



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Chadli Bendjedid El-Tarf

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département d'Agronomie – Filière des Sciences Alimentaires

## Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en sécurité agroalimentaire et  
assurance qualité

Thème

**Utilisation des bios conservateurs dans le control des  
contaminants fongiques des denrées alimentaires**

Présenté par : Alleg Sara

Devant le jury :

Encadrant :	Dr. Benabdallah A.	M.C.A	U.C.B.E.T
Président :	Dr. Ibrir F.	M.C.B	U.C.B.E.T
Examineur :	Dr. Hennouni N.	M.C.A	U.C.B.E.T
Co-promotrice :	Dr. Benmiri Y.	M.C.A	U. Msila

Année universitaire : 2023/2024

## Remerciements

Avant tout, je remercie et loue Dieu pour Ses innombrables bienfaits. Sans Sa guidance et Sa miséricorde, je n'aurais pas pu accomplir cet exploit. Il est le Bienfaiteur et le Généreux. Louanges et remerciements à Lui pour nous avoir permis d'atteindre cette étape et de terminer ce travail modeste.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail de fin d'études.

Tout d'abord, je remercie chaleureusement mon encadreur, **Dr. Banabdallah Amina** pour tous vos efforts et votre soutien constant tout au long de cette période. Votre patience face à mes erreurs et à mon manque de connaissances a été inestimable. Vous avez été pour moi une guide exceptionnelle. Merci de ne jamais avoir hésité à partager votre savoir et votre expertise avec moi. Que Dieu vous récompense pour tout ce que vous avez fait. Je me considère extrêmement chanceuse d'avoir pu travailler sous votre supervision et bénéficier de votre vaste expérience. J'ai appris de vous les valeurs de l'effort, de la dévotion et du respect des normes académiques. Que Dieu bénisse vos efforts et vous récompense pour tout le bien que vous avez fait pour nous. Je vous serai toujours reconnaissante et je n'oublierai jamais votre bonté à mon égard.

Avec fierté et gratitude, je voudrais exprimer mes sincères remerciements et appréciation mon co-promoteur **Dr. Bin Miri Yamina** pour le grand soutien et l'assistance continue qu'elle m'a apporté pendant la période de préparation de ma mémoire de fin d'études. Votre vaste expérience et vos précieux conseils ont eu un impact significatif sur l'amélioration de la qualité du travail et son élévation à un haut niveau de professionnalisme. Ma carrière n'aurait pas été aussi réussie sans votre patience, votre dévouement et votre désir sincère de m'aider. Vous avez toujours été disponible pour répondre à mes questions, me fournir des conseils constructifs et m'orienter dans la bonne direction. Vos efforts n'ont pas été vains, mais ont constitué la base sur laquelle j'ai construit ce travail. Merci beaucoup pour tout votre temps et vos efforts, votre confiance en mes capacités et vos encouragements constants. Je me souviendrai toujours de votre soutien et de vos conseils tout au long de ma carrière, et vous souhaite une réussite continue dans votre vie professionnelle et personnelle.

Je tiens à remercier **Dr. Hennouni Nacera**, d 'avoir accepté d'examiner notre modeste travail, ainsi que **Dr. Ibrir Fethia** d'avoir accepté de présider notre jurys de soutenance. Nous sommes vraiment honorés par votre présence qui enrichira nos connaissances.

Un grand merci à mon tuteur de stage, **Dr. Nouasri Ahmed**, pour m'avoir accueilli au sein de Laboratoire des molécules bioactives et valorisation de la biomasse (LPBVB) ENS de kouba, Alger et pour m'avoir fourni un encadrement de qualité. Votre disponibilité, votre souci de notre sécurité et vos conseils pratiques ont été d'une grande aide.

J'adresse également mes sincères remerciements et ma gratitude à **Dr. Zeribi Saliha** pour son aide en nous fournissant du matériel biologique.

Enfin, je remercie toutes les personnes qui ont, de près ou de loin, contribué à la réalisation de ce mémoire, et sans qui ce travail n'aurait pas pu aboutir.

## Dédicaces

En guise de reconnaissance, je dédie ce travail

À celle qui a partagé les détails de ma vie depuis mes premiers pas jusqu'à ce moment, À celle qui m'a donné la force et le soutien, À celle qui a cru en moi et m'a encouragé à aller de l'avant, À ma chère mère **Lekhdari Khadîdja**, Merci pour ton soutien constant. Merci d'être présente dans ma vie.

À mon cher père **Alleg Mohamed Azzedin**,

Celui qui m'a appris la valeur du travail acharné et du dévouement. Tu as toujours été un modèle et une source d'inspiration. Merci pour ta sagesse, ta patience et ton soutien inébranlable. Tu es mon pilier et mon aide.

**À ma chère famille,**

Pour votre encouragement constant et votre soutien indéfectible. Vous êtes la base solide sur laquelle reposent mes rêves. Merci pour les beaux moments et les souvenirs précieux que nous partageons.

**À mes chers amis,**

Vous rendez ce voyage plus lumineux par votre présence. Merci d'être restés à mes côtés dans les moments difficiles et joyeux, pour les rires, les conseils et le soutien infini. Votre amitié est un trésor précieux dont je suis reconnaissant.

## Résumé

L'étude présentée dans ce mémoire vise à évaluer l'efficacité des huiles essentielles (HEs) en tant qu'agents antifongiques naturels contre des souches d'*Aspergillus flavus* et d'*Aspergillus niger* isolées d'échantillons de pain. Ces moisissures sont couramment associées à des contaminations des produits alimentaires et représentent un risque potentiel pour la santé publique.

L'identification des espèces fongiques a été réalisée par des techniques de culture en milieu gélosé et des analyses mycologiques spécifiques. Les huiles essentielles étudiées ont été extraites par diverses méthodes, incluant la distillation par entraînement à la vapeur, l'extraction à froid et l'extraction par solvant.

Les résultats montrent que l'effet optimal pour les deux souches *Aspergillus Flavus* et *Aspergillus Niger* était l'huile essentielle de thym, quant à l'*A.Flavus* elle a été inhibée après 7 jours à la concentration de 0,5, 1 et 1,5 mg/ml avec une inhibition de 49,438%, 65,55% , et 88,764% à la concentration 2 mg/ml et plus, la croissance duest complètement inhibée, comme pour *A.Niger* L'inhibition aux concentrations de 0,5 et 1 mg/ml était dans les proportions suivantes, respectivement, 25 % et 54,545 %. À la concentration de 2 mg/ml, l'inhibition totale était de 100 %, ce qui est le meilleur effet pour cette huile essentielle. . Suivie par la citronnelle, avec un effet légèrement moins efficace que le thym, quant à l'*A.Flavus*, les résultats ont été les suivants : aux concentrations de 0,5, 1 et 1,5 mg/ml, avec une inhibition de 38,88%, 57,303% et 65,55%, avec un effet optimal et une efficacité complète à la concentration de 2,5 mg/ml 100% déconseillé.

Quant à l'*A.Niger*, il y avait une inhibition aux concentrations de 0,5 et 1 mg/ml avec une inhibition de 28,947 % et 42,857 %, atteignant une inhibition complète à une concentration de 2 mg/ml de 100 %. Les résultats donnés par le basilic ont été les plus faibles par rapport aux huiles essentielles précédentes, comme pour *A.Flavus* Aux concentrations de 0,5, 1 et 1,5 mg/ml, l'inhibition était de 25,842 %, 40,449 % et 50,561 %, atteignant une inhibition totale de 100 % à 3,5 mg/ml, ce qui montre que cette huile essentielle nécessite des concentrations élevées ont un effet sur l'*A.Flavus* Quant à *A.Niger* Aux concentrations de 0,5, 1 et 1,5 mg/ml, l'inhibition était de 21,052 %, 37,662 % et 56,578 %, atteignant 100 % d'inhibition à une concentration de 2,5 mg/ml.

Concernant l'inhibition de la germination des spores, les HEs de thym et de citronnelle se distinguent par leur efficacité. Pour le thym, une inhibition de 38% est observée à 0,5 mg/ml, atteignant 100% à partir de 2 mg/ml. L' HE de citronnelle suit une tendance similaire, avec une inhibition de 33% à 0,5 mg/ml et une inhibition complète à 2 mg/ml. L'HE de basilic montre une inhibition initiale plus faible, avec 25% à 0,5 mg/ml, mais atteint une inhibition totale à 2,5 mg/ml.

L'utilisation des huiles essentielles comme agents antifongiques naturels offre une alternative prometteuse aux fongicides de synthèse, réduisant ainsi les risques de résistance fongique et les effets secondaires sur la santé et l'environnement. L'étude souligne l'importance de la surveillance et du contrôle de la qualité microbiologique des aliments pour prévenir les risques sanitaires liés aux contaminants fongiques.

**Les mots clés :** les huiles essentielles, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, analyses mycologique, antifongiques naturels, santé publique.

## Abstract

The study presented in this thesis aims to evaluate the efficacy of essential oils (EOs) as natural antifungal agents against strains of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* isolated from bread samples. These molds are commonly associated with food contamination and represent a potential risk to public health.

The identification of fungal species was carried out by agar culture techniques and specific mycological analyses. The essential oils studied were extracted by various methods, including steam distillation, cold extraction and solvent extraction.

The results show that the optimal effect for both strains *Aspergillus Flavus* and *Aspergillus Niger* was thyme essential oil, as for *A. Flavus* it was inhibited after 7 days at the concentration of 0.5, 1 and 1.5 mg/ml with an inhibition of 49.438%, 65.55%, and 88.764% at the concentration 2 mg/ml and above, the growth of is completely inhibited, as for *A. Niger* The inhibition at the concentrations of 0.5 and 1 mg/ml was in the following proportions, respectively, 25% and 54.545%. At the concentration of 2 mg/ml, the total inhibition was 100%, which is the best effect for this essential oil. . Followed by lemongrass, with a slightly less effective effect than thyme, as for *A. Flavus*, the results were as follows: at concentrations of 0.5, 1 and 1.5 mg / ml, with an inhibition of 38.88%, 57.303% and 65.55%, with an optimal effect and complete efficacy at the concentration of 2.5 mg / ml 100% not recommended. As for *A. Niger*, there was an inhibition at concentrations of 0.5 and 1 mg / ml with an inhibition of 28.947% and 42.857%, reaching a complete inhibition at a concentration of 2 mg / ml of 100%. The results given by basil were the lowest compared to the previous essential oils, as for *A. Flavus* At concentrations of 0.5, 1 and 1.5 mg / ml, the inhibition was 25.842%, 40.449% and 50.561%, reaching a total inhibition of 100% at 3.5 mg / ml, which shows that this essential oil requires high concentrations have an effect on *A. Flavus* As for *A. Niger* At concentrations of 0.5, 1 and 1.5 mg / ml, the inhibition was 21.052%, 37.662% and 56.578%, reaching 100% inhibition at a concentration of 2.5 mg / ml.

Regarding the inhibition of spore germination, thyme and lemongrass EOs stand out for their effectiveness. For thyme, an inhibition of 38% is observed at 0.5 mg/ml, reaching 100% from 2 mg/ml. Lemongrass EO follows a similar trend, with an inhibition of 33% at 0.5 mg/ml and complete inhibition at 2 mg/ml. Basil EO shows a lower initial inhibition, with 25% at 0.5 mg/ml, but reaches complete inhibition at 2.5 mg/ml.

The use of essential oils as natural antifungal agents offers a promising alternative to synthetic fungicides, thus reducing the risks of fungal resistance and side effects on health and the environment. The study highlights the importance of monitoring and controlling the microbiological quality of foods to prevent health risks related to fungal contaminants.

**Key words:** essential oils, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, mycological analysis, natural antifungals, public health.

## الملخص

تهدف الدراسة المقدمة في هذا البحث إلى تقييم فعالية الزيوت الأساسية كعوامل مضادة للفطريات الطبيعية ضد سلالات من المعزولة من عينات الخبز. هذه الفطريات ترتبط عادةً بتلوث المنتجات الغذائية الرشاشيات السوداء و الرشاشيات الصفراء تم تحديد أنواع الفطريات باستخدام تقنيات الزرع في وسط الجيلي وإجراء تحاليل. وتمثل خطرًا محتملاً على الصحة العامة ميكولوجية محددة.

تم استخلاص الزيوت الأساسية المدروسة بطرق متنوعة، بما في ذلك التقطير بالبخار، الاستخلاص البارد والاستخلاص الرشاشيات الصفراء و الرشاشيات أظهرت النتائج أن الزيت الأساسي للزعر هو الأكثر فعالية ضد سلالات بالمذيب الرشاشيات الصفراء، تم تثبيط النمو بعد 7 أيام عند تركيزات 0.5، 1 و 1.5 مل/مغ بنسبة تثبيط بلغت بالنسبة لـ السوداء 49.438%، 65.55%، و 88.764% على التوالي. عند تركيز 2 مل/مغ وأكثر، تم تثبيط النمو بالكامل. أما بالنسبة لـ الرشاشيات السوداء، كانت نسبة التثبيط عند تركيزات 0.5 و 1 مل/مغ 25% و 54.545% على التوالي. عند تركيز 2 يلي زيت الزعر زيت الليمون العطري، الذي أظهر فعالية أقل قليلاً من الزعر. بالنسبة لـ الرشاشيات الكلي 100 الرشاشيات الصفراء، كانت نسب التثبيط عند تركيزات 0.5، 1 و 1.5 مل/مغ 38.88%، 57.303% بالنسبة لـ الرشاشيات السوداء، و 65.55% على التوالي، مع فعالية كاملة عند تركيز 2.5 مل/مغ بنسبة تثبيط 100%. بالنسبة لـ كانت نسب التثبيط عند تركيزات 0.5 و 1 مل/مغ 28.947% و 42.857% على التوالي، مع تثبيط كامل عند تركيز 2 أما نتائج زيت الريحان فقد كانت الأقل فعالية بالمقارنة مع الزيوت الأساسية الأخرى. بالنسبة لـ الرشاشيات السوداء 100 تارشاشيات الصفراء، كانت نسب التثبيط عند تركيزات 0.5، 1 و 1.5 مل/مغ 25.842%، 40.449% و 50.561% على الرشاشيات السوداء، كانت نسب التثبيط عند التوالي، مع تثبيط كامل بنسبة 100% عند تركيز 3.5 مل/مغ. بالنسبة لـ تركيزات 0.5، 1 و 1.5 مل/مغ 21.052%، 37.662% و 56.578% على التوالي، مع تثبيط كامل بنسبة 100% عند تركيز 2.5 مل/مغ.

فيما يتعلق بتثبيط إنبات الأبواغ، تميزت الزيوت الأساسية للزعر والليمون بفعاليتها. أظهر الزعر تثبيطاً بنسبة 38% عند تركيز 0.5 مل/مغ، مع تثبيط كامل بنسبة 100% عند تركيز 2 مل/مغ. زيت الليمون أظهر نتائج مشابهة، حيث كان التثبيط بنسبة 33% عند تركيز 0.5 مل/مغ وتثبيط كامل عند 2 مل/مغ. زيت الريحان أظهر تثبيطاً أولياً أقل، بنسبة 25% عند تركيز 0.5 مل/مغ، ولكنه حقق تثبيطاً كاملاً عند 2.5 مل/مغ.

يقدم استخدام الزيوت الأساسية كعوامل مضادة للفطريات الطبيعية بديلاً واعداً للمبيدات الفطرية الصناعية، مما يقلل من مخاطر مقاومة الفطريات والآثار الجانبية على الصحة والبيئة. تؤكد الدراسة على أهمية مراقبة وضبط الجودة الميكروبيولوجية للأغذية للوقاية من المخاطر الصحية المرتبطة بالملوثات الفطرية.

**الكلمات المفتاحية:** الزيوت الأساسية، الرشاشيات السوداء، الرشاشيات الصفراء، التحاليل الميكولوجية، مضادات الفطريات الطبيعية، الصحة العامة.

## Liste des abréviations

**AFPA** : Milieu sélectif pour la détection et l'identification *d'Aspergillus flavus et A. niger*

**Aw** : activité d'eau

**CE** : électrophorèse capillaire

**CMF** : Concentrations minimales fongicides

**CMI** : Concentrations minimales inhibitrices

**D** : Diamètre de la zone de la croissance

**DO** : Densité optique

**FMC** : Food Machinery Corporation

**GC** : Chromatographie en phase gazeuse

**GC-O** : Chromatographie en phase gazeuse-olfactométrie

**HA** : phase aqueuse

**HE** : Huile Essentielle

**HPLC** : Chromatographie en phase liquide à haute performance

**IR** : Rapport isotopique

**IRMS** : Spectrométrie de masse à rapport isotopique

**LPBVB** : La boratoire des Molécules Bioactives et Valorisation de la Biomasse

**MEA** : Milieu à base d'extrait malt gélosé (Malt Extract Agar)

**MS** : Spectrométrie de masse

**PDA** : Potato Dextrose Agar

**RMN** : Résonance magnétique nucléaire

**SMKY** : Milieu à base d'extrait de levure, sulfate de saccharose (Sucrose Magnésium sulfate potassium nitrate Yeasts extract)

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Moisissures retrouvées dans certains aliments (Omotayo, O.P et al., 2019).....	7
<b>Tableau 2.</b> Différent types de structures rencontrées dans les HEs (Fernandez et al., 2013)..	15
<b>Tableau 3.</b> Effets antifongiques des HEs.....	22
<b>Tableau 4.</b> Effet antifongique de certaines HEs in vivo.....	24
<b>Table 5.</b> Concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration fongicide minimale (CMF) des HEs. ....	46

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Structure typique d'un <i>Aspergillus</i> bisérié (à gauche) et unisérié (à droite).....	10
<b>Figure 2.</b> <i>A. flavus</i> (A: Culture de 7 jours sur gélose au malt à 25°C ; B: Aspect microscopique) .....	11
<b>Figure 3.</b> <i>A. Niger</i> (A: Culture de 7 jours sur gélose au malt à 25°C ; B: Aspect microscopie optique, grossie 100 fois) .....	12
<b>Figure 4.</b> Extraction à la vapeur.....	17
<b>Figure 5.</b> Extraction à froid.....	18
<b>Figure 6.</b> Extraction par solvant.....	19
<b>Figure 7.</b> Le Thym .....	28
<b>Figure 8.</b> Citronnelle.....	29
<b>Figure 9.</b> Basilic.....	31
<b>Figure 10.</b> Montage utilisé pour l'extraction des huiles essentielles.....	33
<b>Figure 11.</b> Effet de l'HE de thym, citronnelle et basilic aux différentes concentrations sur la croissance de l' <i>A. flavus</i> pendant 7 jours d'incubation.....	40
<b>Figure 12.</b> Les pourcentages d'inhibition de la croissance du mycélium de l' <i>A. flavus</i> après 7 jours d'incubation.....	41
<b>Figure 13.</b> Les pourcentages d'inhibition de germination des spores de l' <i>A. flavus</i> .....	42
<b>Figure 14.</b> Effet de l'HE de thym, citronnelle et basilic aux différentes concentrations sur la croissance de l' <i>A. niger</i> pendant 7 jours d'incubation.....	43
<b>Figure 15.</b> Les pourcentages d'inhibition de la croissance du mycélium de l' <i>A. niger</i> après 7 jours d'incubation.....	44
<b>Figure 16.</b> Les pourcentages d'inhibition de germination des spores de l' <i>A. niger</i> .....	46

# Table de matières

## Table des matières

Remerciements .....	
Dédicaces .....	
Résumé .....	
Abstract .....	
المخلص .....	
Liste des abréviations .....	
Liste des tableaux .....	
Liste des figures .....	
Table de matières.....	
Introduction .....	1
<b>I. Les Moisissures .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1. Définition .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2. Caractéristiques fondamentales .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3. Condition de croissance .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Effets des moisissures sur les aliments.....</b>	<b>6</b>
<b>3. Facteurs de processus et environnementaux affectant la croissance des grains .....</b>	<b>7</b>
<b>3.1 . Température de stockage.....</b>	<b>8</b>
<b>3.2. Traitement thermique et résistance thermique du moisissure .....</b>	<b>8</b>
<b>3.3. Inhibiteur de l'éthanol.....</b>	<b>9</b>
<b>1. Décoration Les amidons trouvés lors de la décomposition des aliments .....</b>	<b>9</b>
<b>4. Genre <i>Aspergillus</i> .....</b>	<b>9</b>
<b>4.1. Définition .....</b>	<b>10</b>
<b>4.2. <i>Aspergillus flavus</i> .....</b>	<b>11</b>
<b>4.3. <i>Aspergillus Niger</i> .....</b>	<b>14</b>
<b>II. Huiles Essentielles.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1. Définition, localisation et composition chimique .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2. .Méthodes D'extraction des huiles essentielles : .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2.1. Distillation par Entraînement à la vapeur : .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2.2. Expression Mécanique (à froid) : .....</b>	<b>18</b>
<b>2.2.3. Extraction par solvant.....</b>	<b>19</b>
<b>3 .Analyse des Huiles Essentielles: .....</b>	<b>19</b>

3.1. Méthodes et Techniques .....	20
3.2. Utiliser les huiles essentielles comme agents antifongiques : .....	21
3.3. Limitations des Fongicides de Synthèse : .....	21
a. Résistance Fongique : .....	21
b. Effets secondaires sur l'environnement et la santé .....	21
4. Les Huiles Essentielles comme Antifongiques Naturels : .....	23
4.1. Mécanisme d'Action des Huiles Essentielles : .....	23
a. Dégradation des membranes cellulaires : .....	23
b. Inhibition des enzymes critiques : .....	24
4.2. Application des Huiles Essentielles dans la Prévention de la Contamination Alimentaire : .....	25
4.3. Limitations de l'Utilisation des Huiles Essentielles : .....	26
<b>5. Présentation et description botanique de quelques plantes utilisées dans cette étude .....</b>	<b>27</b>
<b>5.1. Thym (<i>Thymus vulgaris</i>) .....</b>	<b>28</b>
5.1.1. Classification Botanique.....	29
5.2. Citronnelle ( <i>Cymbopogon citratus</i> ).....	29
5.2.1. Classification Botanique.....	30
5.3. Basilic ( <i>Ocimum basilicum</i> ).....	33
5.3.1. Classification Botanique.....	33
III. Matériel et méthodes .....	33
3.1. Lieu d'étude :.....	33
3.2. Appareillage et produits chimiques .....	33
3.3. Matériel végétal.....	34
3.4. Analyse mycologique .....	34
3.4.1. Identification de l'espèce d' <i>A. flavus</i> et <i>A.niger</i> .....	36
3.4.2. Préparation de l'inoculum .....	36
3.4.3. Évaluation de l'activité antifongique <i>in vitro</i> des huiles essentielles .....	37
3.4.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et fongicides (CMF) .....	39
3.4.5. Test de germination des spores.....	39
4. Analyse mycologique .....	46
4.1. Activité antifongique des huiles essentielles .....	46
4.2. Concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration fongicide minimale (CMF) des huiles essentielles .....	47
Conclusion.....	49
Références bibliographiques .....	

Annexe I.....

## **Introduction**

De part le monde, les denrées alimentaires sont fréquemment attaquées par de nombreux parasites et maladies, la plupart étant associées à des maladies fongiques pathogènes (**Magro et al., 2006**). Les maladies post-récolte représentent 50 % des pertes alimentaires mondiales, la majorité étant causée par des infections fongiques et bactériennes. Les champignons associés aux mycoses incluent les dermatophytes, les levures et les moisissures (**Benedict, K. et al., 2016**). L'infection fongique peut se produire par exposition aux spores par inhalation, consommation d'aliments contaminés ou contact avec la peau (**Kumar, P. et al., 2012**).

La croissance des champignons sur les fruits et légumes frais entraîne une dégradation des aliments et de nombreuses maladies végétales, causant des pertes économiques significatives. Cette croissance dépend de facteurs abiotiques tels que le pH, l'activité de l'eau (aw), la concentration de soluté, la température, le vent, et le climat. Cependant, la température et l'humidité sont les principales variables influençant le développement des champignons (**Magan et Aldred, 2007**).

En plus des maladies des plantes, certaines espèces de *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* et *Alternaria* peuvent synthétiser des mycotoxines. Ces composés, nocifs pour la santé animale et humaine, peuvent causer divers effets néfastes tels que la mort, les allergies, des mutations, des malformations, l'immunosuppression, ou imiter les œstrogènes. L'activité de ces toxines dépend de leur type et de leur concentration dans les aliments. Les mycotoxines peuvent être produites avant et après la récolte, leurs niveaux augmentant pendant l'après-récolte et le stockage. Ainsi, l'inhibition de la croissance fongique est cruciale pour prévenir l'accumulation de mycotoxines (**Lucía et al., 2013**).

Les pesticides sont couramment utilisés pour protéger les aliments contre les organismes nocifs. Cependant, leur utilisation excessive et inappropriée favorise le développement de résistances, nécessitant des concentrations plus élevées de ces antifongiques et augmentant les résidus toxiques dans les produits alimentaires. Par exemple, *Penicillium italicum* et *P. digitatum* montrent une résistance à de nombreux fongicides synthétiques utilisés dans les agrumes (**Fogliata et al., 2001**). Certains pesticides ne sont pas biodégradables, s'accumulant dans le sol, les plantes et l'eau, affectant ainsi les humains à travers la chaîne alimentaire.

Compte tenu des dommages causés par ces pesticides, il est impératif de trouver des solutions alternatives pour préserver les aliments et la santé humaine. Les huiles essentielles, reconnues pour leurs propriétés aromatisants et leur activité antimicrobienne contre de nombreux micro-organismes, y compris les bactéries d'origine alimentaire, représentent une solution potentielle (**Bhargava *et al.*, 2015**).

Ce mémoire se propose donc d'étudier l'utilisation de certaines plantes et de leurs produits secondaires, tels que les composés phénoliques et les huiles essentielles, dans la préservation des aliments.

Le travail est scindé en deux partis

Le 1er parti contient 2 chapitres

Chapitre I : les moisissures

Chapitre II : les huiles essentielles

Le 2 eme parti contient 2 chapitres

Chapitre III : Matériel et méthodes

Chapitre VI : Résultats et discussions

# **Chapitre I :**

## **Les Moisissures**

## **I. Les Moisissures**

### **1.1.Définition**

Les moisissures, des champignons se développant sous forme de filaments multicellulaires appelés hyphes, sont présentes dans des environnements spécifiques tels que l'air, le sol, les plantes, les animaux et les hôtes humains (**Jung, B. et al., 2018, Venkatesh, N. et al., 2019**). On les trouve tant en intérieur qu'en extérieur, particulièrement dans des zones très humides (**Health, 2021**). L'exposition aux moisissures provient de diverses sources : aliments végétaux contaminés, métabolites de mycotoxines dans les aliments et les produits laitiers, ainsi que de l'air et de la poussière (**Omotayo, et al., 2019**).

Dans la plupart des pays, la sécurité alimentaire n'est pas toujours garantie, même là où des programmes de contrôle sont en place. Les mycotoxines, métabolites secondaires toxiques produits naturellement par de nombreux champignons, représentent un risque important. Une seule espèce de moisissure peut produire de nombreuses mycotoxines, tandis que différentes espèces peuvent générer la même mycotoxine (**D'Mello, J.F., 1997; Ciegler, A. et Bennett, J.W., 1980**).

### **1.2.Caractéristiques fondamentales**

Les caractéristiques morphologiques des moisissures peuvent varier en fonction des espèces et des conditions environnementales dans lesquelles elles se développent. Voici quelques types de ces caractéristiques couramment observées. Les moisissures peuvent avoir des formes variées, allant de filamenteuses à globuleuses, et peuvent être unicellulaires ou pluricellulaires. Leur taille peut varier de quelques micromètres à plusieurs centimètres. En termes de couleur, elles peuvent présenter une grande variété, allant du blanc, du gris et du noir au vert, au bleu et même au rose. La couleur dépend souvent de l'espèce de moisissure et des pigments qu'elle produit, tels que les mélanines et les caroténoïdes (**Roland., Brigitte et Vian., 1999**).

La texture des moisissures peut être veloutée, poudreuse, cotonneuse ou granuleuse, dépendant de la structure des filaments (hyphes) qui les composent. En général, les moisissures sont des champignons microscopiques eucaryotes constitués d'un thalle filamenteux appelé mycélium, formé de filaments ramifiés appelés hyphes. Ces hyphes peuvent être septés (divisés par des cloisons) ou aseptés (non divisés), ainsi qu'hyalins (translucides) ou pigmentés

Les hyphes se divisent en différents types : les hyphes aériens, qui se dressent verticalement et peuvent se ramifier pour former des structures cnidiennes ; les hyphes stolonifères, qui rampent sur le substrat et peuvent donner naissance à de nouvelles colonies ; et les rhizomorphes, qui sont des cordons d'hyphes épais et agrégés.

Les moisissures se reproduisent soit de manière asexuée (via des conidies, des chlamydospores), soit de manière sexuée (via des ascospores, des basidiospores), en utilisant des spores. Elles sont principalement connues pour leur capacité à altérer les aliments, tels que le pain et les fruits, et jouent un rôle de décomposeurs naturels dans la chaîne alimentaire.

### **1.3. Condition de croissance**

La température joue un rôle crucial dans la croissance mycélienne est prédominante. De manière générale, les moisissures se développent à des températures allant de zéro à plus de 50°C (**Proctor, 1995**). La plupart des champignons sont mésophiles et se développent entre 15°C et 30°C, de préférence entre 20°C et 25°C. Cependant, certaines espèces psychrophiles, comme *Cladosporium* herbeux, peuvent se développer à -6°C sur de la viande congelée (**Guiraud, 1998**). D'autres souches peuvent se développer à des températures élevées. Ceux-ci sont considérés comme thermophiles et peuvent croître au-dessus de 45°C (*Aspergillus, Cladosporium*) (**Chapeland-Leclerc et al., 2005**).

L'humidité surtout dans les zones humides, l'activité de l'eau d'une substance est utilisée pour décrire les besoins des champignons ; une faible activité de l'eau signifie moins d'eau pour la croissance fongique. De nombreux types d'aliments sont caractérisés par l'activité de l'eau, cette disposition varie selon le type de champignon, et a une grande influence sur la croissance mycélienne, la sporulation, et surtout sur la croissance des spores ont également déterminé leurs activités lipolytiques et protéolytiques (**Butt et al., 2004**). Ceux qui vivent dans des milieux solides comme le maïs lors du stockage, voire les produits céréaliers secs, sont caractérisés comme *xérophiles* (aimant les milieux secs). Les fonctions de l'eau nécessaires à la croissance vont de 0,68 à 0,83 (**Reboux, 2006**). De plus, l'interaction entre la température et la teneur en eau du grain influence le taux de colonisation de ces amidons, l'écoulement de l'eau du grain vers la phase vapeur favorise l'élévation de température (**Proctor, 1995**).

Cela dépend de la concentration en protons du milieu, qui a une grande influence sur son équilibre ionique. La plupart des champignons sont acidophiles avec un pH de

développement compris entre 3 et 7. Cependant, le développement maximal de moisissures dans les céréales se produit entre des pH de 6 à 8. Cette dernière affecte le potentiel de croissance des champignons xérophiles (**Gock et al, 2003**).

Selon (**Proctor .1995**), leur développement dépend également de la quantité d'oxygène, d'azote et de dioxyde de carbone présente dans l'air interstitiel. La sporulation des moisissures dépend des conditions nutritionnelles, notamment du rapport C/N, et de l'environnement (**Guiraud, 1998**). Beaucoup d'entre eux grandissent avec un niveau de santé très faible.

## **2. Effets des moisissures sur les aliments**

Les moisissures affectent considérablement les aliments, entraînant à la fois des altérations organoleptiques et des risques pour la santé. Lorsqu'elles se développent sur les produits alimentaires, elles modifient leur goût, leur odeur et leur texture, rendant ces denrées souvent inacceptables pour la consommation (**Jung, B. et al., 2018; Venkatesh, N. et al., 2019**). En plus de ces altérations, certaines moisissures produisent des mycotoxines, des composés toxiques qui peuvent persister même après que les moisissures visibles aient été éliminées.

Parmi les mycotoxines les plus préoccupantes, on trouve l'aflatoxine, produite par *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*, qui est hautement cancérigène et hépatotoxique. La contamination par l'aflatoxine peut se produire dans des cultures telles que le maïs, les arachides et les noix, entraînant des risques graves pour la santé humaine et . Une autre mycotoxine notable est l'*ochratoxine A*, produite par *Aspergillus ochraceus* et *Penicillium verrucosum*, qui est néphrotoxique et peut également causer des cancers. La *zéaralénone*, produite par *Fusarium sp.*, est connue pour ses effets oestrogéniques, perturbant les systèmes reproducteurs des animaux et possiblement des humains (**D'Mello, J.F., 1997**).

Ces mycotoxines peuvent provoquer des changements invisibles mais dangereux dans les aliments. Par exemple, même si les aliments ne montrent pas de signes visibles de moisissures, ils peuvent contenir des niveaux dangereux de mycotoxines. Cela pose un défi majeur pour la sécurité alimentaire, car les mycotoxines sont résistantes à la chaleur et peuvent survivre à la cuisson et à la transformation des aliments. Les conséquences de l'ingestion de mycotoxines peuvent inclure des troubles gastro-intestinaux aigus, des maladies

chroniques comme le cancer, des dommages hépatiques et rénaux, ainsi qu'une immunosuppression (Omotayo *et al.*, 2019).

**Tableau 1.** Moisissures retrouvées dans certains aliments (Omotayo *et al.*, 2019)

<b>Champignon</b>	<b>Mycotoxines</b>	<b>Denrées</b>
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aflatoxine</i>	Maïs, arachides, noix, graines oléagineuses
<i>Penicillium verrucosum</i>	<i>Ochratoxine A</i>	Céréales, grains, produits carnés
<i>Fusarium spp.</i>	<i>Zéaralénone</i>	Maïs, blé, céréales
<i>Claviceps</i>	<i>Alcaloïdes de l'ergot</i>	Blé et dérivés Siegel
<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Ochratoxine A</i>	Céréales, café, raisins secs

### **3. Facteurs de processus et environnementaux affectant la croissance des grains**

#### **3.1 . Température de stockage**

La température est le deuxième facteur affectant la croissance des moisissures après aW. De plus, les interactions entre température et aW ont un effet significatif sur la croissance fongique. Parmi les moisissures, certaines espèces peuvent se développer à des températures douces et élevées (appelées champignons thermocollants). Par exemple, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus Niger* peuvent se développer entre 8°C et 45°C et sont optimales autour de 30°C. Ces moisissures affectent la détérioration des aliments stables, surtout par temps chaud. Les moisissures sont plus psychrophiles dans la dégradation des aliments réfrigérés (c'est-à-dire qu'elles peuvent se développer à basse température). Certaines espèces de *Penicillium*, et *Aquarium* sont capables de croître entre 0°C et 5°C (Klein et Anderson, 1963) et même entre -7°C et 0°C (Putt et Hacking, 2009).

### **3.2.Traitement thermique et résistance thermique du moisissure**

Il existe seulement quelques types de moisissures connues pour résister à la chaleur (autrement dit les moisissures qui survivent aux processus de pasteurisation). En fait, la plupart des spores asexuées (appelées conidies) ainsi que les cellules végétatives des genres *Penicillium* et *Aspergilles* sont tuées après cinq minutes de chauffage à 60°C. La résistance thermique de la moisissure est donc liée aux spores denses appelées ascospores. Parmi les formations d'ascospores, *Fulvie*, *B. Nivea*, *Fischer*, *Saccaromyces favus*, *T. macrospores* *T. avelines* sont les espèces les plus courantes trouvées dans la détérioration des aliments transformés (**Malik et Piassava, 2001**).

Ces moisissures se retrouvent dans le sol. En conséquence, ils gâtent les aliments aromatisés (par exemple, les jus de fruits, les fruits en conserve) et les rendent mous. Contaminés par le sol. Pour éviter que ces types d'aliments ne soient gâtés par la moisissure, les fabricants doivent inclure leurs propres valeurs D et z ou modèles de contamination dans leur processus de pasteurisation. *Fulvie* est un bon candidat modèle, car il est considéré comme le champignon le plus tropical. Cela dépend de la souche avec un facteur matriciel intrinsèque dont la valeur D est de 1 à 12 minutes à 90°C et dont la valeur de 6°C à 7. 4°C (**Wayne et Michèle, 1979, 1997 ; Santans et al, 2009**).

### **3.3.Inhibiteur de l'éthanol**

Inhibiteur de l'éthanol sur la croissance des plantes a été rapporté et la croissance de l'amidon en arrêtant ou en retardant la croissance. En perturbant la membrane cellulaire. Lors de la production de produits alimentaires, l'éthanol est utilisé directement sur le produit (par exemple pulvérisé sur la surface) ou dans l'air de production (brouillard d'éthanol) (**Do et D'Antigny, 2011**). ont montré que lorsque la concentration en hydrocarbures était > 4 %, les conidies de *Penicillium isolées* des fruits gâtés étaient inhibées et la plupart d'entre elles étaient capturées lors du dynamitage la deuxième étape de la germination après activation, elles ont constaté que l'effet de l'éthanol change dans les conditions expérimentales. Basé sur un grand nombre de moisissures ont déterminé que la concentration minimale d'éthanol sans croissance était d'environ 4 % pour *Penicillium* et variait entre 3 et 5 % pour la plupart des autres micro-organismes testés (**D'Antigny et al. 2005**)

### **1. Décoration Les amidons trouvés lors de la décomposition des aliments**

sont strictement aérobies, c'est-à-dire. e. l'oxygène est nécessaire à la croissance des moisissures. Par conséquent, limiter l'oxygène comme substrat pour les moisissures est un moyen efficace de les prévenir. Cependant, certains champignons tels que *Penicillium roquefort*, *Mucor plumbeus* ou certains *Aquarium* peuvent se développer à des concentrations d'oxygène dans l'air inférieures à 0,5 % (**Tanisai et al, 2009**) ou à 2 %. De plus, il a été rapporté que les moisissures peuvent utiliser l'oxygène de la matrice plutôt que celui de l'air (**Amando et al, 2007**).

Ainsi, la dégradation de l'oxygène dans l'atmosphère (O<sub>2</sub>) des produits alimentaires emballés doit être combinée à l'effet toxique d'autres composés tels que le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) et l'azote (N<sub>2</sub>). Une étude menée avec Modified Atmosphere Packaging (MAP) a montré que la croissance était significativement inhibée en conditions anaérobies et retardée en conditions aérobies (5% O<sub>2</sub>) pour *Aspergillus Niger*, *Euopium Amsterdam*, *Penicillium* et *Aquarium*. La croissance de *Penicillium* a également été rapportée être inhibée à des concentrations de CO<sub>2</sub> > 70% dans MAP (**Smith et al, 1986**).

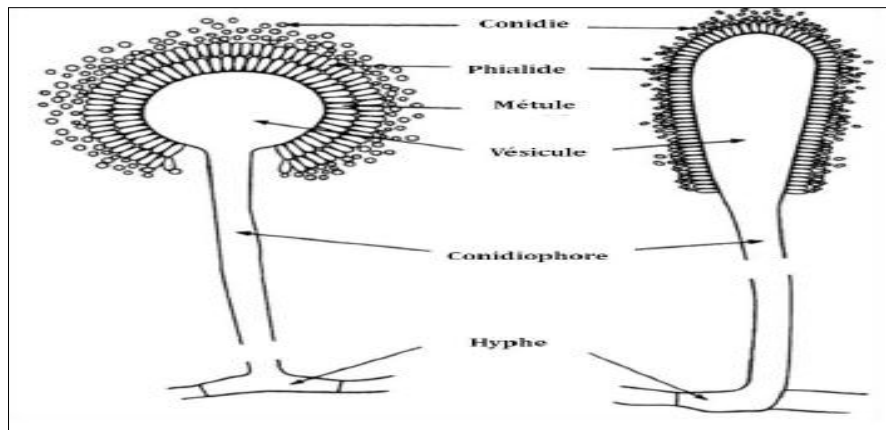
Le MAP constitue donc une solution efficace pour prévenir la croissance de moisissures dans les produits alimentaires emballés.

#### 4. Genre *Aspergillus*

##### 4.1. Définition

*Aspergillus* est un genre composé d'environ 250 espèces. On lui donne son nom en référence à une forme particulière semblable à l'*Aspergillus*, un instrument d'asperger l'eau bénite, qui a inspiré le prêtre catholique Michelin en 1729 (**Klich 2009**). *Aspergillus* est une espèce très commune dans la nature, en particulier dans le sol, où elle joue un rôle essentiel dans la dégradation et le recyclage des matières organiques (**Scheidegger et Payne, 2003**). On les retrouve aussi dans différents secteurs, tels que l'agriculture, la biotechnologie et la santé, afin de fabriquer des métabolites bénéfiques tels que des enzymes, des protéines et des acides.

En raison de leur valeur économique, tant pour leurs effets positifs que négatifs, de nombreux travaux ont été consacrés au genre *Aspergillus*, en se concentrant sur sa taxonomie et sa phylogénie (**Samson et Pitt, 2000, Varga et al., 2003, Frisvad et Samson, 2004, Samson et al., 2006**).



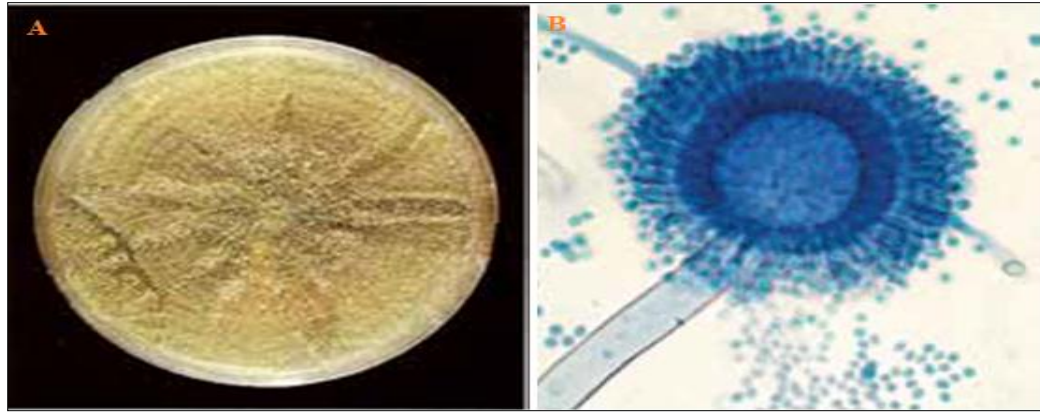
**Figure 1.** Structure typique d'un *Aspergillus* bisérié (à gauche) et unisérié (à droite) (El Khoury, 2016).

#### 4.2. *Aspergillus flavus*

La moisissure *Aspergillus flavus* est d'un vert-jaune à un vert olive, avec des têtes cnidiennes, unisériées ou bisériées, radiées au début, puis se répartissant en plusieurs colonnes de spores mal individualisées, jaunâtres au début, puis devenant vert-jaune foncé. Les conidiospores présentent une texture hyalin et verruqueuse, mesurant de 1 à 2,5  $\mu\text{m}$  de long. La vésicule présente une forme globuleuse ou su globuleuse, avec un diamètre compris entre 10 et 65  $\mu\text{m}$ . Les têtes sont principalement bisériées, avec deux rangées de stérigmates, et les conidies sont lisses ou légèrement rugueuses (Hedayati, 2007 ; Samson, 2010).

*A. flavus* se rencontre principalement dans les régions tropicales et subtropicales, où elle peut coloniser différents substrats. Elle est commune dans le sol, les déchets végétaux en décomposition, les fourrages, les grains et semences en stockage, les aliments pour animaux et les dérivés de céréales (Horn et Dorner, 1998). Cette espèce a aussi un pouvoir pathogène considérable, attaquant principalement les voies respiratoires humaines et animales. Elle joue un rôle essentiel dans la cause des aspergilloses bronchiques allergiques.

En plus de ses impacts pathogènes, *A. flavus* produit divers métabolites toxiques, notamment les aflatoxines, avec l'aflatoxine B1 (AFB1) étant l'un des plus puissants hépatocarcinogènes connus. L'aflatoxinogénèse peut se produire entre 12 °C et 42 °C, avec un optimum situé entre 25 °C et 30 °C.



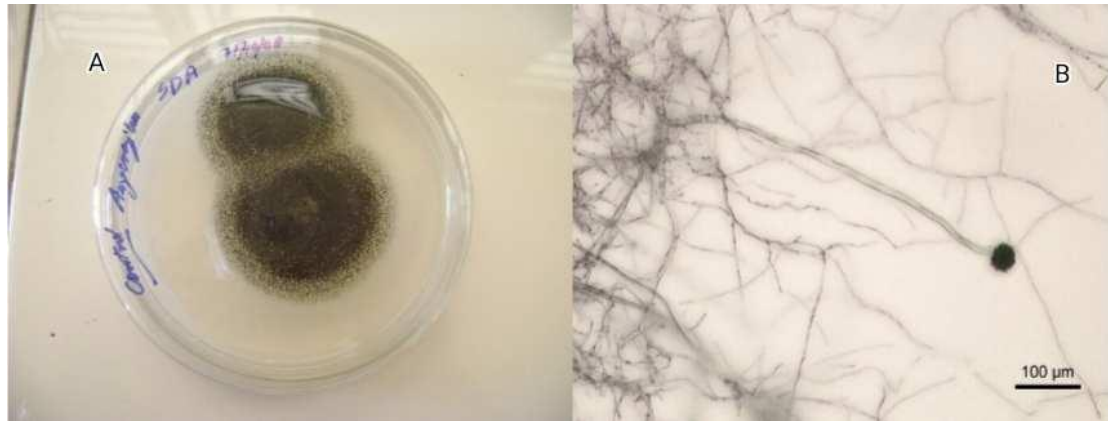
**Figure 2.** *A. flavus*(A: Culture de 7 jours sur gélose au malt à 25°C ; B: Aspect microscopique) (Tabuc, 2007).

#### **4.3. *Aspergillus Niger***

*Aspergillus niger* est un champignon filamenteux appartenant au genre *Aspergillus*. Il est couramment trouvé dans le sol et sur des matières organiques en décomposition. C'est l'une des espèces les plus importantes du genre en raison de ses nombreuses applications industrielles, notamment dans la production d'enzymes, d'acides organiques (comme l'acide citrique) et dans la bioremédiation (Pitt, J.I., et Hocking, A.D. 2009).

*A. Niger* est une espèce de champignon microscopique saprophyte, cosmopolite et ubiquitaire. Il est caractérisé par ses conidiospores (structures reproductrices) noirs et ses conidies (spores) en chaînes (Frisvad, J. C., et Samson, R.A. 2004).

Il est largement étudié pour ses capacités à produire des enzymes telles que l'amylase, la lipase, et la cellulase, et est largement utilisé dans les industries agroalimentaire et pharmaceutique (Schuster, E., et al., 2002).



**Figure 3.** *A. Niger* (A: Culture de 7 jours sur gélose au malt à 25°C ; B: Aspect microscopie optique, grossie 100 fois) (**Hriss, R. 1955**).

## **Chapitre II :** Les Huilles Essentielles

## II. Huiles Essentielles

### 2.1. Définition, localisation et composition chimique

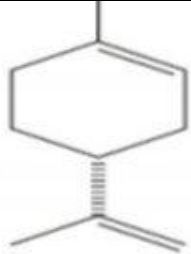

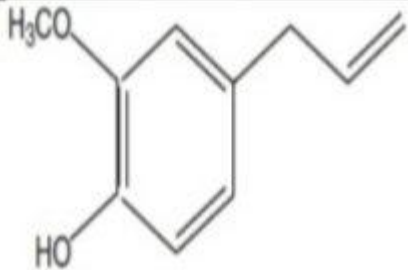
L'huile essentielle (HE) est le produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale au moyen de la distillation. Le terme "essence" définit les parfums exhalés -qui sont des sécrétions naturelles produites par différents organes de la plante. Ces parfums sont dus à la présence de composés volatiles aromatiques dans les cellules végétales. Le terme "huile" désigne le lipophile (c'est-à-dire hydrophobe) et la nature visqueuse de ces substances alors que le terme "essentiel" signifie leur préciosité et leur parfum typique de plantes (**Li et al., 2014**).


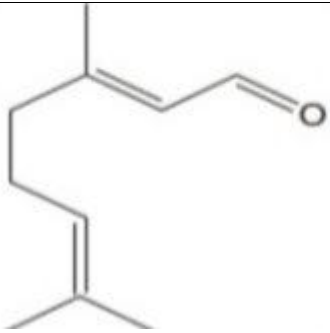
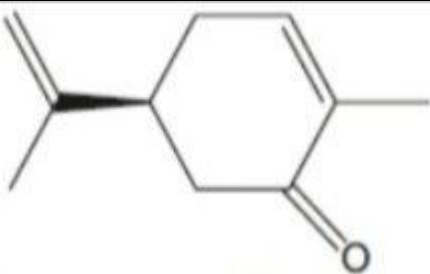
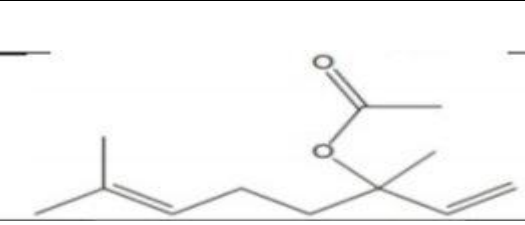
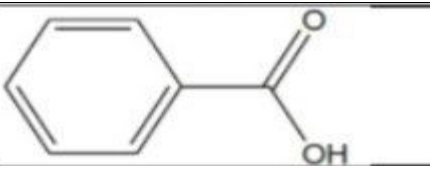
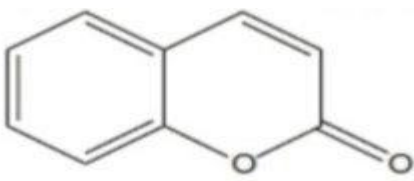
Les HEs peuvent être trouvées dans divers organes de plantes de différentes familles ,dont les familles des Lamiacées, des Myrtacées (Eucalyptus) et des Rutacées (Citrus) ont un niveau élevé de composés aromatiques volatils (**Chemat et al., 2013; Djenane, 2015**). Elles se retrouvent dans toutes les parties de la plante comme les fleurs (lavande, bergamote, jasmin, rose), les feuilles (lavande, citronnelle, Laurel, romarin, sauge, mélisse), les tiges (citronnelle), les racines (vétiver, angélique), les rhizomes (gingembre, acorus), le bois (bois de cèdre, santal), l'écorce (cannelier), les fruits (citron, orange) et les graines (muscade, cardamome, coriandre) (**Benabdelkader, 2012; Djenane, 2015**). La teneur des plantes en HE est faible, voir infime: pour obtenir un litre d'HE, il faut par exemple 10 kg de clous de girofle, de 4 à 10 tonnes de pétales de rose, 150 kg de fleurs de lavande ou encore 10 ares de surfaces cultivées de chanvre (**Degryse et al., 2008**).

En général, la plupart des HEs sont des liquides incolores, lucides et mobiles température ambiante. Cependant, l'ensemble du spectre de couleurs des HEs va du jaune au noir brun avec toute l'échelle intermédiaire de couleurs. De plus, des solides tels que des cristaux (par exemple stéaroptènes) se trouvent dans les HEs de rose, camomille et certaines espèces d'Eucalyptus. L'odeur typique des HEs est dépendante des organes, des espèces et de l'origine des plantes et de chémotype. Contrairement aux huiles végétales, les HEs sont des huiles volatiles avec un indice de réfractons élevées et une rotation optimale à la suite de nombreux composés asymétriques. La densité relative des HEs est généralement inférieure à celle de l'eau alors qu'il existe plusieurs exceptions. Elles sont généralement reconnues comme hydrophobes mais elles sont largement solubles dans les graisses, les alcools et la plupart des solvants organiques. Elles sont constituées de composés ayant diverses structures chimiques, qui sont produits dans toutes les plantes aromatiques et les arbres par la

photosynthèse à travers deux voies. La première est la multiplication de l'isoprène activé (isopentényl pyrophosphate C<sub>5</sub>) produits d'addition uniformes et inégaux. L'autre est la biosynthèse de l'acideshikimique, en dont certaines déviations de biomolécules sont responsables des composés aromatiques dérivés du phénylpropane tel que l'eugénol, l'anéthol, l'aldéhyde cinnamique, etc. Tous les composés des HEs peuvent être divisés en deux catégories principales, les hydrocarbures principalement les composés mono-, sequin- et di- terpènes et oxygénés, pour les alcools, les oxydes, les aldéhydes, les cétones, les phénols, les acides et les esters/lactones. Les molécules des HEs sont classées dans le **Tableau 2** sur la base de leurs fonctions chimiques (**Fernandez et al., 2013**).

**Tableau 2.** Différent types de structures rencontrées dans les HEs (**Fernandez et al., 2013**).

fonctions chimiques	Exemple de structure	Molécules	plantes
Hydrocarbure		Limonène α-pinène Phellandène β-caryophyllène α-camphorène	Orange, citron, Géranium, anis, Eucalyptus, Clou de girofle
Alcool		Linalol Prenol Menthol Farnesol Vetise linalol Phytol α-terpinéol	Ylang ylang, Menthe, Lavande, Cardamome, Camomille, Vétiver, Jasmin, Citrus
Phénol		Eugénol Thymol Anéthol Safrol	Thym, Clou de girofle, Anis, Safran

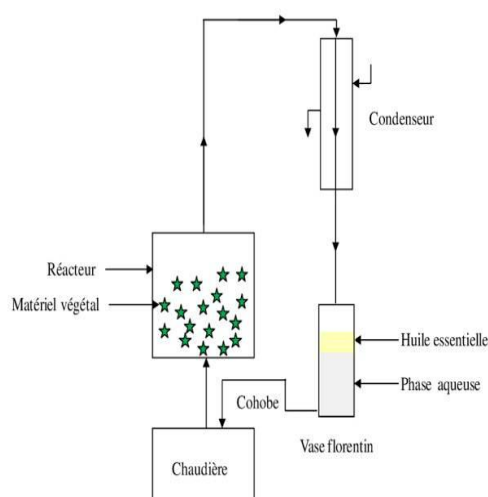
Ether-oxyde		1,8-cinéole Géranyl butyl éther	Rose, Eucalyptus
Aldéhyde		Géraniale Cinnamaldehyde Néra	Cannelle, Citrus, Pelargonium
Cétone		Carvone $\alpha$ - et $\beta$ - vétivone Menthone	Vétiver, Carvi, Poivre noir
Esters		Acétate de inlay Acétate de géranyl Neryl et $\alpha$ - Acétate de terpinyl	Pélargonium, Lavande, Citrus
Acide		Acid benzoïque Acide cinnamique	Pomme, Cannelle
Autres composés (molécule nitrogène et sulfuré, lactone, acides gras,...)		Coumarine Indole Diméthyl trisulfure	Gardénia, Jasmin, Rose, Lavande

## 2.2..Méthodes D'extraction des huiles essentielles :

### 2.2.1. Distillation par Entrainement à la vapeur :

C'est l'une des méthodes valables pour obtenir l'HE (**Pharmacopée Européenne.2007**). Dans ce système d'extraction, la matière végétale est soumise à l'action de la vapeur sans macération préalable. Les vapeurs saturées de composés volatils sont condensées et évacuées dans un essencier, avant d'être séparées en une phase aqueuse (HA) et une phase organique (HE).

L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques, évite certaines conditions d'hydrogénation ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile. . De plus, l'arôme de l'HE obtenue est plus délicat et la clarification est plus uniforme et plus rapide, ce qui signifie que les esters des extraits sont élevés (**Raman, N.2006**) .



**Figure 4.** Extraction à la vapeur (**Farhat, A. 2010**)

### 2.2.2. Expression Mécanique (à froid) :

Est réservée la méthode d'extraction des graines molles contenues dans les péricarpes des agrumes par déchirement de ces derniers par des moyens mécaniques. Briser ou déchirer les parois des sacs huileux du mésocarpe juste sous la peau du fruit, l'épicarpe, pour recueillir la matière non modifiée . Les essences d'agrumes ont longtemps été extraites à la main, la mécanisation et la production par pression à froid ne sont apparues qu'au début du XXe siècle, pour réduire les coûts de production et améliorer les rendements pour répondre à

l'augmentation de la demande. Les systèmes modernes, tels que le Food Machinery Corporation en ligne (FMC), peuvent extraire simultanément le jus et la graisse de fruit sans contact entre les deux.

C'est pourquoi l'expression à froid est la méthode d'extraction de ces graisses, surtout lorsque le processus de congélation n'est plus la méthode la plus appropriée. En effet, des parfums de mauvaise qualité sont produits en raison de la forte présence d'aldéhydes, des composés sensibles à l'oxydation et à la chaleur (Blésité, E. L. et al. 2007. Ferhat, M. A., et al. 2016)

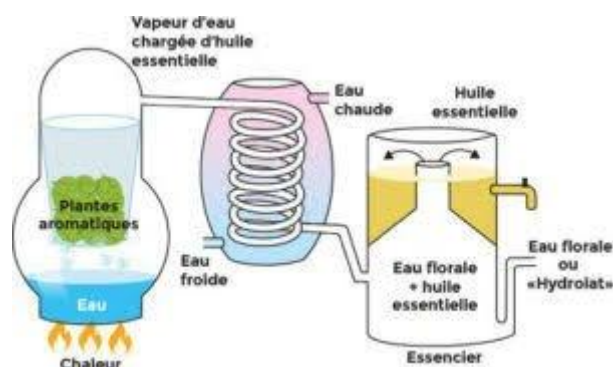


Figure 5. Extraction à froid (Jerry Louis, J. 2020)

### 2.2.3. Extraction par solvant

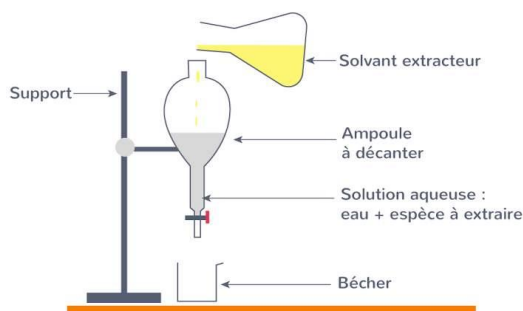
Les solvants les plus couramment utilisés aujourd'hui sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol et, dans une moindre mesure, le dichlorométhane et l'acétone. Le solvant choisi, en plus d'être efficace, doit également être stable à la chaleur, à la lumière ou à l'oxygène. Il est préférable d'avoir un point d'ébullition bas pour une extraction efficace et de ne pas utiliser de produits chimiques lors de l'extraction.

L'extraction se fait avec un appareil Soxhlet. Ces solvants ont un pouvoir d'extraction supérieur à celui de l'eau, de sorte que les extraits contiennent non seulement des composés volatils, mais également de nombreux composés non volatils tels que des cires, des pigments, des acides gras et autres produits chimiques (Hubert, R. 1992). Selon la méthode et le solvant utilisés, on obtient des hydrolysats (eau comme solvant), des alcools (hydrocarbures dilués), des destivés (éthanol/eau), des *résinoïdes* (extraits éthanoliques concentrés) et des plâtres (extraits à froid et à chaud utilisant divers solvants) (Hernandez Ochoa, L.R. 2005).

La méthode "classique" d'extraction des métaux consiste à placer, dans un extrait, un métal précieux et à traiter la matière végétale. Grâce aux lavages ultérieurs, le solvant se

charge en molécules aromatiques, avant d'être envoyé vers le convertisseur pour y être refroidi sous pression atmosphérique.

Le recours limité à l'extraction par solvants organiques n'est pas justifié en raison de problèmes de coût, de sécurité et de toxicité, ainsi que de réglementations liées à la protection de l'environnement. Cependant, les résultats sont supérieurs à ceux du refroidissement et cette méthode évite le processus de refroidissement de la vapeur d'eau (**Lucchesi, M. E.2005**).



**Figure 6.** Extraction par solvant (Kartable googel)

### **3 .Analyse des Huiles Essentielles:**

#### **3.1. Méthodes et Techniques**

L'analyse des huiles essentielles est importante pour déterminer leur composition chimique, leurs propriétés médicinales et leur pureté. De nombreuses méthodes analytiques sont utilisées pour caractériser ces composés volatils et complexes.

La chromatographie en phase gazeuse(GC) est l'une des méthodes les plus utilisées pour analyser les huiles essentielles. Cette méthode sépare les composés volatils en fonction de leur point d'ébullition et de leur polarité, permettant ainsi d'identifier avec précision les composants individuels. Selon Adams (2007), la GC et l'ionisation de flamme (FID) sont utiles pour l'analyse quantitative.

La spectrométrie de masse (MS), souvent associée au gaz (GC-MS), fournit des informations détaillées sur la structure moléculaire des composés présents dans l'huile essentielle. Cette méthode est très utile pour identifier les composants chimiques en comparant les valeurs de masse obtenues avec les bases de données existantes (**Stein, 1999**).

Bien que moins coûteuse que la GC, la chromatographie liquide haute performance est utilisée pour analyser les composés volatils et volatils des huiles de pétrole. La HPLC,

combinée à la réaction UV ou MS, permet une analyse détaillée des composants polaires et thermosensibles (**Santos et al., 2004**).

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) est utilisée pour déterminer la structure moléculaire des principaux composants des huiles essentielles. Cette méthode fournit des informations sur les environnements chimiques des molécules dans la molécule, ce qui est important pour la définition de la structure (**Ebrahimi et al., 2010**).

Une méthode rapide et non destructive est utilisée pour identifier les groupes fonctionnels dans les huiles de pétrole. Les bandes d'absorption IR correspondent aux vibrations spécifiques des liaisons chimiques, et donc l'activité des composants peut être indiquée (**Silverstein et al., 2005**).

L'analyse olfactive ou olfactive, aussi subjective soit-elle, est importante pour évaluer la qualité organoleptique des huiles essentielles. Cette technique et les techniques instrumentales sont souvent utilisées pour relier les concepts cognitifs à la structure chimique (**Dravnieks, 1985**).

Chromatographie en Phase Gazeuse-Olfactométrie (GC-O) : GC-O combine l'analyse atmosphérique et olfactive pour identifier les composés responsables des propriétés aromatiques des huiles essentielles. Cette méthode permet de corréler les pics chromatographiques avec les observations olfactives humaines (**Marsili, 2002**).

L'analyse isotopique, telle que la spectrométrie de masse à rapport isotopique (IRMS), est utilisée pour déterminer l'authenticité et la pureté des huiles essentielles. Cette méthode permet d'identifier une falsification avec des composés synthétiques ou des huiles bon marché (**Hener et al., 1998**).

L'électrophorèse capillaire est une méthode rapide et efficace pour séparer et analyser les composants des huiles essentielles par poids et taille. Le CE est particulièrement utile pour les analyses polaires et ioniques (**Scriba, 2003**).

### **3.2. Utiliser les huiles essentielles comme agents antifongiques :**

Les maladies fongiques constituent une menace sérieuse pour les cultures agricoles et la sécurité alimentaire dans le monde entier. Pour prévenir ces maladies, des fongicides synthétiques sont utilisés depuis longtemps. Cependant, ces fongicides présentent de

nombreuses limites importantes, telles que la résistance fongique et les effets néfastes sur l'environnement et la santé humaine. Face à ces enjeux, les huiles essentielles s'imposent comme une bonne alternative grâce à leurs propriétés antifongiques naturelles et leur impact sur l'environnement.

### **3.3. Limitations des Fongicides de Synthèse :**

#### **a. Résistance Fongique :**

Des principales limites associées à l'utilisation de fongicides synthétiques est la résistance fongique. Lorsque les fongicides sont utilisés en continu, une pression est exercée sur les populations fongiques et des souches résistantes apparaissent (**Lucas et al., 2015**). Ce phénomène est documenté pour de nombreux *phytopathogènes*, dont *Botrytis cinerea*, *Fusarium spp.*, et *Aspergillus spp.* (**Brent et Hollomon, 2007**).incluent des mécanismes d'inhibition génétique, une diminution de la perméabilité des membranes aux fongicides et une dégradation des composés chimiques par les enzymes. Par exemple, des mutations du gène CYP51 de *Fusaigraminearum* peuvent conférer une résistance *au tébuconazole* (**Ma et Michailides, 2005**).

#### **b. Effets secondaires sur l'environnement et la santé**

On s'inquiète également des effets négatifs des pesticides sur l'environnement et la santé humaine. Ces produits chimiques restent dans le sol et les cours d'eau et peuvent nuire aux écosystèmes. Par exemple, certains fongicides, comme les dithiocarbamates, se sont révélés toxiques pour les organismes aquatiques, causant ainsi des problèmes dans les écosystèmes aquatiques (**Stewart et al, 2001**). De plus, l'exposition humaine à fongicides peut provoquer des effets secondaires tels qu'une irritation cutanée, des problèmes respiratoires et des problèmes endocriniens. Ces préoccupations ont alimenté la recherche de solutions alternatives, comme le pétrole (**Alavanja et al, 2004**).

### **4. Les Huiles Essentielles comme Antifongiques Naturels :**

Les huiles essentielles sont extraites de plantes aromatiques et contiennent de nombreux composés biologiques différents, tels que des terpénoïdes, des phénols et des aldéhydes, qui possèdent des propriétés antimicrobiennes. Ces composés peuvent agir ensemble pour inhiber la croissance de champignons pathogènes (**Bakkali et al., 2008**). Par exemple, il a été démontré que l'huile essentielle de thym, riche en thymol et en carvacrol,

possède une activité antifongique significative contre *Candida albicans* et *Aspergillus niger* (Pawar et Thaker, 2006). De même, l'huile essentielle d'origan, qui contient également du carvacrol, s'est révélée efficace contre de nombreux types de champignons résistants aux fongicides conventionnels (Hammer et al., 1999).

L'huile essentielle offre de nombreux avantages comme alternative naturelle à la production artificielle. Ils sont généralement biodégradables et présentent un risque moindre de toxicité pour l'environnement et la santé humaine (Burt, 2004). De plus, la diversité chimique des huiles essentielles rend difficile le développement de résistances par les champignons, contrairement aux fongicides de synthèse. Par exemple, des études ont montré que l'huile d'origan peut inhiber la croissance de *Penicillium expansum* sur les médicaments (Neri et al., 2006).

**Tableau 3.** Effets antifongiques des HEs.

Nom scientifique	Nom commun	champignons de test	Références
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Cannelle	<i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>Fusarium spp</i> , <i>Penicillium citrinum</i> et <i>P. viridicatum</i>	Velluti et al. (2004); Singh et al. (2007),
<i>Citrus limon L</i>	Citron	<i>P. chrysogenum</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>A. niger</i> et <i>A. flavus</i>	Viuda-Martos et al. (2008),
<i>Cymbopogon spp</i>	citronnelle	<i>Fusarium spp</i>	Velluti et al. (2004),
<i>Eucalyptus</i>	Eucalyptus	<i>A. flavus</i> et <i>A.</i>	Vilela et al.

<i>globulus</i>		<i>parasiticus</i>	(2009)
<i>Foeniculum vulgare</i>	Fenouil	<i>Phytophthora infestans</i>	Soylu et al. (2006),
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romarin	<i>P. infestans et B. cinerea</i>	Soylu et al. (2006) ; Soylu et al. (2010),
<i>Thymus vulgaris</i>	Thym	<i>F. oxysporum, F. verticillioides, P. expansum, A. fumigatus, P. brevicompactum, A. flavus et Alternata alternata</i>	Feng et Zheng, (2007); Zabka et al. (2009),

#### 4.1. Mécanisme d'Action des Huiles Essentielles :

##### a. Dégradation des membranes cellulaires :

Les huiles essentielles exercent leur activité antifongique en perturbant les membranes cellulaires fongiques. Les composés antibiotiques tels que le caracola et le thymol peuvent perturber la bicouche lipidique des cellules fongiques, augmentant ainsi la perméabilité et endommageant les compartiments intracellulaires (Cox *et al.*, 2000). Dans la plupart des cas, la maladie de cette membrane entraîne la mort. Des études ont montré que le caracola et le thymol perturbent la membrane plasmique de *Bacillus cereus*, un pathogène d'origine alimentaire, entraînant la libération de potassium et de phosphate (Ultee *et al.*, 2002).

##### b. Inhibition des enzymes critiques :

De plus, certains composants de l'huile essentielle peuvent inhiber les enzymes fongiques nécessaires à la croissance et à la reproduction du champignon. Par exemple, le cinnamaldéhyde présent dans l'huile essentielle de cannelle inhibe l'activité des enzymes impliquées dans la biogenèse de la paroi fongique (Shreaz *et al.*, 2016). Ces enzymes sont essentielles à la

croissance et à la division cellulaires, et leur inhibition affaiblit la paroi cellulaire, conduisant finalement à la mort cellulaire.

#### 4.2. Application des Huiles Essentielles dans la Prévention de la Contamination

##### Alimentaire :

Bien que le criblage in vitro d'extraits de plantes soit un premier pas important dans l'identification des plantes potentielles à cet effet, la confirmation in vivo de leur activité biologique est essentielle parce que les matrices alimentaires peuvent interagir avec les composés bioactifs, diminuant leur efficacité. Les tests in vivo rapportés dans la littérature sont résumés dans le **Tableau 4**

**Tableau 4.** Effet antifongique de certaines HEs in vivo

Hes	moisissure	Matrice alimentaire	Effet	Références
C. virosa	<i>A. flavus</i>	Tomates/cerises	<10% des fruits infectés à 200 µl / ml pour toutes les souches	Tian et al. (2011),
T. vulgaris, Satureja hortensis et S. aromaticum	<i>A. flavus</i>	Ketchup	Concentrations inhibitrices maximales: 350 ppm (T. vulgaris), 500 ppm (S. hortensis)	Omidbeygi et al. (2007)
Chenopodium ambrosioides	<i>A. flavus</i>	Blé	91% de protection à 100 µg / ml.	Kumar et al. (2007)
Origanum majorana, C.sativum, Hedychium	<i>A. flavus</i>	Bois chiche	> 75% de protection : 3 µl/ml (O. majorana),	Prakash et al. (2012),

spicatum, Commiphora myrrha et Cananga odorat			2,5 µl/ ml (H. spicatum), 3 µl / ml (C. myrrha) et 2 µl / ml (C. odorata).	
Boswellia carterii	<i>A. flavus</i>	Poivre noir	65,38% de protection à 1,75 µl / ml.	Prakash et al. (2014),
C. cyminum, Laurus nobilis, M. pulegium, O. vulgare, et S. montana	<i>A. flavus</i>	Rais	Protection à 50 µl : 60,0 % (C. cyminum), 49,8 % (L. nobilis), 46,8 % (M. pulegium), 55,9% (O. vulgare), et 57,4% (S. montana).	RazzaghiAb yaneh et Rai, (2013),
S. hortensis	<i>A. flavus</i>	Citron	Protection des fruits à 6,25 µl / ml.	Dikbas et al. (2008),
C. jensenianum, R. officinalis, L. nobilis, T. vulgaris, E .caryophyllata.	<i>A. flavus</i>	Pain de seigle	Inhibition de la croissance fongique à 270 µl/l.	Suhr et Nielsen, (2003).

#### 4.3. Limitations de l'Utilisation des Huiles Essentielles :

Les HEs sont utilisées comme agents naturels de conservation dans le domaine agroalimentaire: le poisson, les viandes, les ovo produits (Djenane *et al.*, 2019), dans plusieurs d'autres produits. Bien que l'utilisation des HEs en fumigation sur des grains en stockage puisse constituer une stratégie intéressante, elle se heurte à plusieurs contraintes :

**Phytotoxicité** : L'altération de l'intégrité de la membrane cellulaire suite à l'exposition aux HEs (responsable de leur effet anti-fongique) pourrait aussi affecter les plantes et induire une phytotoxicité à des concentrations légèrement plus élevées que celles utilisées pour lutter contre les champignons (**Isman et Machial, 2006**).

Toxicité pour les mammifères : une exposition à des HEs ou bien à leurs composants peut-être toxique pour les mammifères, ont reporté un cas d'ingestion de 5 ml d'huile essentielle de clou de girofle chez un enfant qui a entraîné une hépatotoxicité sévère et un coma. D'autres effets toxiques des HEs ont été rapportés comme, par exemple, une photosensibilisation entraînant des irritations dermiques et des brûlures lors d'exposition à la lumière (HE avec une teneur élevée de furanocoumarins). Le linalool, présent dans les HE de thym et de lavande est également toxique pour des cellules dermique humaines (**Prashar et al., 2004**).

**Volatilisation rapide** : Les composés des HEs sont hautement volatiles et peuvent également se dégrader par oxydation suite à une exposition à la lumière ou une élévation de température. Cette perte d'activité nécessiterait donc leur réintroduction de manière continue pour maintenir l'effet protecteur (**Kedia et al., 2015**).

**Altération des qualités organoleptiques** : Les HEs sont constituées de substances aromatiques très fortes et sont souvent utilisées en industrie cosmétique pour leur odeur agréable. Leur application sur des aliments pourrait en changer les qualités organoleptiques et altérer le goût de ces derniers (**Kumar et al., 2010**).

## **5. Présentation et description botanique de quelques plantes utilisées dans cette étude**

### **5.1. Thym (*Thymus vulgaris*)**

Le thym (*Thymus vulgaris*), communément connu sous le nom de thym commun ou thym vulgaire, est une plante aromatique vivace appartenant à la famille des Lamiaceae. Originaire de la région méditerranéenne, cette plante est largement reconnue pour ses usages culinaires, médicaux et aromatiques. Le thym se présente sous forme d'un petit arbuste atteignant généralement 20 à 30 cm de hauteur, avec une capacité à s'étendre jusqu'à 40 cm dans des conditions optimales, formant des touffes denses et buissonnantes. Ses tiges, ligneuses à la base et herbacées vers le sommet, sont quadrangulaires et couvertes de poils fins, donnant une texture légèrement veloutée (**Jung et al., 2018**). Les feuilles du thym, petites et étroites, mesurent environ 5 à 10 mm de long et sont disposées en paires opposées le long de la tige. Elles présentent une face supérieure vert foncé et une face inférieure

légèrement plus claire, recouverte de poils glandulaires contenant des huiles essentielles, d'où émane une forte odeur aromatique (**Venkatesh et al., 2019**).

Les fleurs, petites et regroupées en inflorescences terminales, varient du blanc au rose pâle ou lilas, et possèdent un calice tubulaire à cinq lobes et une corolle bilabée, caractéristiques des Lamiaceae. La floraison se produit principalement de mai à août (**Health, 2021**). Le fruit du thym est un tétrakène, constitué de quatre petites graines lisses et brunes, logées dans le calice persistant. Préférant les sols bien drainés, pauvres à modérément fertiles, et légèrement alcalins, le thym nécessite une exposition ensoleillée et supporte bien la sécheresse, ce qui le rend idéal pour les climats méditerranéens (**Omotayo et al., 2019**). En cuisine, le thym est utilisé pour assaisonner les viandes, les poissons, les légumes, les soupes et les sauces, apportant une saveur distincte et agréable. Sur le plan médicinal, il est réputé pour ses propriétés antiseptiques, antifongiques et expectorantes, et est utilisé en phytothérapie pour traiter les infections respiratoires et les troubles digestifs. L'huile essentielle de thym trouve également des applications en cosmétique et parfumerie, grâce à ses propriétés aromatiques et thérapeutiques (**Ciegler et Bennett, 1980**).

### **5.1.1. Classification Botanique**

**Règne** : Plantae

**Division** : Magnoliophyta

**Classe** : Magnoliopsida

**Ordre** : Lamiales Famille : Lamiaceae

**Genre** : Thymus

**Espèce** : Thymus vulgaris



**Figure7.** Le Thym (Jean-Pierre, G. 2016)

## **5.2. Citronnelle ( *Cymbopogon citratus* )**

La citronnelle (*Cymbopogon citratus*), également connue sous le nom de citronnelle de l'Inde ou verveine des Indes, est une plante herbacée vivace appartenant à la famille des Poaceae. Originaires des régions tropicales d'Asie du Sud-est, elles sont largement cultivées pour leurs usages culinaires et médicinaux. La citronnelle se caractérise par des touffes denses de longues feuilles linéaires et arquées, pouvant atteindre 1 à 1,5 mètre de hauteur. Les feuilles, qui ont une texture rugueuse et une marge coupante, dégagent un fort parfum citronné dû à la présence d'huiles essentielles, principalement le citral et le géraniol (**Charles et Simon, 1990**).

Les tiges de la citronnelle sont épaisses, rigides et bulbeuses à la base, formant des pseudo-tiges constituées de gaines foliaires imbriquées. Les inflorescences sont des panicules composées de nombreux épillets, mais la floraison est rare sous les climats non tropicaux. Préférant les sols bien drainés, riches en matières organiques, et les expositions ensoleillées, la citronnelle nécessite des conditions climatiques chaudes et humides pour une croissance optimale (**Bhagat et al., 2014**).

Utilisée couramment dans la cuisine asiatique, la citronnelle apporte une saveur citronnée distinctive aux soupes, currys, et marinades. En phytothérapie, elle est réputée pour ses propriétés antimicrobiennes, antifongiques, et anti-inflammatoires, et est souvent utilisée pour traiter les troubles digestifs, les infections et comme répulsif contre les insectes (**Sharma et al., 2016**). L'huile essentielle de citronnelle, extraite par distillation à la vapeur, est également employée en aromathérapie et dans la fabrication de produits cosmétiques et de soins personnels en raison de ses qualités antiseptiques et déodorantes (**Tadtong et al., 2009**).

### 5.2.1. Classification Botanique

**Règne** : Plantae

**Division** : Magnoliophyta

**Classe** : Liliopsida

**Ordre** : Poales

**Famille** : Poaceae

**Genre** : Cymbopogon

**Espèce** : Cymbopogon citratus



**Figure8.** Citronnelle (Winer, M. 2023)

### 5.3. Basilic (*Ocimum basilicum*)

Le basilic (*Ocimum basilicum*), communément appelé basilic doux ou basilic à grandes feuilles, est une plante herbacée annuelle appartenant à la famille des Lamiaceae. Originnaire des régions tropicales d'Asie, notamment d'Inde, cette plante aromatique est largement cultivée pour ses usages culinaires, médicaux et aromatiques. Le basilic se caractérise par une croissance rapide, atteignant généralement une hauteur de 30 à 60 cm, bien que certaines variétés puissent atteindre jusqu'à 1 mètre (**Simon *et al.*, 1990**).

Le basilic présente des tiges quadrangulaires et légèrement poilues, une caractéristique commune aux membres de la famille des Lamiacée. Les feuilles sont opposées, ovales à lancéolées, mesurant entre 3 et 11 cm de long et 1 à 6 cm de large. Elles sont de couleur vert clair à vert foncé, avec une surface lisse ou légèrement ridée. Les feuilles du basilic dégagent un arôme intense et agréable, résultant de la présence d'huiles essentielles, notamment le linéale, l'eugénol et le méthylchavicol (**Hiltunen et Holm, 1999**).

Les inflorescences du basilic sont des épis terminaux composés de petites fleurs blanches ou violettes, disposées en verticilles. Chaque fleur possède un calice tubulaire à cinq lobes et une corolle bilabée, typique des Lamiaceae. La floraison se produit principalement en été. Le fruit du basilic est un akène, composé de quatre petites graines noires et lisses, logées dans le calice persistant (**Morales et Simon, 1997**).

Le basilic préfère les sols bien drainés, riches en matières organiques, et nécessite une exposition ensoleillée pour une croissance optimale. Il est sensible aux basses températures et au gel, ce qui limite sa culture en extérieur aux périodes chaudes de l'année dans les régions tempérées (**Grayer et al., 1996**).

Utilisé en cuisine, le basilic est un ingrédient essentiel dans de nombreuses recettes méditerranéennes et asiatiques, comme le pesto, les salades, et les plats à base de tomates. Médicalement, le basilic est reconnu pour ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antimicrobiennes. En phytothérapie, il est utilisé pour traiter divers maux, notamment les troubles digestifs, les infections respiratoires et comme sédatif léger (**Purushothaman et al., 1981**).

L'huile essentielle de basilic, extraite par distillation à la vapeur, est employée en aromathérapie et dans la fabrication de produits cosmétiques et de soins personnels pour ses propriétés apaisantes et antiseptiques (**Charles et Simon, 1990**).

### **5.3.1. Classification Botanique**

**Règne** : Planta

**Division** : Magnoliophyta

**Classe** : Magnoliopsida

**Ordre** : Lamiales

**Famille** : Lamiaceae

**Genre** : Ocimum

**Espèce** : Ocimum basilicum



**Figure9.** Basilic (Nunez, B. 2023)

**Chapitre III :**  
Matériel et Méthodes

### III. Matériel et méthodes

#### 3.1.Lieu d'étude :

Cette recherche a été menée au laboratoire des Molécules Bioactives et Valorisation de la Biomasse (LPBVB) de l'École Normale Supérieure (ENS) de Kouba, Alger.

#### 3.2.Appareillage et produits chimiques

Tous les appareils et produits chimiques utilisés dans cette étude sont répertoriés dans l'annexe ( I et II ) , où la composition chimique des milieux est également indiquée.

#### 3.3.Matériel végétal

Les matières végétales utilisées dans cette étude sont *Cymbopogon citratus* (citronnelle), *Thymus vulgaris* (thym) et *Ocimum basilicum* (basilic), dont l'huile essentielle a été extraite par distillation à la vapeur. Les échantillons ont été achetés prêts à l'emploi auprès d'un spécialiste de l'extraction d'huiles essentielles à El Kala.



**Figure 10.** Montage utilisé pour l'extraction des huiles essentielles (Alleg, S. 2024).

#### 3.4.Analyse mycologique

L'isolement de l'*Aspergillus flavus* et *Aspergillus iger* dans le pain a été réalisé par la technique de suspension-dilution et l'inoculation sur milieu gélosé. Dix (10) grammes de

chaque échantillon de couscous ont été ajoutés à 90 mL d'eau distillée additionnée de tween 80 et homogénéisés en remuant pendant 15 minutes. Des dilutions sérielles ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$ ) ont été réalisées à partir de la solution mère. Cent (100) microlitres de chaque dilution ont été ensemencés en surface des boîtes de Petri contenant le milieu DRBC et incubés à 28 °C pendant 5 à 7 jours dans l'obscurité. Des isolats représentatifs de chaque échantillon ont été purifiés, puis sous-cultivés dans des tubes à essai contenant du PDA. Après incubation pendant 7 jours à 28 °C, les isolats ont été stockés à 4 °C pour des analyses ultérieures.

### **3.4.1. Identification de l'espèce d'*A. flavus* et *A. niger***

Pour identifier l'espèce d'*A. flavus* et *A. niger*, plusieurs étapes ont été suivies. Tout d'abord, l'identification du genre a été réalisée. Cette étape a impliqué une observation macroscopique des colonies développées de la souche pour déterminer si elles correspondent à celles d'*Aspergillus*, en se basant sur les caractères morphologiques du mycélium. Ensuite, une observation microscopique a été effectuée, en examinant le mode de groupement des conidies, le mode de conidiophore et l'agencement des cellules conidiogènes. Cette observation microscopique a été facilitée par la préparation d'échantillons microscopiques à l'aide d'un ruban adhésif transparent, permettant de coller légèrement à la surface de la culture puis d'observer au microscope avec des grossissements de 10 et 40.

Une fois le genre identifié, l'espèce a été déterminée en utilisant la méthode de single spore sur trois milieux de culture différents : MEA à 25 °C, G25N à 25 °C et CYA à 37 °C. La couleur des colonies a été observée après une et deux semaines de croissance. L'identification spécifique de l'espèce a été réalisée conformément au guide de **Pitt et Hocking (2009)**. Enfin, la confirmation de l'espèce a été obtenue en utilisant le milieu AFPA, où la couleur du revers de la colonie a été observée après une incubation de 5 à 7 jours à  $28 \pm 2$  °C, confirmant ainsi l'appartenance au groupe *A. flavus* et *A. parasiticus*.

### **3.4.2. Préparation de l'inoculum**

Les spores issues de cultures jeunes (âgées de 7 jours) de chaque souche ont été collectées en rinçant les boîtes de Pétri avec 10 ml d'une solution stérile de Tween-80 à 0,1% (v/v). Ensuite, la suspension a été filtrée à travers un tissu de mousseline stérile placé sur un entonnoir stérile, récupérant ainsi le filtrat qui constitue l'inoculum. Pour préparer la gamme étalon, 1

ml de la suspension de spores, préalablement agitée, a été mélangé avec 9 ml d'eau contenant du Tween. Le nombre de spores dans chaque dilution a été déterminé en effectuant un comptage à l'aide de la cellule de Mallassez. La courbe d'étalonnage a été établie en mesurant la densité optique (DO) de chaque dilution à une longueur d'onde de 625 nm, en fonction du nombre de spores comptées sur la cellule. Avant chaque inoculation, le nombre de spores a

été estimé en se référant à la courbe d'étalonnage, et la suspension a été diluée pour obtenir un nombre de spores de  $1 \times 10^6$  /ml (Annexe II).

### 3.4.3. Évaluation de l'activité antifongique *in vitro* des huiles essentielles

L'évaluation de l'activité des huiles essentielles (HEs) sur la croissance mycélienne de la souche test a été réalisée par la technique de contact direct, selon la méthode décrite par **Ben Miri et al. (2023)**.

Les HEs sélectionnées ont été incorporées dans le milieu gélosé pour obtenir les concentrations suivantes : 0,5 ; 1,00 ; 1,50; 2,00; 2,50; 3,00; 3,50 mg/ml de milieu PDA. Ce milieu a été versé dans des boîtes de Pétri à raison de 10 ml par boîte. Après solidification, 10 µl de la suspension fongique ( $1 \times 10^6$  spores/ml) ont été déposés au centre de chaque boîte de culture. Un témoin sans HE a également été préparé. L'ensemble des boîtes a été incubé dans une étuve à une température de  $28 \pm 2$  °C.

La croissance mycélienne est suivie en mesurant le diamètre suivant deux droites perpendiculaires au centre. Les mesures ont été faites quotidiennement pendant 7 jours. La comparaison des dimensions obtenues avec celles des témoins a permis de calculer le pourcentage d'inhibition (I%) selon la formule suivante (**Albuquerque et al., 2006**):

$$I\% = (D_{\text{témoin}} - D_{\text{essai}} / D_{\text{témoin}}) \times 100$$

Dont:

**D<sub>essai</sub>**: le diamètre de la zone de la croissance de l'essai en cm;

**D<sub>témoin</sub>**: le diamètre de la zone de la croissance du témoin.

### 3.4.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et fongicides (CMF)

La CMI et la CMF de chaque huile essentielle (HE) ont été déterminées selon la méthode de dilution en milieu liquide décrite par **Ben Miri et al. (2018)**. Pour cela, 10 µl de la suspension fongique ( $1 \times 10^6$  spores/ml) à tester ont été inoculés dans des tubes à essai contenant 10 ml du milieu liquide SMKY à différentes concentrations d'HE (0,5; 1,00; 1,5; 2,00; 2,5; 3,00; 3,5mg/ml). Des tubes témoins contenant uniquement le milieu SMKY ont également été inoculés avec la suspension fongique. Après homogénéisation, l'ensemble a été

incubé à  $28 \pm 2$  °C pendant 7 jours. À la fin de l'incubation, l'observation visuelle de la gamme a permis de déterminer la CMI, correspondant à la plus faible concentration d'HE capable d'inhiber la croissance du microorganisme (**Tatsadjieuet al., 2009; Tian et al., 2011**).

Les tubes présentant une inhibition totale ont été réensemencés dans des boîtes contenant 10 ml du milieu de culture PDA. Si une reprise de la croissance mycélienne était observée, la concentration était qualifiée de fongistatique (CMFs) (**Bajpaiet al., 2010**). En revanche, si aucune reprise de croissance n'était observée, elle était considérée comme fongicide (CMFc) (**Shuklaet al., 2012**).

#### **3.4.5. Test de germination des spores**

Le test de germination des spores fongiques et la cinétique de croissance ont été réalisés en utilisant la méthode de **Tian et al. (2012)**. Les HEs ont été ajoutées au tube en verre contenant 1 ml de Tween-20 à 0,1 (v/v) pour obtenir des concentrations finales de 0,5; 1,00; 1,5; 2,00; 2,5; 3,00; 3,5mg/ml. Des suspensions de spores de chaque souche ont été obtenues à partir de cultures âgées de 3 jours, en ajoutant 5 ml d'eau stérile contenant 0,1% (v/v) de Tween-20 à chaque boîte de Pétri, et en grattant doucement la surface mycélienne trois fois avec un étaleur stérile en forme de L pour libérer les spores. La suspension homogène de spores, contenant  $10^6$  spores/ml, a ensuite été inoculée dans chacun des tubes mentionnés ci-dessus. À partir de cela, des aliquotes de 10  $\mu$ l de la suspension de spores ont été incubés dans un milieu PDA frais dans des lames de dépression séparées. Les lames de dépression contenant les spores ont été assemblées avec une lamelle de couverture puis incubées dans une chambre d'humidité à 28 °C pendant 20 heures en trois répétitions. Pour chaque traitement, 200 spores ont été examinées et l'étendue de la germination des spores a été évaluée en recherchant l'émergence de tubes germinatifs. Le nombre de spores germées a été évalué et rapporté en pourcentage de germination des spores.

**Chapitre VI :**  
Résultats et Discussion

#### **4. Analyse mycologique**

L'étude mycologique a permis d'isoler les espèces *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger* dans l'échantillon de pain, en suivant une méthodologie rigoureuse. Les résultats ont été obtenus par la technique de suspension-dilution et l'inoculation sur milieu gélosé, avec des procédures de culture et d'identification spécifiques.

Les résultats de cette analyse démontrent la présence d'*A. flavus* et *A. niger* dans l'échantillon de pain. Ces espèces sont souvent associées à des contaminations fongiques dans les produits alimentaires et peuvent présenter des risques pour la santé publique. La méthodologie utilisée, combinant des techniques de culture et d'identification, a permis une caractérisation précise des souches isolées, fournissant ainsi des informations essentielles pour évaluer la qualité et la sécurité du produit alimentaire. Les résultats mettent en évidence l'importance de la surveillance et du contrôle de la qualité microbiologique des aliments pour prévenir les risques sanitaires liés à la présence de contaminants fongiques.

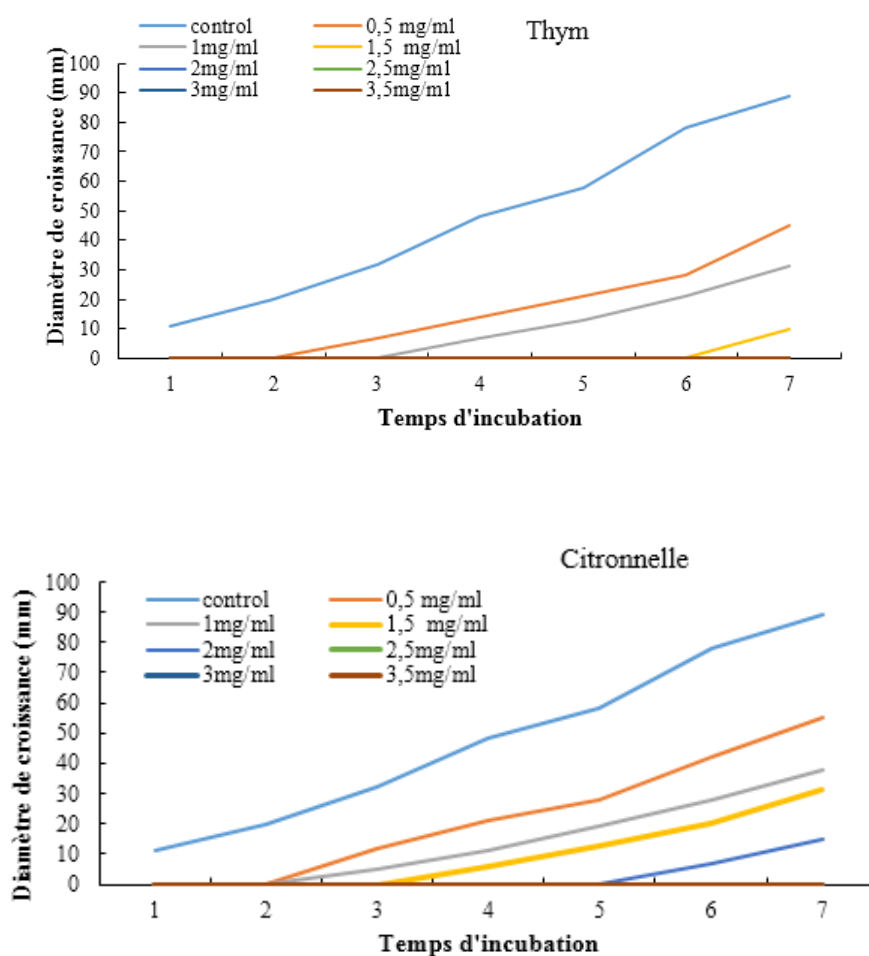
##### **4.1. Activité antifongique des huiles essentielles**

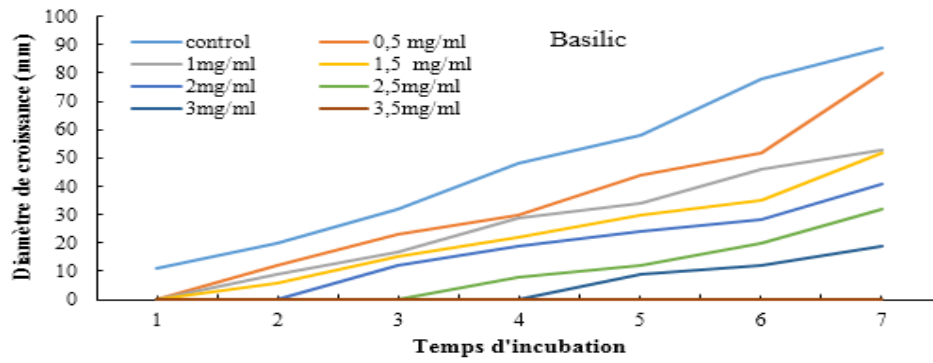
Les résultats de notre étude mettent en évidence des différences d'efficacité entre différentes huiles essentielles (HEs) sur la croissance d'*A. flavus* et *A. niger*, qui sont potentiellement toxigènes. Une sensibilité significative des souches à toutes les HEs par rapport au témoin a été observée, et cette sensibilité semble dépendre de la composition chimique des HEs ainsi que de la fonction des composés majoritaires ayant des propriétés antimicrobiennes.

Les composants des HEs de faible poids moléculaire et hautement lipophiles ont tendance à traverser facilement les membranes cellulaires, ce qui entraîne une perturbation de l'organisation des cellules microbiennes. Par exemple, des études antérieures (Chao *et al.*, 2005) ont montré que ces composants peuvent affecter la croissance des micro-organismes en perturbant leur structure cellulaire.

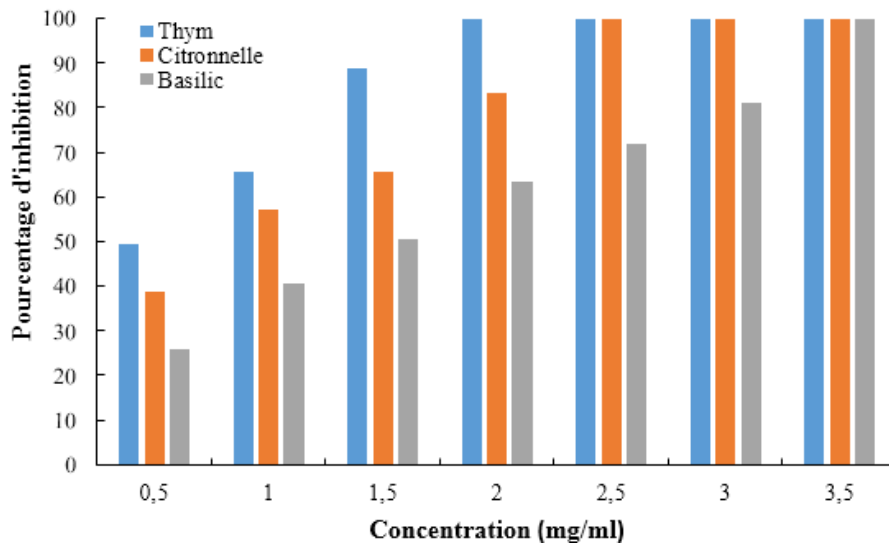
Pour *A. flavus*, l'HE de thym montre une inhibition significative de la croissance à partir de 0,5 mg/ml, avec une inhibition de 49,438% après sept jours. À 1 mg/ml, l'inhibition atteint 65,55%, et à 1,5 mg/ml, la croissance est presque totalement supprimée avec une inhibition de 88,764%. Aux concentrations de 2 mg/ml et plus, la croissance est complètement inhibée, indiquant une efficacité maximale de cette HE. L'HE de citronnelle présente également une inhibition notable, bien que légèrement moins efficace que le thym. À 0,5 mg/ml, l'inhibition atteint 38,88% après sept jours, et à des concentrations de 1 mg/ml et

1,5 mg/ml, les pourcentages d'inhibition sont respectivement de 57,303% et 65,55 %. L'inhibition complète est observée à partir de 2,5 mg/ml. En revanche, l'HE de basilic est la moins efficace des trois. À 0,5 mg/ml, l'inhibition est relativement faible à 25,842%, mais augmente progressivement avec des concentrations de 1 mg/ml (40,449%) et 1,5 mg/ml (50,561%). Une inhibition complète n'est atteinte qu'à 3,5 mg/ml, indiquant que cette huile essentielle nécessite des doses plus élevées pour être pleinement efficace contre *A.flavus* (Figure 11, 12, et 13).

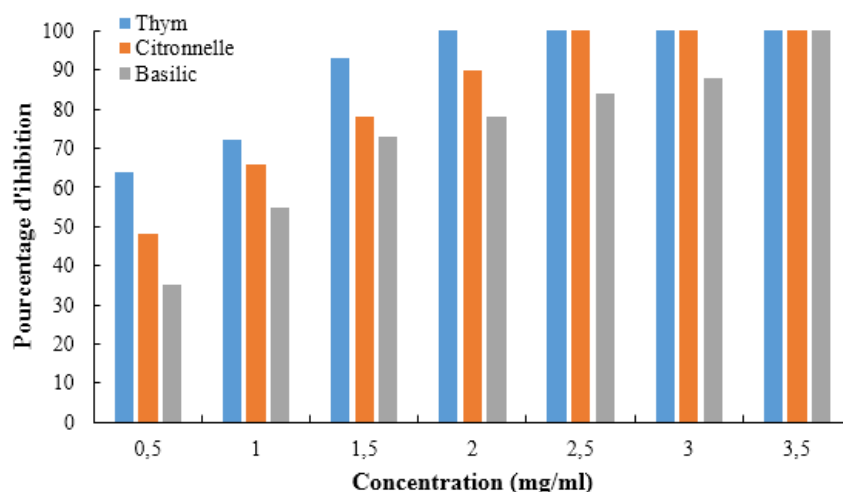




**Figure11.** Effet de l'HE de thym, citronnelle et basilic aux différentes concentrations sur la croissance de l'*A. flavus* pendant 7 jours d'incubation (Alleg, S. 2024).



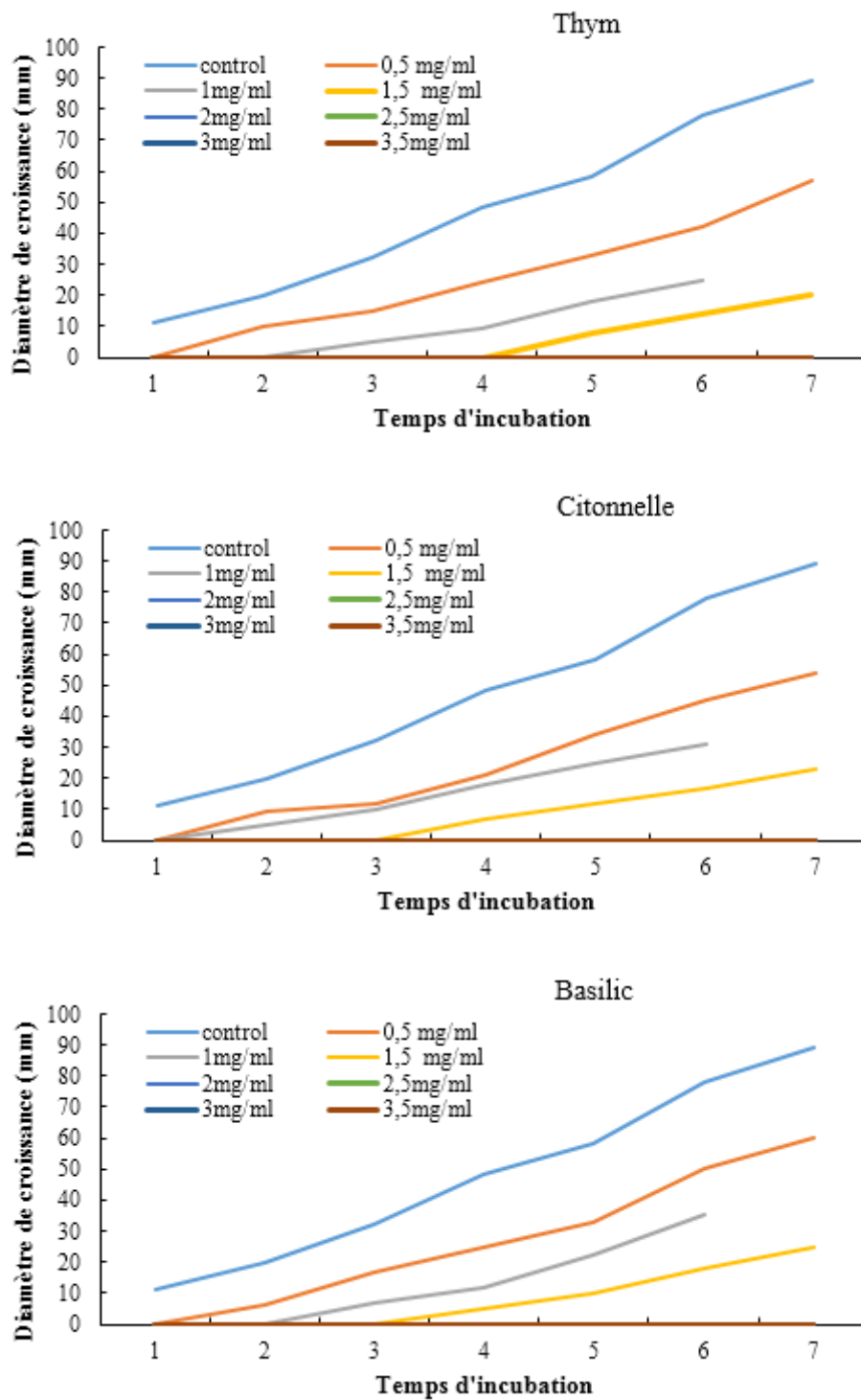
**Figure 12.** Les pourcentages d'inhibition de la croissance du mycélium de l'*A. flavus* après 7 jours d'incubation (Alleg, S. 2024).



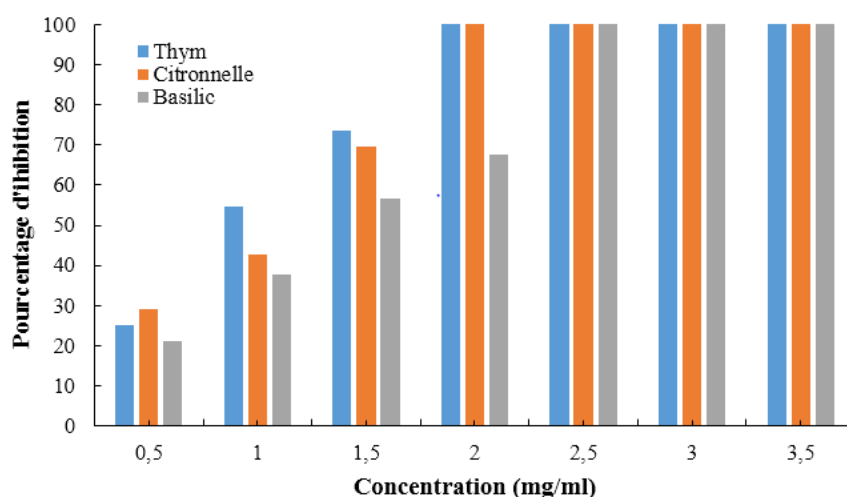
**Figure13.** Les pourcentages d'inhibition de germination des spores de l'*A. flavus* (Alleg, S. 2024).

Pour ce qui est de *A.niger*, les résultats révèlent une efficacité variable des HEs. L'HE de thym montre une inhibition partielle de la croissance à 0,5 mg/ml, atteignant 25% au jour 7. À 1 mg/ml, l'inhibition atteint 54,545%, et à 1,5 mg/ml, elle est de 73,684%. Aux concentrations de 2 mg/ml et plus, aucune croissance n'est observée, indiquant une inhibition totale de 100%. L'HE de citronnelle inhibe également la croissance d'*A.niger*, avec 28,947% d'inhibition à 0,5 mg/ml. À 1 mg/ml, l'inhibition est de 42,857%, et à 1,5 mg/ml, elle atteint 69,736%. Une inhibition totale de 100% est observée à partir de 2 mg/ml. L'HE de basilic présente une inhibition plus faible initialement, avec 21,052% à 0,5 mg/ml, mais l'efficacité augmente à 37,662% à 1 mg/ml et 56,578% à 1,5 mg/ml. Une inhibition complète de 100% est atteinte à partir de 2,5 mg/ml (**Figure 14, 15, et 16**).

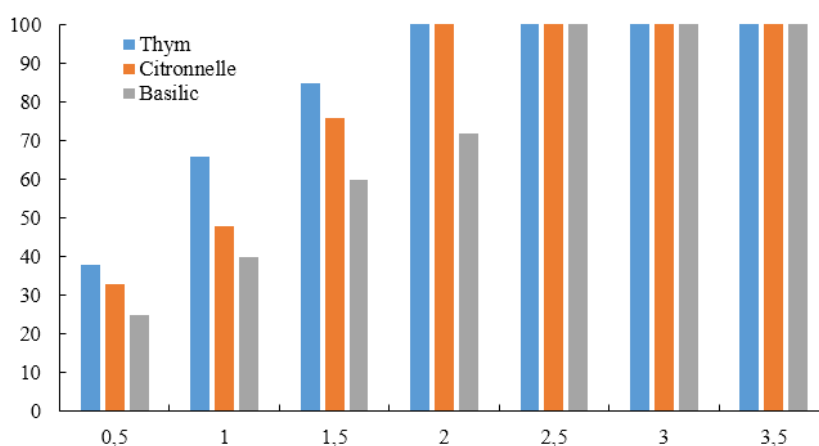
Concernant l'inhibition de la germination des spores, les HEs de thym et de citronnelle se distinguent par leur efficacité. Pour le thym, une inhibition de 38% est observée à 0,5 mg/ml, atteignant 100% à partir de 2 mg/ml. L'HE de citronnelle suit une tendance similaire, avec une inhibition de 33% à 0,5 mg/ml et une inhibition complète à 2 mg/ml. L'HE de basilic montre une inhibition initiale plus faible, avec 25% à 0,5 mg/ml, mais atteint une inhibition totale à 2,5 mg/ml.



**Figure 14.** Effet de l'HE de thym, citronnelle et basilic aux différentes concentrations sur la croissance de l'*A. niger* pendant 7 jours d'incubation (Alleg, S. 2024).



**Figure 15.** Les pourcentages d'inhibition de la croissance du mycélium de l'*A. niger* après 7 jours d'incubation (Alleg, S. 2024).



**Figure 16.** Les pourcentages d'inhibition de germination des spores de l'*A. niger* (Alleg, S. 2024).

Le mécanisme d'action des HEs au niveau cellulaire n'est pas encore entièrement élucidé. Cependant, plusieurs cibles cellulaires potentielles ont été identifiées. Composées de plusieurs types de molécules bioactives, les HEs peuvent agir simultanément sur plusieurs cibles cellulaires (Kim et al., 2006 ; Kedia et al., 2014 ; Kedia&Dubey, 2015). La nature hydrophobe des constituants des HEs facilite leur incorporation dans les membranes plasmiques et celles des organites intracellulaires (notamment les mitochondries). Ces composés peuvent alors agir en altérant la composition lipidique de la membrane. Ils sont souvent associés à une diminution des niveaux d'ergostérol (Kedia et al., 2014 ; Prakash et

**al., 2015**). Ce dernier est un lipide membranaire et un constituant majeur de la membrane cellulaire fongique, essentiel à son intégrité et au développement fongique. La déstructuration de la paroi cellulaire peut également se produire en agissant sur les membranes polysaccharidiques (galactose et galactosamine) (**Tatsadjieu et al., 2010**). Ces déséquilibres membranaires conduisent à une fuite d'organites et d'ions nécessaires à la survie des cellules fongiques. L'étude de **Tatsadjieu et al. (2010)** a ainsi démontré l'inhibition dose-dépendante de l'acidification du milieu extracellulaire par l'HE de verveine en relation avec la modulation de la croissance d'*A. flavus*.

L'inhibition de la germination des spores pourrait être attribuée à plusieurs mécanismes. D'une part, les huiles essentielles pourraient induire la dénaturation des enzymes impliquées dans le processus de germination des spores, compromettant ainsi leur fonctionnement normal. D'autre part, elles pourraient interférer avec les acides aminés essentiels nécessaires à la germination des spores, perturbant ainsi le processus (**Bajpai et Kang, 2010, Tian et al., 2012, Hu et al., 2019**). De plus, les composants des HEs pourraient également affecter la perception ou la transmission des signaux cellulaires qui régulent la transition entre la croissance végétative et le développement reproducteur, ce qui pourrait contribuer à l'inhibition de la germination des spores, comme l'ont suggéré **Negeri et al. (2014)**.

En outre, **Songsamoe et ses collaborateurs (2016)** ont rapporté que le limonène, un composant présent dans certaines HEs, pourrait altérer certaines fonctions enzymatiques impliquées dans la germination des spores, en prolongeant la phase de latence lors de la germination des spores après une exposition aux rayons UV-C. Ces divers mécanismes illustrent la complexité des interactions entre les huiles essentielles et les spores fongiques, soulignant leur potentiel en tant qu'agents antifongiques prometteurs.

L'HEde thym est la plus prometteuse pour inhiber la croissance et la germination des spores de *A.flavus* et *A.niger*, suivie par l'HEde citronnelle. Bien que nécessitant des concentrations plus élevées, l'HEde basilic reste une option viable. Ces résultats suggèrent que les HEs, en particulier celle de thym, pourraient être utilisées comme agents antifongiques naturels pour contrôler ces deux espèces d'*Aspergillus*.

La complexité des HE rend difficile la corrélation entre leur activité antifongique et des composés spécifiques. Même les composants mineurs peuvent jouer un rôle critique dans

leur efficacité, et les effets inhibiteurs semblent résulter de leur action synergique. Cela suggère que l'utilisation des HE entières peut réduire le développement de la résistance fongique et élargir le spectre des organismes sensibles à leur action, ce qui les rend potentiellement plus prometteuses dans les applications commerciales par rapport aux composés isolés (da Cruz Cabral et al., 2013).

#### 4.2. Concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration fongicide minimale (CMF) des huiles essentielles

Dans l'étude présentée, nous avons évalué la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale fongicide (CMF) de différentes HEs contre les souches d'*A.flavus* et *A. niger*, dont les résultats sont synthétisés dans le Tableau 5. Il est important de noter qu'il n'existe pas de critères universellement acceptés pour déterminer les valeurs seuils de CMI dans les essais in vitro. Cependant, selon les travaux antérieurs d'Aligiannis et al. (2001), une activité antimicrobienne est considérée comme plus forte lorsque les valeurs de CMI se situent entre 0,05 mg/ml et 0,50 mg/ml, modérée lorsque les valeurs se situent entre 0,6 mg/ml et 1,5 mg/ml, et faible lorsque les valeurs dépassent 1,50 mg/ml. Dans le cadre de notre étude, nous avons testé les concentrations allant jusqu'à un maximum de 3,50 mg/ml pour déterminer les effets inhibiteurs et fongicides des HEs sur ces souches d'*Aspergillus*.

**Table 5.** Concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration fongicide minimale (CMF) des HEs (Alleg, S. 2024).

Souche	HEs	CMI ( mg/ml)	CMF ( mg/ml)
<i>A.flavus</i>	Thym	2,00	2,00
	Citronnelle	2,50	3,00
	Basilic	3,50	>3,50
<i>A. niger</i>	Thym	2,00	2,50
	Citronnelle	2,00	3,00
	Basilic	2,50	3,00

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et les concentrations minimales fongicides (CMF) des HEs vis-à-vis des souches d'*A. flavus* et *A. niger* ont été évaluées en utilisant la méthode de dilution en milieu liquide PDB. Cette méthode présente l'avantage de permettre aux HEs d'entrer en contact étroit avec les spores fongiques et de se diffuser de manière homogène dans le milieu, comme démontré par **Kalemba et Kunicka (2003)**. **Sharma et Tripathi (2008)** ont également confirmé que cette méthode de dilution est plus efficace pour évaluer l'activité antifongique des HEs. Des observations similaires ont été rapportées par **Hammer et al. (2003)**. Cependant, un inconvénient de cette méthode est qu'elle nécessite une grande quantité d'HE (**Mesa-Arango et al., 2009**).

La valeur de la CMI est importante car elle indique la plus faible concentration d'un agent antifongique nécessaire pour inhiber la croissance d'une moisissure. Ainsi, une CMI plus basse signifie qu'une quantité moindre de l'agent est nécessaire pour contrôler la croissance du champignon. Par conséquent, des extraits présentant une CMI plus basse sont considérés comme des agents antifongiques plus efficaces car ils sont capables d'inhiber la croissance fongique à des concentrations plus faibles. En revanche, la CMF est la plus faible concentration d'un agent antifongique qui tue complètement le champignon plutôt que de simplement inhiber sa croissance. Généralement, les CMF sont relativement plus élevées que les CMI, ce qui indique que l'effet des agents antifongiques est principalement fongistatique, c'est-à-dire qu'ils inhibent la croissance fongique sans nécessairement tuer les moisissures.

Pour obtenir une vision globale de l'activité des HEs sur un éventail significatif de microorganismes, il est nécessaire de multiplier les expérimentations, ce qui génère une quantité importante de résultats. Cependant, la comparaison précise de ces données est complexe pour plusieurs raisons :

- La composition chimique et la nature des HEs influent sur leur action antifongique. Les chémotypes au sein d'une même famille botanique peuvent varier, et la composition exacte des huiles étudiées n'est pas toujours spécifiée dans la littérature, ce qui peut avoir un impact sur leur activité.
- L'action des HEs dépend également du microorganisme ciblé.

- Les différentes méthodes utilisées pour évaluer l'activité des HEs contribuent à la variabilité des résultats. Les HEs sont souvent insolubles dans l'eau ou dans les milieux utilisés en microbiologie, ce qui entraîne l'utilisation de techniques variées telles que l'ajout de surfactants pour solubiliser l'huile, la dilution ou non dans un solvant, l'utilisation de différents milieux de culture et des durées d'incubation variables.

De plus, les termes CMI et CMF ne sont pas universellement définis, et les auteurs peuvent exprimer les résultats dans différentes unités telles que % (v/v),  $\mu\text{g/ml}$ ,  $\mu\text{l/ml}$  ou  $\text{mg/ml}$ , ce qui rend la comparaison des résultats difficile. Tous ces facteurs peuvent contribuer aux divergences observées dans les résultats de CMI entre les études.

## Conclusion

L'étude entreprise a permis de démontrer l'efficacité potentielle des huiles essentielles (HEs) en tant qu'agents antifongiques naturels contre des souches d'*Aspergillus flavus* et d'*Aspergillus niger* isolées d'échantillons de pain. Les résultats obtenus montrent que les HEs de thym, de citronnelle et de basilic possèdent des propriétés antifongiques significatives, avec des variations dans leur efficacité selon la concentration et la composition chimique spécifique de chaque huile.

Les tests ont révélé que le thym et la citronnelle sont particulièrement efficaces pour inhiber la croissance mycélienne et la germination des spores des deux espèces d'*Aspergillus*, ce qui souligne leur potentiel comme alternatives naturelles aux fongicides chimiques. Ces découvertes sont importantes, car elles offrent des solutions plus sûres et plus respectueuses de l'environnement pour la protection des denrées alimentaires contre les contaminations fongiques.

Cependant, il convient de noter que l'efficacité des HEs dépend fortement de leur composition chimique, ce qui suggère la nécessité de standardiser les méthodes d'extraction et d'application pour maximiser leur effet antifongique. En outre, des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre pleinement les mécanismes d'action des HEs et évaluer leur efficacité dans des conditions réelles de stockage et de conservation des aliments.

En conclusion, cette recherche ouvre la voie à l'utilisation des huiles essentielles comme une alternative prometteuse aux fongicides de synthèse, contribuant ainsi à la sécurité alimentaire et à la réduction des risques pour la santé humaine et l'environnement. La poursuite de ces travaux pourrait aboutir à des innovations importantes dans le domaine de la conservation des aliments et de la lutte contre les contaminants fongiques.

## Références bibliographiques

1. Albuquerque, U. P., Lucena, R. F., Monteiro, J. M., Florentino, A. T., & Cecília de Fátima, C. B. R. (2006). Evaluating two quantitative ethnobotanical techniques. *Ethnobotany Research and Applications*, 4, 051-060.
2. Amado-Filho, G. M., Maneveldt, G., Manso, R. C. C., Marins-Rosa, B. V., Pacheco, M. R., & Guimarães, S. M. P. B. (2007). Structure of rhodolith beds from 4 to 55 meters deep along the southern coast of Espírito Santo State, Brazil. *Ciencias marinas*, 33(4), 399-410.
3. Bajpai, P., & Kumar, M. (2010). Genetic algorithm—an approach to solve global optimization problems. *Indian Journal of computer science and engineering*, 1(3), 199-206.
4. Bajpai, V.K.; Kang, S.; Xu, H.; Lee, S.G.; Baek, K.H.; Kang, S.-C. Potential roles of essential oils on controlling plant pathogenic bacteria *Xanthomonas* species: A review. *Plant Pathol. J.* 2011, 27, 207–224. Baker B.P., Grant J.A. Lemongrass Oil Profile. 2018. [(accessed on 30 March 2022)]. Available online: <https://ecommons.cornell.edu/handle/1813/56130>
5. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils--a review. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 46(2), 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
6. Ben Miri, Y., Arino, A., & Djenane, D. (2018). Study of antifungal, anti-aflatoxicogenic, antioxidant activity and phytotoxicity of Algerian Citrus limon var. Eureka and Citrus sinensis var. Valencia essential oils. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21(2), 345-361.
7. Benabdelkader, T. (2012). Biodiversité, bioactivité et biosynthèse des composés terpéniques volatils des lavandes ailées, *Lavandula stoechas* sensu lato, un complexe d'espèces méditerranéennes d'intérêt pharmacologique (Doctoral dissertation, Université Jean Monnet-Saint-Etienne; Ecole normale supérieure de Kouba (Alger)).
8. Bhagat, S., Sood, M., Sood, A., & Sood, N. (2014). *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf: A comprehensive review on its ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 10, 68-80.

9. Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.
10. Charles, D. J., & Simon, J. E. (1990). Comparison of extraction methods for the rapid determination of essential oil content and composition of basil. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 115(3), 458-462.
11. Charles, D. J., & Simon, J. E. (1990). Comparison of extraction methods for the rapid determination of essential oil content and composition of basil. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 115(3), 458-462.
12. Chemat, S., & Esvelde, E. D. (2013). Contribution of microwaves or ultrasonics on carvone and limonene recovery from dill fruits (*Anethum graveolens* L.). *Innovative food science & emerging technologies*, 17, 114-119.
13. da Cruz Cabral, L., Pinto, V. F., & Patriarca, A. (2013). Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International journal of food microbiology*, 166(1), 1-14.
14. Degryse, H., & Ongena, S. (2008). Competition and regulation in the banking sector: A review of the empirical evidence on the sources of bank rents. *Handbook of financial intermediation and banking*, 2008, 483-554.
15. Djenane, D. (2015). Chemical profile, antibacterial and antioxidant activity of Algerian citrus essential oils and their application in *Sardina pilchardus*. *Foods*, 4(2), 208-228.
16. Djenane, D. (2015). Chemical profile, antibacterial and antioxidant activity of Algerian citrus essential oils and their application in *Sardina pilchardus*. *Foods*, 4(2), 208-228.
17. D'Mello, J. F. (1997). *Handbook of plant and fungal toxicants*. CRC press
18. Edris A. E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy research : PTR*, 21(4), 308–323. <https://doi.org/10.1002/ptr.2072>
19. Ferhat, M. A., Boukhatem, M. N., Hazzit, M., & Chemat, F. (2016). Rapid extraction of volatile compounds from Citrus fruits using a microwavedry distillation. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 8(3), 753-781.
20. Fernández, V., & Brown, P. H. (2013). From plant surface to plant metabolism: the uncertain fate of foliar-applied nutrients. *Frontiers in plant science*, 4, 289.
21. Fratianni, F., De Martino, L., Melone, A., De Feo, V., Coppola, R., & Nazzaro, F. (2010). Preservation of chicken breast meat treated with thyme and balm essential

- oils. Journal of food science, 75(M528–M535). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01791.x>
22. Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6), 985-990.
  23. Health N.C.f.E. Basic Facts about Mold and Dampness. [(accessed on 30 August 2021)]; Available online: <https://www.cdc.gov/mold/faqs.htm>
  24. Heiss, R. (1955). Die Butyrometrie nach Gerber und Heiss: Ein Beitrag zur Milchwirtschaft. *Milchwirtschaftliche Berichte*.
  25. Hernandez Ochoa, L. R. (2005). Substitution desolvants et matières actives de synthèse par uncombine (solvant/actif) d'origine végétale. Thèse de Doctorat en Science des Procédés (option Sciences des Agroressources), Institut National Polytechnique, Toulouse, France.
  26. Hiltunen, R., & Holm, Y. (1999). Basil: The genus *Ocimum*. CRC Press. - Simon, J. E., Morales, M. R., Phippen, W. B., Vieira, R. F., & Hao, Z. (1990). Basil: A source of aroma compounds and a popular culinary and ornamental herb. In *Perspectives on new crops and new uses*. ASHS Press.
  27. Hu, Y., Zhang, J., Kong, W., Zhao, G., & Yang, M. (2017). Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*. *Food chemistry*, 220, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.179>
  28. Hubert, R. (1992). *Epices et aromates*. Edition Tec & Doc, Lavoisier, France.
  29. Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in microbiology*, 3, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>
  30. Isman, M. B., & Machial, C. M. (2006). Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. *Advances in phytomedicine*, 3, 29-44.
  31. Jung, B., Park, J., Kim, N., Li, T., Kim, S., Bartley, L. E., ... & Lee, J. (2018). Cooperative interactions between seed-borne bacterial and air-borne fungal pathogens on rice. *Nature communications*, 9(1), 31.
  32. Jung, R., Morasch, R., Karayaylali, P., Phillips, K., Maglia, F., Stinner, C., ... & Gasteiger, H. A. (2018). Effect of ambient storage on the degradation of Ni-rich

- positive electrode materials (NMC811) for Li-ion batteries. *Journal of The Electrochemical Society*, 165(2), A132.
33. Kalembe, D. A. A. K., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, 10(10), 813-829.
34. Kalembe, D., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current medicinal chemistry*, 10(10), 813–829. <https://doi.org/10.2174/0929867033457719>
35. Klich, M. A. (2009). Health effects of *Aspergillus* in food and air. *Toxicology and Industrial Health*, 25(9-10), 657-667.
36. Lang, G.; Buchbauer, G. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour Fragr. J.* 2012, 27, 13–39.
37. Li, P., Legault, J., & Litcofsky, K. A. (2014). Neuroplasticity as a function of second language learning: Anatomical changes in the human brain. *Cortex*, 58, 301-324.
38. Lucas, J. A., Hawkins, N. J., & Fraaije, B. A. (2015). The evolution of fungicide resistance. *Advances in Applied Microbiology*, 90, 29-92.
39. Lucchesi, M. E. (2005). Extraction sans solvant assistée par micro-ondes: conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat en Sciences (option: Chimie), Faculté des Sciences et Technologies, Université de la Réunion, France.
40. Marsili, O. (2002). Technological regimes and sources of entrepreneurship. *Small Business Economics*, 19, 217-231.
41. Mesa-Arango, A. C., Montiel-Ramos, J., Zapata, B., Durán, C., Betancur-Galvis, L., & Stashenko, E. (2009). Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) NE Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 878-884.

42. Miri, Y. B., Benabdallah, A., Taoudiat, A., Mahdid, M., Djenane, D., Tacer-Caba, Z., ... & Simal-Gandara, J. (2023). Potential of essential oils for protection of Couscous against *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 contamination. *Food Control*, 145, 109474.
43. Mukarram M., Choudhary S., Khan M.A., Poltronieri P., Khan M.M.A., Ali J., Kurjak D., Shahid M. Lemongrass Essential Oil Components with Antimicrobial and Anticancer Activities. *Antioxidants*. 2021;11:20. doi: 10.3390/antiox11010020.
44. Negeri, E. L. (2014). Assessment of risky sexual behaviors and risk perception among youths in Western Ethiopia: the influences of family and peers: a comparative cross-sectional study. *BMC Public Health*, 14, 1-12.
45. Omotayo, O. P., Omotayo, A. O., Mwanza, M., & Babalola, O. O. (2019). Prevalence of mycotoxins and their consequences on human health. *Toxicological research*, 35, 1-7.
46. Pharmacopée Européenne. (2007). Direction de la Qualité du Médicament & Soins de Santé du Conseil de l'Europe (DEQM), Strasbourg, France.
47. Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage* (Vol. 519, p. 388). New York: Springer.
48. Prakash, B., et al. (2012). Efficacy of essential oils in food preservation and their synergistic interactions with other preservatives: a review.
49. Scheidegger, K. A., & Payne, G. A. (2003). Unlocking the secrets behind secondary metabolism: a review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 22(2-3), 423-459.
50. Scriba, G. K. (2003). Pharmaceutical and biomedical applications of chiral capillary electrophoresis and capillary electrochromatography: An update. *Electrophoresis*, 24(15), 2409-2421.
51. Sharma, N., & Tripathi, A. (2008). Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological research*, 163(3), 337-344.
52. Sharma, P., Sharma, S., & Purohit, S. K. (2016). Antimicrobial and anti-inflammatory properties of medicinal plants: *Cymbopogon citratus*. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 8(3), 134-138.
53. Shreaz, S., Bhatia, R., Khan, N., Muralidhar, S., Manzoor, N., Khan, L. A., & Rao, R. (2016). Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents

- targeting cell wall integrity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1860(11), 2428-2437.
54. Shukla, N., Fallahi, A., & Kosny, J. (2012). Performance characterization of PCM impregnated gypsum board for building applications. *Energy Procedia*, 30, 370-379.
55. Smith, G. A., Nickels, J. S., Kerger, B. D., Davis, J. D., Collins, S. P., Wilson, J. T., ... & White, D. C. (1986). Quantitative characterization of microbial biomass and community structure in subsurface material: a prokaryotic consortium responsive to organic contamination. *Canadian journal of microbiology*, 32(2), 104-111.
56. Stewart, D., Wilson, H., Yeadon, M., & Yeadon, S. (2001). Pesticide reduction programs in Denmark: Policy strategies and impacts. *Environmental Science & Policy*, 4(3), 179-195.
57. Tadtong, S., Puangpronpitag, D., Chitprasert, S., & Mahabusarakam, W. (2009). Essential oil from *Cymbopogon citratus* as an effective antimalarial, antibacterial, antifungal and antioxidant: Its activity and chemical components. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 6(1), 1-9.
58. Tatsadjieu, N. L., Maïworé, J., Hadjia, M. B., Loiseau, G., Montet, D., & Mbofung, C. M. F. (2010). Study of the microbial diversity of *Oreochromis niloticus* of three lakes of Cameroon by PCR-DGGE: Application to the determination of the geographical origin. *Food control*, 21(5), 673-678.
59. 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(2-3), 464-470. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.023>
60. Tian, X., Liu, Z., Niu, B., Zhang, J., Tan, T. K., Lee, S. R., ... & Zheng, G. (2011). E-cadherin/ $\beta$ -catenin complex and the epithelial barrier. *BioMed Research International*, 2011(1), 567305.
61. Ultee, A., Kets, E. P., & Smid, E. J. (2002). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4606-4610.
62. Venkatesh, N., & Keller, N. P. (2019). Mycotoxins in conversation with bacteria and fungi. *Frontiers in microbiology*, 10, 435647.
63. Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. A. (2008). Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of Food Science*, 73(9), R117-R124.

## **Annexe I**

### **Appareillage**

- Agitateur magnétique.
- Autoclave.
- Spectrophotomètre : UV/ visible
- pH-mètre
- Balance analytique.
- Four à moufle.
- Micropipettes.
- Plaque chauffante.
- Etuve.
- Bec benzène.
- Microscope optique.

### **Verreries**

- Bêches.
- Entonnoirs.
- Eprouvettes graduées à pied.
- Erlenmeyers.
- Fioles jaugées à 1 trait.
- Pipettes graduées à écoulement.
- Tubes à essai.

- Agar
- Chloramphénicol
- Citrate d'ammonium ferreux
- Cu SO<sub>4</sub>, 5 H<sub>2</sub>O
- Czapek Concentré
- Dichloran (2,6 dichloro-4-nitroaniline)
- Eau distillée
- Extrait de levure
- Extrait de Malt
- Fe SO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O
- Glucose
- Glycérol
- KCl
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- KNO<sub>3</sub>
- NaNO<sub>3</sub>
- Noix de coco
- Peptone
- Pomme de terre
- Saccharose
- Zn SO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O
- β-cyclodextrine (β-cyd)
- Méthanol
- Tween-80
- Alcool isoamylique
- Standard analytique AFB1
- Huile à immersion
- Plaque CCM
- Toluène

## Annexe II

### Compositions des milieux de culture

#### Milieu PDA (Pomme de terre, Dextrose, Agar)

Pomme de terre .....	200 g
Agar .....	15 g
Glucose .....	20 g
Eau distillée .....	1000 ml
pH= 5,6 ± 0,2	

#### Extract de Malt Agar (MEA)

Extrait de Malt.....	20 g
Glucose.....	20 g
Peptone.....	20g
Eau distillée .....	1000 ml
pH=5,6 ± 0,2	

#### G25N (25% Glycérol Nitrate Agar)

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,75g
Czapek Concentre.....	7,5ml
Extrait de levure.....	3,7g
Glycérol.....	250g
Agar.....	12g
Eau distillée.....	750ml
pH=7	

#### Czapek concentré

NaNO <sub>3</sub> .....	30 g
KCl .....	5 g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O .....	5 g
Fe SO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O .....	0,1 g
Zn SO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O .....	0,1 g
Cu SO <sub>4</sub> , 5 H <sub>2</sub> O .....	0,05 g

#### Milieu CYA (Czapek Yeast extract Agar)

Saccharose .....	30 g
Extrait de levure .....	5 g
Czapek concentré .....	10 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1 g

Agar ..... 15 g  
Eau distillée ..... 1000 ml

pH= 6,7 ± 0,2

**Milieu AFPA**

Peptone ..... 10 g  
Extrait de levure ..... 20 g

Citrate d'ammonium ferreux ..... 0,5g

Chloramphénicol ..... 100 mg

Agar ..... 15g

Dichloran (2,6 dichloro-4-nitroaniline) ..... 2mg

Eau distillée ..... 1000 ml

pH= 6± 0,2

**Milieu à base d'extrait de noix de coco gélosé (Coconut Agar Medium) (CAM)**

Noix de coco ..... 100g

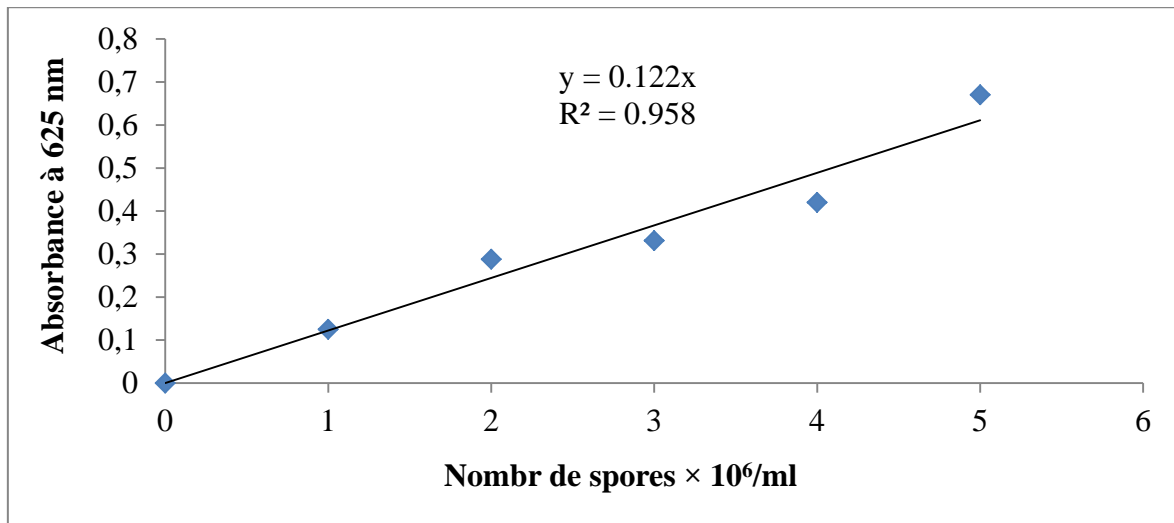
Agar ..... 20g

β-cyclodextrine (β-cyd) ..... 3g

Eau distillée ..... 1000ml

pH=7

### Annexe III



**Figure 1.** Courbe d'étalonnage des spores d' *Aspergillus flavus*.

## Annexe VI



**Figure 1** A :.Préparation de Milieu culture PDA,B : Préparation suspension fongique  $1 \times 10^6$  Spores/ml,C : préparation gamme de concentration,D : Le spectrophotomètre, F : solution mère de HE,H : CMI, I : Ph de miliru PDA, J : les soucges *A.flavus* et *A.niger*, K : Résultats de gamme de concentration *A. flavus*, L : gamme de concentration *A. Niger* (Alleg, S. 2024).