus* nécessitait une dose d'huile plus élevée que ce qui était nécessaire à l'inhibition de la croissance fongique (**Vilela et al., 2009**).

Sur les grains de riz traités, la biosynthèse de l'aflatoxine B1 par *A. flavus* n'était pas inhibée par l'eugénol obtenu à partir du clou de girofle, sauf lorsque la croissance fongique était complètement inhibée. Au fur et à mesure que la concentration de l'antifongique augmentait, la croissance et l'inhibition des mycotoxines augmentaient également (**Reddy et al., 2007**).

Dans un travail ultérieur, ils ont constaté que *S. aromaticum* inhibait complètement la croissance d'*A. flavus* et par conséquent, la production d'AFB1 à une concentration de 5 g/kg, ils ont également trouvé que *C. longa*, *A. sativum* et *O. sanctum* étaient efficaces pour réduire la croissance fongique et la production d'AFB1 à la concentration de 5 g/kg (**Reddy et al., 2009**).

L'HE d'*O. sanctum* et son principal composant, l'eugénol, ont montré une puissante activité antifongique contre *A. flavus*, et ils ont également rapporté que la réduction de la croissance fongique et de la production d'AFB1 était due à la présence de certains composés phénoliques dans l'HE d'*O. sanctum*, spécifiquement son principal composant l'eugénol (**Kumar et al., 2010**).

Les chercheurs ont trouvé que la croissance d'*A. parasiticus* et la biosynthèse des aflatoxines étaient reprimées par l'HE de *R. officinalis* et de *Trachyspermum copticum* L, l'effet inhibiteur des huiles augmentait proportionnellement avec leurs concentrations. En général, le ralentissement de la croissance mycélienne lié à l'huile essentielle a été observé pour diminuer de manière significative la production d'aflatoxines (**Rasooli et al., 2008**).

Cependant, les auteurs ont rapporté que bien que la croissance mycélienne ait été observée à 4 µl/ml d'HE de *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak, la production d'AFB1 a été complètement inhibée, la teneur d'AFB1 est réduite à environ la moitié de celle du contrôle à 2 µl/ml, les mêmes résultats ont été obtenus avec l'huile essentielle de *C. jensenianum*, qui a réduit la teneur en AFB1 à environ la moitié de celle du témoin à une concentration de 2 µl/ml, les deux HEs ont présenté des propriétés antiaflatoxigènes à des concentrations inférieures à leur concentration fongitoxique (**Tian et al., 2012**).

L'inhibition de la production d'AFB1 ne peut pas être entièrement attribuée à la réduction de la croissance fongique, mais elle a été considérée comme une conséquence de l'inhibition de la catabolisation des carbohydrates chez *A. flavus* en agissant sur certaines enzymes clés, réduisant ainsi sa capacité à produire la toxine (**Tatsadjieu et al., 2009**). Les chercheurs ont rapporté que la production d'AFB1 par la souche d'*A. flavus* en présence d'HE *P. betle* var. *magahi* à faible concentration (0,1 µl/ml), était supérieure à celle du contrôle. À une concentration plus élevée, un effet inhibiteur de l'aflatoxine a été observé, et à 0,6 µl/ml la production d'aflatoxine par cet isolat a été complètement inhibée.

Au vu de ces résultats les auteurs ont suggéré que des faibles doses de fongicides créent des conditions de stress qui sont responsables de la production de plus de métabolites secondaires en tant que mécanisme de défense du champignon (**Prakash et al., 2010**).

Bien que l'HE de *Betula alba* inhibait à la fois la production d'aflatoxines et la croissance fongique en parallèle, après avoir purifié l'huile par chromatographie sur colonne de gel de silice, ils ont obtenu une fraction active qui n'inhibait que la production d'aflatoxines, cette fraction a été purifiée et identifiée comme étant du syringate de méthyle (**Jermnak et al., 2012**).

Ce composé a inhibé la production des aflatoxines B1 et G1 par *A. parasiticus* en milieu liquide de manière dose-dépendante et a également inhibé la production d'aflatoxine B1 par *A. flavus*, il a été démontré qu'il inhibe fortement la production d'acide norsolorinique, une étape précoce de la voie de biosynthèse de l'aflatoxine, il a été démontré aussi que le syringate de méthyle inhibe la production d'aflatoxine dans un système d'infection modèle composé d'*A. flavus* sur des arachides crues (**Jermnak et al., 2012**).

L'inhibition de l'AFB1 dépendait étroitement de l'activité de l'eau, de la concentration, des périodes d'incubation et de leurs interactions, les chercheurs ont montré que les HEs de boldus, de poleo et de thym des montagnes inhibaient complètement l'AFB1 à 2000 et 3000 µg/g à une a_w de 0,981 et que l'inhibition était également observée à toutes les concentrations dosées à une a_w plus faible (0,955 et 0,900). De plus, l'HE de clou de girofle s'est avérée avoir un effet inhibiteur important sur l'accumulation de l'AFB1 à l' a_w 0,982, les pourcentages d'inhibition de l'AFB1 pour toutes les souches d'*Aspergillus* testées étaient supérieurs à 98% à toutes les concentrations d'HE de clou de girofle étudiées (**Bluma et Etcheverry, 2008**). D'autre part, les chercheurs ont trouvé une stimulation de l'aflatoxigénèse par *A. flavus* et *A. parasiticus* dans certaines des conditions d' a_w et de T° analysées en présence d'extraits végétaux d'*E. arvense* et de *S. rebaudiana*, même si aucune aflatoxine n'a été trouvée dans le milieu de contrôle (**Garcia et al., 2011**).

Ces auteurs ont également étudié les effets des extraits végétaux sur la production d'ochratoxine (OTA) ; une autre toxine très importante comme pour l'AFB1, ils ont constaté que la production d'OTA par *A. carbonarius* et *A. westerdijkae* était plus élevée que dans le contrôle, et cette augmentation était plus importante avec *S. rebaudiana* qu'avec le milieu à base d'extrait d'*E. arvens* (**Garcia et al., 2011**).

L'accumulation d'OTA par six isolats d'*Aspergillus* section *Nigri* était complètement inhibée en présence de 2000 µl/l d'HE de boldo. Cependant, à l' a_w 0,98, la plupart des souches de l'agrégat *A. niger* et *A. carbonarius* ont montré une stimulation de l'OTA en présence de 1000 µl/l d'HE de poleo, l'effet antiochratoxigène de l'HE de girofle était plus significatif à a_w 0,93, aboutissant à une inhibition totale à 5000 µl/l, Dans ce travail, l'inhibition de l'OTA a nécessité une dose d'huile plus faible que celle nécessaire à l'inhibition de la croissance fongique, quelle que soit l' a_w du milieu. (**Passone et al., 2012**).

L'inhibition de la toxigénèse chez le *Fusarium* a également été étudiée. les scientifiques ont exploré l'efficacité du traitement des grains de maïs avec des huiles essentielles de cannelle, de clou de girofle, de citronnelle, d'origan et de palmarosa afin de prévenir l'accumulation de zéaralénone

(ZEA) et de déoxynivalénol (DON) lors de l'inoculation avec *F. graminearum*, Ces essais étaient basés sur des grains de maïs non stérilisés et naturellement contaminés, deux études différentes ont été réalisées, dans la première, les espèces de *Fusarium* ont été inoculées 24 heures avant que les différentes HEs ne soient ajoutées au grain de maïs, tandis que dans l'autre test, les HEs ont été ajoutées 24 heures avant l'inoculation (Marín *et al.*, 2004). Tous les facteurs (HE, T°, a_w, moment du traitement) ainsi que leurs interactions ont eu un impact significatif sur la production de ZEA.

L'accumulation de ZEA n'a été inhibée qu'à 0,950 a_w et principalement à 30 °C ; dans ces conditions, la production de ZEA dans les témoins était maximale. A 30 °C, la prévention totale de l'accumulation de DON par toutes les huiles essentielles s'est produite à 0,995 a_w ; tandis qu'à 0,950 a_w, les HEs de cannelle, de clou de girofle et de citronnelle se sont révélées inhiber l'accumulation, et l'oregano et la palmarosa l'ont stimulée lorsqu'elles ont été ajoutées 24 h après l'inoculation. Les auteurs ont conclu que l'huile essentielle de clou de girofle était le meilleur candidat pour l'inhibition simultanée de la production de ZEA et de DON, bien que son efficacité était faible (Marín *et al.*, 2004).

La capacité de dix composés phénoliques naturels ont été étudiés pour tester leur pouvoir d'inhibition de la synthèse de fumonisine B1 (FB1) par *F. verticillioides* et ont révélé que le thymol, le carvacrol et l'isoeugénol, suivis de l'eugénol, étaient les plus actifs, ces composés phénoliques présentaient également l'activité antifongique la plus élevée, en revanche, le m-crésol, le créosol et le gäiacol n'ont pas eu d'effets significatifs sur la réduction de la production de FB1 ou l'accumulation de biomasse, Ces résultats ont mis en évidence qu'en ajoutant au groupe fonctionnel d'autres propriétés telles que une légère différence structurelle peuvent affecter les propriétés physiques ou chimiques de ces composés, modifiant ainsi leur bioactivité (Dambolena *et al.*, 2011).

Étant donné que les composés phénoliques ayant la plus grande activité antifumonisine présentaient également les taux les plus élevés d'inhibition de la croissance, les auteurs ont suggéré que l'activité antifumonisine des composés phénoliques pouvait être due à une augmentation de la phase de latence et/ou résulter d'un effet sur le taux de croissance, Par conséquent, un retard peut survenir dans l'apparition de la phase de croissance stationnaire, qui est le moment où les mycotoxines sont produites. Une autre hypothèse suggérée est qu'en raison du stress induit par l'HE, les champignons réagissent en limitant la production de métabolites secondaires (Dambolena *et al.*, 2011). Au contraire, certains d'autres ont trouvé que la production de fumonisines B1 et B2 par *F. verticillioides*, et de ZEA et DON par *F. graminearum* était stimulée ou similaire à celle des témoins dans la plupart des conditions testées en utilisant des extraits d'*E. arvense* et de *S. rebaudiana* (Garcia *et al.*, 2011).

5. Essais *in vivo*

Dans la recherche d'antifongiques alternatifs à appliquer dans les aliments, il est important de prendre en compte leur performance *in vivo*.

Bien que le criblage *in vitro* des extraits de plantes soit une première étape importante dans l'identification des plantes potentielles à cette fin, la confirmation de l'activité *in vivo* est essentielle, car les matrices alimentaires peuvent interagir avec les composés bioactifs, diminuant ainsi leur efficacité.

En général, pour obtenir un effet similaire dans les produits alimentaires que ceux observés dans les essais *in vitro*, des concentrations plus élevées d'HE ou d'extraits de plantes sont nécessaires, cela peut s'expliquer par que lorsqu'ils sont en contact avec la surface de l'aliment, les substances actives hautement hydrophobes et volatiles sont liées aux composants alimentaires (hydrates de carbone, lipides et protéines), tandis que les autres composants sont répartis dans le produit en fonction de leur affinité avec l'eau, Si tel est le cas, des modifications indésirables de la saveur et du goût peuvent se produire.

Il a été suggéré que les lipides présents dans les aliments pourraient former un revêtement autour des micro-organismes, les protégeant contre les agents antimicrobiens.

En outre, la teneur faible des aliments en eau par rapport aux milieux de laboratoire pourrait entraver le transfert des molécules antimicrobiennes vers le site actif dans la cellule microbienne. Les essais récents *in vivo* rapportés dans la littérature sont résumés dans le **tableau 3**.

Tableau 3. Effets antifongiques des extraits d'origine végétale *in vivo*.

Extrait de plante/HE	Espèces fongiques	Matrice alimentaire	Effet	Référence
Extrait méthanolique d' <i>Anadenanthera colubrina</i>	<i>A. alternata</i>	Fruit et tangor de murcott	Suppression des lésions dues aux polyphénols et aux tanins	Costa Carvalho <i>et al.</i> (2011)
HE de Cassia	<i>A. alternata</i>	Tomate cerise	34,2% de réduction des tomates pourries à 500 ppm.	Feng et Zheng (2007)
	<i>Botrytis cinerea</i>	fraise	40% réduction de fruits pourris à 800 ppm.	El-Mogy <i>et al.</i> (2012)
Extrait méthanolique d' <i>Origanum vulgare</i>	<i>B. cinerea</i> et <i>P. expansum</i>	“Rocha” poire	Réduction du diamètre de lésion à 20 µl.	Matos et Barreiro (2004)
HE d' <i>O. vulgare</i>	<i>Colletotrichum coccodes</i>	Tomate	Suppression de 20% de la viabilité des spores avec traitement à la vapeur..	Tzortzakakis (2010)
	<i>R. stolonifer</i> and <i>A. niger</i>	Cepage de table Isabella	Retard du développement fongique et réduction des fruits infectés	dos Santos <i>et al.</i> (2012)
HE d' <i>O. syriacum</i>	<i>B. cinerea</i>	Feuilles de tomate	Protection à 75 mg/l: 77% (activité curative) et 33% (activité protectrice).	Soylu <i>et al.</i> (2010)
HE de <i>Cicuta virosa</i>	<i>A. flavus</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. niger</i> et <i>A. alternata</i>	Tomate cerise	Plus de 10% de fruits infectés à 200 µl/ml pour toutes les souches.	Tian <i>et al.</i> (2011)
Thyme (<i>T. vulgaris</i>), sariette d'été (<i>S. hortensis</i>) et huile du clou de girofle (<i>S. aromaticum</i>)	<i>A. flavus</i>	Pate de tomate	Concentration maximale inhibitrice : 350 ppm (<i>T. vulgaris</i>), 500 ppm (<i>S. hortensis</i>).	Omidbeygi <i>et al.</i> (2007)
Chou (<i>Brassica oleracea</i>) isothiocyanates	<i>A. alternata</i>	Poivron vert	Effet fongicide maximal à 0.56 mg/ml.	Troncoso <i>et al.</i> (2005)
HE de <i>Chenopodium ambrosioides</i> 50:50	<i>A. flavus</i>	Graains de blé	91% protection à 100 µg/ml.	Kumar <i>et al.</i> (2007)
melange d'orange: HE de bergamote	<i>P. chrysogenum</i> and <i>A. niger</i> /		Réduction de croissance de 70.8% (<i>A. niger</i>) et 57.8% (<i>P. chrysogenum</i>).	Phillips <i>et al.</i> (2012)

Sur la base d'essais *in vitro*, ils ont sélectionné cinq extraits végétaux (*Artemisia annua*, *Cariniana estrelensis*, *Ficus carica* et *Ruta graveolens*) pour être évalués contre *A.alternata* dans les fruits de *Murcott tangor*, Seule celle provenant d'*A.colubrina* a montré une suppression des lésions causées par ce pathogène (Costa Carvalho *et al.*, 2011).

Les auteurs ont suggéré que les polyphénols étaient les substances actives de l'extrait d'*A.Colubrina*, étant donné que ces composés pouvaient former des complexes avec des protéines et des polysaccharides, inactivant les enzymes essentielles à la croissance fongique. En outre, l'écorce d'*A.colubrina* est riche en tanins, qui peuvent conférer des propriétés antimicrobiennes à l'extrait végétal, les résultats obtenus lors du test sur des fruits inoculés avec *A. alternata* suggèrent une cohérence entre les essais *in vitro* et *in vivo*, puisque l'extrait d'*A.Colubrina* a été le plus actif dans toutes les expériences, réduisant les effets du champignon sur les fruits à des niveaux comparables à ceux observés pour les fongicides commerciaux (Costa Carvalho *et al.*, 2011).

Dans une étude *in vivo* de l'efficacité de l'huile de cassia contre *B. cinerea* dans les fraises, ils ont noté que cette huile a complètement inhibé la croissance fongique *in vitro*, ayant une activité fongistatique à de faibles concentrations et à une exposition à long terme, ou des effets fongicides à des concentrations élevées, Le pourcentage de pourriture des fruits inoculés artificiellement avec *B. cinerea* et des fruits non inoculés a été significativement réduit par l'application de l'huile de casse, ils ont aussi constaté que ce traitement n'affectait pas les paramètres de qualité organoleptique et que la perte de poids des fraises était réduite par toutes les concentrations (El- Mogy et Alsanis, 2012).

Des effets similaires ont été rapportés de cette huile sur la pourriture d'*A. alternata* sur les tomates cerise (Feng et Zheng, 2007). Les deux travaux ont mis en évidence que les effets inhibiteurs des concentrations d'huile de casse étaient plus efficaces *in vitro* qu'*in vivo*.

L'étude de l'extrait d'*O. vulgare* pour contrôler les pourritures sur les poires "Rocha" inoculées avec *B. cinerea* et *P. expansum* a montré que l'extrait était moins actif contre les deux champignons que ce qui a été observé dans l'étude *in vitro*, cela était probablement dû à la faible solubilité dans l'eau de certains éléments de ses composants (Matos et Barreiro, 2004).

La tomate (*Lycopersicon esculentum*) est une culture largement commercialisée dans le monde entier, elle est très sensible à l'attaque de plusieurs pathogènes fongiques, c'est la raison pour laquelle, de nombreuses recherches sont consacrées à l'étude de la manière de contrôler les infections dans cette plante, ils ont montré que l'exposition à un mélange 50:50 d'huiles essentielles d'orange et de bergamote n'est pas un traitement antifongique efficace contre *A. alternata* sur les tomates, car

toutes les plaies ou (blessures) des tomates témoins et des tomates traitées ont été infectées au bout de 7 jours, quel que soit le nombre de traitements qu'ils avaient été subi (**Phillips et al., 2012**).

Dans un autre essaie, ils ont pulvérisé de l'huile essentielle d'*O. syriacum* sur les feuilles de tomate avant ou après l'inoculation de *B. cinerea* afin de révéler si l'HE a des activités curatives ou protectrices, bien que les deux traitements aient été efficaces pour réduire l'infection fongique, le contrôle le plus efficace a été obtenu lorsque les applications d'huile étaient effectuées 24 heures après l'inoculation (activité curative). Cela suggère que les huiles entières ont exercé leur plus grand effet sur le développement fongique précoce à la surface des feuilles, par exemple la germination des spores, croissance des tubes germinatifs et/ou formation de l'appressorium (**Soylu et al., 2010**).

L'évaluation de l'huile d'origan en phase gazeuse contre *Colletotrichum coccodes* dans les fruits de tomate, montrant que ce traitement à la vapeur supprimait la viabilité des spores de 22 %, cette recherche a révélé que l'enrichissement en substances volatiles réduisait considérablement l'altération par anthracnose pendant la phase de reproduction (germination des spores/ production) des champignons, ce qui est d'une grande importance pour le cycle de la maladie et de leur propagation (**Tzortzakis 2010**).

Selon une étude, l'application de l'HE de *C. virosa* a permis d'obtenir les pourcentages d'infection les plus faibles dans les cultures des tomates cerises inoculées par rapport au témoin non traité, à 200 µl/ml pour *A. flavus* (11,1 %), *A. oryzae* (11,1 %), *A. niger* (8,6 %) et *A. alternata* (2,8 %). Dans les fruits sains, les résultats indiquent que le pourcentage de fruits infectés était significativement réduit par l'HE à 18 °C pendant 21 jours. L'huile a réduit de manière significative la pourriture dans les tomates cerises inoculés artificiellement et dans les tomates cerise non inoculés (**Tian et al., 2011**).

L'activité antifongique d'huiles essentielles de thym (*T. vulgaris*), de sarriette d'été (*S.hortensis*) et de clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) a été évaluée *in vitro* et dans de la pâte de tomate, ils ont remarqué que l'ajout de l'HE inhibait le développement du champignon testé, *A.flavus* avec l'huile de thym à 350 ppm et l'huile de sarriette à 500 ppm étant le plus efficace.

Les résultats de l'évaluation sensorielle ont montré qu'il n'y avait pas de différences significatives entre les échantillons contenant 500 ppm d'huile de thym et le témoin (sans HE), mais des différences organoleptiques significatives ont été observées entre les échantillons contenant 500 ppm d'huile de sarriette d'été, huile de clou de girofle et le témoin (sans HE), ainsi l'utilisation d'HEs de plantes aux concentrations requises pour être efficaces dans la pâte de tomates pourrait soulever

des questions concernant les changements dans les propriétés organoleptiques de l'aliment (**Omidbeygi et al., 2007**).

L'efficacité de l'application combinée de chitosane et l'HE d'*O. vulgare* a été évaluée pour inhiber *Rhizopus stolonifer* et *A. niger* dans le cultivar de raisin de table Isabella et son effet sur les propriétés physique, physicochimique et les caractéristiques sensorielles des fruits pendant leur stockage à T° ambiante et froide, le mélange a montré une activité antifongique lorsqu'il a été appliqué comme revêtement sur des raisins artificiellement contaminés par les deux moisissures, ainsi que contre le microbiote fongique natif du raisin.

En général, les raisins traités ou non traités n'ont pas différencié en poids à aucun des intervalles de stockage évalués aux deux températures de stockage testées, pas plus que leur fermeté, leur niveau d'acidité titrable, leur teneur en solides solubles, leurs niveaux d'anthocyanine et leur couleur, les résultats des caractéristiques sensorielles des fruits ont révélé que les fruits non enrobés présentaient les scores les plus élevés pour tous les attributs analysés par rapport aux fruits enrobés, en particulier pour les attributs arôme, saveur, arrière-goût et fermeté, ces notes ont diminué tout au long de la période de stockage des fruits traités (**Dos santos et al., 2012**).

Des poivrons verts ont été traités avec des iso-thiocyanates extraits de feuilles de chou (*Brassica oleracea var. capitata*), il a été trouvé qu'une concentration plus élevée était nécessaire pour inhiber complètement la maladie causée par *A. alternata* dans les gousses que celle qui était inhibitrice dans les tests *in vitro*.

Les auteurs ont proposé plusieurs théories pour expliquer ce comportement :

- a) la composition plus complexe du fruit du poivron par rapport au milieu PDA utilisé dans le test *in vitro*.
- b) la stabilité dans le temps et la volatilité des composés étudiés.
- c) l'effet diffusif du composé actif à l'intérieur du fruit
- d) la fuite possible des composés volatils à travers le polyéthylène basse densité utilisé dans les expériences.

Cependant ce traitement était meilleur que le fongicide commercial pour contrôler la pourriture fongique sur le poivron sans aucun effet sur la qualité du fruit (**Troncoso et al., 2005**).

Outre les fruits et les légumes, certaines études ont également été menées sur les céréales en tant que matrice alimentaire en raison de leur contamination commune par les champignons, ils ont constaté que l'huile de *C. ammbrosioides* était efficace pour contrôler la contamination fongique des échantillons de blé lorsqu'elle a été testée comme fumigant (**Kular et al., 2007**).

Le traitement avec Citri- V™® (une vapeur d'HE d'agrumes antimicrobienne) sur les grains réduit la croissance de *P. chrysogenum* et de *A.niger*, comme il a été démontré que ce mélange d'HE n'affecte pas les propriétés organoleptiques des denrées alimentaires (**Phillips et al., 2012**).

Il a été suggéré qu'il pourrait être utilisé dans des situations industrielles telles que le stockage des fraises (**Fisher et al., 2009**).

6. Traitements combinés

La principale limitation des composés antifongiques dérivés de plantes est la forte saveur qu'ils peuvent conférer, limitant ainsi leur applicabilité uniquement aux produits ayant une saveur compatible. Les chercheurs ont proposé différentes idées, telles que l'utilisation de l'extrait de plante non seulement comme conservateur, mais aussi comme composant aromatique.

Par ailleurs, si le produit dans lequel les extraits sont incorporés a déjà une forte saveur, celle-ci peut masquer celle de l'antifongique naturel.

Une autre option consiste à appliquer certains des composants les plus actifs, plutôt que l'extrait entier ; cependant, comme il a été mentionné précédemment, on pense que l'activité antimicrobienne de toute HEs de plante est susceptible d'être le résultat de l'interaction synergique entre les différents composants, ce qui permet d'obtenir différents modes d'inhibition et diminue le risque de développement d'une résistance dans les cellules microbiennes cibles. Enfin, l'alternative la plus prometteuse semble être le développement de combinaisons synergiques, soit sous la forme de deux extraits de plantes ou un agent antimicrobien combiné à un facteur de stress tel qu'un taux d'*a_w* réduit ou un pH faible.

Le traitement des conidies des pathogènes post-récolte de pommier *B. cinerea*, *M. fructigena*, *P. expansum* et *P. vagabunda* avec de l'huile d'eugénol extraite des bourgeons et des feuilles du clou de girofle (*E. caryophilus*) à 2 mg/ml combinée à 50 mg/ml de lécithine à 50 °C pendant 2 min a réduit de manière significative leur germination dans le milieu MEA (**Amiri et al., 2008**). Au cours d'essais *in vivo* sur deux cultivars de pommes, des réductions significatives de l'incidence de la maladie ont été observées sur les fruits traités dans les mêmes conditions (**Amiri et al., 2008**).

Les observations au MEB ont révélé des dommages à la cuticule des fruits traités avec une solution d'eugénol sans lécithine, cela peut avoir permis une pénétration importante des pathogènes, augmentant ainsi l'incidence de la maladie (**Amiri et al., 2008**).

L'ajout de lécithine à la solution d'eugénol a éliminé leur effet phytotoxique à des températures élevées et aucun dommage n'a été causé à la cuticule, il a donc été démontré que la

combinaison de la formulation lécithine-eugénoles avec un traitement thermique diminuait significativement les infections naturelles causées par les différents pathogènes (Amiri *et al.*, 2008). La température élevée a amélioré l'émulsification de la formulation, la rendant plus active contre les agents pathogènes. Les auteurs ont également conclu que l'eugénoles n'affectait pas la saveur et l'apparence des pommes (Amiri *et al.*, 2008).

L'effet inhibiteur de l'huile de *cassia* sur la croissance mycélienne d'*A. alternata* était amélioré par l'ajout de KCl sur PDA, les effets inhibiteurs combinés de l'huile de casse et du KCl étaient supérieurs à ceux de l'huile de casse seule à la même concentration. La combinaison de l'huile avec NaCl a donné des résultats similaires. Les résultats des essais *in vivo* ont montré que l'huile de casse à 500 ppm réduisait significativement l'incidence de la pourriture des fruits de tomate.

La combinaison de 500 ppm d'huile de casse avec 1% de NaCl ou de KCl a eu un effet inhibiteur significatif contre *A. alternata* sur les fruits. Les effets renforcés du KCl ou du NaCl avec l'huile de *cassia in vivo* semblent disparaître lorsque la concentration de KCl ou de NaCl atteignait 3%. Les auteurs ont suggéré que cette forte concentration de sels peut endommager les cellules des tomates, entraînant une diminution de la résistance aux agents pathogènes (Feng et Zheng 2006).

L'étude des effets inhibiteurs des huiles de cannelle et de clou de girofle, ajoutées seules et en diverses combinaisons dans des conditions de MAP (atmosphère modifiée à faible teneur en O₂ et à forte teneur en CO₂), sur la croissance de moisissures fréquemment rencontrés dans les aliments à humidité intermédiaire (IMF, aw =0,65-0,90), tels que *P. roqueforti*, *Eurotium sp.*, *A. flavus*, et *M. plumbeus*. Les résultats ont montré que la composition du gaz a une influence synergique sur les effets inhibiteurs des huiles ; ils étaient plus efficaces pour inhiber la croissance de tous les micro-organismes lorsqu'ils sont utilisés en combinaison avec de faibles niveaux d'oxygène (moins de 0,05%) et de fortes concentrations de CO₂ (40%) (Matan *et al.*, 2006).

La synergie observée en mélangeant des fractions d'HE de citrates de *Cymbopogon*, *T. vulgaris* et *O. gratissimum* contre *P. expansum*, un champignon post-récolte responsable de la détérioration des fruits et légumes et l'agent pathogène de « la pourriture bleue » dans les pommes. Cette synergie s'explique par l'effet combiné des différents composants de chaque fraction individuelle (Nguefack *et al.*, 2012).

Les constituants majeurs d'une fraction d'*O. gratissimum*, le thymol et le carvacrol, sont beaucoup plus actifs que les hydrocarbures terpéniques, comme le p-cymène, le constituant majeur d'une autre fraction de la même HE. Cependant, ce dernier gonfle plus les membranes cellulaires que les citrals, le carvacrol et le thymol. L'effet synergique variait selon la proportion de chaque fraction

dans le mélange, étant plus élevé lorsque ces fractions étaient mélangées dans une proportion 50/50 v/v. De plus, un effet synergique a été observé avec des mélanges de fractions non actives. Une explication possible est une augmentation de la concentration en terpènes oxygénés présents à l'état de traces dans chacune des fractions individuelles, et dont le transport transmembranaire pourrait être facilité par les hydrocarbures terpéniques (Nguefack *et al.*, 2012).

D'autre part, des mélanges de certaines des fractions les plus actives des trois plantes ont révélé un effet antagoniste. Ces observations pourraient résulter de la réaction chimique qui pourrait se produire entre les constituants des fractions, comme la réaction en milieu neutre ou acide entre le groupe hydroxyle (des alcools et des phénols) avec une fonction carbonyle pour former des acétals qui sont composés avec le groupe hydroxyle bloqué et la fonction carbonyle (Nguefack *et al.*, 2012).

L'efficacité de combiner l'application de chitosane ; un polysaccharide linéaire dérivé de la désacétylation de la chitine aux propriétés antimicrobiennes, et de l'HE d'*O. vulgare* pour inhiber les pathogènes fongiques post-récolte de *R. stolonifer* et *A. niger* dans les milieux de laboratoire et dans le cultivar de raisin de table Isabella. L'application combinée des deux antimicrobiens aux différentes concentrations testées a fortement inhibé la germination des spores des champignons. Les analyses aux MEB des spores ont révélé des changements dans leur forme et leur structure et des changements morphologiques du mycélium (dos Santos *et al.*, 2012).

Les auteurs ont suggéré que l'effet fort, rapide et constant observé à partir de l'application combinée de chitosane et de l'HE à des concentrations sous-inhibitrices était dû à la synergie. Le mélange possédait également une activité antifongique lorsqu'il était enrobé sur des raisins artificiellement contaminés par *R. stolonifer* et *A. niger*, ainsi que contre le microbiote fongique natif du raisin tout au long du stockage à température ambiante (12 jours) et à froid (24 jours). Les fruits enrobés du mélange stockés à basse température et contaminés par *R. stolonifer* n'ont montré aucune croissance fongique visible pendant toute la période de stockage, tandis que la croissance d'*A. niger* était visible dès le dixième jour de stockage (25% de fruits infectés), et 33% des fruits étaient infectés au douzième jour de stockage. L'application des deux antimicrobiens a également inhibé la population fongique indigène des fruits puisqu'il n'y avait aucun signe visible d'infection tout au long des intervalles de stockage évalués aux deux températures testées. Les fruits non enrobés de combinaisons d'HE de chitosane et d'*O. vulgare* ont montré des signes visibles d'infection fongique dès le deuxième jour de stockage à température ambiante (41 % de fruits infectés) et à partir du dixième jour de stockage à température froide (36 % de fruits infectés) (dos Santos *et al.*, 2012).

L'association de deux ou plusieurs extraits végétaux ou d'autres agents antimicrobiens respectueux de l'environnement pourraient constituer une option viable pour une application dans les aliments, en obtenant les effets antimicrobiens souhaités avec des modifications mineures des propriétés organoleptiques du produit et en réduisant le risque de développement d'une résistance par des champignons comme le mélange contient une plus grande variété de composés avec différents sites cibles dans la cellule que l'extrait seul.

7. Développements récents

7.1. Extraction par fluide supercritique (EFS)

À l'heure actuelle, l'extraction de composés bioactifs nécessite l'utilisation de grandes quantités de solvants et de technologies qui ne sont pas respectueuses de l'environnement.

La SFE est une technique d'extraction alternative pour les matériaux solides, avec une meilleure sélectivité et une meilleure efficacité. Récemment, elle a été étudiée pour la séparation des composés actifs des plantes afin d'éliminer les solvants, d'éviter la dégradation des substances sensibles et réduire la forte consommation d'énergie et les résidus générés dans les procédés conventionnels. Le CO₂ est le composé utilisé généralement pour cette application car sa pression et sa température critiques sont basses et faciles à atteindre ($T_c = 31,04\text{ °C}$, $P_c = 73,8\text{ bar}$).

En outre, ses autres avantages incluent le fait qu'il s'agit d'un composé non toxique, qu'il est ininflammable et qu'il est disponible en grande pureté à un coût relativement bas.

Le CO₂ supercritique possède de bonnes propriétés de solvant pour l'extraction de composants non polaires tels que les hydrocarbures. Pour faciliter l'extraction des composants polaires, un entraîneur (par exemple éthanol, méthanol) est souvent utilisé pour augmenter le pouvoir solvant du CO₂ supercritique.

Les extraits éthanoliques et supercritiques d'*Origanum majorana* présentaient une composition similaire, bien que dans l'extrait EFS, la teneur en terpinen-4-ol était presque deux fois supérieure à celle de l'extrait éthanolique. (Vági *et al.*,2005).

D'après les résultats du test de croissance fongique, l'activité d'inhibition la plus forte contre *A. niger*, *T. viride* et *P. cyclopium* a été observée en présence de l'extrait EFS. Les auteurs ont expliqué ce comportement par le fait que l'extrait EFS contenait une plus grande concentration de composés volatils et de composés biologiquement actifs de poids moléculaire plus élevé. Les interactions entre ces constituants pourraient être à l'origine de l'augmentation de l'activité (Vági *et al.*,2005).

7.2. Films comestibles et encapsulation

L'utilisation d'enrobages comestibles est l'une des méthodes les plus importantes pour préserver la qualité, ils sont utiles pour améliorer l'apparence des aliments et retarder la transmission de l'humidité, de l'oxygène, de l'arôme et des solutés au cours de la transformation, de la manipulation et du stockage, ce qui améliore la durée de conservation du produit. Ils sont généralement constitués de protéines ou de polysaccharides, ils sont donc considérés comme respectueux de l'environnement.

En outre, ils peuvent retarder l'altération des aliments en inhibant la croissance des micro-organismes, grâce à leur activité intrinsèque naturelle ou de l'incorporation de composés antimicrobiens.

L'incorporation de composés végétaux (purifiés, l'extrait entier ou l'huile essentielle) à l'enrobage peut prolonger son activité antimicrobienne. Les films peuvent réduire la diffusion dans le produit car l'huile essentielle fait partie de la structure chimique du film et interagit avec le polymère et l'agent émulsifiant, qui est généralement nécessaire pour assurer la dispersion et la formation d'un enrobage homogène.

De plus, les composés végétaux sont progressivement libérés à la surface du produit au fil du temps, maintenir une concentration adéquate de composants antimicrobiens pendant la période de stockage et permettant l'utilisation de plus petites quantités par rapport à une application directe. La libération antimicrobienne du film comestible dépend de plusieurs facteurs, tels que les interactions électrostatiques entre l'agent antimicrobien et les chaînes polymères, l'osmose, les modifications structurelles induites par la présence de l'agent antimicrobien et les conditions environnementales (T°, pH).

L'amidon est un milieu d'encapsulation universel pour les produits alimentaires ; il est également utilisé pour l'encapsulation d'herbicides et de pesticides en raison de sa biodégradabilité et de sa souplesse d'utilisation dans le traitement.

Le degré d'inhibition fongique contre *A. niger* et *P. digitatum* a été étudié par différentes HEs (cannelle, origan mexicain et citronnelle) incorporées dans trois films comestibles: l'amarante, chitosane et amidon. Ils ont conclu que le niveau d'inhibition dépendait directement du type de polymère utilisé pour former le film, car différents polymères retiennent les HE à des degrés divers (Avila-Sosa *et al.*, 2012).

Les films d'amarante ont été les moins efficaces en tant que supports pour les HEs testées. Les principaux composés des HEs testées (thymol, carvacrol, eugénol et géraniol) pourraient interagir avec les composants du film, ce qui pourrait affecter l'activité antimicrobienne.

Afin d'annuler cet effet, des concentrations plus élevées d'HE doivent être ajoutées à l'enrobage, ce qui favorise la saturation du système et permettant ainsi la présence de molécules actives libres.

Les films de chitosane et d'amidon, qui ne contiennent qu'un seul type de polymère, retiennent moins efficacement les biocomposants et permettent donc à plus de molécules d'entrer dans la phase vapeur, ce qui entraîne une augmentation des activités antimicrobiennes.

Les films comestibles à base de chitosane incorporant de l'HE d'origan mexicain ou de cannelle se sont révélés les plus efficaces pour inhiber la croissance d'*A. niger* et de *P. digitatum* à des concentrations d'HE inférieures à celles requises pour les films comestibles à base d'amarante et d'amidon (Avila-Sosa *et al.*, 2012).

L'utilisation d'HE incorporée dans des films de chitosane modifié (chitosane N-acylé) pour enrober des fraises afin d'améliorer leur durée de conservation. Les suspensions d'enrobage bioactives ont été préparées en dispersant l'HE de limonène ou de menthe poivrée (*Mentha piperita*) en présence de Tween 80, un émulsifiant destiné à améliorer la stabilité de la suspension d'enrobage. Ces deux HEs ont été choisies car elles ont montré la plus grande activité antifongique contre les mycètes totaux isolés de la fraise, principalement *R. stolonifer* et *B. cinerea*, au cours d'études *in vitro* (Vu *et al.*, 2011).

Les suspensions de polymères ont été ajustées à pH 3,5 (pH des fraises) à l'aide d'une solution d'acide acétique à 10 % avant d'être pulvérisées sur les fruits. En général, le pourcentage de fraises présentant une pourriture était plus faible dans les enrobages au limonène à la plupart des moments de l'expérience par rapport au chitosane seul ou aux enrobages à la menthe poivrée et avec des fraises non enrobées.

En outre, ils ont remarqué que l'enrobage au limonène ne provoquait pas de phytotoxicité et n'affectait pas l'aspect des fraises, probablement en raison de la présence de l'émulsifiant et des conditions de pH (pH 3,5-4,0) qui améliorent la solubilisation du chitosane modifié (Vu *et al.*, 2011).

7.3. Emballage actif

Récemment, un nouveau concept axé sur l'idée que les interactions actives entre l'emballage et le produit peuvent avoir des effets positifs a gagné en importance en réponse à la demande des consommateurs pour des produits sûrs, de haute qualité, d'aspect frais et de durée de conservation prolongée. L'emballage actif est l'un des concepts d'emballage alimentaire les plus innovants qui implique l'interaction entre l'emballage et le produit ou l'espace libre entre l'emballage et le système alimentaire afin de limiter la croissance des micro-organismes et de réduire d'autres processus de détérioration de la qualité.

Les applications de l'emballage actif comprennent l'utilisation d'absorbants d'oxygène et de dioxyde de carbone pour manipuler les concentrations de gaz dans l'espace de tête et l'ajout d'agents bioactifs, comme les extraits de plantes, au système d'emballage.

On s'attend à ce que les volatiles de l'espace de tête augmentent en concentration après leur libération, qui peut être déclenchée par un changement d'environnement (par exemple, augmentation de la T° ou de l'humidité), puis diminuent pendant le stockage (en fonction de la perméabilité de l'emballage et de la durée du stockage) et se disperser lors de l'ouverture de l'emballage par le consommateur (**Matan *et al.*, 2006**).

Les principaux avantages de cette technologie, ainsi que les films comestibles, pour l'application d'antimicrobiens naturels dans les aliments, sont la libération contrôlée des composés bioactifs dans le produit pendant la durée de stockage et le risque plus faible de développement des saveurs indésirables que l'ajout direct dans les aliments pourrait provoquer (**Ramos *et al.*, 2012**).

Les films à base de polyoléfine sont généralement utilisés pour le développement de systèmes d'emballage actifs, associant les bonnes propriétés générales du polymère (mécaniques, barrières, optiques et thermiques) et l'efficacité antimicrobienne ou antioxydante des additifs (**Ramos *et al.*, 2012**).

Un groupe de chercheurs a analysé l'influence du substrat de plusieurs matériaux d'emballage contenant l'HE de cannelle (*Cinnamomun zeylanicum*) comme agent actif sur l'activité antifongique contre *A. flavus*. Ils ont démontré que les films plastiques (PET, PP et PE/EVOH) nécessitent beaucoup moins d'HE que le papier actif pour inhiber le champignon. Cela indique que la libération de l'HE de cannelle à partir du polymère de la matière plastique au micro-organisme se produit de la même manière, sans dépendre fortement du substrat du film et que l'interaction avec la surface du polymère (absorption, dégradation) est négligeable.

Cependant, les deux substrats se caractérisent par une excellente efficacité et stabilité à long terme (Manso *et al.*, 2013).

Conclusion générale

La recherche d'antifongiques alternatifs est une préoccupation majeure pour l'industrie alimentaire, principalement en raison des importantes pertes post-récolte qui se produisent à cause des contaminations fongiques que subissent les produits alimentaires. Par ailleurs, les agences et organisations de protection de l'environnement expriment leur inquiétude face à l'utilisation généralisée de fongicides synthétiques qui contaminent le sol et l'eau, et laissent des résidus toxiques susceptibles d'affecter les cultures ainsi que les consommateurs.

D'un point de vue sanitaire, le plus grand danger associé au développement des champignons est leur capacité à produire des mycotoxines. La possibilité d'utiliser des composés extraits de plantes ou de leurs extraits entiers pour contrôler la contamination par les mycotoxines est une alternative prometteuse et a fait l'objet d'études approfondies.

Le fait d'utiliser des plantes qui ont été historiquement utilisées dans la médecine alternative, dont l'innocuité est prouvée, renforce la confiance des consommateurs, qui sont de plus en plus intéressés par les "produits verts".

Il en résulte également un avantage économique supplémentaire grâce à la possibilité d'utiliser une large gamme de plantes ou de mauvaises herbes. Même si certaines d'entre elles sont déjà utilisées comme herbes aromatiques ou épices, elles pourraient être ajoutées à des concentrations plus élevées que dans la pratique habituelle. D'où des études supplémentaires sur la toxicité animale et humaine doivent être menées.

Lorsque ces plantes sont destinées à être ajoutées aux aliments en tant qu'antifongiques naturels ou lorsqu'ils sont utilisés en combinaison avec d'autres substances.

Le champ de la recherche sur les antifongiques naturels est vaste et il reste encore un grand nombre de possibilités à explorer. Nous sommes convaincus que d'autres études systématiques sont nécessaires pour élargir les connaissances dans ce domaine.

Pour les études futures, les espèces végétales testées doivent être décrites et identifiées en détail ; y compris le lieu et la saison où elles poussent, de même, le type et le nombre de micro-organismes à évaluer doivent être choisis de manière appropriée, en utilisant à la fois des souches de collection et des isolats du substrat dans lequel l'extrait de plante sera utilisé.

En outre, l'application de nouveaux conservateurs nécessite l'approbation des autorités gouvernementales.

Enfin, il est important de garder à l'esprit la complexité des matrices alimentaires et de l'écologie microbienne des aliments lorsqu'un nouvel antifongique doit être testé, en prenant en compte le comportement des micro-organismes et les mécanismes physiologiques et moléculaires au sein des cellules qui provoquent ces réponses microbiennes.

Références bibliographiques

- Ahn, Y.-J., Lee, H.-S., Oh, H.-S., Kim, H.-T., Lee, Y.-H., 2005. Antifungal activity and mode of action of *Galla rhois*-derived phenolics against phytopathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 81, 105–112.
- Amiri, A., Dugas, R., Pichot, A.L., Bompeix, G., 2008. *In vitro* and *in vitro* activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 126, 13–19.
- Avila-Sosa, R., Palou, E., Jiménez Munguía, M.T., Nevárez-Moorillón, G.V., Navarro Cruz, A.R., López-Malo, A., 2012. Antifungal activity by vapor contact of essential oils added to amaranth, chitosan, or starch edible films. *International Journal of Food Microbiology* 153, 66–72.
- Bagheri-Gavkosh, S., Bigdeli, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Razzaghi-Abyaneh, M., 2009. Inhibitory effects of *Ephedra major* host on *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Mycopathologia* 168, 249–255.
- Bluma, R.V., Etcheverry, M.G., 2008. Application of essential oils in maize grain: Impact on *Aspergillus* section Flavi growth parameters and aflatoxin accumulation. *Food Microbiology* 25, 324–334.
- Boyras, N., Özcan, M., 2005. Antifungal effect of some spice hydrosols. *Fitoterapia* 76,661– 665.
- Brul, S., Coote, P., 1999. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology* 50, 1–17.
- Cakir, A., Kordali, S., Kilic, H., Kaya, E., 2005. Antifungal properties of essential oil and crude extracts of *Hypericum linarioides* Bosse. *Biochemical Systematics and Ecology* 33, 245–256.
- Codex Alimentarius, 2006. Food additive details. Update up to the 29th session of the Codex 333 Alimentarius Commission. The Joint FAO/WHO Committee on Food Additives. Available 334 in: www.codexalimentarius.net/web/jecfa.
- Costa Carvalho, D.D., Alves, E., Barbosa Camargos, R., Ferreira Oliveira, D., Soares Scolforo, J.R., de Carvalho, D.A., Sâmia Batista, T.R., 2011. Plant extracts to control *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium* in Murcott tangor fruits. *Revista Iberoamericana de Micología* 28, 173–178.
- Coutinho de Oliveira, T.L., de Araújo Soares, R., Mendes Ramos, E., das Graças Cardoso, M., Alves, E., Hilsdorf Piccoli, R., 2011. Antimicrobial activity of *Satureja montana* L. essential oil against *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella- type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. *International Journal of Food Microbiology* 144, 546–555.
- Dambolena, J.S., Zygadlo, J.A., Rubinstein, H.R., 2011. Antifumonisin activity of natural phenolic compounds: a structure–property–activity relationship study. *International Journal of Food Microbiology* 145, 140–146.

- Deba, F., Xuan, T.D., Yasuda, M., Tawata, S., 2008. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*. *Food Control* 19, 346–352.
- Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B., Mazza, G., 2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 74, 101–109.
- dos Santos Oliveira, M., Badiale Furlong, E., 2008. Screening of antifungal and antimycotoxigenic activity of plant phenolic extracts. *World Mycotoxin Journal* 1, 139–146.
- dos Santos, N.S.T., Athayde Aguiar, A.J.A., Vasconcelos de Oliveira, C.E., Veríssimo de Sales, C., de Melo e Silva, S., Sousa da Silva, R., Montenegro Stamford, T.C., de Souza, E.L., 2012. Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare* L. essential oil to control *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis labrusca* L.). *Food Microbiology* 32, 345–353.
- Droby, S., Wisniewski, M., El Ghaouth, A., Wilson, C., 2003. Influence of food additives on the control of postharvest rots of apple and peach and efficacy of the yeast-based biocontrol product *aspire*. *Postharvest Biology and Technology* 27, 127–135.
- E.F.N., Mbeffo, M., Tamgue, O., Fotio, D., Zollo, P.H.A., Nkengfack, A.E., 2009. Food preservative potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against mycotoxigenic fungi. *International Journal of Food Microbiology* 131, 151–156.
- El-Mogy, M.M., Alsanius, B.W., 2012. Cassia oil for controlling plant and human pathogens on fresh strawberries. *Food Control* 28, 157–162.
- Feng, W., Zheng, X., 2006. Control of *Alternaria alternata* by cassia oil in combination with potassium chloride or sodium chloride. *Journal of Applied Microbiology* 101, 1317–1322.
- Feng, W., Zheng, X., 2007. Essential oils to control *Alternaria alternata* *in vitro* and *in vivo*. *Food Control* 18, 1126–1130.
- Fisher, K., Phillips, C.A., McWatt, L., 2009. The use of an antimicrobial *citrus* vapour to reduce *Enterococcus* sp. on salad products. *International Journal of Food Science and Technology* 44, 1748–1754.
- Fogliata, G.M., Torres, L.G.J., Ploper, L.D., 2001. Detection of imazalil-resistant strains of *Penicillium digitatum* Sacc. in *citrus* packing houses of Tucumán Province (Argentina) and their behaviour against current employed and alternative fungicides. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán* 77, 71–75.

- Fung, D.Y.C., Taylor, S., Kahan, J., 1977. Effects of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) on growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Safety* 1, 39–51.
- Gamboa-Angulo, M.M., Cristóbal-Alejo, J., Medina-Baizabal, I., Chí-Romero, F., Méndez-González, R., Simá-Polanco, P., May-Pat, F., 2008. Antifungal properties of selected plants from the *Yucatan peninsula*, Mexico. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, 1955–1959.
- Garcia, D., Garcia-Cela, E., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marín, S., 2011. Mould growth and mycotoxin production as affected by *Equisetum arvense* and *Stevia rebaudiana* extracts. *Food Control* 22, 1378–1384.
- Guleria, S., Tiku, A.K., Gupta, S., Singh, G., Koul, A., Razdan, V.K., 2012. Chemical composition, antioxidant activity and inhibitory effects of essential oil of *Eucalyptus teretecornis* grown in north-western Himalaya against *Alternaria alternata*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 21, 44–50.
- IARC-WHO, 2002. Chemical agents and related occupations. Volume 100 F. “A review of human carcinogens”. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 225–248.
- Isolation of methyl syringate as a specific aflatoxin production inhibitor from the essential oil of *Betula alba* and aflatoxin production inhibitory activities of its relat-
- Jasso de Rodríguez, D., Hernández-Castillo, D., Angulo-Sánchez, J.L., Rodríguez-García, R., Villarreal Quintanilla, J.A., Lira-Saldivar, R.H., 2007. Antifungal activity *in vitro* of *Flourensia* spp. extracts on *Alternaria* sp., *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium oxysporum*. *Industrial Crops and Products* 25, 111–116.
- Jay, J.M., 2000. *Modern Food Microbiology*, 6th ed. Aspen Publishers, Gaithersburg, MD.
- Jermnak, U., Yoshinari, T., Sugiyama, Y., Tsuyuki, R., Nagasawa, H., Sakuda, S., 2012. Isolation of methyl syringate as a specific aflatoxin production inhibitor from the essential oil of *Betula alba* and aflatoxin production inhibitory activities of its related compounds. *International Journal of Food Microbiology* 153, 339–344.
- Kumar, A., Shukla, R., Singh, P., Dubey, N.K., 2010. Chemical composition, antifungal and antiaflatoxigenic activities of *Ocimum sanctum* L. essential oil and its safety assessment as plant based antimicrobial. *Food and Chemical Toxicology* 48, 539–543.
- Kumar, R., Mishra, A.K., Dubey, N.K., Tripathi, Y.B., 2007. Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity. *International Journal of Food Microbiology* 115, 159–164.

- Latha, P., Anand, T., Ragupathi, N., Prakasam, V., Samiyappan, R., 2009. Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and Zimmu leaf extract against *Alternaria solani*. *Biological Control* 50, 85–93.
- Lee, S.-H., Chang, K.-S., Su, M.-S., Huang, Y.-S., Jang, H.-D., 2007. Effects of some Chinese medicinal plant extracts on five different fungi. *Food Control* 18, 1547–1554.
- López-Malo, A., Maris Alzamora, S., Palou, E., 2005. *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. *International Journal of Food Microbiology* 99, 119–128.
- Magan, N., Aldred, D., 2007. Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology* 119, 131–139.
- Magro, A., Carolino, M., Bastos, M., Mexia, A., 2006. Efficacy of plant extracts against stored products fungi. *Revista Iberoamericana de Micología* 23, 176–178.
- Mahlo, S.M., McGaw, L.J., Eloff, J.N., 2010. Antifungal activity of leaf extracts from South African trees against plant pathogens. *Crop Protection* 29, 1529–1533.
- Manso, S., Cacho-Nerin, F., Becerril, R., Nerín, C., 2013. Combined analytical and microbiological tools to study the effect on *Aspergillus flavus* of cinnamon essential oil contained in food packaging. *Food Control* 30, 370–378.
- Marín, S., Velluti, A., Ramos, A.J., Sanchis, V., 2004. Effect of essential oils on zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* in non-sterilized maize grain. *Food Microbiology* 21, 313–318.
- Matan, N., Rimkeeree, H., Mawson, A.J., Chompreeda, P., Haruthaithanasan, V., Parker, M., 2006. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *International Journal of Food Microbiology* 107, 180–185.
- Matos, O.C., Barreiro, M.G., 2004. Safety use of bioactive products of plant origin for the control of post harvested fungal diseases of “Rocha” pear. IV Simposium Ibérico de Maduración e pós-colheita: Frutos Hortícolas. Livro de Actas, pp. 525–529.
- Naeini, A., Ziglari, T., Shokri, H., Khosravi, A.R., 2010. Assessment of growth-inhibiting effect of some plant essential oils on different *Fusarium* isolates. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology* 20, 174–178.
- Nguefack, J., Dongmo, J.B.L., Dakole, C.D., Leth, V., Vismer, H.F., Torp, J., Guemdjom, E.F.N., Mbeffo, M., Tamgue, O., Fotio, D., Zollo, P.H.A., Nkengfack, A.E., 2009. Food preservative potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against mycotoxigenic fungi. *International Journal of Food Microbiology* 131, 151–156.

- Nguefack, J., Tamgue, O., Dongmo, J.B.L., Dakole, C.D., Leth, V., Vismer, H.F., Amvam Zollo, P.H., Nkengfack, A.E., 2012. Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*. *Food Control* 23, 377–383.
- Nogueira, J.H.C., Gonçalves, E., Galleti, S.R., Facanali, R., Marques, M.O.M., Felício, J.D., 2010. *Ageratum conyzoides* essential oil as aflatoxin suppressor of *Aspergillus flavus*. *International Journal of Food Microbiology* 137, 55–60.
- ofFlourensia spp. extracts on *Alternaria* sp., *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium oxysporum*. *Industrial Crops and Products* 25, 111–116.
- Omidbeygi, M., Barzegar, M., Hamidi, Z., Naghdibadi, H., 2007. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control* 18, 1518–1523.
- packaging. *Journal of Food Engineering* 109, 513–519.
- Parajuli, R.R., Tiwari, R.D., Chaudhary, R.P., Gupta, V.N., 2005. Fungitoxicity of the essential oils of some aromatic plants of Manang against *Alternaria brassicicola*. *Scientific World* 3 (3), 39–43.
- Passone, M.A., Girardi, N.S., Etcheverry, M., 2012. Evaluation of the control ability of five essential oils against *Aspergillus* section Nigri growth and ochratoxin A accumulation in peanut meal extract agar conditioned at different water activities levels. *International Journal of Food Microbiology* 159, 198–206.
- Phillips, C.A., Laird, K., Allen, S.C., 2012. The use of Citri-V™® — an antimicrobial citrus essential oil vapour for the control of *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger* and *Alternaria alternata* *in vitro* and on food. *Food Research International* 47,310–314.
- Prakash, B., Shukla, R., Singh, P., Kumar, A., Mishra, P.K., Dubey, N.K., 2010. Efficacy of chemically characterized *Piper betle* L. essential oil against fungal and aflatoxin contamination of some edible commodities and its antioxidant activity. *International Journal of Food Microbiology* 142, 114–119.
- Ramos, M., Jiménez, A., Peltzer, M., Garrigós, M.C., 2012. Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging *Journal of Food Engineering* 109, 513–519.
- Rasooli, I., Abyaneh, M.R., 2004. Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food Control* 15, 479–483.

- Rasooli, I., Fakoor, M.H., Yadegarinia, D., Gachkar, L., Allameh, A., Rezaei, M.B., 2008. Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 122, 135–139.
- Rasooli, I., Rezaei, M.B., Allameh, A., 2006. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymusx-porlock*. *Food Control* 17, 359–364.
- Ravikumar Patil, H.S., Makari, H.K., Gurumurthy, H., 2007. *In vitro* antimicrobial activity of ethanol extract of *Thevetia peruviana*. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 6 (9), 2318–2322.
- Reddy, C.S., Reddy, K.R.N., Prameela, M., Mangala, U.N., Muralidharan, K., 2007. Identification of antifungal component in clove that inhibits *Aspergillus* spp. colonizing rice grains. *Journal of Mycology and Plant Pathology* 37 (1), 87–94.
- Reddy, K.R.N., Reddy, C.S., Muralidharan, K., 2009. Potential of botanicals and biocontrol agents on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* infecting rice grains. *Food Control* 20, 173–178.
- Santos, L., Kasper, R., Gil-Serna, J., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J., 2010. Effect of Capsicum carotenoids on growth and ochratoxin A production by chilli and paprika *Aspergillus* spp. isolates. *International Journal of Food Microbiology* 142, 354–359.
- Satish, S., Raghavendra, M.P., Mohana, D.C., Raveesha, K.A., 2008. Antifungal activity of a known medicinal plant *Mimusops elengi* L. against grain moulds. *Journal of Agricultural Technology* 4 (1), 151–165.
- Shukla, R., Kumar, A., Prasad, C.S., Srivastava, B., Dubey, N.K., 2008. Antimycotic and antiaflatoxigenic potency of *Adenocalymma alliaceum* Miers. on fungi causing biodeterioration of food commodities and raw herbal drugs. *International Biodeterioration & Biodegradation* 62, 348–351.
- Singh, G., Maurya, S., deLampasona, M.P., Catalan, C.A.N., 2007. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food and Chemical Toxicology* 45, 1650–1661.
- Souza, E.L.d, Lima, E.d.O., Freire, K.R.d.L., Sousa, C.P.d, 2005. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48, 245–250.
- Soylu, E.M., Kurt, Ş., 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, 183–189.

- Soylu, E.M., Soylu, S., Kurt, S., 2006. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia* 161, 119–128.
- Tatsadjieu, N.L., Dongmo, P.M.J., Ngassoum, M.B., Etoa, F.X., Mbofung, C.M.F., 2009. Investigations on the essential oil of *Lippia rugosa* from Cameroon for its potential use as antifungal agent against *Aspergillus flavus* Link ex. Fries. *Food Control* 20,161–166.
- Tian, J., Ban, X., Zeng, H., He, J., Huang, B., Wang, Y., 2011. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. *International Journal of Food Microbiology* 145, 464–470.
- Tian, J., Huang, B., Luo, X., Zeng, H., Ban, X., He, J., Wang, Y., 2012. The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand.-Mazz essential oil and its potential use as a food preservative. *Food Chemistry* 130, 520–527.
- Tolouee, M., Alinezhad, S., Saberi, R., Eslamifar, A., Zad, S.J., Jaimand, K., Taeb, J., Rezaee, M.-B., Kawachi, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Razzaghi-Abyaneh, M., 2010. Effect of *Matricaria chamomilla* L. flower essential oil on the growth and ultrastructure of *Aspergillus niger* van Tieghem. *International Journal of Food Microbiology* 139,127–133.
- Troncoso, R., Espinoza, C., Sánchez-Estrada, A., Tiznado, M.E., García, H.S., 2005. Analysis of the isothiocyanates present in cabbage leaves extract and their potential application to control *Alternaria* rot in bell peppers. *Food Research International* 38, 701–708.
- Tzortzakis, N.G., 2010. Ethanol, vinegar and *Origanum vulgare* oil vapour suppress the development of anthracnose rot in tomato fruit. *International Journal of Food Microbiology* 142, 14–18.
- Vági, E., Simándi, B., Suhajda, Á., Héthelyi, É., 2005. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. *Food Research International* 38, 51–57.
- Velluti, A., Marín, S., Gonzalez, P., Ramos, A.J., Sanchis, V., 2004. Initial screening for inhibitory activity of essential oils on growth of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* on maize-based agar media. *Food Microbiology* 21, 649–656.
- Vilela, G.R., de Almeida, G.S., D'Arce, M.A.B.R., Moraes, M.H.D., Brito, J.O., da Silva, M.F.d.G.F., Silva, S.C., de Stefano Piedade, S.M., Calori-Domingues, M.A., da Gloria, E.M., 2009. Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. *Journal of Stored Products Research* 45, 108–111.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J., 2008. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control* 19,1130–1138.

- Vu, K.D., Hollingsworth, R.G., Leroux, E., Salmieri, S., Lacroix, M., 2011. Development of edible bioactive coating based on modified chitosan for increasing the shelf life of strawberries. *Food Research International* 44, 198–203.
- Zabka, M., Pavela, R., Slezakova, L., 2009. Antifungal effect of *Pimenta dioica* essential oil against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi. *Industrial Crops and Products* 30, 250–253.