

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

UNIVERSITE MENTOURI CONSTANTINE
INSTITUT DE LA NUTRITION, DE L'ALIMENTATION
ET DES TECHNOLOGIES ARGO-ALIMENTAIRES
(I.N.A.T.A.A)

Département des Technologies Alimentaires

N° d'ordre :

N° de série :

Mémoire

**présenté pour l'obtention du diplôme de Magister en Sciences
Alimentaires**

Option : Technologie alimentaire

Thème :

**Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile
essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* sur les
moisissures des légumes secs**

Présenté par : M^{elle} LAIB Imène

Soutenu le: 16 / 06 / 2011

Devant le jury :

Président :	Pr. NAMOUNE H.	Professeur	U.M.C.
Encadreur :	Dr. BARKAT M.	M.C.A	U.M.C.
Examinatrices :	Dr. AMOURACHE L.	M.C.A	U.M.C.
	Dr. KHARROUB K.	M.C.A	U.M.C.

Année universitaire : 2010/2011

Remerciements

J'exprime mes remerciements et mes sincères gratitudees au Dr BARKAT M. pour ses orientations et aides durant l'élaboration de ce travail.

A Monsieur le professeur NAMOUNE H., pour avoir l'honneur de présider ce jury, qu'il soit assuré de mes remerciements.

A Dr : AMOURACHE L. et Dr. KHARROUB K. pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

Mes remerciements vont également à Monsieur BRAHIMI responsable du Laboratoire du complexe GLK1/K, Skikda.

A Messieurs : FOUFOU A. Chef de Département d'Agronomie, université Skikda, LAIB M.,
Chef de Département de biologie, université Skikda.

Enfin, à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail veuillez bien accepter ici l'expression de ma gratitude.

Dédicaces

A ma mère, à mon père.

A mes très chers frères : Djamel eddine et Zinou.

A ceux, qui me sont chers, Je dédie ce travail.

M^{elle} LAIB Imène

SOMMAIRE

Introduction	1
Partie 1 : Synthèse bibliographique	
Chapitre 1 : Les légumes secs	
1. Généralités.....	3
2. Composition biochimique.....	4
3. Stockage.....	5
3.1. Méthodes de stockage traditionnel.....	5
3.2. Le stockage en sac.....	5
3.3. Le stockage en vrac.....	6
3.4 Le stockage en silos.....	6
4. Microbiologie des légumes secs.....	6
4.1. La flore du champ.....	6
4.2. La flore intermédiaire.....	6
4.3 La flore de stockage.....	7
5. Altérations des légumes secs.....	7
5.1. Les altérations d'origine biologique.....	7
5.1.1. Les microorganismes.....	7
5.1.2. Les prédateurs.....	8
5.2 Altérations d'origine physicochimique.....	8
5.2.1. Le facteur temps.....	8
5.2.2. Les facteurs température et hydratation.....	8
5.2.3. Le facteur composition de l'atmosphère.....	9
5.3. Les altérations d'origine endogène.....	9
5.3.1. Par action des enzymes.....	9
5.3.2. Par respiration.....	10
5.3.3. Par fermentation anaérobie.....	10
5.3.4. Par germination.....	10
6. Conséquences des altérations sur la composition biochimique et la valeur marchande des légumes secs.....	10
6.1. Dégradation des lipides.....	11
6.2. Dégradation des protéines.....	11
6.3. Dégradation des glucides.....	12
6.4. Biosynthèse des mycotoxines.....	12

7. Procédés de traitement des légumes secs.....	13
7.1. Produits chimiques.....	13
7.2. Traitements physiques.....	14
7.3. Lutte biologique.....	14
7.4. Produits naturels.....	15

Chapitre II : Moisissures

1. Caractères généraux.....	16
2. Classification.....	16
3. Mode de développement et reproduction.....	17
3.1. Facteurs nutritifs.....	17
3.1.1. Source de carbone.....	17
3.1.2. Source d'azote.....	17
3.1.3 Source d'éléments minéraux et vitamine.....	17
3.2. Modes de reproduction.....	17
3.2.1. La reproduction sexuée.....	18
3.2.2. La reproduction végétative.....	18
3.3. Isolement et identification des moisissures.....	18
3.4. Identification des moisissures.....	19
3.4.1. Identification morphologique.....	19
3.4.2. Identification génétique.....	19

Chapitre III : Les huiles essentielles

1. Définition.....	21
2. Localisation des huiles essentielles dans la plante.....	21
3. Rôles et propriétés des huiles essentielles.....	22
4. Composition chimique.....	22
5. Propriétés physicochimiques.....	23
6. Facteurs de variabilité de la composition des huiles essentielles.....	24
6.1. Les facteurs intrinsèques.....	24
6.2. Les facteurs extrinsèques.....	24
7. Toxicité des huiles essentielles.....	25
8. Activités biologiques des huiles essentielles.....	25
8.1. Activité antioxydante.....	26
8.2. Activité antibactérienne.....	26
8.3. Activité antifongique.....	27

9. Méthodes d'extraction et d'identification des composés des huiles essentielles.....	28
9.1. Méthodes d'extraction.....	28
9.1.1. Extraction entraînement à la vapeur d'eau.....	28
9.1.2 Extraction par hydro distillation d'huile essentielle.....	28
9.1.3 Expression à froid.....	28
9.1.4 Extraction par solvants organiques.....	28
9.1.5 Extraction par fluide à l'état supercritique.....	29
9.2 Méthodes d'identification des composés des huiles essentielles.....	29
9.2.1 Chromatographie en phase gazeuse(CPG).....	30
9.2.2 Le couplage CG/SM.....	30

Partie 2 : Partie pratique

Matériel et méthodes

1. Matériel et méthodes.....	32
1.1 Matériel végétal.....	32
1.1.1 Description de la plante.....	32
1.1.2 Collecte.....	32
1.1.3 Détermination de l'humidité.....	32
1.1.4 Séchage et conservation.....	33
1.2 Méthodes d'analyse.....	33
1.2.1. Extraction de l'huile essentielle.....	33
1.2.1.1. Description du dispositif d'extraction.....	33
1.2.1.2. Procédé d'extraction.....	34
1.2.1.3 Détermination de la cinétique et du rendement d'extraction.....	34
1.2.1.4 Conservation de l'huile essentielle obtenue.....	34
2.Détermination de la composition chimique de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse.....	35
3.Evaluation de l'activité antioxydante.....	35
3.1 Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH*.....	35
3.1.1 Principe.....	35
3.1.2 Mode opératoire.....	36
3.2 Détermination du pourcentage d'inhibition.....	36
3.3 Détermination du temps d'équilibre TEC50.....	36
3.4 Détermination de l'efficacité antiradicalaire EA.....	37
4. Recherche et identification moisissures des légumes secs.....	37

4.1	Présentation des échantillons.....	37
4.2	Triage des grains.....	37
4.3	Mesure de l'humidité des grains.....	37
4.4	Dénombrement des moisissures.....	38
4.4.1.	Observation et repiquage des mycéliums.....	38
4.4.2.	Purification.....	38
4.4.3.	Identification.....	38
4.4.4.	Etude des caractères macroscopique.....	39
4.4.5	Etude des caractères microscopiques et de la sexualité.....	39
4.4.6.	Conservation des souches.....	40
5.	Evaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle de <i>Lavandula officinalis</i>	40
5.1	Utilisation de souches tests.....	40
5.1.1	Choix et origine des souches tests.....	40
5.2.	Test antifongique.....	41
5.2.1	Préparation des solutions de l'huile essentielle.....	41
5.2.2.	Technique de dilution en milieu solide.....	41
5.2.3	Technique de dilution en milieu liquide.....	42
5.2.3.1	Détermination des CMI.....	42
5.2.3.2	Détermination des CMF et CFS.....	43
6.	Traitement statistique.....	43

Résultats et discussion

1.	Huile essentielle.....	44
1.1	Taux d'humidité de la matière végétale.....	44
1.2.	Cinétique d'extraction de l'huile essentielle et rendement en huile essentielle.....	44
1.2.1	Cinétique d'extraction de l'huile essentielle.....	44
1.3	Rendement en huile essentielle.....	45
1.4.	Principaux composés de l'huile essentielle détectés par la chromatographie en phase gazeuse.....	45
1.5	Activité antioxydante.....	48
1.5.1	Cinétique de la réaction.....	48
1.5.2	Détermination du pourcentage d'inhibition.....	49

1.5.3. Détermination d'IC50.....	50
1.5.4. Détermination de TC50.....	51
1.5.5. Paramètre d'efficacité antiradicalaire.....	51
2. Taux d'humidité et les principaux genres de moisissures détectés dans les échantillons de légumes secs étudiés.....	53
2.1. Taux d'humidité des échantillons des légumes secs.....	53
2.2. Isolement.....	53
2.3. Identification des genres.....	54
2.4. Discussion	63
3. Activité antifongique de l'huile essentielle de <i>Lavandula officinalis</i>	65
3.1 Sur les souches tests.....	65
3.1.1 Taux d'inhibition.....	65
3.1.2 Concentrations minimales inhibitrices(CMI).....	67
3.1.3 Activités fongistatique et fongicide.....	68
3.2 Sur les souches isolées des légumes secs.....	68
3.2.1 Taux d'inhibition.....	68
3.2.2 Concentrations inhibitrices minimales(CMI).....	73
3.2.3 Activités fongistatique et fongicide.....	74
3.3 Discussion.....	75
3.4 Conclusion.....	80
Références bibliographiques.....	82
Annexes	
Résumé	

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Superficie et production des légumes secs en Algérie (2006-2009).....	4
Tableau 2 : Concentration en% et temps de rétention des différents composés obtenus par analyse chromatographique en phase gazeuse de l'huile essentielle de <i>Lavandula officinalis</i>	46
Tableau 3 : Les paramètres de calcul de l'activité antioxydante.....	52
Tableau 4 : Taux d'humidité des grains des différents échantillons des légumes secs.....	53
Tableau 5: Caractères macroscopiques des souches isolées des haricots.....	55
Tableau 6: Caractères macroscopiques des souches isolées des pois chiches.....	56
Tableau 7: Caractères macroscopiques des souches isolés des fèves.....	57
Tableau 8 : Caractères macroscopiques des souches isolées des petits pois.....	58
Tableau 9: Caractères microscopiques des souches isolées des légumes secs.....	59
Tableau 10: CMI ($\mu\text{g/ml}$) des extraits en milieu liquide.....	67
Tableau 11: Activités fongistatique (CFS) et fongicide (CMF) en $\mu\text{g/ml}$ de l'huile essentielle de <i>Lavandula officinalis</i> sur les micromycètes filamenteux.....	68
Tableau 12 : CMI ($\mu\text{g/ml}$) de l'huile essentielle de <i>Lavandula officinalis</i> en milieu liquide.....	73
Tableau 13: Activités fongistatique (CFS) et fongicide (CMF) en $\mu\text{g/ml}$ de l'huile essentielle de <i>Lavandula officinalis</i> sur les souches isolées.....	74

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Classification des champignons.....	16
Figure 2 : Dispositif de l'hydro distillation.....	33
Figure 3 : Taux d'humidité de <i>Lavandula officinalis</i>	44
Figure 4 : Cinétique d'extraction d'huile de la lavande.....	44
Figure 5 :Chromatogramme de l'HE de <i>Lavandula officinalis</i> obtenu par CPG.....	47
Figure 6 : Cinétique de réduction du DPPH*.....	48
Figure 7: Pourcentage d'inhibition pour l'huile essentielle et la vitamine E.....	49
Figure 8: Calcul d'IC50 pour l'huile essentielle de la lavande.....	50
Figure 9: Valeurs d'IC50.....	50
Figure 10: Valeurs de TC50.....	51
Figure 11 : Taux de contamination des légumes secs.....	62
Figure 12 : Taux d'inhibition des extraits vis-à-vis des quatre souches testées.....	65
Figure 13 : Taux d'inhibition de l'huile essentielle de <i>Lavandula officinalis</i> vis-à-vis d' <i>Aspergillus niger</i>	66
Figure 14 : Taux d'inhibition de l'huile essentielle de <i>Lavandula officinalis</i> vis-à-vis d' <i>Aspergillus fumigatus</i>	67
Figure 15 : Taux d'inhibition des moisissures isolées des légumes secs.....	69
Figure 16: Taux d'inhibition de l'huile essentielle de <i>Lavandula officinalis</i> vis-à-vis de <i>Penicillium</i> isolé des haricots secs.....	70
Figure 17: Taux d'inhibition de l'huile essentielle de <i>Lavandula officinalis</i> vis-à-vis d' <i>Aspergillus</i> isolé des pois chiches.....	70
Figure 18 : Taux d'inhibition de l'huile essentielle de <i>Lavandula officinalis</i> vis-à-vis de <i>Aspergillus</i> isolé des petits pois.....	71
Figure 19: Taux d'inhibition de l'huile essentielle de <i>Lavandula officinalis</i> vis-à-vis de <i>Penicillium</i> isolé des fèves.....	71

LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

% :Pourcentage

°C : Degré CELSIUS

µg : Microgramme

A : absorbance

AFNOR : la norme de l'Association Française de Normalisation

Aw : Activité d'eau

CFS : concentration fongistatique

cm : centimètre

CMF : concentration minimales fongicide

CMI : concentration minimale inhibitrice

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

dC = Diamètre de colonies dans les boîtes « témoins positifs »

dE = Diamètre de colonies dans les boîtes contenant l'extrait de plante

DPPH : Diphenylpicrylhydrazine

DPPH⁺ : 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl

DSASI : Direction des statistiques agricoles et des systèmes d'information

EA : Efficacité antiradicalaire

FAO : Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture

g : Gramme

H (%) : Taux d'humidité exprimé en pourcentage

h : Heure

H' (%) : Taux d'humidité d'échantillon de légume sec exprimé en pourcentage.

HE : Huile essentielle

I% : Pourcentage d'inhibition

I' (%) = Taux d'inhibition des moisissures exprimé en pourcentage

IC50: Concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du DPPH• initiale de 50%.

ITGC : Institut national des technologies grandes cultures

KGy : kilogray, unité de mesure de dose absorbée du Système international, valant 10³ grays.

Km : Kilomètre

M' : Masse d'huile essentielle en gramme à partir des fleurs sèches

M : Masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme

M : Masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme

m : Mètre

m/m : Masse par masse M1 Poids de l'échantillon en gramme (plante fraîche)

M'1= Poids de l'échantillon de légume sec en gramme avant séchage.

M'2 = Poids de l'échantillon de légume sec en gramme après le séchage.

M2 : Poids de l'échantillon en gramme après le séchage

ml : Millilitre

mn : Minute

nm : Nanomètre

OMS : Organisation mondiale de la Santé

PCR : Polymerase chain reaction

R• : Radical libre

RESALA : Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation

RH : Antioxydant

RHE : Rendement en Huile Essentielle

TEC50 : Temps d'équilibre avec une concentration d'antioxydant égale à IC50.

Introduction

En Algérie, les légumineuses occupent une place importante et constituent avec les céréales l'épine dorsale du système alimentaire. De nombreuses espèces de légumineuses sont utilisées comme ressources d'alimentation humaine (fève, soja, haricot, pois chiche, lentille, etc.) (**Khelil, 1977**).

En effet, les grains des légumes secs s'altèrent rapidement s'ils sont stockés dans conditions défavorables. Plusieurs phénomènes en sont la cause (insectes, microorganismes, oxydation, etc.) (**Terrain et Grallet, 2003**).

Avec la révolution dans le domaine agro-alimentaire, l'espèce humaine doit maximiser sa production alimentaire afin d'assurer une alimentation adéquate pour la population mondiale. Pour ce faire elle doit réduire l'abondance des espèces qui sont en compétition alimentaire avec elle et mettre ces produits à l'abri de toutes altérations. (**Khelil, 1977**).

Parmi les microorganismes, les moisissures représentent le groupe le plus diversifié et le plus riche en nombre d'espèces. Les moisissures des légumes secs stockés peuvent causer des pertes importantes en réduisant la qualité et/ou la quantité des légumes secs stockés (**Terrain et Grallet, 2003**). D'après la FAO, les pertes correspondent à 35% de la production agricole mondiale des légumes secs (**Khelil, 1977**).

En raison de son efficacité et de son application facile et pratique, l'utilisation des produits chimiques constitue à l'heure actuelle la technique la plus utilisée pour lutter contre les moisissures nuisibles (**Magan et Olsen, 2004**). Cependant, l'emploi intensif et inconsidéré de ces produits a provoqué une contamination de la biosphère et de la chaîne alimentaire, une éradication des espèces non cibles telles que la faune auxiliaire et l'apparition des microorganismes résistants. Ces dangers ont conduit l'OMS à interdire l'usage de certains fongicides chimiques, d'autres vont être prohibés dans un futur proche (**Khelil, 1977**).

Il est devenu très indispensable la recherche de molécules nouvelles en prenant en compte d'autres critères que l'efficacité. Cette recherche s'est orientée vers la lutte biologique par l'utilisation de substances naturelles antioxydantes et antifongiques pouvant constituer une solution alternative aux produits chimiques. Parmi ces substances naturelles figurent les huiles essentielles extraites des plantes aromatiques.

Les plantes aromatiques constituent une richesse naturelle très importante dont la valorisation demande une parfaite connaissance des propriétés à mettre en valeur. Les propriétés des plantes dépendent de la présence d'agents bioactifs variés et appartenant à différentes classes chimiques (**Mailhebiau, 1994**).

L'Algérie, par sa situation géographique, offre une végétation riche et diverse. Un grand nombre de plantes aromatiques y pousse spontanément. L'intérêt porté à ces plantes n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années. .

A cet effet, on s'est intéressé à l'une des espèces de la famille des Lamiacées : la lavande (*Lavandula officinalis*), celle-ci est utilisée comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antimicrobien et antioxydant (**Bouhdid et al., 2006**).

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'activité antioxydante et antifongique de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* et d'étudier leur action sur la croissance des moisissures de détérioration des légumes secs (haricots, pois chiches, fèves et petits pois).

Ce travail est structuré en deux parties importantes :

La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique mettant l'accent sur trois chapitres : le premier chapitre traite les légumes secs, les causes et les conséquences d'altérations et les moyens de lutte. Le second chapitre est consacré à l'étude des moisissures, leur mode de développement et de reproduction, leur isolement et leur identification. Le troisième chapitre présente les huiles essentielles, leur localisation dans la plante, leurs rôles et leurs propriétés, leur composition chimique, les facteurs de variabilité, la toxicité, les activités biologiques et les principales méthodes de leur extraction et l'identification de leurs composants.

La deuxième partie illustre le matériel et les méthodes utilisés ainsi que les résultats obtenus. En ce qui concerne les principales analyses effectuées, elles ont porté sur:

- L'extraction de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* par hydro distillation ;
- L'évaluation du rendement et la cinétique d'extraction ;
- L'analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse ;
- L'évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle par la méthode de piégeage du radical libre DPPH ;
- La recherche et l'identification des principaux genres fongiques contaminants des quatre légumes secs ; l'évaluation l'activité antifongique de l'huile essentielle sur des souches tests et sur les souches fongiques isolées des quatre légumes secs (haricots, pois chiches, petits pois et fèves) avec la détermination des paramètres suivants : taux d'inhibition, concentration minimale inhibitrice, concentrations minimales fongicides (CMF) et les concentrations fongistatiques(CFS).

Enfin, une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus.

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I :

Les légumes secs

1. Généralités

Les légumineuses ou Fabacées constituent une vaste famille de plantes cultivées pour l'alimentation humaine et animale. Sur le plan botanique, elles ont souvent des fleurs en forme de papillons (Papilionacées) évoluant vers un fruit de type gousse ou légume.

Les légumineuses sont utilisées à des fins alimentaires et/ou industrielles (Siret, 2000).

Ces graines sont caractérisées par :

- ❖ Une faible teneur en eau ce qui permet un stockage facile et long ;
- ❖ une forte teneur en protéines d'où le terme de protéagineux.

Les graines de légumineuses regroupent :

- ❖ Les « légumes secs » qui sont des graines sèches de légumineuses déshydratées par séchage : fèves, haricots (avec de nombreuses espèces), lentilles, pois chiches, pois secs ;
- ❖ Les graines utilisées en tant que matière première en industrie agro alimentaire : soja, féverole, lupin et arachide (Frédot, 2005).

Toutefois, en raison de siccité, les grains légumes vivent normalement dans un état métabolique extrêmement ralenti ; lorsque les conditions deviennent favorables, il y a accélération du rythme vital, dont l'aboutissement physiologique normal est la germination. Les grains lésés (cassures, fissures) ou morts (tués par un séchage excessif par exemple), ont perdu ces défenses et sont beaucoup plus vulnérables (Multon, 1982).

En Algérie, les légumineuses alimentaires (légumes secs), font partie du paysage agricole depuis des millénaires. Ces cultures sont utilisées dans la rotation avec les céréales car elles enrichissent le sol en azote. Les légumes secs sont aussi cultivées parce qu'ils constituent une source protéique importante susceptible de remplacer les protéines animales difficilement accessibles pour une large couche de la population. Ils sont aussi calorifiques et riches en glucides que le blé.

La superficie en hectares ainsi que la production des légumes secs en quintaux sont indiquées dans le tableau 1.

Tableau1 : Superficie et production des légumes secs en Algérie (2006-2009) (DSASI, 2009).

	2006/2007		2007/2008		2008/2009	
	Superficie (ha)	Production (Qx)	Superficie (ha)	Production (Qx)	Superficie (ha)	Production (Qx)
Fève/ féveroles	31284	279735	30688	235210	32278	364949
Pois secs	9184	62430	7556	36175	8487	59692
Lenticelles	873	5605	1309	10809	2588	26932
Pois chiches	20681	142940	20361	112110	22274	178404
Haricots secs	1394	9170	1040	5441	1616	11588
Gesses et guerfales	94	950	197	1980	205	1325
Total des légumes secs	63510	500830	61151	401725	67448	642890

La place des légumineuses alimentaires dans le système agraire n'est pas toujours importante. Leur superficie totale entre 2008 et 2009 avoisine 67448 hectares. Les espèces les plus cultivées sont d'ordre d'importance : la fève et la féverole, le pois chiche et le pois sec.

Bien que les légumineuses alimentaires cultivées aient bénéficié de quelques programmes de développement, la production nationale en légumes secs n'a pas connu l'amélioration escomptée, tant sur le plan de la superficie que production de graines. Au contraire, toutes les espèces ont connu une régression et instabilité de leur rendement. Les raisons de cette situation sont d'ordre technique mais aussi socio-économique (ITGC, 1999).

2. Composition biochimique

Sur le plan biochimique et nutritionnel, les légumes secs sont caractérisés par :

- un taux des protéines compris entre 20 et 25 % ; ces protéines sont surtout des globulines caractérisées par un déficit en acides aminés soufrés (méthionine et cystéine) ;
- des glucides constitués d'amidon parfaitement digestible (45 à 50 %), et de fibres (8 à 18%) ; par contre, on y trouve aussi des α -galactosides (raffinose, stachyose,

verbascose, etc.) non digestibles, hydrolysés et métabolisés par des bactéries intestinales en hydrogène, méthane, et autres gaz responsables de flatulence ;

- la présence de facteurs antinutritionnels (inhibiteurs de la trypsine, lectines) ; mais ceux-ci de nature protéique (donc thermolabiles) sont détruits lors de la cuisson (**Siret, 2000**).

3. Stockage

Aujourd'hui, le problème de stockage des grains se pose en termes très différents suivant le niveau technologique des pays.

Selon une estimation de la FAO, les pays ayant une technologie avancée de stockage ne subissent que de faibles pourcentages de pertes. Il existe plusieurs méthodes de stockage (**Khelil, 1977**).

3.1. Méthodes de stockage traditionnel

Dans ce type de stockage, les graines sont conservées dans des greniers et des cases d'habitation mal entretenues où se trouvent les restes des récoltes précédentes fortement contaminées par les insectes. Les greniers sont généralement en terre. De forme ronde ou carrée, ces greniers en terre plus ou moins additionnée de fibres végétales (pailles...) reposent généralement sur une ou plusieurs pierres qui évitent les remontées d'humidité.

L'inconvénient majeur de cette méthode de stockage est la très forte humidité et les eaux d'infiltration qui favorisent le développement des moisissures et les phénomènes de fermentation bactérienne (**Huignard, 1985**).

3.2. Le stockage en sac

La solution de stockage en sacs au magasin est la plus fréquemment utilisée, car elle permet d'employer des bâtiments existants et, dans le cas de constructions neuves, exige un investissement plus faible que le stockage en vrac. Les sacs sont déposés par terre et sont exposés aux oiseaux, rongeurs, et insectes (**Jard, 1995**).

Les principaux facteurs de dégradation des stocks sont la température, l'humidité et les différents prédateurs (insectes, rongeurs, oiseaux). Les magasins doivent être conçus et gérés de façon à limiter l'influence de chacun de ces facteurs (**Cruz et al., 1988**).

3.3. Le stockage en vrac

Le stockage en vrac est encore peu répandu dans les pays en développement alors qu'il est généralisé dans les pays développés. Les grains en tas sont laissés à l'air libre sous des hangars ouverts à charpente métallique. Malheureusement les contaminations sont possibles d'autant plus que dans ce type de construction, il demeure toujours des espèces entre les murs et les toits et le libre passage des insectes est permis. Dans ce type de stockage, la hauteur du tas ne doit pas être assez grande pour pouvoir traiter le produit stocké par fumigation (Doumandji, 1977).

3.4 Le stockage en silos

Ce sont des enceintes cylindriques en métal ou en maçonnerie couvertes sur les parois internes d'une couche d'aluminium pour éviter les phénomènes de condensation. C'est une nouvelle méthode de stockage des grains efficace qui diminue les dégâts et limite l'attaque des ravageurs (Jard, 1995).

La conservation en silos étanches à l'air entraîne la destruction des insectes par asphyxie (Doumandji, 1981).

4. Microbiologie des légumes secs

4.1 La flore du champ

Les grains à la récolte sont porteurs de moisissures champêtres, surtout adaptées aux conditions extérieures. Il s'agit essentiellement de *Fusarium*, qui peuvent dans certaines conditions produire au champ des mycotoxines toxiques. Ces dernières sont thermorésistantes, donc le séchage ne les détruit pas. Les précautions à prendre pour les éviter sont d'ordre agronomique en privilégiant les variétés résistantes, l'utilisation du labour avant le semis, un programme antifongique adapté et une rotation des cultures (Terrain et Grallet, 2003).

4.2 La flore intermédiaire

Elle regroupe les germes capables d'un développement limité en début de stockage, en conditions particulières et notamment sur grains suffisamment secs. *Cladosporium*, *Trichoderma*, et surtout les Mucorales comme *Rhizopus*, *Absidia*, *Mucor*, avec les levures *Candida*, *Torulopsis*, etc, sont les représentants habituels de cette flore intermédiaire, dont la

mise en évidence révèle, très souvent, un stockage en conditions confinées et trop humides (**Blanc, 1982**).

4.3 La flore de stockage

La flore de stockage est composée d'espèces xérophiles adaptées à des substrats relativement secs, qui peuvent proliférer au cours du stockage (**Feillet, 2000**).

Penicillium et *Aspergillus* ne se trouvent qu'en faible proportion sur les grains à la récolte, mais, adaptés aux substrats relativement secs, ils peuvent prendre leur essor au cours du stockage, alors que les autres espèces, plus hydrophiles, se multiplient moins activement ou régressent. Les origines du peuplement microbien sont multiples. Une grande partie des éléments qui le composent proviennent de la plante sur pied : c'est ainsi que des plantes fusariées peuvent donner des grains riches en *Fusarium* (**Multon, 1982**).

5. Altération des légumes secs

Au cours du stockage, la qualité des grains s'altère rapidement s'ils sont conservés trop humides. Cette altération de la qualité s'accompagne d'une perte de poids. Plusieurs phénomènes en sont la cause (**Terrain et Grallet, 2003**) :

5.1 Les altérations d'origine biologique

Ce sont essentiellement les insectes, les acariens et les microorganismes qui sont la cause. Leur présence constitue un risque considérable, car leur action se traduit par décomposition du milieu dont ils vivent et par la libération de substances nouvelles dans le grain : enzymes, toxines et autres résidus de leurs métabolites (**Multon, 1982**).

5.1.1 Les microorganismes

Par leur activité, les microorganismes contribuent à la dégradation de la valeur d'utilisation des grains. Il est très difficile d'évaluer, dans un processus d'altération, la part revenant respectivement au grain et la microflore considérée isolément (**Multon, 1982**).

De plus, le métabolisme des microorganismes modifie le comportement glucidique, lipidique et protéique du grain (**Tabuc, 2007**).

Plus encore que l'action des bactéries, c'est celle des moisissures et plus particulièrement celle des *Penicillium* et des *Aspergillus* qui est à craindre en cours du stockage (**Flamini et Luigi Cioni, 2003**).

5.1.2 Les prédateurs

Les insectes et les acariens qui vivent dans les grains posent des problèmes souvent sous estimés. Ils sont une cause d'altération grave par la consommation des denrées et par la contamination dont ils sont les vecteurs (**Seri-Kouassi et al., 2004**).

Il existe une étroite interrelation entre microflore et la microfaune de stockage. En effet, beaucoup d'acariens consomment non seulement des débris de grains, mais également des moisissures, préférant d'ailleurs des espèces les plus abondantes et ceci peut favoriser la pullulation de ces acariens. Inversement les spores fongiques sont largement disséminées par les acariens et les insectes (**Prevelt, 1975**).

5.2 Altérations d'origine physico-chimique

5.2.1 Le facteur temps

Il introduit la notion de la vitesse de réaction dont la connaissance permet d'estimer une durée probable de stockage. Généralement, le stockage de courte durée, dans les conditions favorables de température et d'humidité améliore la valeur d'utilisation des légumes secs. Ces derniers ne sont utilisés couramment qu'après 2 à 3 mois après récolte.

Pomeranz (1971) confirme qu'un long stockage des grains s'accompagne d'une diminution de la qualité.

5.2.2 Les facteurs température et hydratation

Roberts (1972) note que le degré de détérioration des grains durant le stockage et dépendant de trois facteurs majeurs, la température, l'humidité et la composition de l'atmosphère inter granulaire.

Pertruzelli (1986) confirme que les modifications physiques et métaboliques dans les grains stockés sont probablement toutes accélérées, quand la température augmente. Alors

que le comportement des grains à une augmentation de la teneur en eau paraît être plus complexe.

5.2.3 Le facteur composition de l'atmosphère

La présence d'oxygène en quantité suffisante permet le développement de la flore aérobie et les oxydations des substances biochimiques. Les réactions de dégradations qui font appel à l'oxygène permettent de stimuler l'activité respiratoire des grains et des microorganismes, provoquant aussi un appauvrissement de la teneur en oxygène et un enrichissement en gaz carbonique de l'atmosphère (Multon, 1982).

Le gaz carbonique bloque le développement des moisissures, mais pas celui des bactéries anaérobies. Dès que l'on atteint une teneur de 10%, une fermentation apparaît et donne au produit des effets indésirables (Terrain et Grallet, 2003).

5.3 Les altérations d'origine endogène

5.3.1 Action des enzymes

Les protéases, les amylases et les lipases dont les actions ont été particulièrement étudiées, interviennent en donnant des produits aisément dégradables (Multon, 1982). La lipase libère des acides gras qui sont ensuite oxydés plus facilement que les triglycérides dont ils proviennent (Alais *et al.*, 2003).

Les enzymes lipolytiques sont les seules enzymes susceptibles d'être actives aux faibles A_w , zones qui sont précisément les plus favorables aux oxydations chimiques (Thiam *et al.*, 1976). Il en résulte que des grains possédant leurs activités lipasiques intactes, et relativement secs, réunissent toutes les conditions de sensibilité à l'oxydation. L'expérience prouve que l'activité de la lipase et la lipoxygénase des grains reste en absence de germination très limitée tant que les structures cellulaires demeurent intactes (Multon, 1982).

Bon nombre de grains possèdent des lipases propres. La part de responsabilité des grains eux-mêmes et des microorganismes dans les processus d'acidification ont été longtemps controversés. Des études réalisées sur grains artificiellement décontaminés permettent aujourd'hui de conclure au rôle prépondérant, quasi exclusif, des moisissures, dans ces processus d'acidification (Milner *et al.*, 1947 ; James et Lejeune, 1955 ; Thiam *et al.*, 1976).

Une corrélation étroite existe entre la croissance des moisissures et l'apparition de ces composés volatils à odeur de moisi qui peuvent être considérés comme spécifiques et indicateurs d'une activité des moisissures. Selon toute vraisemblance, ces composés résultent d'une activité lipoxygénasique de ces moisissures (**Richardmolard et al., 1979**).

5.3.2 Par respiration

En présence d'oxygène, le grain respire et l'amidon se dégrade : il se forme de la vapeur d'eau et du gaz carbonique qui se répandent spontanément dans l'atmosphère qui entoure chaque grain.

Dans le cas d'une cellule étanche, le gaz carbonique produit remplace progressivement l'oxygène de l'air et la réaction de dégradation tend à s'interrompre. En cas de ventilation ou d'entrée d'air, l'oxygène est renouvelé et la réaction perdure tant qu'il reste de l'amidon.

La respiration augmente la température du grain. On sait que l'intensité de la réaction double pour une augmentation de température de 5°C. La teneur en eau élevée des grains favorise également la réaction (**Terrain et Grallet, 2003**).

5.3.3 La fermentation anaérobie

En absence d'oxygène, l'amidon du grain humide se dégrade par fermentation. Il se forme de l'alcool et du gaz carbonique. Cette réaction chimique produit également de la chaleur, mais en quantité moindre que la respiration (**Terrain et Grallet, 2003**).

5.3.4 La germination

Elle se produit spontanément si le grain est suffisamment humide et dès que sa température est assez élevée. L'apparition des germes et des radicules, dans les tas de grains, réduit la capacité des grains à rouler les uns sur les autres. Dès lors, leur descente gravitaire dans les silos et les séchoirs, et leur manutention en vrac sont difficiles, voire impossibles. La germination est un prolongement de la respiration (**Terrain et Grallet, 2003**).

6. Conséquences des altérations sur la composition biochimique et la valeur marchande des légumes secs

Sur les énormes quantités cultivées ou collectées, une partie importante est détruite ou altérée chaque année pendant l'entreposage (**Multon, 1982**), d'où les graves conséquences que pouvaient avoir les ressources alimentaires mondiales avec une élimination ou même une réduction sensible des pertes après récolte que subissent les denrées vivrières (**Prevelt, 1975**).

La contamination microbienne des légumes secs, destinées à l'homme ou à l'animal, est le principal dommage qui va entraîner de nombreux problèmes. Il y a donc une réduction quantitative et qualitative de la valeur alimentaire de la denrée, et une baisse du rendement des récoltes (**Bulter et Day, 1998**).

Les métabolites produits par les champignons lors de leur croissance sont aussi des éléments majeurs dans l'altération des denrées alimentaires. Des manifestations dans la qualité organoleptique (en modifiant le goût de la denrée par exemple) mais aussi de graves problèmes sanitaires surgissent, comme par exemple des risques d'intoxication due à la présence de mycotoxines (**Krogh, 1987**).

6.1 Dégradation des lipides

Les premières modifications biochimiques que subissent les grains en cours du stockage mal conduit s'observent le plus souvent au niveau des lipides (**Daftary et al., 1970 ; Pomeranz, 1974**).

La dégradation débute par l'hydrolyse des glycérides sous l'action des lipases microbiennes conduisant à une augmentation de la teneur en acides gras libres. Les lipases microbiennes provoquent souvent une dégradation partielle des triglycérides en di et mono glycérides (**Guenot, 1975**).

Le développement sur les grains stockés de certaines moisissures, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, etc., s'accompagne d'une formation de composés volatils spécifiques comme le 1-octène-3-ol et 2-octène-1-ol (**Kaminski et al., 1974 ; Abramson et al., 1980**).

L'accroissement des moisissures a une action néfaste sur la qualité des grains, elle se traduit par une détérioration organoleptique et par une formation potentielle de métabolites toxiques (**Daftary et Pomeranz, 1965**).

6.2 Dégradation des protéines

La plupart des microorganismes présents sur les grains stockés montrent, à des degrés divers, des activités protéolytiques. L'hydrolyse des protéines en polypeptides et en acides aminés assimilables par les microorganismes ne se fait que très lentement dans les conditions habituelles de stockage (**Pomeranz, 1974**).

6.3 Dégradation des glucides

Les grains ne contiennent généralement que de faibles quantités de sucres directement assimilables par les microorganismes. Il faut donc l'intervention d'enzymes extracellulaires, cellulases, amylases par exemple, pour réduire les macromolécules glucidiques en fragments assimilables comme le glucose.

Les sucres simples, après transport dans la cellule, sont dégradés par glycolyse, suivant les voies classiques, voie EMBDEN-MEYERHOF et voie des pentoses phosphates pour ne citer que les principales reconnues chez les moisissures (**Cochrane, 1976**).

Bien entendu, le grain est lui-même un organisme vivant, qui respire en même temps que les microorganismes dont il est porteur, et il a été longuement discuté de la part de responsabilité revenant au grain et aux microorganismes, dans les processus d'échauffement.

Les données expérimentales paraissent suffisantes pour affirmer que la plupart des cas, ce sont les microorganismes et principalement les moisissures qui sont responsables, par leur respiration, de l'échauffement des stocks de grains (**Christensen et Kaufmann, 1969**).

6.4 Biosynthèse des mycotoxines

Plusieurs moisissures notamment les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* sont connus pour être des contaminants des légumes secs et/ou pour leur capacité à produire des métabolites secondaires toxiques (**Cahagnier et al., 1998 ; Doyle et al., 1998 ; Meyer et al., 2004**). Les mycotoxines sont des métabolites secondaires élaborés par plusieurs souches de champignons à certains stades de leur développement (**Reboux, 2006**).

Les mycotoxines sont produites dans les matières alimentaires, leur décontamination est très difficile. Ces molécules ne sont pas détruites au cours d'un stockage prolongé et sont souvent résistantes aux traitements thermiques ou chimiques (**Langseth et al., 1993 ; Cahagnier et al., 1998**).

La production des mycotoxines peut s'effectuer depuis le champ jusqu'à l'assiette. Cependant, le type de mycotoxines contaminant les aliments ainsi que la quantité de

mycotoxine produite dépendent de plusieurs éléments comme les espèces fongiques, les conditions écologiques dans lesquelles les champignons se développent. Il dépend également de la stabilité de ces toxines dans le milieu alimentaire (**Langseth et al., 1993 ; Cahagnier et al., 1998**).

7. Procédés de traitement des légumes secs

Mettre les grains à l'abri d'altérations, c'est prendre un ensemble de mesures qui sont applicables à toutes les étapes de la vie des grains, depuis la récolte (et même avant) jusqu'à leur utilisation (**Multon, 1982**)

Qualité initiale des grains, maîtrise de la température, de l'humidité et de la composition du milieu ambiant, traitements physiques et chimiques, sont la clé du contrôle de l'activité microbienne (**Multon, 1982**). Il existe plusieurs méthodes de traitement des légumes secs

7.1 Produits chimiques

Des acides organiques de faible poids moléculaire (acide propionique, acide acétique et acide formique) et leurs sels sont les plus employés pour conserver les grains (**Magan et Olsen, 2004**).

Cependant, ils ont beaucoup d'inconvénients : leur efficacité dépend du temps ; ils sont corrosifs ; les traitements de l'acide détruisent la viabilité de la graine ; et, surtout, le soin spécial doit être pris par l'utilisateur pour éviter l'inhalation.

Dans quelques cas, la production des mycotoxines accrue est observée dans le grain traité à l'acide. Quelques mycètes peuvent utiliser ces acides comme source de carbone (**Tatsadjieu, et al., 2009**). Actuellement, il ya une tendance mondiale de réduire au minimum, ou même interdiction de l'utilisation des pesticides dans les produits agricoles, ce qui donne l'urgence à la recherche des méthodes alternatives de conservation des grains (**Bankole, 1997 ; Tatsadjieu, et al., 2009**).

Les traitements des grains humides par l'ammoniac gazeux ou en solution dans le but d'inhiber le développement de leur microflore suscite actuellement un certain intérêt (**Multon, 1982**).

Certaines substances chimiques utilisées pour faire face aux dégradations présentent un risque toxique non négligeable : c'est le cas de l'oxyde d'éthylène, du bromure de méthyle (**Leyral et Vierling, 2003**). Ces produits causent l'induction des phénomènes de résistance

des genres mycotiques pathogènes et l'accumulation des résidus (**Flamini et Luigi Cioni, 2003**).

L'aldéhyde formique a été utilisé avec succès pour lutter contre le développement des moisissures des grains, mais son emploi pose également de nombreux problèmes (odeur, couleur, perte d'activité enzymatique).

7.2 Traitements physiques

Des méthodes physiques se sont généralement appliquées dans le stockage de grain. Les atmosphères modifiées et l'irradiation gamma devraient être mentionnées. L'action létale de l'irradiation sur les organismes vivants résulte de modifications chimiques, même quantitativement infimes, induites dans leurs molécules vitales. Les champignons producteurs de toxines sont plus sensibles que d'autres à l'irradiation (**Magan et Olsen, 2004**).

Les moyens physiques réduisent ou éliminent l'utilisation des produits chimiques, cependant, beaucoup de facteurs pratiques, techniques aussi bien que biologique, continuent à limiter l'utilisation des atmosphères modifiées et l'irradiation gamma (**Magan et Olsen, 2004**). Les doses de rayonnements ionisants suffisantes pour remplacer les produits chimiques sont très faibles : 0.4 à 1 KGy (**Leyral et Vierling, 2003**).

7.3 Lutte biologique

Des levures, et des bactéries nombreuses se sont avérées efficaces dans le contrôle du produit agricole frais après récolte. Les mécanismes par lesquels la croissance fongique et la production des mycotoxines peuvent être empêchées dans l'environnement concurrentiel incluent : la concurrence pour les nutriments et l'espace ; l'induction des mécanismes de défense ; les interactions hyper parasitiques. Bien que le contrôle biologique ne semble pas encore être faisable sur les grains, un avantage important qui pourrait émerger des études sur les mycètes antagoniques serait la découverte des composés inhibiteurs à la production de mycètes et/ou de mycotoxine de stockage (**Magan et Olsen, 2004**)

La grande majorité des antifongiques naturels est d'origine microbienne et près de la moitié est synthétisée par les actinomycètes, en particulier par les *Streptomyces*, le genre le plus répandu dans l'environnement (**Eckwall et Schottel, 1998**). Les recherches actuelles tiennent beaucoup plus compte des actinomycètes peu fréquents ou rares, provenant de diverses niches écologiques ignorées ou peu exploitées. Ces actinomycètes, dits « rares » dont

le genre *Actinomadura*, se sont révélés être une source intéressante d'antibiotiques (**Lazzarini et al., 2001, Maskey et al., 2003**).

7.4 Produits naturels

Nombreux constituants des plantes montrent une activité antifongique contre des mycètes de stockage. De telles plantes incluent l'origan, le clou de girofle, la cannelle, l'ail, le thym et la lavande (**Nguefacka et al ., 2004**).

Cependant, des résultats contradictoires ont été rapportés dans beaucoup des cas, puisque plusieurs paramètres doivent être considérés quand ces résultats sont comparés : le milieu de culture, la source botanique de matière végétale ou la période de la moisson (qui pourrait affecter la composition d'huile) ; les techniques d'extraction et l'espèce étant examinées (**Lis-Balchin, 2002**).

Il y a des différences dans la sensibilité à l'huile, entre différents espèces appartenant aux mêmes genres et entre les diverses structures fongiques: spores, sclérotites et fragments mycéliens (**Magan et Olsen, 2004**).

Chapitre II :

Moisissures

1. Caractères généraux

Les moisissures sont des champignons microscopiques. Ce sont des organismes pluricellulaires dont l'appareil végétatif, le thalle, est formé de longs filaments ramifiés et souvent cloisonnés que l'on appelle des hyphes. Lorsque la croissance est suffisamment avancée, l'ensemble des hyphes constitue un mycélium visible à l'œil nu qui se présente comme une sorte de feutrage à la surface colonisée (Nicklin *et al.*, 2000).

Non photosynthétiques, les moisissures ne peuvent se développer que sur des substrats organiques. La structure filamenteuse du thalle les rend particulièrement aptes à coloniser des substrats solides. En raison de leurs aptitudes écologiques et physiologiques ; les moisissures sont de loin les microorganismes les plus redoutables pour les grains stockés (Multon, 1982).

2. Classification

La classification des champignons est essentiellement basée sur des caractères purement morphologiques (Meyer *et al.*, 2004).

La classification de Kwon Chung et Bennett (1992) est la plus utilisée actuellement (Figure 1). On estime à plus de 100 000 le nombre d'espèces fongiques, plus de 1000 d'entre elles pouvant contaminer les aliments (Castegnaro et Pfohl- Leskowitz, 2002).

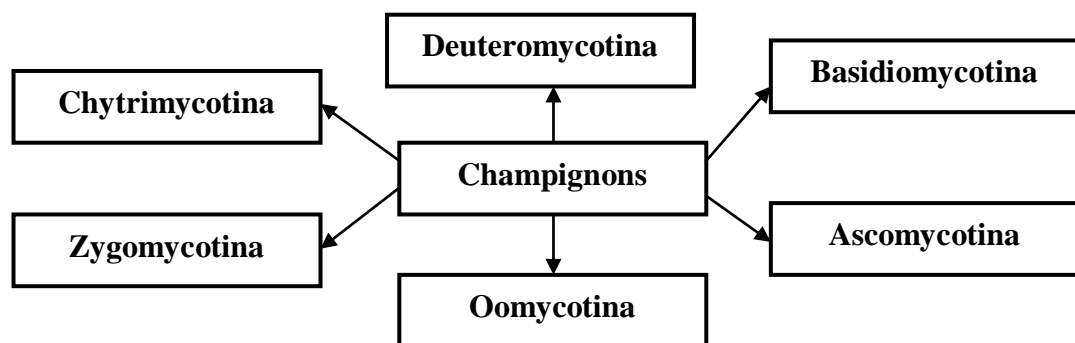


Figure1 : Classification des champignons (Kwon Chung et Bennett, 1992)

3. Physiologie et reproduction

3.1 Facteurs nutritifs

3.1.1 Source de carbone

Les mycètes utilisent des matières organiques comme source de carbone et énergie. Ils tirent ce carbone par saprophytisme, symbiose ou parasitisme. Les mycètes utilisent la glycolyse comme métabolisme aérobie pour dégrader les hydrates de carbone. Certains peuvent utiliser des fermentations à des taux bas d'oxygène. Récemment, des mycètes anaérobies vrais ont été découverts dans le rumen du bétail. Ces mycètes présentent un métabolisme énergétique proche de certains Protozoaires parasites (Nicklin *et al.*, 2000).

3.1.2 Source d'azote

Les mycètes incorporent l'azote par hétérotrophisme. Ils ne peuvent assimiler l'azote gazeux mais peuvent utiliser le nitrate, l'ammonium et certains acides aminés par absorption directe à travers la membrane. Des sources complexes d'azote, comme les peptides et les protéines, ne sont utilisables par les hyphes qu'après leur dégradation par des protéases en acides aminés (Nicklin *et al.*, 2000).

3.1.3 Source d'éléments minéraux et vitamines

Le phosphore, le potassium, le magnésium, le calcium et le soufre constituent des sels minéraux requis par les mycètes. Les mycètes ont la possibilité d'accéder à des réserves de phosphore en sécrétant dans le milieu extracellulaire des enzymes phosphatases. Le fer est relativement insoluble et donc pas facilement assimilable ; mais les mycètes sont capables de synthétiser des séchérophores ou des acides organiques qui peuvent chélater le fer ou modifier sa solubilité. Certains mycètes peuvent avoir besoins de vitamines préformées, comme par exemple de la thiamine et de la biotine, ainsi que des stérols, de la riboflavine, de l'acide nicotinique et folique (Nicklin *et al.*, 2000).

3.2 Modes de reproduction

L'appareil végétatif des champignons est un thalle composé de filaments (hyphes) ramifiés dont l'ensemble constitue le mycélium. Ils se reproduisent grâce à des spores (Nguyen Minh Tri, 2007).

Après un certain temps de développement, les moisissures comme tous les champignons et autres êtres vivants doivent se reproduire, puis se propager pour aller coloniser d'autres substrats (**Roquebert, 1997**).

Les champignons se reproduisent de deux manières :

- ❖ Par voie sexuée : suite à la fusion de deux cellules gamétiques ;
- ❖ Par voie asexuée ou végétative, la plupart d'entre eux étant rencontrés dans le groupe des imparfaits (**Champion, 1997**).

3.2.1. La reproduction sexuée

Des moisissures se reproduisent selon un cycle de reproduction sexuée. La reproduction sexuée implique la production d'organes sexués et de gamètes, la fusion des gamètes ou des organes sexués suivie par la fusion nucléaire ou caryogamie et la méiose, le développement des organes de fructification (**Larpen et Larpen-Gourgaud, 1990**).

Ce type de reproduction permet la recombinaison des caractères héréditaires. La sexualité n'existe que chez certaines espèces, pour d'autres elle n'a jamais été mise en évidence, pour d'autres elle est inconstante ou rare (**Guiraud, 1998**).

3.2.2 La reproduction végétative

Elle est beaucoup plus répandue que la précédente, et si elle ne fait pas intervenir de transformation génétique, elle joue un grand rôle dans la dissémination des espèces. Elle se fait, soit par une fragmentation du thalle, soit par la production de spores asexuées (**Branger et al., 2007**).

Chez les moisissures, plusieurs types de spores de reproduction végétative peuvent être produites : arthrospores (issues de la septation de la paroi cellulaire), sporangiospores (formées dans un sporange à l'extrémité d'un hyphes), conidiospores (produites à la périphérie des hyphes), blastospores (formées par un bourgeonnement de surface d'une cellule végétative) (**Branger et al., 2007**).

3.3 Isolement des moisissures

Le choix des milieux de culture est aussi déterminant dans l'isolement et le dénombrement de la microflore du produit à analyser. Trois catégories de milieux peuvent être distinguées : les milieux de routine, peu sélectifs, permettant l'isolement d'un grand nombre de moisissures ; les milieux sélectifs adaptés à la recherche d'une espèce ou d'un groupe d'espèces à écologie

particulière et difficile à mettre en évidence avec un milieu ordinaire ; les milieux différentiels utilisés pour la détermination de champignons appartenant le plus souvent à des genres difficiles

3.4 Identification des moisissures

L'identification des très nombreuses espèces fongiques susceptibles de coloniser les aliments et d'en altérer les qualités, voire de produire des mycotoxines est une étape indispensable à l'évaluation du risque mycotoxique.

Cette identification a pendant longtemps été exclusivement basée sur l'observation des caractères cultureux et morphologiques de l'espèce. Les progrès récents de la biologie moléculaire ont permis de proposer des outils d'aide à l'identification. Toutefois, la complexité du règne fongique fait, qu'à l'heure actuelle, ces outils ne peuvent pas encore remplacer complètement l'examen morphologique, qui reste la base de l'identification (Tabuc, 2007).

3.4.1 Identification morphologique

L'identification d'une espèce fongique repose sur l'analyse de critères cultureux (température et vitesse de croissance, milieux favorables) et morphologiques. Ces derniers sont constitués des paramètres macroscopiques (aspect des colonies, de leur revers) et microscopique (aspect du mycélium, des spores, des phialides, des conidiophores,...) (Cahagnier et Richard-Molard, 1998).

3.4.2 Identification génétique

L'identification d'espèces fongiques est traditionnellement fondée sur les caractéristiques culturelles et morphologiques macroscopiques et microscopiques. Cette identification nécessite donc, en général, plusieurs jours de culture (7 à 10 jours le plus souvent). La culture sur des milieux spécifiques peut être nécessaire pour obtenir la formation de conidies et, dans certains cas, l'absence d'apparition de conidies rendra impossible l'identification du mycélium. Par conséquent, de nombreuses études ont visé à développer des méthodes outils d'identification reposant sur l'étude des acides nucléiques (ADN et ARN) et ne nécessitant plus obligatoirement un examen morphologique (Reiss *et al.*, 1998 ; Jin *et al.*, 2004 ; Feuilhade de Chauvin, 2005 ; Hinrikson *et al.*, 2005 ; Peterson, 2006).

Les méthodes les plus intéressantes sont basées sur l'amplification par PCR (polymerase chain reaction). Cette méthode est aussi utilisée pour différencier et identifier les moisissures

responsables de l'altération des aliments, principalement les espèces de *Penicillium* (**Boysen et al., 2000** ;

Hageskal et al., 2006).

De nombreux travaux visent aussi à utiliser les progrès de la biologie moléculaire afin de dépister rapidement les souches fongiques toxigènes (**Niessen, 2007**).

Si à l'heure actuelle les outils d'identification moléculaire ne semblent pas en mesure de remplacer l'identification morphologique classique, il est probable que dans les années à venir, ces méthodes représenteront des outils particulièrement utiles pour la détection et l'identification fongique dans les aliments (**Niessen, 2007**).

Chapitre III :

Les huiles essentielles

1. Définition

Il s'agit d'un mélange de composés lipophiles, volatils et souvent liquides, synthétisés et stockés dans certains tissus végétaux spécialisés. Extraites de la plante grâce à des procédés physiques tels l'hydro distillation, l'entraînement à la vapeur ou par expression à froid dans le cas des agrumes, les huiles essentielles sont responsables de l'odeur caractéristique de la plante. Les produits obtenus par extraction avec d'autres procédés ne sont pas repris dans la définition d'huile essentielle donnée par la norme de l'Association Française de Normalisation (AFNOR) (**Bruneton, 1993 ; AFNOR, 2000**).

Contrairement à ce que le terme pourrait laisser penser, les huiles essentielles ne contiennent pas de corps gras comme les huiles végétales obtenues avec des pressoirs (huile de tournesol, de maïs, d'amande douce, etc.). Il s'agit de la sécrétion naturelle élaborée par le végétal et contenue dans les cellules de la plante, soit dans les fleurs (ylang-ylang, bergamotier, rosier), soit dans les sommités fleuries (tagète, lavande), soit dans les feuilles (citronnelle, eucalyptus), ou dans l'écorce (cannelier), ou dans les racines (vétiver), ou dans les fruits (vanillier), ou dans les graines (muscade) ou encore autre part dans la plante (**Anton et Lobstein, 2005**).

Le terme « huile » s'explique par la propriété que présentent ces composés de se solubiliser dans les graisses et par leur caractère hydrophobe. Le terme « essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur plus ou moins forte dégagée par la plante.

2. Localisation des huiles essentielles dans la plante

Les huiles essentielles sont produites dans des cellules glandulaires spécialisées recouvertes d'une cuticule.

Elles sont alors stockées dans des cellules à huiles essentielles (Lauraceae ou Zingiberaceae), dans des poils sécréteurs (Lamiaceae), dans des poches sécrétrices (Myrtaceae ou Rutaceae) ou dans des canaux sécréteurs (Apiaceae ou Asteraceae). Elles peuvent aussi être transportées dans l'espace intracellulaire lorsque les poches à essences sont localisées dans les tissus internes.

Sur le site de stockage, les gouttelettes d'huile essentielle sont entourées de membranes spéciales constituées d'esters d'acides gras hydroxylés hautement polymérisés, associés à des groupements peroxydes. En raison de leur caractère lipophile et donc de leur perméabilité extrêmement réduite vis-à-vis des gaz, ces membranes limitent fortement l'évaporation des huiles essentielles ainsi que leur oxydation à l'air (**Bruneton, 1993 ; Anton et Lobstein, 2005**).

3. Rôles et propriétés des huiles essentielles

Le rôle des huiles essentielles dans la physiologie de la plante reste encore mal connu. Toutefois, les parfums émis jouent un rôle attractif pour les insectes pollinisateurs (**Deroin, 1988**). De plus, en règle générale, les huiles essentielles constituent un moyen de défense naturel contre les insectes prédateurs et les microorganismes. Les substances émises sont dans ce dernier cas appelées « phytoalexines ». Ce type de toxine n'est produit qu'en cas d'infection et n'entre donc pas dans la composition d'une huile essentielle provenant d'une plante saine (**Mann, 1987**).

La sauge *Salvia leucophylla* libère quant à elle des substances dans l'atmosphère telles du cinéole, du camphre et d'autres composés voisins afin d'inhiber la germination et le développement d'espèces prairiales en concurrence. Ces composés agissent par absorption dans un sol sec (**Guignard et al., 1985**).

L'intérêt pour les produits naturels dans l'alimentation et dans l'industrie pharmaceutique est grandissant. **Baratta et al. (1998)**, ont réalisé une expérience visant à mettre en évidence les propriétés antimicrobiennes, antifongiques et antioxydantes de plusieurs huiles essentielles.

4. Composition chimique

Le nombre des molécules chimiquement différentes qui constituent une huile essentielle est variable (**Belaiche, 1979**). A côté des composés majoritaires (entre 2 et 6 généralement), on retrouve des composés minoritaires et un certain nombre de constituants sous forme de traces (**Pibiri, 2006**).

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et variables de constituants qui appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes :

- ❖ le groupe de terpénoïdes ;
- ❖ le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane.

D'après **Pibiri (2006)**, la structure des composés des huiles essentielles est constituée d'un squelette hydrocarboné, constituant une chaîne plus ou moins longue. Sur ce squelette de base est souvent présent un ou plusieurs sites fonctionnels semblables ou différents. La majorité des sites fonctionnels sont des sites oxygénés avec un ou plusieurs atomes d'oxygène, pour quelques groupes fonctionnels azotés ou soufrés.

Selon **Mailhebiau (1994)**, cette structure varie en fonction :

- ❖ Du nombre d'atomes de carbone qui les constitue :
 - Les monoterpènes ;

- Les sesquiterpènes ;
- Rarement les diterpènes.
- ❖ Du caractère saturé ou insaturé des liaisons ;
- ❖ De leur agencement : linéaire ou cyclique ;
- ❖ De la configuration spatiale (forme de chaise, de bateau, de trièdre...) ;
- ❖ De la nature des groupes fonctionnels à savoir :
 - Terpènes : $R_1\text{-HC=CH-R}_2$;
 - Alcools terpéniques : $R\text{-OH}$;
 - Cétones : $R_1\text{-CO-R}_2$;
 - Phénols : $C_6H_6\text{-OH}$;
 - Aldéhydes : $R\text{-CHO}$;
 - Esters : $R_1\text{-COO-R}_2$;
 - Ethers : $R_1\text{-O-R}_2$.

5. Propriétés physico-chimiques

En ce qui concerne les propriétés physico-chimiques, les huiles essentielles forment un groupe très homogène (**Bernard *et al.*, 1988 ; Bruneton, 1993**). Les principales caractéristiques sont :

- ❖ Liquides à température ambiante ;
- ❖ N'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes ;
- ❖ Volatiles et très rarement colorées ;
- ❖ Une densité faible pour les huiles essentielles à forte teneur en monoterpènes ;
- ❖ Un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé, cependant une teneur élevée en dérivés oxygénés produira l'effet inverse ;
- ❖ Solubles dans les alcools à titre alcoométrique élevé et dans la plupart des solvants organiques mais peu solubles dans l'eau ;
- ❖ Douées d'un pouvoir rotatoire puisqu'elles sont formées principalement de composés asymétriques ;
- ❖ Très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux, il convient alors de les conserver à l'abri de la lumière et de l'air.

6. Facteurs de variabilité de la composition des huiles essentielles

Etant formées de mélanges généralement complexes, les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, tant au niveau de leur composition, qu'au plan du rendement des plantes d'origine. Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs, que nous pouvons regrouper en deux catégories :

- ❖ Facteurs intrinsèques, liés à l'espèce, au type de clone, à l'organe concerné, à l'interaction avec l'environnement (type de sol ou climat, ...) et au degré de maturité du végétal concerné, voire au moment de la récolte au cours de la journée ;
- ❖ facteurs extrinsèques, en lien avec ou la méthode d'extraction (**Besombes, 2008**).

6.1 Les facteurs intrinsèques

Les cellules productrices d'huile essentielle pouvant se situer dans différents organes, il est possible d'obtenir différentes huiles selon les parties sélectionnées d'une même plante. Ainsi les huiles essentielles extraites à partir des baies et des feuilles de piment ne sont pas identiques.

Les travaux de **Maffei et Sacco (1997)**, ont montré des différences de composition des huiles essentielles en raison d'organes différents (feuilles et fleurs) et de sous-espèces différentes.

Le stade végétatif au moment de la récolte est un facteur déterminant pour le rendement et la composition de l'huile essentielle des plantes de *Lavandula* obtenus par clonage (**Fantino, 1990**).

6.2 Les facteurs extrinsèques

Huang et al. (1995) ont montré l'influence des méthodes d'extraction sur la composition des huiles essentielles.

Le stockage des matières premières avant distillation peut également influencer la composition et le rendement des huiles essentielles. **Fantino(1990)** a noté des pertes considérables d'huile essentielle lors d'un stockage prolongé au congélateur, mais peu d'évolution de la composition.

Par ailleurs le temps de stockage des huiles essentielles après extraction tend aussi à modifier la composition de ces huiles. D'après **Carette (2000)**, les huiles essentielles se conservent entre 12 et 18 mois après leur obtention, car, avec le temps, leurs propriétés tendent à décroître.

D'autres travaux ont mis en évidence l'influence de l'origine géographique de la matière première (**Verzele et al., 1988**)

7. Toxicité des huiles essentielles

Alors que de nombreux ouvrages font référence à la toxicité de nombreux produits sur le marché, la toxicité des huiles essentielles est moins investiguée. La plupart du temps, sous le terme de toxicité sont décrites des données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi. Les interactions de ces produits avec les médicaments sont aussi peu mentionnées (**Pibiri, 2006**).

Cependant quelques informations sur certaines toxicités sont décrites par la littérature :

En règle générale, les huiles essentielles d'usage commun ont une toxicité par voie orale faible ou très faible avec des DL50 supérieures à 5g/kg. En ce qui concerne la lavande la toxicité est faible autour des 5g/kg (donnée observée chez l'animal) (**Bruneton, 1993**). Chez l'homme des intoxications aiguës sont possibles. Les accidents graves, les plus souvent observés chez les petits enfants, sont provoqués par l'ingestion en quantité importante d'huiles essentielles.

Certains auteurs (**Franchomme et al., 1990 ; Mailhebiau, 1994**) se basent sur la composition des huiles essentielles et les toxicités relatives des familles biochimiques auxquelles elles appartiennent.

Certaines huiles essentielles se révèlent cytotoxique selon la phase dans laquelle elles sont mises en contact (la toxicité du thym est augmentée par contact en phase liquide et réduite en phase gazeuse, alors que c'est l'inverse pour la lavande (**Inouye, 2003**).

8. Activités biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont connues pour être douées de propriétés antiseptiques et antimicrobiennes. Beaucoup d'entre elles, ont des propriétés antitoxiques, antivenimeuses, antivirales, anti-oxydantes, et antiparasitaires. Plus récemment, on leur reconnaît également des propriétés anticancéreuses (**Valnet, 2005**).

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique et les possibles effets synergiques entre ses composants. Sa valeur tient à son «totum» ; c'est-à-dire, l'intégralité de ses constituants et non seulement à ses composés majoritaires (**Lahlou, 2004**).

8.1 Activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant de ces huiles est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Ce sont surtout les phénols et les polyphénols qui sont responsables de ce pouvoir **(Richard, 1992)**.

Lorsque l'on parle d'activité antioxydante, on distingue deux sortes selon le niveau de leur action : une activité primaire et une activité préventive (indirecte). Les composés qui ont une activité primaire sont interrompus dans la chaîne autocatalytique de l'oxydation **(Multon, 2002)**. En revanche, les composés qui ont une activité préventive sont capables de retarder l'oxydation par des mécanismes indirects tels que la complexation des ions métalliques ou la réduction d'oxygène... etc **(Madhavi et al., 1996)**.

Des études de l'équipe constituant le Laboratoire de Recherche en Sciences Appliquées à l'Alimentation (RESALA) de l'INRS-IAF, ont montré que l'incorporation des huiles essentielles directement dans les aliments (viandes hachées, légumes hachés, purées de fruit, yaourts...) où l'application par vaporisation en surface de l'aliment (pièce de viande, charcuterie, poulet, fruits et légumes entiers...) contribuent à préserver l'aliment des phénomènes d'oxydation **(Caillet et Lacroix, 2007)**.

8.2 Activité antibactérienne

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

De façon générale, il a été observé une diversité d'actions toxiques des HES sur les bactéries comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, la perturbation de la force motrice de proton, fuite d'électron et la coagulation du contenu protéique des cellules **(Davidson, 1997)**.

Le mode d'action des HES dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane **(Cox et al., 2000; Carson et al., 2002)**.

Une inhibition de la décarboxylation des acides aminés chez *Enterobacter aerogenes* a aussi été rapportée **(Wendakoon et Sakaguchi, 1995)**. Les HES peuvent aussi inhiber la synthèse de DNA, ARN, des protéines et des polysaccharides **(Cox et al., 1991)**.

Néanmoins, certains composés phénoliques de bas poids moléculaire comme le thymol et le carvacrol peuvent adhérer à ces bactéries par fixation aux protéines et aux lipopolysaccharides pariétales grâce à leurs groupes fonctionnels et atteindre ainsi la membrane intérieure plus vulnérable (**Dorman et Deans, 2000**).

8.3 Activité antifongique

Dans le domaine phytosanitaire et agro alimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant la denrée alimentaire (**Lis-Balchin, 2002**).

Les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antifongiques appartiennent à la famille des *Labiatae* : thym, origan, lavande, menthe, romarin, sauge, etc... Etant donnée la grande complexité de la composition chémotypique des huiles essentielles, malgré de possibles synergies certains auteurs préfèrent étudier l'effet d'un composé isolé pour pouvoir ensuite le comparer à l'activité globale de l'huile. Ainsi l'activité fongistatique des composés aromatiques semble être liée à la présence de certaines fonctions chimiques (**Voukou et al., 1988**). Ils concluent que les phénols (eugénol, chavicol 4-allyl-2-6-diméthoxyphénol) sont plus antifongiques et que les aldéhydes testés (cinnamique et hydro cinnamique). Ils présentent également des propriétés fongistatiques très marquées. Les groupements méthoxy, à l'inverse, ne semblent pas apporter à ce type de molécules une fongitoxicité significative.

Cette activité est estimée selon la durée d'inhibition de la croissance déterminée par simple observation macroscopique. L'activité antifongique décroît selon le type de fonction chimique : **Phénols** > **Alcools** > **Aldéhydes** > **Cétones** > **Ethers** > **Hydrocarbures**

Parmi les aldéhydes aliphatiques, le cinnamaldéhyde s'est révélé le plus actif. En ce qui concerne les composés phénoliques, l'activité antifongique augmente avec l'encombrement stérique de la molécule (p-n-propylphénol > thymol > isoeugénol > eugénol) (**Ullree et al., 2002**).

L'addition de groupements alkyls au noyau benzène du phénol augmente le caractère antifongique. Par conséquent, un certain degré d'hydrophobicité des composés phénoliques ou aldéhydes aromatiques paraît donc requis pour exprimer une caractéristique antifongique optimale. L'activité des terpènes des huiles essentielles est en corrélation avec leur fonction chimique. Les travaux de **Chao et al. (2000)**, ont montré l'importance de la spécification du genre et de l'espèce, ainsi que de la variété de la plante d'où provient l'extrait.

9. Méthodes d'extraction et d'identification des composés des huiles essentielles

9.1 Méthodes d'extraction

Le procédé d'obtention des HE intervient d'une façon déterminante sur sa composition chimique (**Garnero, 1977**). Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales, cette diversité est due à la variété des matières premières et à la sensibilité considérable de certains de leurs constituants.

9.1.1 Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

Dans ce système d'extraction, le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur sans macération préalable. Les vapeurs saturées en composés volatils sont condensées puis décantées. L'injection de vapeur se fait à la base de l'alambic (**Richard et Peyron, 1992**).

9.1.2 Extraction par hydro distillation d'huile essentielle

Ce mode d'extraction a été proposé par Garnier en 1891, c'est la méthode la plus utilisée pour extraire les HE et pouvoir les séparer à l'état pur mais aussi de fournir de meilleurs rendements. Le principe consiste à immerger directement la matière végétale à traiter dans un ballon rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition, les vapeurs hétérogènes vont se condenser sur une surface froide et l'HE sera alors séparée par différence de densité (**Bruneton, 1993**).

9.1.3 Expression à froid

L'expression à froid est réservée à l'extraction des composés volatils dans les péricarpes. Il s'agit d'un traitement mécanique qui consiste à déchirer les péricarpes riches en cellules sécrétrices (**Basil et al., 1998**).

9.1.4 Extraction par solvants organiques

L'extraction par solvant organique volatil reste la méthode la plus pratiquée. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol moins fréquemment le dichlorométhane et l'acétone (**Legrand, 1993 ; Dapkevicius et al., 1998 ; Kim et Lee, 2002**).

En fonction de la technique et du solvant utilisé, on obtient (**AFNOR, 2000**) :

- ❖ Des hydrolysats : extraction par solvant en présence d'eau
- ❖ Des alcoolats : extraction avec de l'éthanol dilué

- ❖ Des teintures ou solutions non concentrées obtenues à partir de matières premières traitées par l'éthanol ou des mélanges éthanol/eau.
- ❖ De résinoïdes ou extraits éthanoliques concentrés

L'emploi restrictif de l'extraction par solvants organiques volatils se justifie par son coût, les problèmes de sécurité et de toxicité, ainsi que la réglementation liée à la protection de l'environnement (**Lagunez Rivera, 2006**).

9.1.5 Extraction par fluide à l'état supercritique

L'extraction par gaz liquéfié ou par fluide à l'état supercritique met en œuvre généralement le dioxyde de carbone (**Aghel et al., 2004**).

D'autres travaux de recherche de **Luque de Castro et Jiménez (1998)** ; **Gámiz-Gracia et Luque de Castro (2000)** ; **Ozel et al. (2003)** ; **Deng et al. (2005)** montrent l'utilisation de l'eau dans son état supercritique. Dans ce système, le solvant est utilisé en boucle par interposition d'échangeurs de chaleur, d'un compresseur et d'un détendeur afin de porter le solvant à l'état désiré à chaque stade du processus. La séparation de l'extrait a lieu en phase gazeuse par simple détente.

L'avantage de cette méthode est la possibilité d'éliminer et de recycler le solvant par simple compression détente. De plus, les températures d'extraction sont basses dans le cas de dioxyde de carbone et non agressives pour les constituants les plus fragiles. A ces différents avantages s'ajoutent ceux de l'innocuité, d'inertie et d'ininflammabilité de CO₂ (**Lagunez Rivera, 2006**).

Le frein du développement de cette technologie est le coût élevé des appareillages lié à l'application de pressions de plusieurs centaines de bars (**Lagunez Rivera, 2006**).

9.2 Méthodes d'identification des composés des huiles essentielles

Selon la Pharmacopée Française et Européenne, le contrôle des huiles essentielles s'effectue par différents essais, comme la miscibilité à l'éthanol et certaines mesures physiques : indice de réfraction, pouvoir rotatoire et densité relative. La couleur et l'odeur sont aussi des paramètres importants (**Pibiri, 2006**).

La meilleure carte d'identité quantitative et qualitative d'une huile essentielle reste cependant le profil chromatographique en phase gazeuse. Il permet de connaître très exactement la composition chimique.

9.2.1 Chromatographie en phase gazeuse(CPG)

La CPG s'est montrée une méthode appropriée pour la séparation et l'identification des composants d'une HE, elle réalise à la fois une analyse qualitative et quantitative (**Paris et Godon, 1979**).

L'échantillon est vaporisé et injecté en tête de colonne. L'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile. La CPG est basée sur le partage de produit analysé entre une phase gazeuse mobile et une phase (liquide ou solide) immobilisée sur la surface d'un support inerte (**Skoog et al., 2003**).

Les constituants des mélanges appelés généralement « solutés » sont inégalement retenus par la phase stationnaire lors du transit dans la colonne. De ce phénomène appelé « rétention », les solutés injectés se déplacent avec une vitesse inégale entre eux et inférieure à celle de la phase mobile, ceci les conduit à sortir de la colonne les uns après les autres. On enregistre d'abord un signal dit ligne de base en présence du gaz vecteur seul, puis un pic au passage de chaque soluté séparé (**Tranchant, 1995**).

9.2.2 Le couplage Chromatographie phase gazeuse/Spectrométrie de masse (CPG/SM)

Dans le secteur particulier des huiles essentielles, le couplage CPG/SM est, aujourd'hui, la technique de référence (**Longevialle, 1981 ; Constantin, 1996**).

Lorsqu'on soumet un composé moléculaire à cette analyse, on déclenche un processus à plusieurs étages (**Pradeau et Cohen, 1992**).

- **Ionisation** : les molécules présentes dans l'échantillon se volatilisent sous l'effet du vide et de la haute température (200°C), il en résulte un mélange d'ions issus de la fragmentation de l'échantillon de départ ;
- **Accélération** : Les ions formés se dirigent vers le dispositif de séparation sous l'effet d'un champ magnétique augmentant ainsi leurs énergies cinétiques.
- **Séparation** : Les ions seront distribués suivant leur rapport masse/charge ;
- **Détection** : après séparation, les ions sont recueillis par un détecteur sensible aux charges électriques transportées ;
- **Traitement du signal** : le signal de sortie de l'appareil conduit au spectre de masse qui constitue la représentation conventionnelle de l'abondance des ions en fonction de leurs rapports : masse/charge.

L'appareillage CPG/SM permet de fournir un chromatogramme accompagné d'un ensemble de spectres de masse correspondants à chaque pic chromatographique, ce qui permet l'identification précise de la majorité des constituants séparés par la CPG.

Partie II : Partie pratique

Matériel et méthodes

1. Matériel et méthodes

1.1 Matériel végétal

L'huile essentielle étudiée est extraite à partir des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* (la lavande).

1.1.1 Description de la plante

La lavande est un arbrisseau buissonnant pouvant atteindre 1 m de hauteur. Les feuilles, linéaires et de couleur gris vert, ont une longueur variant entre 3 et 5 cm. Lors de la floraison, la plante développe de longs pédoncules non ramifiés terminés par des épis dont la couleur varie du mauve pâle au violet (**Lis-Bachlin, 2002**).

Selon **Quezel et Santana (1963)**, la classification de cette plante est la suivante :

Règne	Plantes
Sous règne	plantes vasculaires
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Dialypétales
Ordre	Lamiales (Labiales)
Famille	Lamiaceées
Genre	<i>Lavandula</i>
Espèce	<i>Lavandula officinalis</i>

1.1.1. Collecte

Les fleurs de *Lavandula officinalis* ont été récoltées de l'Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires (INATAA), Université de Constantine, situé au septième Kilomètre du centre ville. La récolte était entreprise manuellement au mois de juin 2009 durant laquelle la plante était en pleine floraison.

1.1.2. Détermination de l'humidité

Le taux d'humidité est la quantité d'eau contenue dans la matière végétale. Le contenu en humidité des plantes a été déterminé par le procédé de séchage à l'étuve à $105^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ (**Twidwell et al., 2002**). Le taux d'humidité est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

$$H (\%) = (M1 - M2) / M1 \times 100$$

H % = taux d'humidité exprimé en pourcentage.

M1= Poids de l'échantillon en gramme après la récolte (plante fraîche).

M2 = poids de l'échantillon en gramme après le séchage (plante sèche).

1.1.4 Séchage et conservation

Les fleurs, fraîchement récoltées, sont séchées à l'ombre dans un endroit sec et aéré pendant environ 10 jours. Devenues sèches, elles sont récupérées dans des sacs propres pour servir ultérieurement à l'extraction de l'huile essentielle.

1.2. Méthodes d'analyse

1.2.1. Extraction de l'huile essentielle

1.2.1.1. Description du dispositif d'extraction

L'appareil utilisé pour l'hydrodistillation est de type Clevenger, il est constitué d'un chauffe ballon qui permet la distribution homogène de la chaleur dans le ballon, un ballon en verre pyrex où l'on place les fleurs séchées et l'eau distillée, une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant) qui vient de l'échauffement du ballon, un collecteur (erlen) en verre pyrex également qui reçoit les extraits de la distillation (figure 2).



Figure 2 : dispositif de l'hydro distillation

1.2.1.2 Procédé d'extraction

10 g des fleurs sèches sont mises dans un ballon à fond rond de 250 ml, additionnées de 100ml d'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition pendant environ 2 heures. L'huile essentielle est alors entraînée par la vapeur d'eau. Elle est ensuite condensée en passant par le condensateur. Le liquide recueilli résulte en un distillat avec une couche d'huile mince à la surface qui sera par la suite séparée, après repos du liquide. L'huile essentielle obtenue est gardée au réfrigérateur à 4 °C et à l'obscurité.

1.2.1.3 Détermination de la cinétique et du rendement d'extraction

Pour étudier la cinétique d'extraction de l'huile essentielle des fleurs de *Lavandula officinalis* à l'état sec, nous avons récupéré des quantités de l'huile essentielle correspondantes à des intervalles de temps de 10 mn qui s'étalent de 0 à 90 minutes. Les quantités des huiles essentielles obtenues vont être exploitées dans le but de calculer le rendement à chaque intervalle de temps.

Selon la norme **AFNOR (1986)**, le rendement en huile essentielle (RHE) est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M). Le rendement est exprimé en pourcentage, et il est donné par la formule suivante :

$$\text{RHE (\%)} = \text{M}'/\text{M} \times 100$$

RHE : rendement en huile essentielle des fleurs sèches ;

M' : masse d'huile essentielle en gramme à partir des fleurs sèches ;

M : masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme et qui vaut 10 g.

1.2.1.4 Conservation de l'huile essentielle obtenue

La conservation des huiles essentielles exige certaines précautions indispensables. C'est pour cela nous les avons conservées à une température voisine de 4 °C, dans un flacon en verre brun fermé hermétiquement pour la préserver de l'air et de la lumière.

2. Détermination de la composition chimique de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse

L'étude analytique de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* a été réalisée au complexe GL1/K département ADM/Soc service Laboratoire, Skikda par chromatographie en phase gazeuse type VARIAN CHROMPACK-CP 3800 par injection de 0.2µl d'extrait à l'aide d'une micro-seringue. Le mode d'injection (Split) doit être rapide pour éviter les élargissements des pics.

- ❖ Le gaz vecteur est l'hélium (He) d'un débit de 0.3ml/min ;
- ❖ La colonne utilisée est une colonne capillaire de type CP-Chirasil-Dex CB fusedsilica WCOT, de 25m de longueur et de 0.25mm de diamètre intérieur. Epaisseur de la phase stationnaire : 0.25µm ;
- ❖ La programmation de la température de la colonne est comme suit : la température initiale d'injection est de 70°C pendant 2.50mn, puis s'élève par palier de 15°C/mn à 240°C pendant 20mn ;
- ❖ Le détecteur utilisé pour cette analyse est de type FID, température 250° C.

L'appareil est piloté par un ordinateur menu d'un logiciel approprié pour ce genre d'analyse et d'une banque de données NIST qui permet l'identification des composés .Le temps de sortie de chaque pic, le « temps de rétention », caractérise qualitativement la substance concernée. L'aire limitée par ces pics permet de mesurer la concentration de chaque composé séparé.

3. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante *in vitro* a été évaluée par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH*. Le pouvoir antioxydant de l'huile essentielle testée a été estimé par comparaison avec un antioxydant naturel (α -tocophérol). Tous les tests ont été réalisés avec 3 répétitions pour chaque concentration.

3.1 Mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH*

3.1.1 Principe

La capacité de donation des électrons par les huiles essentielles est mise en évidence par une méthode spectrophotométrique, en suivant la disparition de la couleur violette d'une solution méthanolique contenant le radical libre DPPH⁺ (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) (**Burits et Bucar, 2000**).

3.1.2 Mode opératoire

Le test de DPPH est réalisé en suivant la méthode décrite par **Burits et Bucar, (2000)** ; où 50µl de chacune des solutions méthanoliques des HE testées à différentes concentrations (200µg/ml, 400 µg/ml, 600 µg/ml, 800 µg/ml et 1000µg/ml) sont mélangées avec 5ml d'une solution méthanolique de DPPH(0.004%). Après une période d'incubation de 30minutes à la température de laboratoire, l'absorbance est lue à 517nm. L'inhibition du radical libre DPPH par la vitamine E a été également analysée à la même concentration pour la comparaison.

On détermine la cinétique de la réaction et les paramètres de calcul de l'activité antioxydante pour la vitamine E et l'huile essentielle.

3.2 Détermination du pourcentage d'inhibition

Selon **Sharififar et al., (2007)**, l'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage (I%) est calculée de la manière suivante :

$$I\% = (A \text{ blanc} - A \text{ échantillon}) \times 100 / A \text{ blanc}$$

A blanc : Absorbance du blanc (DPPH dans le méthanol) ;

A échantillon : Absorbance du composé d'essai.

Tous les essais ont été effectués en triple

La cinétique des réactions de l'huile essentielle et de la vitamine E avec le DPPH• a été inscrite à chaque concentration examinée.

Les concentrations en huile essentielle et en vitamine E, en fonction des pourcentages du DPPH inhibés, ont été tracées à la fin de la réaction afin d'obtenir l'index IC50. Ce paramètre est défini comme la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du DPPH• initiale de 50% (**Sharififar et al., 2007**).

3.3 Détermination du temps d'équilibre TEC50

Le paramètre TEC50 est défini comme le temps atteint à l'équilibre avec une concentration d'antioxydant égale à IC50. Ce temps est déterminé graphiquement (**Sharififar et al., 2007**).

3.4 Détermination de l'efficacité antiradicalaire EA

Les deux facteurs IC50 et TEC50 peuvent être combinés afin d'obtenir le paramètre d'efficacité anti-radicalaire.

$$EA = 1/IC50 \times TEC50$$

ml/ μ g x mn

4. Recherche et identification des moisissures des légumes secs

4.1 Présentation des échantillons

Les légumes secs utilisées pour cette étude sont :

- ❖ Les haricots (*Phaseolus vulgaris*),
- ❖ Les Pois chiches (*Cicer arietinum*),
- ❖ Les Fèves (*Vicia faba*)
- ❖ Les Pois secs (*Pisum sativum*).

Ces légumes secs sont vendus au marché de Skikda, sans emballage adéquat dans des sacs de 25 kg, stockés à température ambiante.

Les prélèvements ont été réalisés le 15/05/2010, 2kg de chaque type de légumineuse sont pris au hasard et sont mis dans un sachet propre et amenés au laboratoire pour être analysés.

4.2 Triage des grains

Pour chaque échantillon, une séparation préalable des grains supposés contaminés et des grains supposés sains a été réalisée. La séparation s'effectue en se basant sur les critères suivants :

- Couleur des grains ;
- Volumes et tailles des grains ;
- Formes des grains ;
- Etat des grains (cicatrice, blessure...).

Tout changement de taille, de couleur, ou d'aspect général de la graine permet de suspecter la contamination de cette dernière (**Botton et al., 1990**).

4.3. Mesure de l'humidité des grains

L'humidité est déterminée par séchage des légumes secs broyés à une température de 110°C jusqu'à un poids constant (**François, 2004**).

Le taux d'humidité est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

$$H' (\%) = (M'1 - M'2) / M'1 \times 100$$

H' (%) = taux d'humidité exprimé en pourcentage.

M'1 = Poids de l'échantillon en gramme avant séchage.

M'2 = poids de l'échantillon en gramme après le séchage.

4.4. Dénombrement des moisissures

Cinq graines ont été aléatoirement choisies, plaquées (une graine au centre et une dans chaque quart de cercle) dans des boîtes de Pétri contenant l'agar de dextrose de pomme de terre (PDA) et incubées à 28°C pendant sept jours. Cinq répliques ont été faites par échantillon. L'identification de différentes espèces des mycètes a été faite selon **Pitt et Hocking (1999) et Houssou et al. (2009)**.

4.4.1. Observation et repiquage des mycéliums

Des observations quotidiennes sont effectuées dès la germination des graines et apparition des mycéliums. Ces derniers sont repiqués sur milieu PDA (**Botton et al., 1990 ; Guiraud, 1998**).

4.4.2. Purification

La purification des souches est effectuée par prélèvement d'un hyphe terminal après culture en boîte de Pétri sur un milieu neuf. La souche estensemencée au centre de la boîte. Le prélèvement a lieu lorsque le développement de la souche est suffisant. L'étude approfondie d'une souche est effectuée à partir d'une culture issue d'une seule spore (**Guiraud, 1998**).

4.4.3. Identification

L'identification des moisissures est réalisée par examen de la culture sur milieux solides en boîte de Pétri. L'examen est effectué à l'œil nu, à la loupe et au microscope. Il est relativement facile d'identifier le genre mais il est beaucoup plus délicat de déterminer avec certitude l'espèce (**Guiraud, 1998**).

4.4.4. Etude des caractères macroscopique

Les caractères culturaux sont étudiés par préférence sur un milieu PDA car les milieux trop riches en sucre et en peptone entraînent des phénomènes de pléomorphisme, les colonies peuvent perdre leur aspect caractéristique et ne pas sporuler (**Guiraud, 1998**).

Les caractères culturaux ainsi étudiés sont :

- Vitesse de croissance ;
- Couleur des colonies et variation des couleurs en fonction du temps ;
- Structure du thalle ;
- Couleur de l'envers des colonies ;
- Couleur et changement de couleur du milieu ;
- Présence de gouttes de transpiration sur le mycélium aérien (exsudat) ;
- Odeurs.

4.4.5 Etude des caractères microscopiques et de la sexualité

La détermination des moisissures fait appel aux caractères morphologiques. Elle nécessite le montage de préparations microscopiques, parfois une coloration du matériel à examiner et des mesures micrométriques sont nécessaires (**Botton et al., 1990, Guiraud, 1998**).

L'examen microscopique permet d'étudier les caractères suivants :

- Hyphes cloisonnés ou non ;
- Mycélium diffus, épais, coloré, incolore ;
- Présence et type de spores sexuelles : oospore, zygosporé, ascospores et basidiospores ;
- Présence de spores asexuées : type et apparence ;
- Agencement des conidiophores et sporangiophores ;

L'examen microscopique s'effectue sur des préparations à l'état frais, après fixation au lactophénol et après coloration à différents grossissements (x10, x40 et x100 pour l'étude des spores) (**Guiraud, 1998 ; Smith, 2002**).

❖ Montage sans coloration

La méthode utilisée est celle de **Moreau (1991)**, Sur une lame porte objet est déposée une goutte d'eau sur laquelle on y place délicatement un fragment de thalle à observer, que l'on recouvre d'une lamelle pour être observé au microscope.

Pour éclaircir les préparations, un meilleur milieu de montage est utilisé c'est le lactophénol d'AMANN dont la composition est la suivante :

Phénol pur cristallisé.....	20g
Acide lactique.....	20g
Glycérine.....	40g
Eau distillée.....	20ml

A conserver en flacon coloré à l'abri de la lumière.

❖ Montage avec coloration

La méthode utilisée est celle de **Guiraud (1998)**. Le colorant utilisé est le bleu de méthyle (bleu coton C₄B poirier qualifié de meilleur colorant pour les champignons). Il est utilisé en mélange avec un autre milieu de montage, le lactophénol à 0.5%.

4.4.6. Conservation des souches

Les souches isolées sont conservées en tube sur gélose inclinée. Après repiquage, les cultures sont maintenues pendant une semaine à 30°C puis stockées à 4°C pour favoriser la viabilité et limiter les possibilités de variations, ou par congélation en présence de substances cryoprotectrices telles que le glycérol (**Bouchet *et al.*, 1999**).

5. Evaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis*

L'évaluation de l'activité antifongique de l'HE étudiée sur des souches tests et des souches isolées des légumes secs, a été appréciée selon la méthode de **Moulari (2005)**.

5.1 Utilisation de souches tests

5.1.1 Choix et origine des souches tests

L'activité antifongique de l'HE étudiée a été testée sur quatre souches pures issues de Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications de la Faculté des Sciences de la nature, Université Mentouri, Constantine. Les souches sont :

- ❖ *Aspergillus niger* CIP 1431;
- ❖ *Aspergillus fumigatus* CIP 1082.74;
- ❖ *Trichoderma rubrum* CIP 2043.92;
- ❖ *Fusarium oxypouim* CIP 625.72.

Ces souches ont été choisies parce qu'elles figurent parmi les genres les plus contaminants des légumes secs et principaux producteurs de mycotoxines.

5.2. Test antifongique

L'activité antifongique a été évaluée par la méthode de dilution en milieu solide pour déterminer les taux d'inhibition et en milieu liquide pour déterminer les CMI, CMF et CFS (Baba-Moussa, 1999 ; Ngonu Ngane, 1999 ; Batawila, 2002 ; Moulari, 2005).

5.2.1 Préparation des solutions de l'huile essentielle

En se basant sur des essais préalables, une gamme de solutions de concentration allant de 250 µg/ml à 4000 µg/ml a été préparée par l'ajout de 2500 à 40000 µg de l'huile essentielle dans 10ml de solvant constitué de 50% d'eau et 50% d'éthanol (pour éviter des gènes de précipités lors de la culture sur milieu liquide).

5.2.2. Technique de dilution en milieu solide

Cette technique a été appliquée dans des boîtes de Pétri de 9mm pour déterminer les taux de croissance et les taux d'inhibition.

1000 ml de Sabouraud solide ont été préparés, stérilisés et conservés.

Au début de l'application de cette méthode, ce milieu de Sabouraud solide stérilisé a été placé dans de l'eau bouillante puis introduit au bain-Marie pour ramener sa température à 45° C.

Pour tous les tubes contenant 20ml de Sabouraud, 0.5ml de l'huile essentielle est ajouté. Chaque tube est homogénéisé instantanément par agitation manuelle puis son contenu est versé dans une boîte de Pétri. Le mélange ainsi versé et laissé au repos jusqu'à refroidissement et solidification.

L'ensemencement est fait par piqûre puis, les boîtes de Pétri (témoins et essais) sont mises à incuber respectivement pour 7 jours.

Quotidiennement, la croissance de filaments sur chaque boîte est relevée et il est procédé, à la fin du temps approprié d'incubation, à une mesure des diamètres de différentes colonies de champignons filamenteux pour calculer le taux d'inhibition (I%) (Kordali *et al.*, 2003)

Pour cette méthode, la technique consiste à mesurer les diamètres des différentes colonies de champignons après le temps d'incubation requis puis résoudre l'équation :

$$I'(\%) = 100 \times (dC - dE) / dC$$

I'(%) = Taux d'inhibition exprimé en pourcentage

dC = Diamètre de colonies dans les boîtes « témoins positifs »

dE = Diamètre de colonies dans les boîtes contenant l'extrait de plante

L'huile essentielle est dite :

- ❖ très active lorsqu'elle possède une inhibition comprise entre 75 et 100 % ; la souche fongique est dite très sensible ;
- ❖ active lorsqu'elle possède une inhibition comprise entre 50 et 75 % ; la souche fongique est dite sensible ;
- ❖ moyennement active lorsqu'elle possède une inhibition comprise entre 25 et 50% ; la souche est dite limitée ;
- ❖ Peu ou pas active lorsqu'elle possède une inhibition comprise entre 0 et 25% ; la souche est dite peu sensible ou résistante.

A l'issue de cette étude préliminaire, toutes concentrations ayant présentées un pourcentage d'inhibition > 50% sur une souche fongique sont sélectionnées pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de dilution en milieu liquide (**Alcamo, 1984 ; Rotimi et al., 1988**).

De même, on peut évaluer l'efficacité de l'HE sur une ou des souche(s) donnée(s) en exprimant la proportion de celles ayant présentées un taux d'inhibition supérieur ou égal à 50%.

5.2.3 Technique de dilution en milieu liquide

Cette technique comporte deux étapes : la première permettant de déterminer les CMI et la seconde les CMF et CFS. La technique suivie se fonde sur celles des travaux d' **Alcamo (1984)** et de **Rotimi et al. (1988)**.

5.2.3.1 Détermination des CMI

Préalablement, le Sabouraud liquide est préparé et stérilisé à l'autoclave puis conservé dans des flacons de 250ml. Les diverses solutions (250 à 4000 µg/ml) ayant eu des pourcentages d'inhibition supérieur à 50% sont effectuées.

Juste avant la manipulation, la suspension de spores est préparée. L'application de la technique se fait dans des tubes à essais.

Cinq types d'essais successifs sont réalisés :

- Essai 1 : 100 µl d'huile essentielle dans 900 µl du milieu Sabouraud liquide ;
- Essai 2 : souches à tester dans 1000 µl du milieu Sabouraud liquide (sans l'huile essentielle) ;
- Essai 3 : 100 µl du solvant (éthanol et eau) dans 900 µl du milieu Sabouraud liquide ;
- Essai 4 : souches à tester plus 100µl de fongicide chimique (Malotox 50) dans 900µl du milieu Sabouraud liquide ;
- Essai 5 : 100 µl d'huile essentielle avec différentes concentrations, la souche à tester dans 900 µl du milieu Sabouraud liquide.

Les tubes ainsi préparés sont incubés à 28° C pendant 7 jours. Après l'incubation, on repère les tubes dans lesquels on ne note aucune croissance de moisissures et on passe à la seconde étape de cette technique : la détermination des CMF et des CFS.

5.2.3.2 Détermination des CMF et CFS

Après avoir repéré les tubes dans lesquels aucune croissance n'est constatée, on poursuit l'expérimentation dans des nouveaux tubes identifiés.

Dans chaque tube, on introduit 950µl de Sabouraud liquide stérile puis 50µl d'un essai déterminé ayant présenté une inhibition totale. On en fait de même dans les tubes témoins.

On introduit les subcultures ainsi réalisées dans une boîte et on passe à l'incubation comme précédemment. Les subcultures sont observées chaque jour. Après 7 jours, on note les subcultures dans lesquelles il n'y a aucune reprise de croissance : on détermine ainsi les concentrations minimales fongicides (CMF) (Al-Awad, 1993). On note les concentrations des extraits des subcultures pour lesquelles il y a croissance comme étant les concentrations fongistatiques (CFS).

6. Traitement statistique

Les moyennes plus ou moins l'écart type des trois essais ainsi que les représentations graphiques ont été réalisées par le logiciel Excel 2007.

Résultats et discussion

1. Huile essentielle

1.1 Taux d'humidité de la matière végétale

La détermination de l'humidité des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* a révélé un taux égal approximativement à la moitié du poids des fleurs fraîches. Ce taux correspond à environ 52,77% (figure 3). Ce qui signifie que 47,23% représente le taux de matière sèche ayant servi réellement à l'extraction des huiles essentielles.

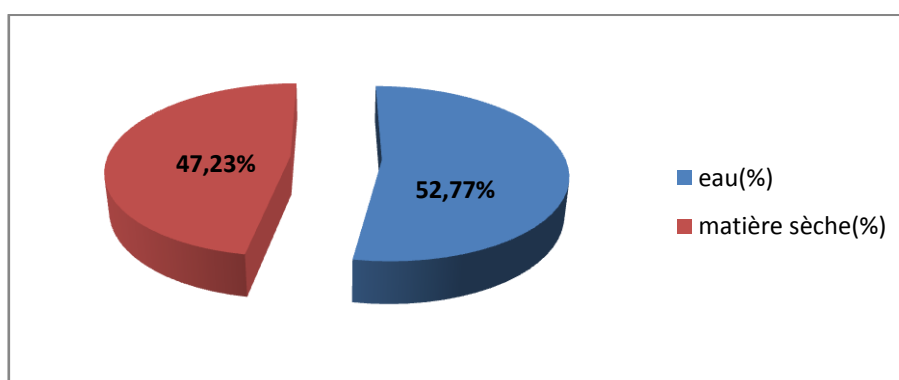


Figure 3 : Taux d'humidité de *Lavandula officinalis*

1.2. Cinétique d'extraction de l'huile essentielle et rendement en huile essentielle

1.2.1 Cinétique d'extraction de l'huile essentielle

D'après la formule du RHE(%), nous avons obtenu les résultats illustrés dans la figure 4.

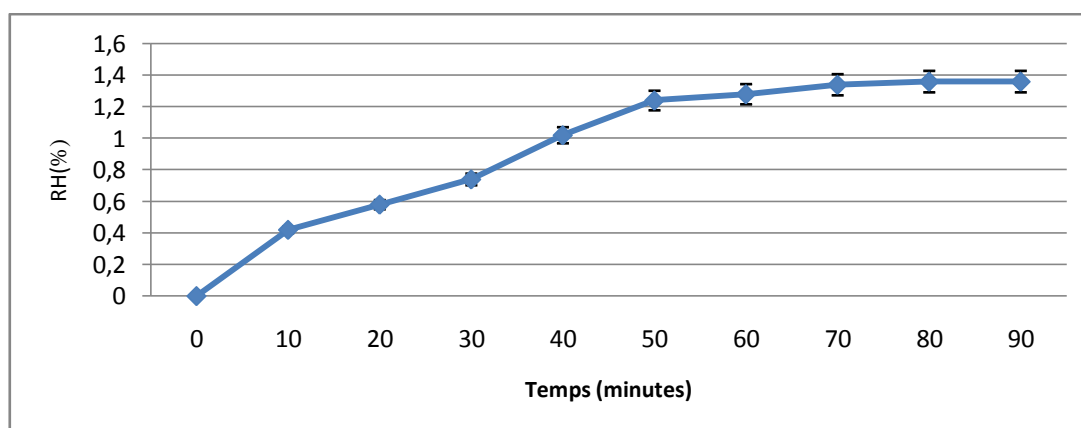


Figure 4 : Cinétique d'extraction d'huile de la lavande

La cinétique d'extraction consiste à déterminer le rendement en fonction du temps d'extraction. Cette étude a pour but de fixer le temps nécessaire pour extraire le maximum d'huile et pour éviter les pertes de temps et d'énergie.

La cinétique d'extraction de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis*, indique que le rendement augmente en fonction du temps puis il se stabilise. Ce rendement augmente rapidement puis il tend vers un palier à partir de 80mn.

1.3 Rendement en huile essentielle

On a pu récupérer une quantité huileuse voisine de $1.36 \pm 0.2\%$. **Bouguerra et Zeghou (2009)** ont trouvé que les fleurs de *Lavandula officinalis* collecté du même lieu ont présenté un rendement de 3.41%

De même, les résultats obtenus par **Sidi Boulouar et Ziane (2003)** indiquent que les fleurs sèches de *la lavande* provenant de la région d'Ouchba et Zarifet ont donné des teneurs en huile essentielle équivalentes respectivement à 0.94% et 0.70%.

Ces variations de teneurs peuvent être dues à plusieurs facteurs cités dans la bibliographie notamment le degré de maturité des fleurs de *Lavandula officinalis*, l'interaction avec l'environnement (type de climat, sol), le moment de la récolte et la méthode d'extraction (**Besombes, 2008**).

1.4. Principaux composés de l'huile essentielle détectés par la chromatographie en phase gazeuse

L'analyse de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* par chromatographie en phase gazeuse a permis d'identifier 49 composés terpéniques cités dans le tableau 2 par ordre d'élution.

Tableau 2 : Concentration en (%) et temps de rétention des différents composés obtenus par analyse chromatographique en phase gazeuse de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis*

Composé	Temps de rétention (mn)	(m/m) %	Composé	Temps de rétention (mn)	(m/m)%
Tricyclene	6.101	tr	Carvone	82.354	tr
3-octanol	13.201	1.7	Dihydro linalool acetate	83.622	tr
Camphène	15.711	0.37	Linalool	86.970	10.68
βPinène	18.330	0.25	Lavandulyl acetate	87.950	0.08
Octen-3-ol	19.178	0.41	Linalyl acetate	88.390	15.26
Bornyle acetate	21.882	0.7	α- cis bergamotene	89.292	0.07
Myrcene	22.202	0.51	αPinène	89.997	0.3
Camphor	22.365	11.25	δ- Cadinene	90.700	0.02
α-phellandrene	25.337	tr			
δ- 3-carene	26.490	0.32			
1,4-Cineole	28.210	0.35			
Limonene	29.990	tr			
3-octanone	30.112	0.65			
o-cymene	30.995	tr			
p-cymene	40.114	0.49			
(z)-β-ocimene	42.151	0.87			
(E)-β-ocimene	43.571	0.75			
Hexyl-iso butyrate	43.622	0.95			
α- CampolenalI	47.911	tr			
trans sabinene hydrate	48.700	0.1			
Perillene	50.160	tr			
γ-terpinene	52.339	11.20			
1,8-cineole	53.064	10.25			
trans-pinocarveol	54.129	0.24			
Lavandulyl isobutyrate	55.624	0.35			
Isoborneol	57.430	0.6			
Carvacrol	58.008	0.9			
Cis-chrysantheol	58.027	0.49			
Borneol	59.855	tr			
Lavandulol	60.235	0.7			
Terpinen-4-ol	61.751	0.7			
m- cymen-8-ol	63.015	0.6			
p-cymen-8-ol	64.899	1.25			
Neoisomenthol	70.367	0.15			
α- Terpeneol	73.205	0.5			
Hexyl butyrate	74.496	0.3			
Mytenol	76.469	0.75			
Cis- carveol	78.409	tr			
Dihydro carveol	78.917	tr			
Isobornyl formate	81.382	tr			
Hexyl-2-methyl butyrate	81.254	0.13			

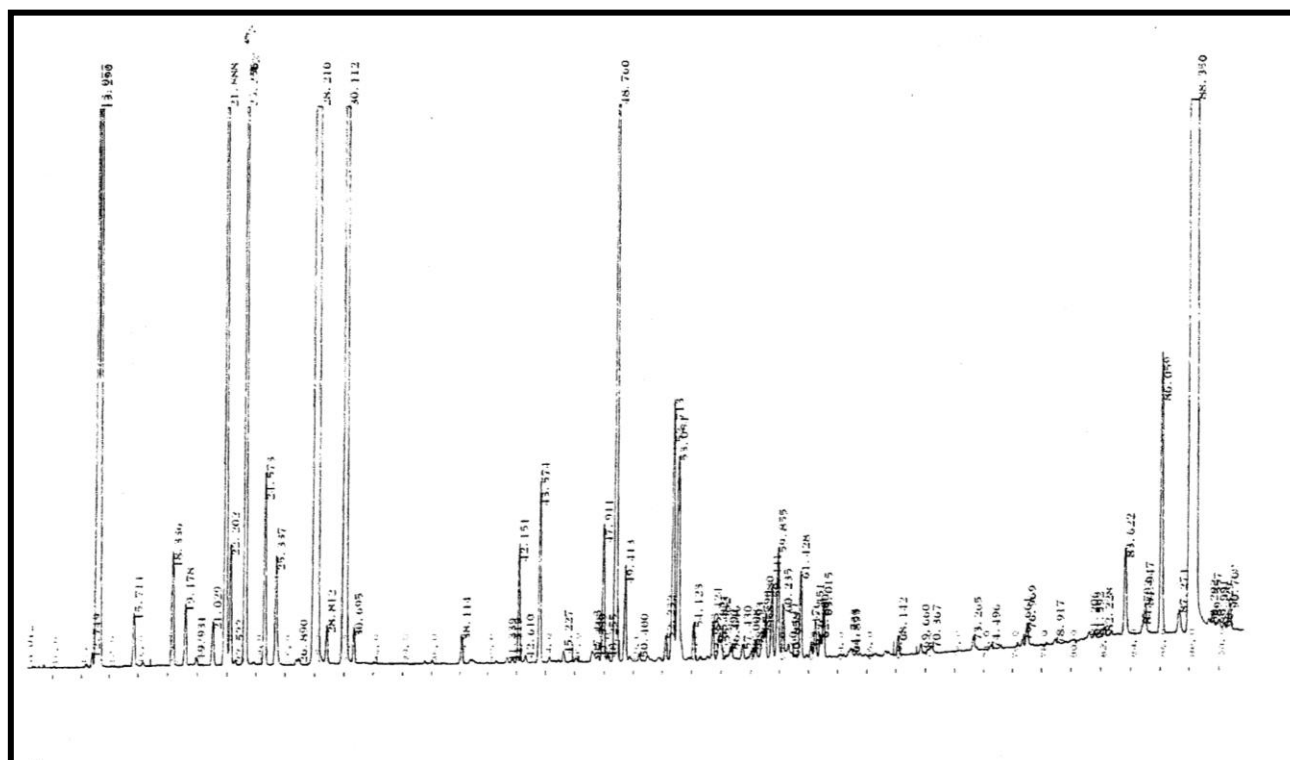


Figure 5 :Chromatogramme de l'HE de *Lavandula officinalis* obtenu par CPG

D'après ces résultats, 82.59% des composants de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* représentant la somme des pourcentages des composants obtenus ont été identifiés dont 67.29% sont des dérivés monoterpéniques oxygénés et 15.3% sont des hydrocarbures monoterpéniques. Il semble que les composants de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* sont des mono terpènes. Les composants majeurs de cette huile sont :Linalyl acétate (15.26 %), Linalool(10.68%), 1,8- cineole(10.25%), γ -terpinene(11.2%) et camphor(11.25%) .

Ces résultats sont différents de ceux obtenus par **Kulevanova et al. (2000)** qui ont examiné la composition chimique des huiles essentielles des fleurs de *Lavandula officinalis* collectées de la montagne de KOZJAK(MACEDONIA). Ils ont trouvé 32 constituants avec une prédominance de Linalool (25.7%), Linalyl acétate (23.2%) et lavandulyl acetate(12.4%) avec une dominance des composants monoterpéniques et et la présence des hydrocarbures sesqueterpéniques et ses dérivés oxygénés.

Verma et al. (2009), ont analysé la composition des fleurs de *Lavandula officinalis* cultivées à Uttarakand(Inde), ils ont identifiés 37 composés monoterpéniques : les composés majeurs étaient :Linalyl acétate(47.56%), linalool(28.06%), lavandulyl acétate(4.34%) et α -terpineol(3.7%).

Sun kim et Sun lee(2002) ont comparé la composition chimique des huiles essentielles de *Lavandula officinalis* obtenues par différentes méthodes d'extraction. Ils ont trouvé que le

linalyl acétate (35.44%) et le linalool(18.70%) sont prédominants dans les huiles essentielles obtenues par distillation à la vapeur tandis que leurs valeurs étaient respectivement de 2.63 et 4.04% dans le cas d'extraction par solvants ; 36.80 et 43.47% dans le cas d'extraction par micro-ondes.

D'après ces résultats, on remarque que la composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce *Lavandula officinalis* cultivée à Constantine est différente de celle obtenue dans de nombreux travaux sur la même espèce dans les différentes régions dans le monde, avec une prédominance des composés monoterpéniques dans la plupart des cas mais à des proportions différentes.

Cette différence de composition est due probablement à diverses conditions notamment l'environnement, le génotype, l'origine géographique, la période de récolte, le lieu de séchage, la température et la durée de séchage, les parasites et la méthode d'extraction (Svoboda et Hampson, 1999).

1.5Activité antioxydante

1.5.1Cinétique de la réaction

La cinétique de réduction du radical libre DPPH obtenue pour chaque concentration de vitamine E et d'huile essentielle est indiquée dans la figure 6.

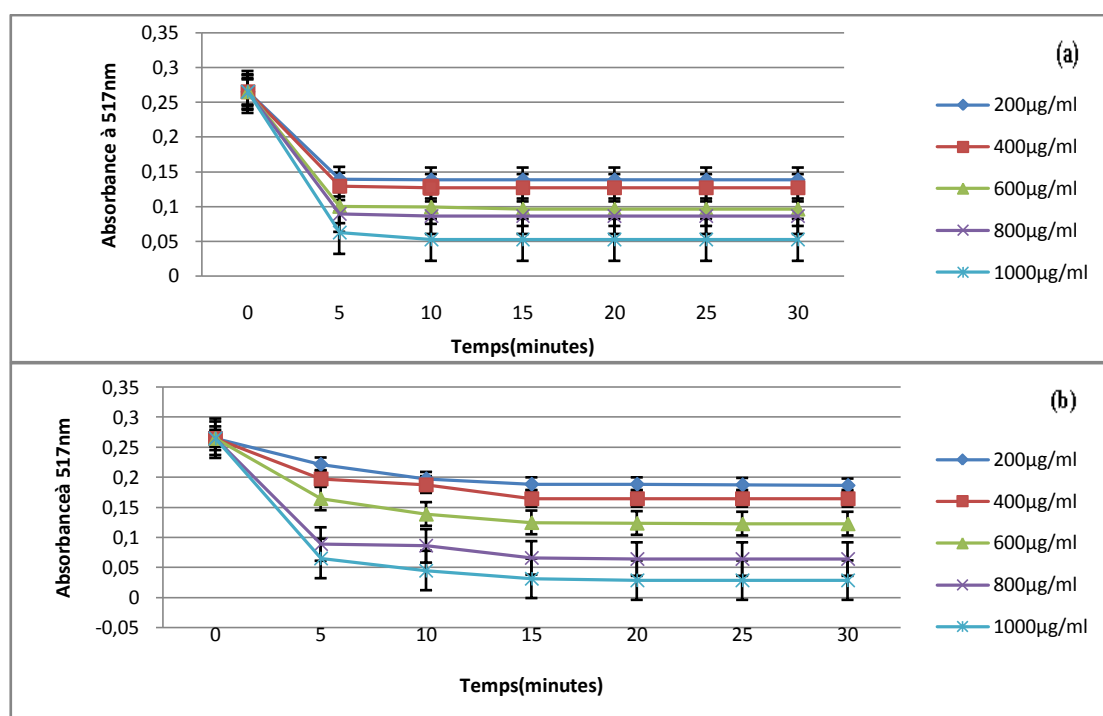


Figure 6 : cinétique de réduction du DPPH : (a) : vitamine E ;(b) : huile essentielle de la lavande

Pour les deux composés examinés (vitamine E et huile essentielle), la réaction est biphasée, avec une baisse rapide dans l'absorbance dans les premières minutes, suivies d'une étape plus lente, jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint (figure 6), alors on distingue deux zones :

- ❖ Zone à forte cinétique de piégeage du radical observée au bout des cinq premières minutes pour la vitamine E pour toutes les concentrations et au bout des 10 minutes pour la concentration 1000 $\mu\text{g/ml}$. Cette zone est observée au bout des 15 premières minutes pour l'HE.
- ❖ Zone à faible cinétique de piégeage du radical DPPH ou zone de tendance vers l'équilibre constatée après les 5 minutes pour toutes les concentrations de la vitamine E, exceptée la concentration 1000 $\mu\text{g/ml}$. Pour l'huile essentielle, cette zone est constatée après les 15 minutes.

Lorsqu'on effectue la réaction entre le DPPH et la vitamine E donneuse d'hydrogène, on constate que la réaction atteint un équilibre au bout d'un temps court par rapport à l'huile essentielle de *Lavandula officinalis*.

L'activité antioxydante est tributaire de la mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle des composés phénoliques de l'huile essentielle. En présence d'un radical libre DPPH \cdot , l'atome H est transféré sur ce dernier alors transformé en une molécule stable DPPH, ceci provoque une diminution de la concentration du radical libre et également l'absorbance au cours du temps de réaction jusqu'à l'épuisement de la capacité d'antioxydant donneur d'hydrogène.

1.5.2 Détermination du pourcentage d'inhibition

Les résultats obtenus lors du test de mesure de pourcentage d'inhibition du radical DPPH (1,1- Diphenyl-2-picrylhydrazyl) sont enregistrés dans la figure 7.

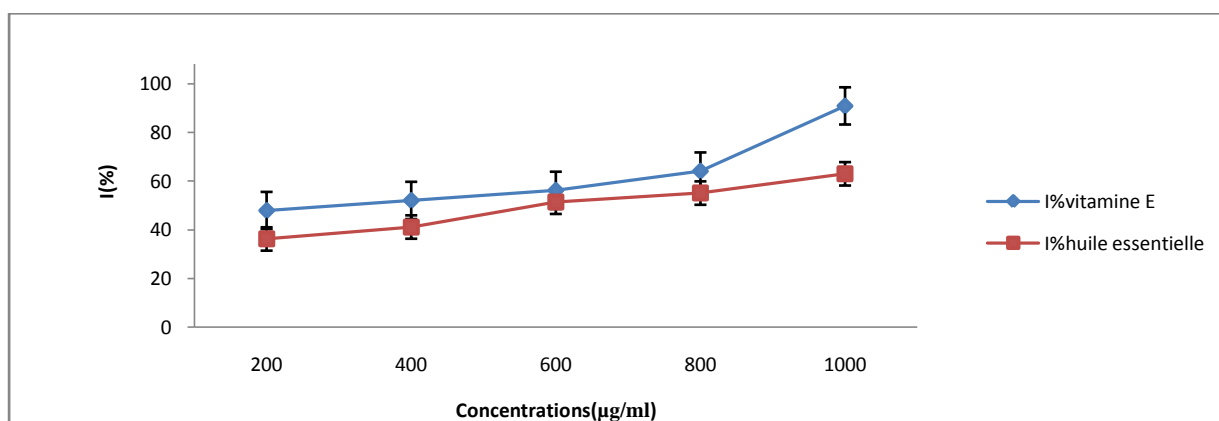


Figure 7: Pourcentage d'inhibition pour l'huile essentielle et la vitamine E

Il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour la vitamine E ou pour l'huile essentielle de la lavande.

On remarque que le pourcentage d'inhibition du radical libre pour l'huile essentielle est inférieur à celui de la vitamine E pour toutes les concentrations utilisées. Pour une concentration de 1000µg/ml, l'huile essentielle a révélé un pourcentage d'inhibition de DPPH de 63.01±5.26% tandis que la vitamine E est de 90.94±2.66%

1.5.3. Détermination d'IC50

IC50 est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande, un exemple de calcul est schématisé dans la figure 8.

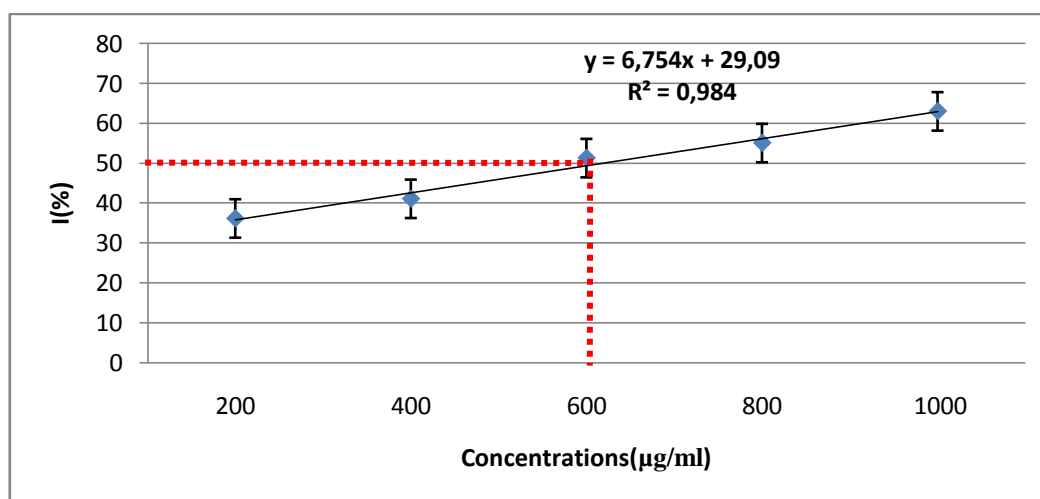


Figure 8: Calcul d'IC50 pour l'huile essentielle de la lavande

Les valeurs d'IC50 pour l'huile essentielle de la lavande et la vitamine E sont indiquées dans la figure 9

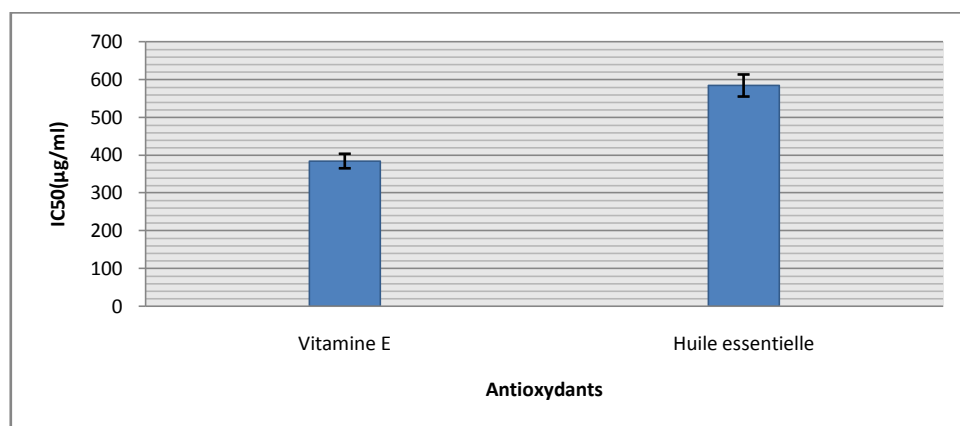


Figure 9: Valeurs d'IC50

L'huile essentielle de la lavande pouvait ramener le radical libre stable 2.2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) au diphenylpicrylhydrazine jaune-coloré avec un IC50 de $584 \pm 0.58 \mu\text{g/ml}$ montrant une activité antioxydante inférieure à celle de la vitamine E.

Il semble d'après ces résultats que la vitamine E est l'antioxydant le plus efficace avec un IC50 de $384 \pm 0.76 \mu\text{g/ml}$ par rapport à l'huile essentielle étudiée.

1.5.4. Détermination de TC50

On a choisi l'état d'équilibre comme période de mesure où il s'avère que la réaction ne progresse pas plus loin. Le temps à l'état d'équilibre dépend de la réactivité des antioxydants et des concentrations utilisées.

Le paramètre TEC50 est défini comme le temps atteint à l'équilibre avec une concentration d'antioxydant égale à IC50. Ce temps est déterminé graphiquement.

On constate que la vitamine E réagit d'une façon plus rapide avec DPPH•.

Le TEC50 pour l'HE étudiée est de $17 \pm 1 \text{mn}$, alors que la vitamine E a besoin seulement de $8 \pm 0.66 \text{ minutes}$ pour diminuer la concentration du radical libre de 50%.

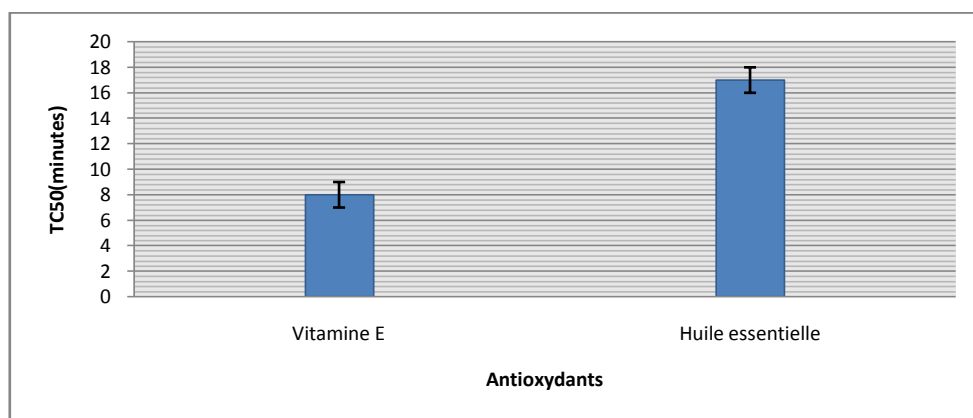


Figure 10: Valeurs de TC50

Pour caractériser l'efficacité de ces antioxydants, on calcule l'EA (paramètre d'efficacité antiradicalaire).

1.5.5 Paramètre d'efficacité antiradicalaire

Un nouveau paramètre a été défini, l'efficacité antioxydante, qui combine les deux paramètres (IC50 et TC50) afin de caractériser facilement le comportement d'une substance en tant qu'antioxydant. Les paramètres de calcul de l'activité antioxydante sont résumés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Les paramètres de calcul de l'activité antioxydante

	IC50($\mu\text{g/ml}$)	TEC50 (mn)	AE($\text{ml}/\mu\text{g}\times\text{mn}$)
Vitamine E	384 \pm 0.76	8 \pm 0.66	0.32 \pm 0.06
HE	584 \pm 0.58	17 \pm 1	0.1 \pm 0.66

D'après ces résultats, il semble que l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* a une activité antioxydante mais elle est moins efficace que celle de la vitamine E (Tableau 3).

Il semble aussi que cette activité est liée à la présence des composés phénoliques dans l'huile essentielle. Le rôle principal des composés comme réducteurs des radicaux libres est souligné dans plusieurs rapports (**Villano et al., 2007**).

Le camphor qui est un composé majoritaire de notre huile essentielle avec une concentration de 11.25% possède une forte activité antioxydante (**Svoboda et Hampsen, 1999**).

Ce n'est pas uniquement les composés majoritaires des HE qui sont responsables de cette activité antioxydante, mais il peut y avoir aussi d'autres composés minoritaires qui peuvent interagir d'une façon synergique ou antagoniste pour créer un système efficace vis-à-vis des radicaux libres (**Lu et Foo, 2001 ; Sing et al., 2006**). La présence de carvacrol même à faible concentration dans l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* (0.9%) peut expliquer l'activité de piégeage du radical DPPH.

Par ailleurs, **Economou et al. (1991)** ont trouvé une activité antioxydante des huiles essentielles des fleurs du genre *Lavandula* contre la détérioration oxydante du saindoux.

De même, **Hui et al. (2010)** ont analysé la capacité antioxydante d'huile essentielle de la lavande sur l'inhibition de la peroxydation d'acide linoléique et l'inhibition de la peroxydation d'acide linoléique par la vitamine E à la même concentration pour la comparaison. Ils ont constaté que l'huile essentielle de la lavande a présenté une activité antioxydante plus forte que la vitamine E contre la peroxydation des lipides. Cependant, ces constatations ne concordent pas avec les résultats de **Wiesenfeld (1999)**, qui a montré que les extraits des fleurs de la lavande collectées de différentes régions ne possèdent pas une activité antioxydante.

Ces résultats contradictoires sont dus probablement à la différence de la composition chimique entre ces huiles essentielles (**Lis- Balchin, 2002**).

Dans deux autres études réalisées par **Lis-Balchin et Deans (1997)** et **Lis-Balchin et al. (1998)**, ils ont prouvé qu'il n'y avait aucune corrélation entre le pourcentage des composants principaux, linalol et linalyl acetate et l'activité antioxydante des huiles essentielles extraites de la lavande.

2. Taux d'humidité et les principaux genres de moisissures détectés dans les échantillons de légumes secs étudiés

2.1 Taux d'humidité des échantillons des légumes secs

Les taux d'humidité des différents échantillons des légumes secs sont indiqués dans le tableau 4.

Tableau 4 : Taux d'humidité des grains des différents échantillons des légumes secs

Echantillon de légume sec	Haricots secs	Pois chiches	Petits pois	Fèves
Taux d'humidité (%)	15.59±0.22	16.26±0.45	17.65±0.56	16.28±0.7

La détermination de l'humidité des échantillons des légumes secs a révélé des taux supérieurs à 15%. Ces taux correspondent respectivement à 15.59±0.22%, 16.26±0.45%, 17.65±0.56% et 16.28±0.7% pour les haricots secs, les pois chiches, les petits pois et les fèves.

D'après le diagramme de développement des moisissures de Burgers et Burrel (1964) cité in **Terrain et Grallet (2003)**, ces légumes secs regroupent toutes les conditions pour les quelles les moisissures se multiplient.

2.2 Isolement

Malgré l'apparence saine des lots des légumes secs analysés, leurs taux de contamination se sont révélés très élevés.

L'isolement des moisissures réalisé sur les lots des légumes secs analysés, nous a permis d'obtenir :

- ❖ 9 souches à partir des pois chiches : PP1, PP2, PP3, PP4, PP5, PP6, PP7, PP8, PP9 ;
- ❖ 12 souches à partir des fèves : F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10, F11, F12 ;
- ❖ 14 souches à partir des petit pois : PC1, PC2, PC3, PC4, PC5, PC6, PC7, PC8, PC9, PC10, PC11, PC12, PC13, PC14 ;

- ❖ 15 souches à partir des haricots secs : H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15.

2.3 Identification des genres

L'identification des genres fongiques a été réalisée selon les clés de détermination de **Botton et al. (1990)**, **Malloch (1997)**, **Guiraud (1998)** et **Bouchet et al. (1999)**.

❖ Etude macroscopique

Les caractères macroscopiques des différentes souches isolées des légumes secs cultivées sur le milieu PDA sont regroupés respectivement dans les tableaux : 5, 6, 7, 8.

Ces derniers résument l'aspect du mycélium des souches isolées, la surface et la consistance des colonies, ainsi que la présence ou l'absence de pigments caractéristiques de chaque souche.

❖ Etude microscopique

Au terme de l'analyse mycologique, 5 genres différents ont pu être isolés et identifiés à partir des échantillons des légumes secs analysés : Les résultats sont indiqués dans le tableau 9.

Tableau 5: Caractères macroscopiques des souches isolées des haricots.

Code des échantillons	Mycélium aérien	Mycélium de substrat (le revers de la colonie)	Aspect de la colonie et sa consistance	Surface
H1	Noir	Gris	Granuleuse	Plane
H2	Blanc	Marron	Cotonneuse	Concave
H3	Vert	vert	plane	plane
H4	Vert foncé	Blanc	Velouté	Lisse, plane
H5,H6	Vert	Noir	Granuleuse	En dôme
H7, H8, H9	Noir	Noir	Granuleuse	Concave
H10	Blanc	Crème	plissée	Plane
H11	Vert olive	Blanc	Granuleuse	Concave
H12	Vert foncé	Noir	Velouté	Lisse, plane
H13	Vert	Jaune	Granuleuse	plane
H14	Blanc	Crème	Cotonneuse	Cotonneuse
H15	Vert foncé	Noir	Velouté	Lisse, plane

Tableau 6: Caractères macroscopiques des souches isolées des pois chiches .

code des échantillons	Mycélium aérien	Mycélium de substrat (le revers de la colonne)	Aspect de la colonie et sa consistance	Surface
PCI	Noir	Noir	Poudreuse	Concave
PC2	Vert foncé	Blanc	Velouté	En dôme
PC 3	Beige	Crème	Laineuse	Plane, lisse
PC4	Vert	Vert	Granuleuse	Plane
PC 5	Gris	Blanc	Laineuse	Cotonneuse
PC6	Noir avec un centre blanc	Jaune	Laineuse	plane
PC7	Vert olive	Blanc	Velouté	Plane
PC8	Blanc tend vers le jaune	Jaune	Velouté	Bombée
PC9	Vert	Blanc	Granuleuse	En dôme
PC10, PC11, PC12	Crème à jaune clair	Crème	Cotonneuse	concave
PC13, PC14	Noir	Noir	Granuleuse	Concave

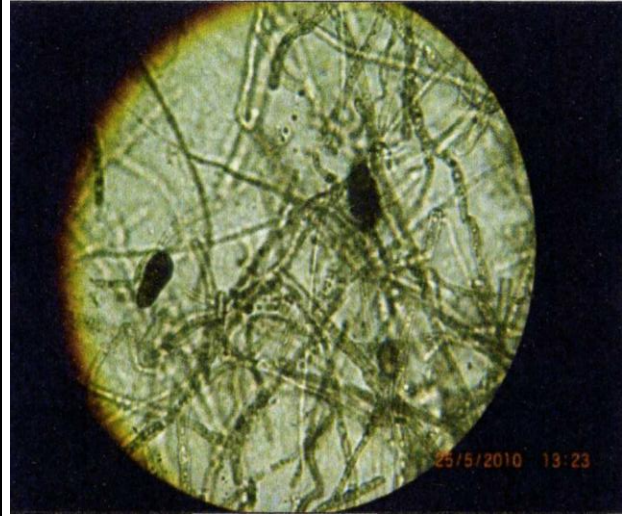
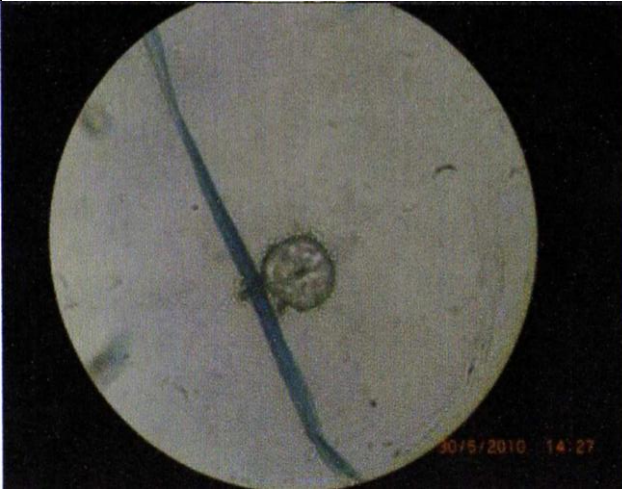
Tableau 7: Caractères macroscopiques des souches isolés des fèves.

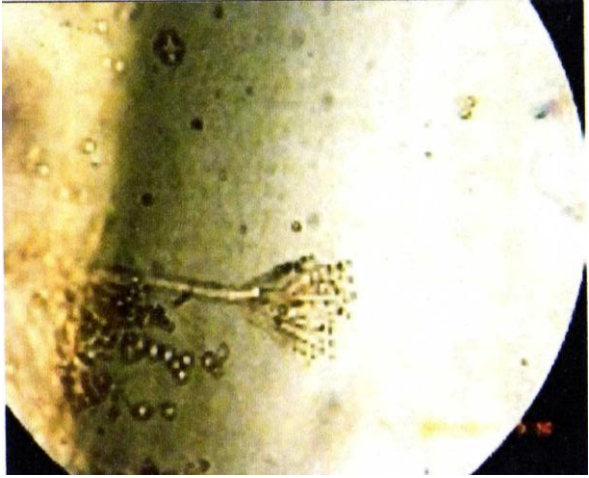

Code des échantillons	Mycélium aérien	Mycélium de substrat (le revers de la colonie)	Aspect de la colonie et sa consistance	Surface
F1	Vert olive	Vert foncé	Granuleuse	Plane
F2	Vert foncé	blanc	Cotonneuse	plane
F3	Noir	Noir	Laineuse	Concave
F4	Blanc	Jaune orange	plissée	plane
F5	Beige	crème	Duveteuse	plane
F6	Vert foncé	Vert foncé	Laineuse	Bombée
F7	Jaune tend vers le vert	Jaune	Laineuse	Plane
F8	Blanchâtre	Grise	Duveteuse	Plane, lisse
F9	Blanc	Jaune orange	Duveteuse	Bombée
F10	Blanc	Jaune orange	plane	plane
F11	Jaune tend vers le vert	Jaune tend vers le marron	Laineuse	Concave
F12	Vert foncé	Noir	Granuleuse	Concave


Tableau8 : Caractères macroscopiques des souches isolées des petits pois.

Code des échantillons	Mycélium aérien	Mycélium de substrat (le revers de la colonie)	Aspect de la colonie et sa consistance	Surface
PP 1 , PP 2	Vert foncé	Noir	granuleuse	plane
PP3	Vert	Jaune	Duveteuse	Plissée et peu cotonneuse aux extrémités
PP 4	Noir	Noir	Laineuse	En dôme
PP5	Vert foncé	Noir	Velouté	En dôme au centre et plane aux extrémités
PP6	Blanc	Jaune foncé	Duveteuse	En dôme
PP7	Vert olive	blanc	Laineuse	Lisse, plane
PP8	Noir avec un centre blanc	jaune	Laineuse	En dôme
PP9	Noir	Noir	Granuleuse	Plane

Tableau 9: Caractères microscopiques des souches isolées des légumes secs

Code de la souche	Etude microscopique	Identification du genre	Photox(100)
H5	-Conidiophore septé, noir, lisse, à croissance sympodiale ; -Conidies pluricellulaires en chaînes brunes irrégulières ; souvent en forme de massue, cloisonnées longitudinalement et transversalement.	<i>Alternaria</i>	
PC5			
F12			
PP1			
H1, H2, H4, H6, H12, H13, H14	-Thalle à mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, non ramifiés, terminés en vésicule ; -Phialides formées directement sur la vésicule ou sur des métules ; -Têtes conidiennes unisériées ou bisériées ; -Masse conidienne rayonnante, les conidies en chaînes unicellulaires.	<i>Aspergillus</i>	
PP7, PP8, PP9, PP6			
PC1, PC6, PC8, PC3, PC7, PC4			
F1, F3, F5, F7, F8			

H3, H7, H8, H10	<p>-Mycélium cloisonné ;</p> <p>-Conidiophores isolés, ramifiés, terminés par un pénicille ;</p> <p>-Penicille constitue de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiophore.</p>	<i>Penicillium</i>	
PC9, PC11, PC12, PC13, PC14			
F2, F9, F10, F4			
PP3, PP4, PP5, PP2			
H9	<p>-Thalle à croissance rapide ; -</p> <p>Sporosystophores généralement très grands, terminés en entonnoir, en bouquet de 2 à 6 présentant à la base de rhizoïdes ;</p> <p>-Columelles brunes, globuleuses ou semi globuleuses.</p>	<i>Rhizopus</i>	
PC10			

H11, H15	<p>mycélium non cloisonné ; - sporocytophore dresse, terminé par un sporocyste globuleux ; -collumelles multisphorées ; - spores cylindriques.</p>	<p><i>Mucor</i></p>	 <p>25/5/2010 13:23</p>
PC2			
F6, F11			

L'échantillon d'haricot sec s'est révélé contaminé par 5 genres de moisissures, le genre *Aspergillus* domine avec plus de 46.66% des grains contaminés. 26.66% par le genre *Penicillium* puis viennent les genres *Mucor*, *Alternaria* et *Rhizopus* avec respectivement 13.33%, 6.66% et 6.66% de contamination des grains de l'échantillon d'haricot sec.

Cinq genres se sont révélés contaminants de l'échantillon de pois chiche. Le genre *Aspergillus* a contaminé 42.85% des grains. Les genres *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* et *Alternaria* ont contaminé respectivement 35.71%, 7.14%, 7.14% et 7.14% des grains de pois chiche.

L'échantillon de petit pois s'est révélé contaminé par 3 genres différents de moisissures. *Penicillium* et *Aspergillus* avec un pourcentage de 44.44 % pour chaque genre, ils sont les plus dominants puis vient le genre *Alternaria* qui a contaminé 11.11% des grains de cet échantillon.

L'échantillon des fèves est contaminé par 5 genres. Le genre *Aspergillus* est le plus dominant avec plus de 41.33% et *Penicillium* a contaminé 33.33 % des grains de cet échantillon. Les genres *Mucor* et *Alternaria* ont contaminé respectivement 16.66%, et 8.33% des grains.

La figure 11 montre le taux de contamination des grains de chaque genre dans les échantillons analysés.

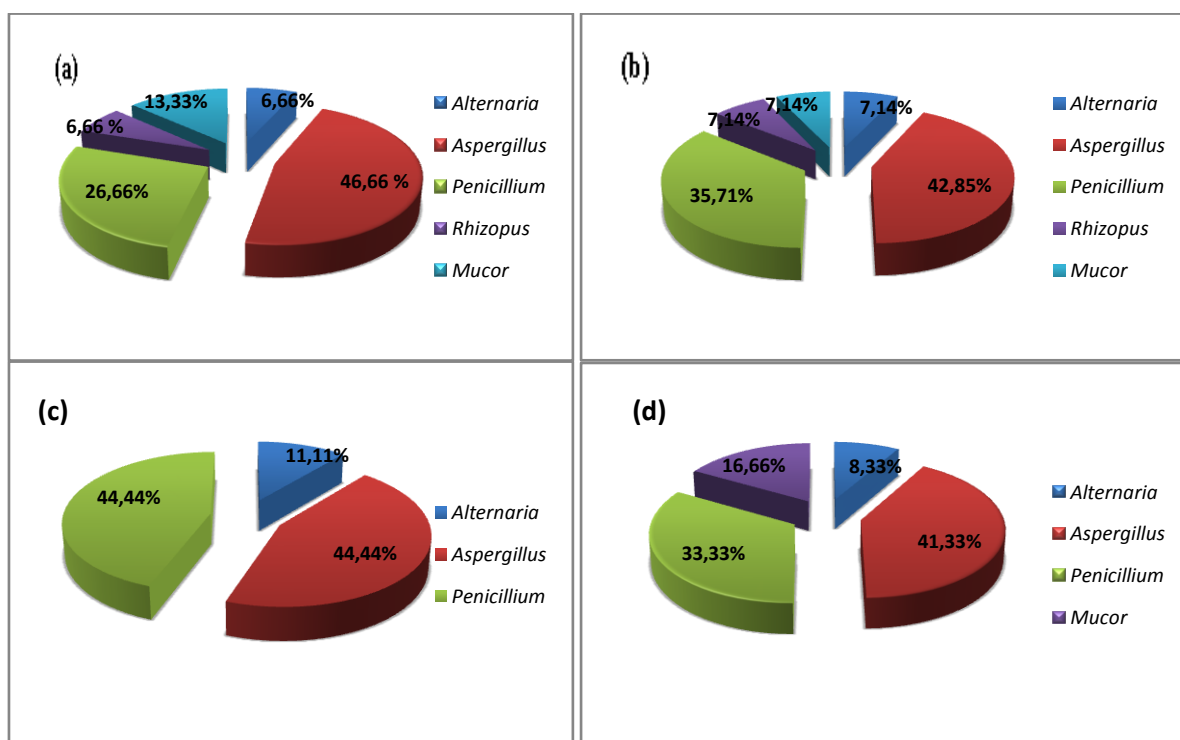


Figure11 : Taux de contamination des légumes secs : (a) : Haricots ; (b) : Pois chiches ; (c) : Petits pois ; (d) : Fèves.

2.4 Discussion

Les légumes secs sont des denrées alimentaires fréquemment contaminées par les moisissures. La contamination peut avoir lieu avant la récolte, au champ, au cours du séchage, ou au cours du stockage des grains.

Si de très nombreuses études sont disponibles concernant la contamination mycotoxique des grains, les enquêtes sur la contamination fongique de ces matières premières sont plus rares. De manière schématique, elles mettent en évidence une relation entre la flore fongique et les conditions climatiques pendant le développement et/ou le stockage des grains (**Tabuc, 2007**).

On remarque que les grains des échantillons des légumes secs étudiées contiennent suffisamment d'eau pour entraîner des altérations (échauffement et moisissures).

Les genres dominants dans tous les échantillons des légumes secs sont *Aspergillus* et *Penicillium*. Ces deux genres prolifèrent principalement pendant le stockage sur des substrats dont l'humidité est assez basse (10 à 15%) (**Pitt et Miscamble, 1995**).

Les moisissures appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont généralement capables de se développer à des Aw voisines de 0,7 à 25°C ; elles peuvent donc se développer dans les aliments pauvres en eau comme les légumes secs au cours du stockage et les produits dont l'activité hydrique a été réduite (**Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002**).

Par comparaison, les genres de moisissures les plus hydrophiles se multiplient moins activement ou régressent.

Selon **Riba et al. (2005)**, le manque de ventilation couplé à une température élevée, favorise la croissance des champignons dits : xérotolérantes, comme les *Aspergillus* et *Penicillium* et c'est le cas pour des grains vendus sur le marché.

Botton et al. (1990) ont souligné qu'au cours du stockage, se développe une flore composée de champignons moins cellulolytiques et plus osmophiles, qui provoquent une acidification de substrat ; ce sont essentiellement des *Aspergillus* et des *Penicillium* dont l'évolution est fonction de la teneur en eau des graines et des interactions spécifiques. Ces genres, en prenant de l'extension, éliminent peu à peu les champignons « du champs ». Sur les graines très altérées on trouve, au terme de cette évolution, des champignons peu cellulolytiques et non osmophiles, appartenant surtout aux Mucorales (*Mucor, Rhizopus...*).

Les genres *Rhizopus* et *Mucor* témoignent une conservation en conditions médiocres des grains. Elles sont alors considérées comme appartenant à la mycoflore d'altération avancés (**Bourgeois et Larpent , 1996**).

Les genres *Alternaria* et *Rhizopus* sont des genres hygrophiles, leur existence est due à l'augmentation de la teneur des grains en eau au moment de la récolte. D'après nos résultats, nous remarquons la présence de ces genres dans nos échantillons, cela est du aux conditions défavorables de stockage des grains vendus au marché, les légumes secs sont vendus au marché sans emballage adéquat exposé à un environnement chaud et humide. L'humidité et la température élevées sont des facteurs favorisant la croissance des moisissures, productrices de mycotoxines.

D'après **Bourgeois et Larpent (1996)**, les Mucorales, les *Aspergillus* et les *Penicillium* sont les hôtes habituels des grains qui se développent généralement au cours de stockage défectueux.

Tandis que des études sur la flore fongique des légumineuses ont montré que les mycètes de stockage des haricots (*Phaseolus vulgaris*) en Inde a inclus *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Stemphylium* et *Trichoderma* (**Sud et al., 2005**). Les espèces de *Penicillium* et *Eurotium* étaient communes pour les Haricots taiwanais, mais, dans les haricots canadiens, les mycètes répandus étaient *Alternaria*, *Fusarium* et *Rhizoctonia* (**Tseng et al., 1995**).

Pour les fèves, les mycètes les plus répandues étaient *Eurotium rubrum*, *Eurotium amstelodami*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Mucor* et *Cladosporium* (**Bhat et al., 2007**).

Selon **Ahmad et Singh (1991)**, les mycètes de stockage des pois chiches comportent principalement *A. flavus*, *A. niger*, *A.ochraceus.*, *Emericella nidulans* et espèces de *Penicillium*.

Dans les Pois chiches australiens, **Sarantinos et al. (1996)** ont trouvé que les mycètes dominantes étaient *Stemphylium botryosum* et *Botrytis cinerea*, suivies d'*A. flavus*, *Alternaria alternata*, *Eurotium chevalieri* et *E. amstelodami*.

La microflore fongique la plus commune des petit pois est provoquée par *Botrytis cinerea* (**Ryall et Lipton, 1979 ; Snowdon, 1991**). Les petit pois sont également susceptibles d'être contaminés par *Colletotrichum*, *Ascochyta* et *Alternaria alternata* (**Snowdon, 1991**).

D'après **Riba et al. (2005)**, la différence des pourcentages de contamination des grains par les genres isolés peut être due aux provenances différentes des échantillons. Cette différence

est due à l'origine de contamination des grains par ces moisissures, qui apparaît difficile à préciser (champ, transport, lieu de stockage....).

Selon Molinié et Pfohl-Leszkowicz (2003), en plus de l'origine qui est mal connue, les spores disséminées par l'air peuvent provenir du champ ou de la poussière présente dans les infrastructures de stockage. Si les conditions de stockage sont défavorables, ces moisissures constituent des facteurs de bio détérioration des légumes secs affectant la qualité des matières premières, ou la qualité sanitaire par la sécrétion des mycotoxines.

3. Activité antifongique de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis*

3.1 Sur les souches tests

3.1.1 Taux d'inhibition

Les taux d'inhibition de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* sont consignés dans la figure 12.

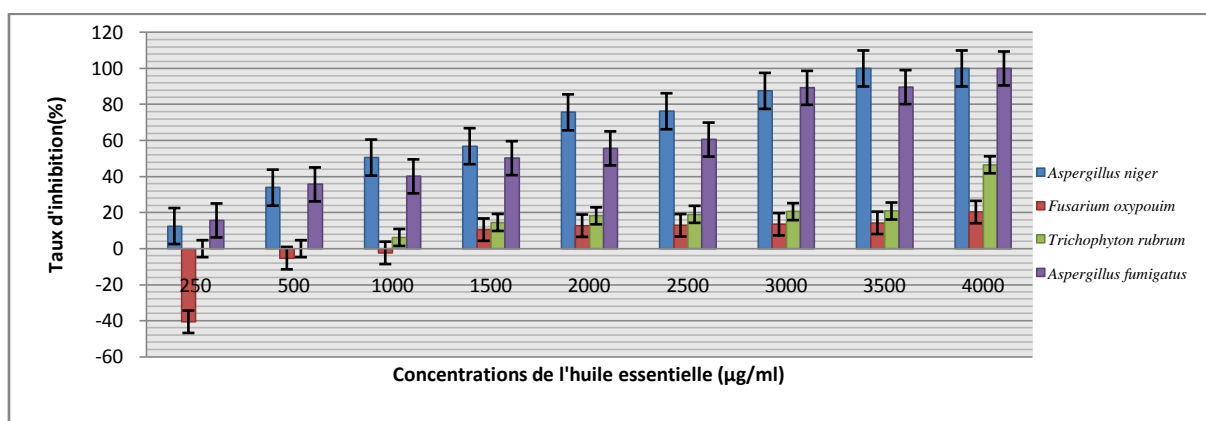


Figure 12 : Taux d'inhibition des extraits vis-à-vis des quatre souches testées

Les huiles essentielles ont eu des activités variables sur les souches filamenteuses testées. *Aspergillus niger* et *Aspergillus fumigatus* sont les moisissures les plus sensibles à l'huile essentielle étudiée.

Concernant *Aspergillus niger*, l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* a donné des taux d'inhibition supérieurs à 50% pour des concentrations d'huile essentielle allant de 1000µg/ml à 4000µg/ml dont deux inhibitions totales dans les boîtes de pétri contenant 3500µg/ml et 4000µg/ml (Figure 13).

Pour *Aspergillus fumigatus*, les six concentrations ont donné des taux d'inhibition supérieurs à 50% (Figure 14).

Quant à l'espèce *Trichophyton rubrum*, elle s'est révélée moins sensible à l'ensemble des huiles essentielles avec deux cas d'absence d'inhibition (250 et 500µg/ml d'huile essentielle).

Résultats et discussion

Fusarium oxypouim se révèle particulier: les essais ont donné des taux d'inhibition négatifs. Tout se passe comme si l'huile essentielle stimulait la croissance de la souche. Les croissances les plus remarquables par rapport au témoin sans huile essentielle sont obtenues avec des concentrations de 250, 500et 1000 μ g/ml. C'est à partir de 1500 μ g/ml que l'huile essentielle s'est révélée efficace pour l'inhibition de cette souche.

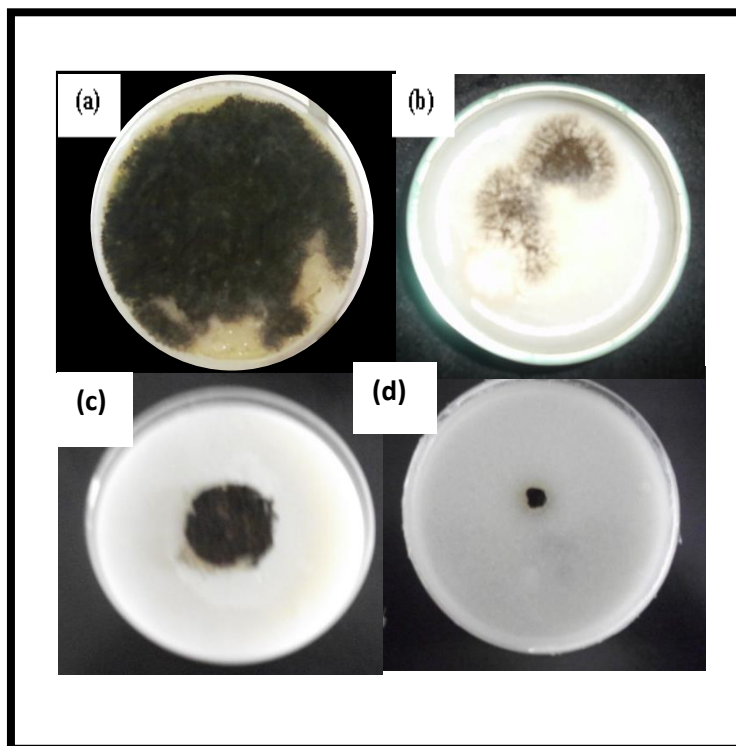


Figure 13 : Taux d'inhibition de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* vis-à-vis d'*Aspergillus niger* : (a) : Témoin, (b) :2000 μ g/ml, (c) : 2500 μ g/ml, (d) : 3000 μ g/ml

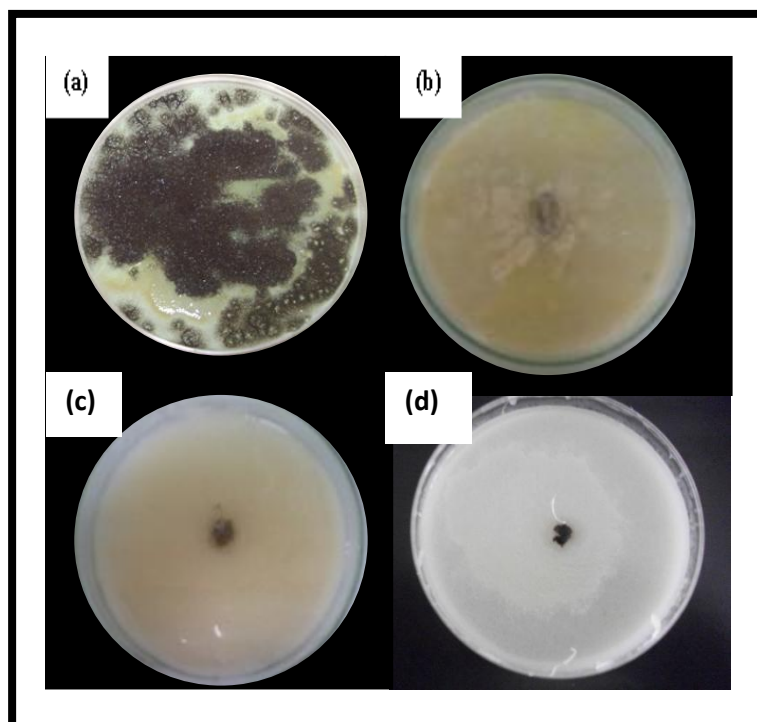


Figure 14 : Taux d'inhibition de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* vis-à-vis d'*Aspergillus fumigatus* : (a) : Témoin, (b) : 2000µg/ml, (c) : 2500µg/ml, (d) : 3000µg/ml

3.1.2 Concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Pour tous les essais dont le taux d'inhibition est inférieur à 50%, les CMI correspondantes sont supérieures à 4000 µg/ml et n'ont pas été étudiés. Pour les autres cas, la recherche s'est accentuée sur deux souches (*Aspergillus niger* et *Aspergillus fumigatus*) qui ont été inhibés par la majeure partie des huiles essentielles à plus de 50%. Les résultats sont consignés dans le Tableau 10.

Tableau 10: CMI (µg/ml) des huiles essentielles en milieu liquide

CMI(µg/ml)	Souches Fongiques	
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
	1000	3000

D'après le tableau 10, les CMI obtenues varient en fonction des extraits et de la souche fongique. Elles sont de 1000 et 3000 µg/ml respectivement pour *Aspergillus niger* et *Aspergillus fumigatus*.

3.1.3 Activités fongistatique et fongicide

Les activités fongistatiques(CFS) et fongicide(CMF) sont présentées dans le tableau 11.

Tableau 11: Activités fongistatique (CFS) et fongicide (CMF) en $\mu\text{g/ml}$ de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* sur les micromycètes filamenteux.

Souches Fongiques			
<i>Aspergillus niger</i>		<i>Aspergillus fumigatus</i>	
CFS	CMF	CFS	CMF
-	1000	3500	4000

Les subcultures réalisées suite à l'obtention des CMI ont permis d'observer seulement une activité fongicide (CMF) sur *Aspergillus niger* (avec une concentration de 1000 $\mu\text{g/ml}$).

L'huile essentielle de *Lavandula officinalis* a présenté, à la fois, une activité fongicide et une activité fongistatique sur *Aspergillus fumigatus* (fongistatique à 3500 $\mu\text{g/ml}$ et fongicide à 4000 $\mu\text{g/ml}$).

3.2 Sur les souches isolées des légumes secs

3.2.1 Taux d'inhibition

Les taux d'inhibition de l'huile essentielle *Lavandula officinalis* de certaines souches isolées des différents légumes secs sont consignés dans -les figures 15, 16, 17,18 et 19.

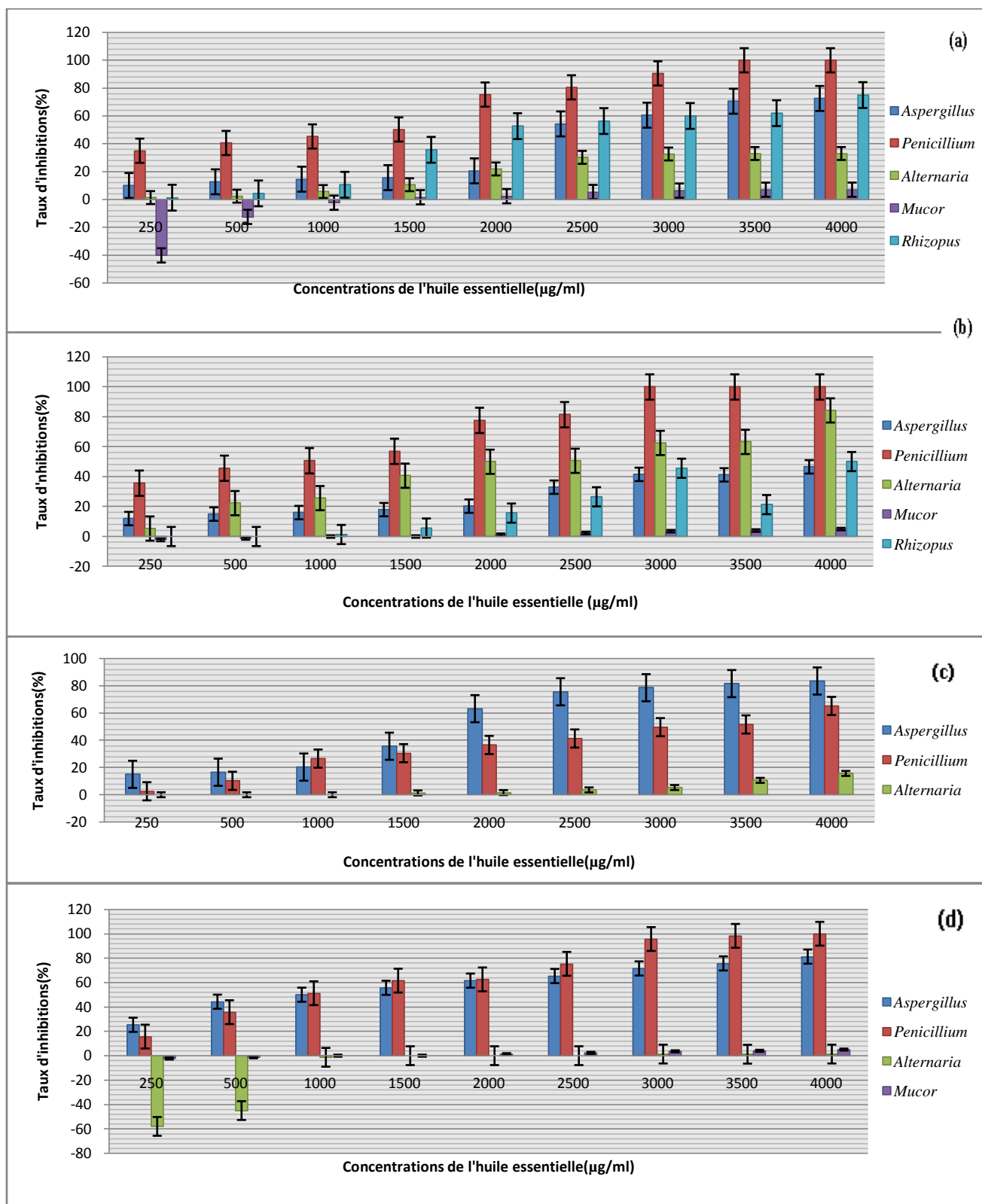


Figure 15 : Taux d'inhibition des moisissures isolées des légumes secs : (a) : Haricots secs ; (b) : Pois chiches ; (c) : Petits pois ; (d) : Fèves.

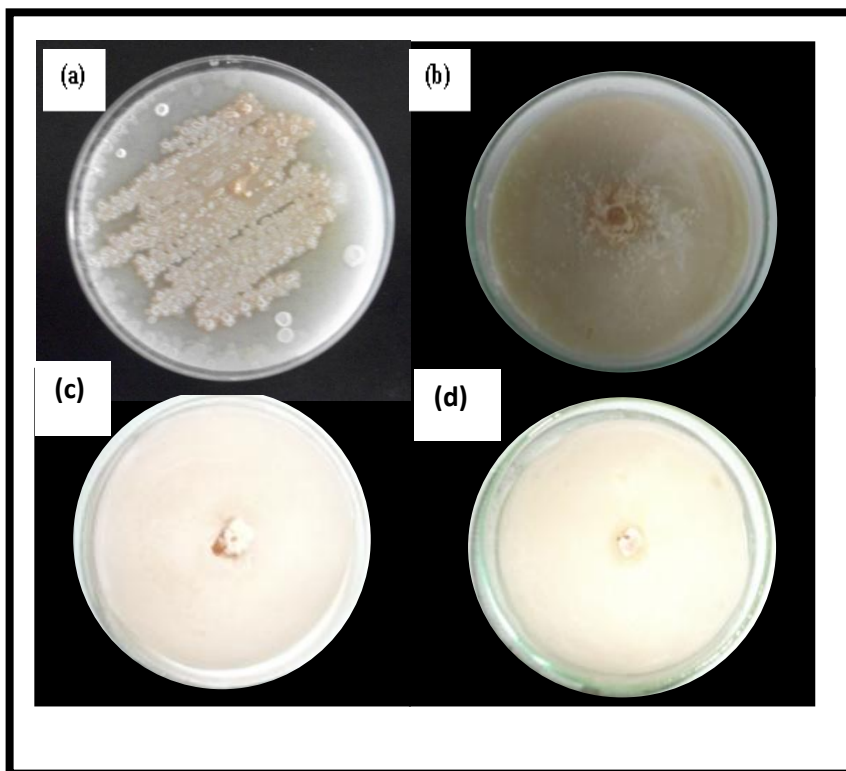


Figure 16: Taux d'inhibition de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* vis-à-vis de *Penicillium* isolé des haricots secs :(a) : Témoin, (b) :2000µg/ml, (c) : 2500µg/ml, (d) : 3000µg/ml

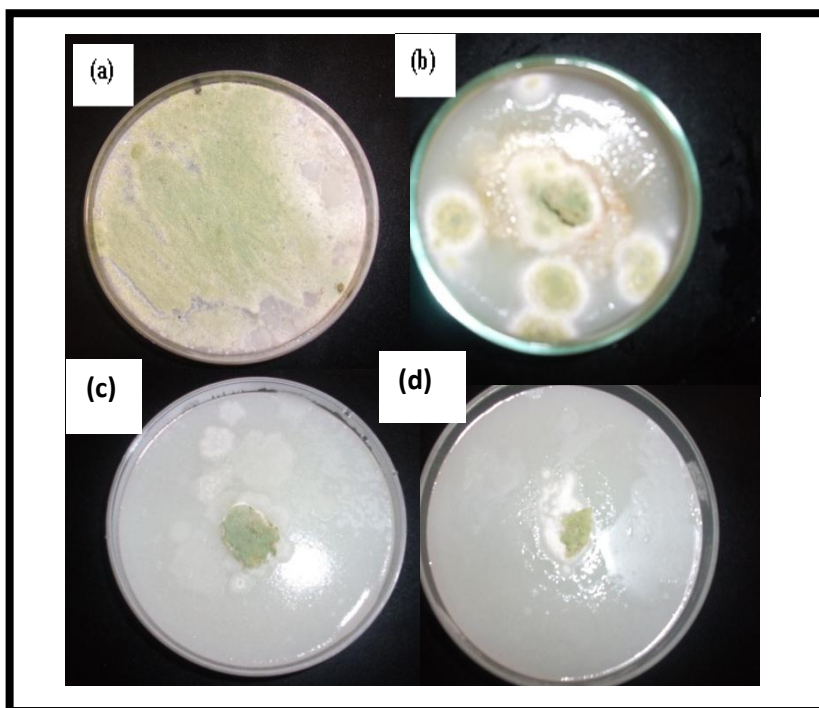


Figure 17: Taux d'inhibition de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* vis-à-vis d'*Aspergillus* isolé des pois chiches :(a) : Témoin, (b) :2000µg/ml, (c) : 2500µg/ml, (d) : 3000µg/ml.

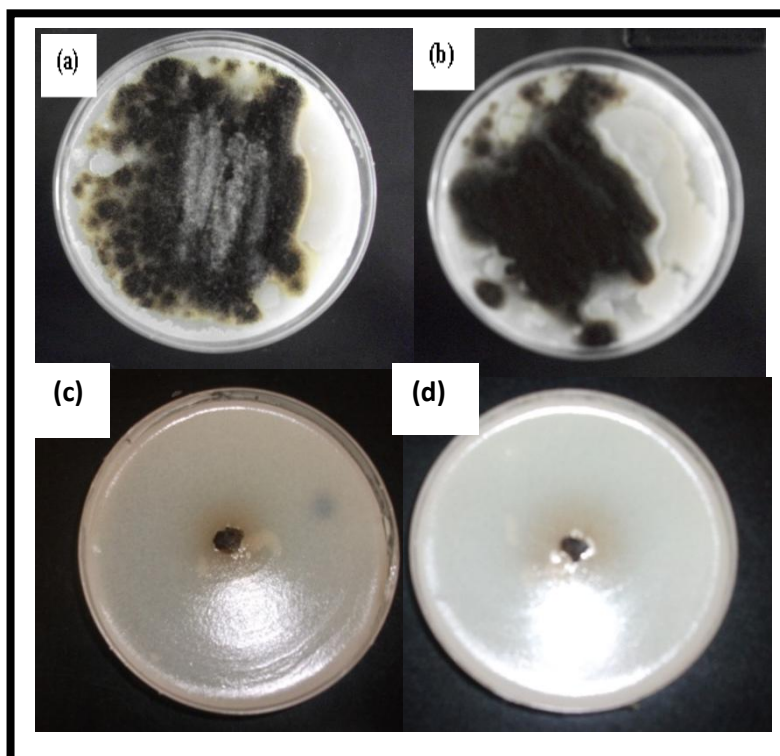


Figure18 : Taux d'inhibition de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* vis-à-vis de *Aspergillus* isolé des petits pois :(a) : Témoin, (b) :2000µg/ml, (c) : 2500µg/ml, (d) : 3000µg/ml

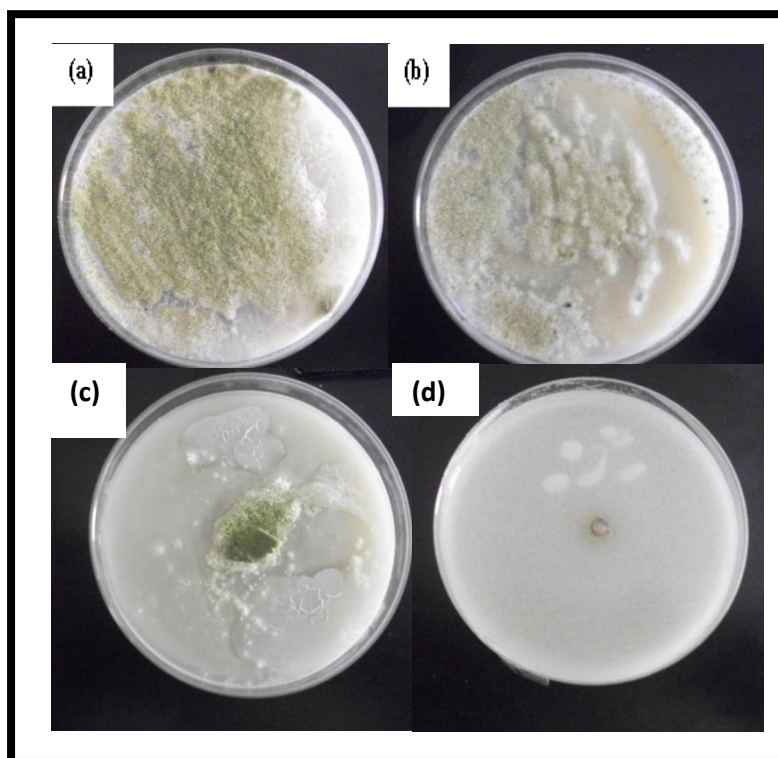


Figure 19: Taux d'inhibition de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* vis-à-vis de *Penicillium* isolé des fèves :(a) : Témoin, (b) :2000µg/ml, (c) : 2500µg/ml, (d) : 3000µg/ml.

Comme dans le cas des souches tests, l'activité inhibitrice de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* est très variée sur les souches isolées des légumes secs.

❖ Pour les haricots,

Penicillium s'est révélé très sensible à l'huile essentielle. Au total les six taux d'inhibition supérieurs ou égaux à 50% ont été révélés dans les boîtes de Pétri contenant des concentrations de l'huile essentielle de : 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 et 4000 μ g/ml. Deux cas d'inhibition totale sont observés pour les concentrations de 3500 et 4000 μ g/ml.

Avec *Aspergillus*, l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* a donné des taux d'inhibition supérieurs à 50% pour des concentrations d'huile essentielle allant de 2500 μ g/ml à 4000 μ g/ml.

Le genre le moins sensible est *Alternaria* sur le quel sont observés les plus faibles taux d'inhibition : il semble être résistant vis-à-vis de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis*.

L'huile essentielle de la lavande semble stimuler la croissance des filaments de *Mucor*, ce qui donne pour ce genre des taux d'inhibition négatifs.

❖ Les pois chiches

L'huile essentielle de *Lavandula officinalis* présente des taux d'inhibition variables sur les souches filamenteuses isolées des pois chiches.

Les activités remarquables sont enregistrées sur *Penicillium* et *Alternaria*. Les inhibitions totales de la croissance de filaments sont obtenues avec des concentrations allant de 3000 à 4000 μ g/ml pour le genre *Penicillium*.

Le genre *Rhizopus* est aussi sensible à l'huile essentielle pour une concentration de 4000 μ g/ml.

Le genre *Aspergillus* s'est révélé moins sensible à l'ensemble des concentrations. Le cas de *Mucor* se révèle particulier: des croissances remarquables par rapport au témoin sans huile essentielle sont obtenues avec des concentrations de 250, 500 et 1000 μ g/ml.

❖ Les petits pois

Les genres *Aspergillus* et *Penicillium* ont paru sensibles à l'huile essentielle : cinq concentrations ont donné des taux d'inhibition supérieurs à 50% pour *Aspergillus* et deux pour *Penicillium*.

L'huile essentielle n'a eu aucun effet sur *Alternaria* pour des concentrations allant de 250 à 1000 μ g/ml ; ce dernier est moins sensible à la plupart des concentrations testées.

❖ Les Fèves

L'huile essentielle révèle une activité variée sur les quatre souches filamenteuses isolées des légumes secs.

Des activités nulles sont obtenues sur *Alternaria* et *Mucor* pour des concentrations de 1500 à 2500µg/ml pour *Alternaria* et de 1000 à 1500 µg/ml pour *Mucor*. Des inhibitions négatives ont été enregistrées pour ces derniers genres pour des concentrations allant de 250 à 1000µg/ml pour *Alternaria* et 250µg/ml jusqu'à 500 µg/ml pour *Mucor*.

Les genres *Penicillium* et *Aspergillus* demeurent les genres les plus sensibles dans l'ensemble des moisissures testées avec inhibition totale de *Penicillium* à la concentration de 4000µg/ml.

3.2.2 Concentrations inhibitrices minimales(CMI)

Pour les autres cas, la recherche s'est accentuée sur les genres qui ont été inhibés par la majeure partie des huiles essentielles à plus de 50% pour tous les essais dont le taux d'inhibition est inférieur à 50%. Les CMI correspondantes sont supérieures à 4 000µg/ml et n'ont pas été étudiées. Les résultats sont représentés dans le Tableau12.

Tableau 12 : CMI (µg/ml) de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* en milieu liquide

CMI (µg/ml)	Souches isolés des légumes secs									
	Souches isolées des haricots secs			Souches isolées des pois chiches			Souches isolées des petits pois		Souches isolées des fèves	
	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>
	2000	2000	3000	2000	3000	>4000	2000	4000	1500	1000

D'après le tableau12, les CMI obtenues varient en fonction des genres fongiques et des légumes secs dont ils proviennent. Elles sont comprises entre 1000 et 4000 µg/ml presque pour tous les genres sélectionnés.

➤ Haricots secs

L'huile essentielle a présenté une CMI de 2000 µg/ml sur deux genres isolés (*Aspergillus* et *Penicillium*). Le genre *Rhizopus* a été inhibé à 3000µg/ml par l'huile essentielle de *Lavandula officinalis*.

➤ **Pois chiches**

Le tableau montre également que l’huile essentielle de *Lavandula officinalis* est particulièrement active sur la croissance de deux souches fongiques (*Penicillium* et *Alternaria*) avec des CMI comprises entre 2000 et 3000 µg/ml.

L’huile essentielle de *Lavandula officinalis* n’a pas eu d’activité sensible sur *Rhizopus* ce qui indique sa faible activité (CMI>4000 µg/ml) sur cette souche.

➤ **Petits pois**

L’huile essentielle de la lavande s’est révélée active sur les deux souches isolées des petits pois avec des CMI de 2000µg/ml pour *Aspergillus* et 4000µg/ml pour *Penicillium*.

➤ **Fèves**

Les meilleures CMI de l’huile essentielle de *Lavandula officinalis* sont obtenues avec les souches isolées des fèves avec des CMI de 1500µg/ml pour *Aspergillus* et 1000µg/ml pour *Penicillium*.

3.2.3 Activités fongistatique et fongicide

Les activités fongistatiques(CFS) et fongicide(CMF) sont présentées dans le tableau 13.

Tableau 13: Activités fongistatique (CFS) et fongicide (CMF) en µg/ml de l’huile essentielle de *Lavandula officinalis* sur les souches isolées.

	Souches isolés des légumes secs									
	Souches isolées des haricots			Souches isolées des pois chiches			Souches isolées des petits pois		Souches isolées des fèves	
	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>
CFS (µg/ml)	3000	2500	3500	2500	4000	-	2000	4000	1500	2000
CMF (µg/ml)	-	-	-	-	-	-	3000	-	2000	3500

- : aucune activité

Les subcultures réalisées suite à l’obtention des CMI ont permis d’observer des activités variées de l’huile essentielle de *Lavandula officinalis* sur les souches isolées des légumes secs :

❖ Les haricots secs

L'huile essentielle de *Lavandula officinalis* a révélé des activités fongistatiques sur les souches isolées des haricots secs à 3000µg/ml pour *Aspergillus*, 2500µg/ml pour *Penicillium* et 3500µg/ml pour *Rhizopus*.

❖ Les pois chiches

L'huile essentielle de *Lavandula officinalis* est fongistatique à 2500µg/ml sur *Penicillium* et 4000µg/ml sur *Alternaria*.

❖ Les petits pois

Les subcultures ont révélé, à la fois, une activité fongicide et fongistatique sur le genre *Aspergillus* isolé des petits pois (CFS=2000µg/ml et CMF=3000µg/ml) et une activité fongistatique sur *Penicillium* à 4000µg/ml.

❖ Les fèves

L'huile essentielle de la lavande a révélé à la fois, une activité fongicide et une activité fongicide et fongistatique sur les souches isolées des fèves : Avec *Aspergillus* on a obtenu des valeurs de CFS=1500 µg/ml, CMF=2000 µg/ml et des CFS=2000µg/ml et CMF=3500 µg/ml avec *Penicillium*.

3.3 Discussion

L'évaluation de l'activité par la méthode de dilution en milieu solide a révélé l'inhibition de croissance des filaments pour la plupart des souches testées. Cela est dû à l'empêchement de la germination des conidies par les composés volatils de l'huile de la lavande. La germination des conidies est la première étape essentielle dans la séquence d'opérations menant à l'établissement d'un tube germinatif et d'un hyphe, par la suite. Le processus commence par l'hydratation suivie de l'action des enzymes lytiques telles que le chitinase et α et β - glucanases. Ceci décompose la paroi cellulaire des conidies épaissie pour permettre l'apparition du tube digestif initial. Une fois que cet événement a lieu, il y a un équilibre entre les systèmes lytiques et synthétiques d'enzymes nécessaires pour la prolongation normale des hyphes. Un déséquilibre dans l'un ou l'autre système d'enzymes mène à l'inhibition et/ou à l'empêchement de croissance (McEwan, 1994). Il s'avérerait que ces événements sont fortement susceptibles à la rupture par les composants d'huile volatile de la lavande (Deans,

2002). En définitive, l'huile essentielle de la lavande a eu des activités variables sur les souches fongiques testées.

La détermination des CMI de l'huile essentielle sur les souches fongiques par la méthode de dilution en milieu liquide confirme les résultats obtenus en milieu solide.

Cette activité antifongique est due probablement au type et à la structure moléculaire des composants actifs présents dans l'HE. Ainsi *in vitro*, une activité antimicrobienne plus élevée des terpènes oxygénés en comparaison des terpènes hydrocarbures a été observée (Oh *et al.*, 1967; Griffin *et al.*, 1998; Dorman et Deans, 2000; Cox *et al.*, 2000).

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et les possibles effets synergiques entre les composants. Ainsi la nature des structures chimiques qui la constituent, mais aussi leurs proportions jouent un rôle déterminant.

Il est cependant probable que les composés minoritaires agissent de manière synergique. De cette manière, la valeur d'une huile essentielle tient à son « totum », c'est à dire dans l'intégralité de ses composants et non seulement à ses composés majoritaires (Lahlou, 2004). Les molécules réputées actives sont des terpénoïdes, car les hydrocarbures saturés et les acétates ioniques sont inactifs, par la nature même de leur faible capacité de liaisons hydrogène et de leur faible solubilité (Griffin, 1999 ; Wyllie *et al.*, 1999).

Des composés chimiques qui ont une grande efficacité et à plus large spectre sont présents dans l'huile essentielle de *Lavandula officinalis*, ce qui explique l'activité de cette dernière sur les mycètes, phénols (1,8 cinéole, carvacrol, octanol, ..) des alcools, (α -terpineol, terpinen-4-ol, linalol), des aldéhydes, des cétones (Camphor, etc.) (Dorman et Deans, 2000).

Chu et Kemper (2001) ont montré que le pouvoir antifongique est lié aux composants volatils d'huile de la lavande et qui sont : l' α pinène, β pinène, P cimène et 1,8 Cinéole. Ces composants sont présents dans l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* avec la prédominance de 1,8 cineole avec une concentration de 13.25%.

Le linalool qui est un composant majeur de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* est connu par son activité antifongique (Svoboda et Hampsen, 1999)

Il résulte alors que l'effet antifongique vis-à-vis des moisissures des légumes secs montré dans cette étude est dû aux composants qui sont démontrés majoritaires dans l'huile

essentielle de *Lavandula officinalis* : le linalool(26.73%), 1,8 -cineole(13.25%) et le camphor (7.10%).

Ainsi l'activité fongistatique ou fongicide des composés aromatiques de l'huile essentielle semble être liée à la présence de certaines fonctions chimiques.

Chaumont et Leger(2001) ont testé 12 composés aromatiques vis-à-vis de huit souches pathogènes *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Microsprum canis* et *Trichophyton spp.* Ils concluent que les phénols sont plus antifongiques. Ils présentent également des propriétés fongistatiques très marquées ce qui explique l'activité fongistatique de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* sur toutes les souches testés.

D'après **Dorman et Deans (2000)**, quelques composés aromatiques possèdent des activités fongistatiques dont certains sont des composants de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* (le Limonène, β pinène et le comphor).

Certains composants de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* sont connus par leurs effets fongicides comme carvacrol, et linalol (**Dorman et Deans, 2000**), ce qui explique l'effet fongicide de cette huile vis-à-vis le genre *Aspergillus* isolé des petits pois et les genres *Aspergillus* et *Penicillium* isolés des fèves.

Un des facteurs intervenant sur l'intensité de l'action antifongique de l'HE est la dose appliquée : ceci a été généralement observé *in vitro* (**Do Amaral et al., 1998; Evans et Martin, 2000; Castillejos et al., 2006**).Ceci a été évident dans notre étude, on a remarqué que le taux de réduction des moisissures par rapport au témoin a été augmenté avec l'augmentation des concentrations en huile essentielle de *Lavandula officinalis*.

Un autre paramètre important déterminant l'activité antifongique de l'HE est le type des microorganismes ciblés. En général, les différents genres isolés des légumes secs n'ont pas une sensibilité similaire vis à vis l'HE. L'activité de l'huile essentielle de la lavande testée a été remarquable surtout sur les genres *Aspergillus* et *Penicillium* isolés de tous les légumes secs alors certaines ont présenté une résistance à cette dernière ou une absence d'effet.

Certains champignons sont plus résistants vis-à-vis de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* par rapport aux autres. De même, l'huile essentielle a présenté des effets différents sur les souches isolées des légumes secs, elle est fongistatique pour certains et révèle à la fois une activité fongistatique et fongicide pour d'autres même si elles appartiennent aux mêmes genres (par exemple une activité à la fois fongicide et fongistatique sur les *Aspergillus fumigatus* et *niger* ; une activité fongistatique de l'huile essentielle sur les *Aspergillus* isolés des petit pois et enfin une activité à la fois fongistatique et fongicide sur les *Aspergillus* isolés des haricots secs ont été constatées). **Mango et Olsen (2004)** ont montré l'existence

de cette différence de sensibilité à l'huile entre différentes espèces appartenant aux mêmes genres et entre les diverses structures fongiques du même genre: spores, sclérotites et fragments mycéliens.

Sachant que cette activité n'est pas générale pour tous les types des moisissures isolés des légumes secs, certains d'entre eux peuvent même consommer les terpènes en tant que source de carbone, les dégrader ou les transformer, ce qui peut expliquer l'inefficacité de certaines de ces molécules vis à vis de certains microorganismes (**Heyen et Harder, 1995**) et c'est le cas de *Fusarium oxypouim*, les genres *Mucor* isolés des haricots secs et des pois chiches et *Alternaria* et *Mucor* isolés des fèves.

L'absence d'activité antifongique d'une molécule sur un microorganisme peut avoir différentes explications. L'une d'entre elles est la biodégradation plus ou moins poussée de cette molécule, ce qui a été observé avec plusieurs microorganismes (**Heyen et Harder, 1995; Misra et al. , 1996; Foss et al., 1998**) et c'est le cas d'*Alternaria* isolé des petits pois et *Alternaria* et *Mucor* isolés des fèves.

Cette différence de l'activité antifongique d'huile essentielle de la lavande vis-à-vis des moisissures à été rapportée dans la littérature.

Pepeljnjak et al.(2007) ont montré la différence de sensibilité entre les différents genres à l'huile de la lavande. Dans leur étude, l'activité antifongique de l'huile essentielle vis-à-vis aux différentes moisissures est classée comme suit : *Penicillium cyclopium*>*Penicillium puberulum*>*Penicillium urticae*>*Penicillium viridicatum*>*Aspergillus flavus*>*Penicillium camemberti*>*Aspergillus clavatus*>*Penicillium roqueforti*>*Rhizopus nigricans*>*Aspergillus niger*>*Aspergillus nidulans*>*Aspergillus versicolor*>*Fusarium oxysporium*. L'huile a révélé une activité fongicide sur tous les genres testés, dans leur étude ils ont trouvés des CMF comprise entre 250 et 1000µg/ml.

Les résultats obtenus par **Lis-Balchin (2002)** ont prouvé qu'*Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* et *Fusarium culmorum* ont réagi différemment à l'huile de la lavande et que *Fusarium culmorum* est moins affectée que les deux aspergillus cela est bien évident pour les aspergillus utilisés dans notre expérience qui ont révélé une sensibilité à l'huile essentielle de la lavande.

Daferera et al. (2000) ont prouvé que l'huile de la lavande était modérément inhibitrice de la croissance radiale et à la germination conidiale de *Penicillium digitatum*, dans leurs étude ils ont obtenu une CMI de 1000µg /ml tandis que l'huile de la lavande a révélé une CMF de 4000µg/ml.

Ces résultats contradictoires sont dus à plusieurs paramètres qui doivent être considérés quand ces résultats sont comparés avec l'activité de l'huile essentielle extraite des fleurs de *Lavandula officinalis* cultivées à Constantine :

- ❖ Le milieu de culture,
- ❖ La source botanique de matière végétale ou la période de la moisson (qui pourrait affecter la composition d'huile) ;
- ❖ Les techniques d'extraction
- ❖ l'espèce de la moisissure étant examinée (**Lis -Balchin, 2002**).

Conclusion

Conclusion

Ce travail a été mené dans le cadre de l'étude de l'activité antioxydante et antifongique de l'huile essentielle extraite des fleurs de *Lavandula officinalis* et son effet sur la croissance des moisissures des légumes secs.

Les résultats obtenus indiquent que le taux de matière sèche (fleurs de *Lavandula officinalis*) ayant servi réellement à l'extraction des huiles essentielles est de 48.23%. Le rendement d'extraction de l'huile essentielle par hydro distillation est de $1.36 \pm 0.2\%$. La cinétique d'extraction a montré que la quasi-totalité de l'huile essentielle est extraite au bout des 80 premières minutes.

L'analyse de la composition chimique par CPG a permis d'identifier 49 composants mono terpéniques dont 67.29% sont des dérivés mono terpéniques oxygénés et 15.3% sont des hydrocarbures mono terpéniques. Cinq constituants majoritaires ont été déterminés : le linalyl acétate (15.26%) suivi ensuite par le camphor(11.25%), le γ terpinene(11.2%) et le linalol (10.68%).

L'huile essentielle a présenté une activité antioxydante mais moins efficace par comparaison à la vitamine E.

Les analyses mycologiques effectuées sur les échantillons des légumes secs ont permis d'isoler 15 souches à partir des haricots ; 14 souches à partir des pois chiches ; 12 souches à partir des fèves et 9 souches à partir des petits pois.

La purification et l'identification des souches isolées ont donné la possibilité d'identifier cinq genres de moisissures: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* et *Alternaria* ; avec une dominance des genres *Aspergillus* et *Penecillium*.

Pour la mise en évidence de l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis*, il s'est avéré qu'elle possède des activités variables vis à vis les souches tests et que *Aspergillus niger* et *Aspergillus fumigatus* sont les moisissures les plus sensibles.

L'huile essentielle étudiée a présenté une activité fongistatique et fongicide à la fois pour ces deux genres. La troisième espèce testée *Trichophyton rubrum* s'est révélée moins sensible à l'ensemble des concentrations avec des cas d'absence d'inhibition. Pour *Fusarium oxypouim* les essais ont donné des croissances remarquables par rapport aux témoins pour des faibles concentrations d'huile essentielle.

Conclusion

Les différents genres isolés des légumes secs n'ont pas une sensibilité similaire vis-à-vis de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis*. Certaines ont montré une sensibilité à l'huile essentielle : *Aspergillus*, *Penicillium* et *Rhizopus* isolées des haricots, *Alternaria*, *Penicillium* et *Rhizopus* isolées du pois chiches, *Aspergillus* et *Penicillium* isolées des petits pois et des fèves.

Pour la plupart des genres isolés, l'huile essentielle a présenté un effet fongistatique sauf pour les *Aspergillus* isolés des petits pois. Par ailleurs, elle a révélé une activité fongicide et fongistatique à la fois chez les *Aspergillus* et les *Penicillium* isolés des fèves.

A certaines concentrations de l'huile essentielle, une absence d'activité ou une inhibition ont été enregistrées pour les genres *Alternaria* isolés des petits pois et *Alternaria* et *Mucor* isolés des fèves. Cette activité antifongique peut être attribuée à la composition chimique de l'huile essentielle. La différence de la sensibilité des genres à l'huile essentielle peut être due à certains facteurs, à savoir la dose appliquée et l'espèce ciblée.

Afin de mieux appréhender les activités de cette huile essentielle sur les légumes secs, il serait intéressant de :

- déterminer les fractions les plus actives et éventuellement de caractériser les molécules responsables de ces activités ;
- déterminer les espèces des souches isolées des légumes secs ;
- Pour une étude beaucoup plus approfondie, on pourra envisager d'autres investigations telles que l'application l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* ou ses vapeurs directement sur les légumes secs durant le stockage.

Références bibliographiques

- Abramson D., Sinha R.N & Mills J.T., 1980.** Mycotoxin and odor formation in moist cereal grains during granary storage. *Cereal Chem.* 57(5), p:346-351.
- AFNOR ,2000.** Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 1. Echantillonnage et méthodes d'analyse. AFNOR, Paris, 440 p.
- AFNOR, 1986.** Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles », AFNOR. Paris. 57 p.
- Aghel N., Yamini Y., Hadjiakhoondi A. & Mahdi Pourmortasavi S. ,2004.** Supercritical carbon dioxide extraction of *Mentha pulegium L.* essential oil. *Talanta.* 62,p: 407-411.
- Ahmad, S.K. & Singh, P.L. ,1991.** Mycofloral changes and aflatoxin contamination in stored chickpea seeds. *Food Addit. Contam.* 8,p: 723–73.
- Alais C., Linden G. & Miclo L., 2003.** Biochimie alimentaire, DUNOD. 5ème édition
- AL-Awad M.,1993.** Etude de l'action antifongique des substances d'origine naturelle sur la croissance de *Microsporum gypseum*, cultivé in vitro. Observation en microscopie photonique et en microscopie électronique à transmission. Thèse Doctorat., Univ. Reims;p: 199 203.
- Alcama E. I. ,1984.** Fundamentals of Microbiology.. Addison-Wesly publishing company, London .p:310-341 ; 617-699.
- Anton R. & Lobstein A. , 2005.** Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec & Doc, Paris, 522p.
- Baba-Moussa F.,1999.** Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. *J ethnopharmacol*; 66 p: 335-338.
- Bankole S. A. ,1997.** Effect of essential oils from two Nigerian medicinal plants (*Azadirachta indica* and *Morinda lucida*) on growth and aflatoxin B1 production in maize grain by a toxigenic *Aspergillus flavus*. *Letters in Applied Microbiology*, 24,p: 190–192.
- Barrata T., Dorman D., Deans S., Figueiredo C., Barroso J. & Ruberto G.,1998.** Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and Fragrance Journal.*13, p:235-244.
- Basil A, Jimenez-carmonna M. M. & Clifford A.A., 1998.** Extraction of rosemary by super heated water. *Journal of food chemistry.*46,p:5205-5209.
- Batawila K., 2002.**Diversité, écologie et propriétés antifongiques des Combretaceae du Togo. Thèse : Doct de Pharmacie, Univ. Reims; 130 p.
- Belaiche P., 1979.**L'aromatogramme. Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. M.S.A. Editeur, Paris.Tome 1, p :204
- Bernard T., Periau F., Brav O., Delmas M. & Gaset A., 1988.** Extraction des huiles essentielles. Chimie et Technologie. Information chimie.

- Besombes C., 2008.** Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse Doctorat. Université de La Rochelle.p :41-45.
- Bhat, R., Sridhar, K.R. & Velmourougane, K. 2007.** Microbial quality evaluation of velvet bean seeds (*Mucuna pruriens L.*) exposed to ionizing radiation. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* 7,p: 29–40.
- Blanc P.J., 1982.** Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin *International Journal of Food Microbiology.*27,p:201-213.
- Botton B., Bertron A., Fevere M., Gauthier S., Guph D., Larpent J.P, Reymond P., Sanglier J.J, Vaysser Y.& Veau S.,1990.** Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2^{ème} Ed Masson collection biotechnologies.p :5-10.
- Bouchet P.H., Guignard J.L & Vihard J., 1999.** Les champignons mycologie fondamentale et appliqué. Masson .p :36-45.
- Bouguerra A. & Zeghou K., 2009.** Etude des activités antioxydante et antibactérienne de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula stoechas L.* Mémoire d'ingénieur INATAA.
- Bouhdid S., Idomar M., Zhiri A., Baudoux D., Skali N.S.& Abrini J., 2006.** *Thymus* essential oils : chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. Congrès international de biochimie, Agadir, Maroc, 09-12 Mai 2006.
- Bourgeois C.M. & Larpent L.P ; 1996.** Microbiologie Alimentaire, les fermentations alimentaires. Tome 2. ED : Lavoisier. P :17-19.
- Boysen M.E., Jacobsson K.G. & Schnürer J., 2000,** Molecular Identification of Species from the *Penicillium roqueforti* Group Associated with Spoiled Animal Feed, *Appl. Environ.* 21,p :22-32.
- Branger M., Bresler G., Vaamonde G., Degrossi C.& Pinto V. F.,2007.** Moisissures et risques alimentaires (mycotoxicoles). *Revue Française des Laboratoires.*p : 373.
- Bruneton J. 1993.** Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.p: 915.
- Burits M., & Bucar F.,2000.** Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*, 14, p:323–328.
- Bulter, M. J. & Day, A. W. (1998)** Fungal melanins: a review. *Canadian Journal Microbiology.* 44,p: 1115-1136.
- Cahagnier B., Dragacc S., Frayssinet C., Frémy J.M., Hennebert G.L., Lesage-meessen L., Multon J.L., Richard-Molard D. &Roquebert, M.F. ,1998** Moisissures des aliments peu hydrates. *Lavoisier Tec&Doc*, France.

- Cahagnier B. & Richard-Molard D., 1998.** Moisissures des aliments peu-hydratés, les moisissures. Collection sciences et techniques agroalimentaires. Ed. : Lavoisier. p :39-41.
- Caillet S. & Lacroix M., 2007.** Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. INRS-Institut Armand-Frappier, (*RESALA*). P :1- 8.
- Carette A.S., 2000.** La lavande et son huile essentielle. Thèse de doctorat, Université de Toulouse. p :100.
- Carson C.F., Riley T.V., Bosque F., 2002.** Antimicrobial activity of the major components of essential oil of *Malaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Bacteriology*. 78, p:264-269.
- Castegnaro M. & Pfohl-Leszkowicz A., 2002.** Balkan endemic nephropathy and the associated urinary tract tumours: review on etiological causes, potential role of mycotoxins. *Food Additive and Contaminants* .19 (3),p: 282-302.
- Castillejos, L., Calsamiglia, S. & Ferret A., 2006.** Effect of Essential Oil Active Compounds on Rumen Microbial Fermentation and Nutrient Flow in vitro systems. *Journal of Dairy Science* .89,p : 2649-2658.
- Champion R., 1997 :** Identifier les champignons transmis par les semences. Techniques et pratiques, INRA Edition.
- Chao S.C, Young D.G. & Oberg G.J., 2000.** Screening for inhibitory activity of essential oils on selected Bacteria, Fungi and viruses. *Journal of Essential oil Research*. 12, p:639-649.
- Chaumont J.P & Leger C., 2001.** Composition chimique and activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Aeollanthus pubescens Benth.* acclimatée au Togo. C.R. Chimie . 7,p :1107-1111.
- Christensen & Kaufmann, 1969.** Heating and respiration. University Minnesota Press. Mineapolis. P:238-255.
- Chu C. J. & Kemper K. J., 2001.** Lavender (*Lavandula spp.*). *Longwood Herbal Task Force*. P:32 .
- Cochrane V.W, 1976.** Glycolysis. Vol.II. Arnold Pub. LTD.London.p:25-59.
- Constantin E., 1996.** Spectrométrie de masse, Lavoisier Tec & Doc, Paris.p : 1-14.
- Cox S.D., Gustafson J.F., Warmington J.R. & Wyllie S.G., 1991.** In vitro antimicrobial activity and chemical composition of *Malaleuca alternifolia* essential oils. *Journal of Applied Microbiology* .88, p:170-175.
- Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.F., Warmington J.R. & Wyllie S.G., 2000.** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Malaleuca alternifolia* (tee tree oil). *Journal of Applied Microbiology* .88, p:170-175.

- Cruz J. , Dick K. & Wright L., 1988.** Conservation des grains en régions chaudes. 2^{ème} édition Ted &Doc APRIA, Paris. p : 41-54.
- Daferera D.J., Ziogas B.N. &Polissiou M.G.,2000.** GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* .48, p:76–81.
- Daftary R.D., Pomeranz Z. & Sauer D.B. ,1970** Changes in wheat flour damaged by mold during storage. Effects on lipid, lipoprotein and protein. *Agr. Food Chem.* 18, p:613-616.
- Daftary R.D. & Pomeranz Z., 1965.** Changes in lipid composition in wheat during storage deterioration. *J. Agr. Food Chem.* 12, p:442-446.
- Dapkevicius A., Venskutonis R, Van Beek T.A. & Linssen J.P.H. 1998.**Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of Science Food and Agriculture.* 77(1),p: 140-146.
- Davidson P.M., 1997.** Methods for testing the efficacy of food antimicrobial. *Food Technology*.43, p:148-155.
- Deans S.G., 2002 .**Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology.* 5,p: 165–80.
- Deng C., Yao N., Wang A. & Zhang X., 2005.** Determination of essential oil in a traditional Chinese medicine, *Fructus amomi* by pressurized hot water extraction followed by liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta.* P :236-237.
- Deroin T. ,1988.** Biologie florale d'une Annonaceae introduite en Côte D'Ivoire : *Cananga diagnosis* and epidemiology of fungal infections. 36 (1),p: 249-257.
- DoAmaral A. L., DalSoglio F.K., DeCarli M.L. &Neto, J. F. B.,1998.** Pathogenic fungi causing symptoms similar to Phaeosphaeria leaf spot of maize in Brazil. *Plant Dis.* 89,p: 44–49.
- Dorman H. J. D. & Deans S. G. , 2000.** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. 88,p: 308-316.
- Doumandji S.E., 1977.** Insectes des céréales et grains stockées. Fiche technique n° 1, 28p.
- Doumandji S.E., 1981-** Insectes des denrées stockées. Fiche technique n° 2, 28p.
- Doyle, M. P., Beuchat, L. R. & Montville, T. J. ,1998.** Food microbiology: Fundamentals and frontiers. *ASM press.* Washington D.C.
- DSASI, 2009.**Superficie et production des légumes secs en Algérie(2006-2009).

- Eckwall EC & Schottel JL., 1998** Isolation and characterization of an antibiotic produced by the scab disease-suppressive *Streptomyces diastatochromogenes* strain Pon SSII. *J Ind Microbiol Biotechnol* ;19, p:5-22.
- Economou L., Venskutonis R. & Van Beek T.A, 1991:** Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs. *Journal of the Science of Food and agriculture*.77, p:140-146.
- Evans D. J., and Marti S. A., 2000.** Effects of Thymol on Ruminant Microorganisms. 41, p :336-340.
- Fantino N.S, 1990.** Etude du polymorphisme au d'une population de lavande (*Lavandula angustifolia Mill.*)- Détermination de critères précoces de sélection. Thèse de doctorat. Université de La Rochelle.p :41-45.
- Feillet P.,2000.** Le grain de blé composition et utilisation. Ed. INRA, Paris. P :53
- FossL.,FriedLand E.N. &Chobert J.M.,1998.** biodegradation of polyphénols. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 45,p: 831-838.
- Feuilhade de Chauvin M., 2005,** New diagnostic techniques, *J. Eur. Acad. Dermatol.*21,p :758-769.
- Flamini G. & Luigi Cioni P., 2003.** Activity of Plant Extracts, Essential Oils, and Pure Compounds Against Fungi Contaminating Foodstuffs and Causing Infections in Human Beings and Animals: A Six-Year Experience (1995-2000). FOOD PRODUCTS PRESS :Crop Science ;New york, p :279-297.
- Franchomme P., Pénoel D. & Reverdy M.E., 1990.** Clefs pour l'aromathérapie. La molécule aromatique : matière, énergie, information.L'aromathérapie exactement. R.J. Editeur. Limoges.2,p :73-227.
- François V. ,2004** .Détermination d'indicateurs d'accélération et de stabilisation de détérioration des céréales, thèse de doctorat N° 8-2004, Université de Limoges.
- Frédot E.,2005.** Connaissance des aliments : Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique. Lavoisier Tec & Doc. p :259-272.
- Gámiz-Gracia L. & Luque de Castro M.D., 2000.** Continuous subcritical water extraction of medicinal plant essential oil: comparison with conventional techniques. *Talanta*. 51,p:1179-1185.
- Garnero M.J. , 1977.** Problèmes rencontrés au cours de l'étude de la composition chimique des huiles essentielles in Parfumes cosmétiques, arômes .14,p :31-40.
- Griffin S. G., Leach D. N., Markham J., and Johnstone R., 1998.** Antimicrobial activity of essential oils from *Zieria*. *Journal of Essential Oil Research*. 10,p: 165-174.

- Griffin S. G.,1999.**The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*.14 p :322-332.
- Guenot M.C. ,1975** – Evolution qualitative et quantitative de la microflore et de la composition glycéridique d'amande de tourne sol au cours du stockage. Thèse université Paris VI. C.N.R.S A.O.
- Guignard J.L.& Cosson L., Henry L., 1985.** *Abrégé de phytochimie*. Masson, Paris, 224 p.
- Guiraud, 1998.** Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod.Paris. p : 8, 98-99, 157, 321-329.
- Hageskal G., Knutsen A.K., Gaustad P., de Hoog G.S.& Skaar I., 2006.** Diversity of Antimicrobial Agents and Chemotherapy. *Journal of Essential Oil Research*. 32,p : 598-600.
- Heyen, U.& Harder J.,1995** . Geranic acid formation, an initial reaction of Gram-bacteria. *Journal of Applied Microbiology*.25.p:259-270.
- Hinrikson H.P., Hurst S.F., De Aguirre L.& Morrison C.J., 2005.** Molecular methods for determination of chemical composition of essential oils. *International journal of Aromatherapy*. 65,p :56-66.
- Houssou P.A., Ahohuendo B.C., Fandohan P., Kpodo K., Hounhouigan D.J.& Jakobsen M., 2009** .Natural infection of cowpea (*Vigna unguiculata*) by toxigenic fungiand mycotoxin contamination in Benin, West Africa. *Journal of Stored Products Research* .45 p:40–44.
- Huang H. S.,Chang L. H., Jong T. T., Nien Y. F.& Chang C. M. J.,1995.** Supercritical carbon dioxide extraction of turmetic oil from *Curcuma longa* Linn. ,and purification of turmerones. *Separation and Purification Technology*. 47, p:119-125
- Hui L., He L., Huan L., XiaoLan L. & Aiguo Z., 2010.** Chemical composition of lavender essential oil and its antioxidant activity and inhibition against rhinitisrelated bacteria. *African Journal of Microbiology Research*. 4 (4), p :309-313.
- Huignard J., 1985** – Importances des pertes dues aux insectes ravageurs des graines: problèmes posés par la conservation des légumineuses alimentaires source de protéines végétales. UA CNRS 340.p: 193-204.
- Inouye S., 2003.**Laboratory evaluation of gaseous essential oils (part 1). *International journal of Aromatherapy*. 45.p :22-35.
- ITGC, 1999-**les légumineuses alimentaires en Algérie. Situation actuelle et perspectives. Ed. ITGC EL-Harrach Alger, 139p.
- James N., Lejeune A.R., 1955.** Microflora and the heating of damp stored wheat. *Canad. J. of Botany*. 30 (1), p:1-8
- Jard N., 1995-** Les maladies des grains- Tome I. Edition. Univ. Omar Mokhtar. BATDHA. LYBIE. p: 517-522.

- Jin J., Lee Y.K. & Wickes B.L., 2004.** Notes Simple Chemical Extraction Method for DNA Isolation from *Aspergillus fumigatus* and Other *Aspergillus* Species, *J. Clin. Microbiol.* 42 (9), p4293-4296.
- Kaminski E., Stawicki S. & Wasowicz E., 1974.** Volatile flavor compounds produced by molds of *Aspergillus*, *Penicillium* and Fungi imperfecti. *Appl. Microbiol.* 27 (6), p :1001-1004.
- Khelil M.A., 1977-** Influence de la chaleur utilisée comme moyen de lutte contre la bruche du haricot *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleopterae: Bruchidae) sur les différents états et stades de développement. Thèse Ing. Agr. INA, 77p.
- Kim N.S. & Lee D.S. 2002.** Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from *Lavandula* species by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography* . 98, p: 31-47.
- Kordali S., Cakir A., Zengin H. & Duru M. E., 2003.** Antifungal activities of the leaves of three *Pistacia* species grown in Turkey. *Fitoterapia*. 74 p: 164-167.
- Krogh, P., 1987.** Ochratoxin A in food. Mycotoxin in Food. *Academic Press*, San Diego, p :97-121.
- Kulevanova' S., Stetkov' G., Ristic M., 2000.** Examination of and essential oils of *Lavandula officinalis* grown on mountain KOZJAK (MACEDONIA). Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia. 19(2), p: 165-169.
- Kwon Chung W. & Bennett J.W. , 1992:** Mycotoxins. *Clinical Microbiology Review* .16 , p:497-516.
- Lagunez Rivera L., 2006.** Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffée par induction thermomagnétique directe. Thèse Doctorat, Institut national polytechnique de Toulouse. P :15-35.
- Lahlou M., 2004.** Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*, 18, p: 435-448.
- Langseth N. Luster, M. I., Germolec, D. R., Burleson, G. R., Jameson, C. W., Ackermann, M. F., Lamm, K. R. & Hayes, H. T., 1993** Mycotoxins and mycotoxicoses, in: Microbial toxins in foods and feeds. *Plenum Press*, New York, USA, P:249-259.
- Larpen J.J et Larpen Gourgaud M., 1990-** Mémento technique de microbiologie. Ed Lavoisier. P :76-89, 255-258, 327-328.
- Lazzarini A., Cavaletti L., Toppo G. & Marinelli F., 2001.** Rare genera of Actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek*;79 p:399-405.
- Legrand G. 1993.** Manuel de préparateur en Pharmacie. Masson, Paris.

- Leyral G. & Vierling E., 2003.** Microbiologie et toxicologie des aliments : Hygiène et sécurité alimentaires. *Lavoisier Tec&Doc*, France. P :154-158.
- Lis-Balchin M. & Deans S.G.,1997.** Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.*, 82,p:759–62.
- Lis-Balchin M., Deans S.G. & Eaglesham E. ,1998.** Relationship between the bioactivity and chemical composition of commercial plant essential oils. *Flav. Fragr. Journal*. 13p :98–104.
- Lis-Balchin M.,2002.** Lavender: the genus *Lavandula*. Taylor and Francis, London.p: 37, 40, 50, 155-200.
- Longevialle P., 1981.** Spectrométrie de masse des substances organiques, Masson,Paris.p :32-35.
- Lu F & Foo L.Y., 2001.** Antioxidant activity of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry*.75, p:197-202.
- Luque de Castro M.D. & Jiménez-Carmona M.M. 1998.** Conventional techniques for the isolation of valuable essential oils. *Trends Anal. Chem.* 17 ,p: 441.
- Madhavi D. L., Deshpande S. S. & Salunkhe D. K., 1996.** Food Antioxidants. Technological, Toxicological, and Health Perspectives. Marcel Dekker, Inc. New York. P: 65.
- Maffei & Sacco, 1997 .**Perfumer and flavorist. . *Flavour and Fragrance Journal*.13 : p:61
- Magan N. & Olsen M., 2004-**Mycotoxines in food: Detection and control, Woodhead Publishing in Food Science and Technology.P:190-203.
- Maihebiau P., 1994.** La nouvelle aromathérapie: biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs. Lausanne. P : 635.
- Malloch D., 1997-**Moulds isolation cultivation and identification. University of Toronto.
- Mann J. (1987).** Secondary metabolism. Clarendon Press, Oxford, 374 p.
- Maskey L.N., Helander I.M. & Latva-Kala K., 2003.** Characterisation of the action of selected essential oil components on Gram-bacteria. *Journal of Agricultural and Food chemistry*.46, p:3590-3595.
- McEwan M.,1994.** The antifungal effects of plant essential oils and their production by transformed shoot culture. Dr thesis, Strathclyde Institute of Biomedical Sciences, University of Strathclyde, Glasgow, Scotland.
- Meyer, A., Deiana, J. & Bernard, A., 2004.** Cour de microbiologie générale. *J.Appl.Microbiol.* 66 (4), p:1523-1526.
- Milner M., Geddes W.F. & Mercier C., 1947.** Grain storage studies: Influence of localized heating of soybeans on interseed air movements. *Cereal Chem.* 22,p: 4 77-483.

- Misra G., Pavlostathis S. G., Perdue E. M. & Araujo R., 1996.** Aerobic biodegradation of selected monoterpenes. *Food Chemistry* .45,p: 831-838.
- Molinié L. & Pfohl-Leszkowicz A., 2003.** Les mycotoxines : contaminants omniprésents
monoterpene metabolism in denitrifying *Alcaligenes defragrans*. 66,p: 3004-3009.
- Moreau C., 1991.** Les moisissures . In Bourgeois C.M. & Leveau J.Y. Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agro alimentaires . Ed Tec. & Doc.p :234-235.
- Moulari B.,2005** Propriétés antimicrobiennes in vitro d'extraits de deux plantes africaines – Rôle de l'Astilbine – potentialisation du pouvoir antibactérien par nanoencapsulation. Thèse Doctorat Univ. Franche-Comté (France); p :4.
- Multon, J.L, 1982.** Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés : Céréales, oléagineux, aliments pour animaux. Lavoisier Technique & Documentation ,Paris Apria. Volume 1, 576p.
- Ngono Ngane R.A, 1999 .** Contribution à l'étude des propriétés antifongiques et analyse phytochimique de cinq plantes médicinales camerounaises. Thèse Doct. Pharmacie, Univ. Reims (France); p : 212
- Nguefacka, J. Leth V. , Amvam Zollo P.H. & Mathur S.B.,2004.** Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology*. 94,p : 329– 334.
- Nguyen Minth Tri M., 2007.** Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxine dans le riz commercialisé de cinq provinces de la région centrale du Vietnam- études des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines, thèse de Doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse. 100pages.
- Nicklin J., Graeme-Cook K., Praget T. & Killington R.,2000.** L'essentiel en microbiologie. Ed.Berti.p:211-217.
- Niessen L., 2007,** PCR based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi, *odorata* (Lam.) Hook. F. and Thoms. *Bull. Museum National Histoire Naturelle, B, Adansonia*, 10 (4),p: 377-393.
- Oh H. K., Sakai T., Jones M. B. & Longhurst W. M. ,1967.** Effects of various essential oils isolated from Douglas fir needles upon sheep and deer rumen microbial activity. *Applied Microbiology* .15,p: 777-784.
- Ozel M.Z., Gogus F. & Lewis A.C. ,2003.** Subcritical water extraction of essential oils from *Thymbra spicata*. *Food Chemistry*. 82,p: 381-386.
- Paris R. & Godon M., 1979.** Chromatographie en couche mince et sur papier des huiles essentielles. Ed. Masson, Paris.

- Pepeljnjak S., Stanic G. & Potocki P. 2007.** Antimicrobial activity of the ethanolic extract of *Satureja montana* subsp. *montana*. *Acta Pharm* .49,p:65-69.
- Pertruzelli L., 1986.** Weat viability et high moisture content under hermetic and aerobic storage condition. *ANN. BOT.* 58, p:259-265.
- Peterson S.W., 2006.** Multilocus sequence analysis of *Penicillium* and *Europicillium* Significance of Mold Species in Norwegian Drinking Water, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72 (12), p :7586-7593.
- Pibiri M.C, 2006.** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. thèse de Doctorat, Lausanne, Canada, p :177.
- Pitt J.I.& Hocking A.D,1999.** Fungi and food spoilage. Springer, London & New York. P:501.
- Pitt J.I. & Miscamble B.F., 1995.** The normal mycoflora of commodities from Thailand. Beans, rice, small grains and other commodities. *International Journal of Food Microbiology* 23 p:35– 53.
- Pomeranz J. ,1971,** Composition and Fonctionnalité of wheat flour components in wheat Ed. Cereal Chem. St. Paul, Minn. USA.p:25-65.
- Pomeranz Y., 1974.** Wheat chemistry and technology Ed. Cereal Chem. St. Paul, Minn. USA.p:25-65.
- Pradeau D. & Cohen Y., 1992.** L'analyse pratique du médicament, Ed.médicales internationales. P :418-428.
- Prevett P.F., 1975-** Pertes causées par les ravageurs dans l'alimentation animale et humaine :La sécurité alimentaire du consommateur.Lavoisier Tec&Doc.p :23-24.
- Quezel P.& Santa S., 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. Ed. C.N.R.S. Paris. Cité par **Mohammedi Z., 2006.** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydante des huiles essentielles et des flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse de Magistère, Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen. 23 p.
- Reboux G., 2006.** Mycotoxines : effets sur la santé et interactions avec d'autres composants organiques. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique* 46, p :208–212.
- Reiss E., Tanaka K., Bruker G., Chazalet V., Coleman D., Debeaupuis J.P., Hanazawa R., Latgé J.P., Lortholary J., Makimura K., Morrison C.J., Murayama S.Y., Naoe S., Paris S., Sarfati J., Shibuya K., Sullivan D., Uchida K. & Yamaguchi H., 1998.** Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections . *International Journal of Food Microbiology* .36 (1),p: 249-257

- Riba A., Sabeau N., Mathieu F. & Lebrihi A., 2005.** Premières investigations sur les champignons producteurs d'Ochratoxine A dans la filière céréale en Algérie. Symposium Euro- Maghrébien sur les contaminants biologiques, chimiques et la sécurité alimentaire, Fès.
- Richard F., 1992.** Manuel des corps gras, Paris, Ed: Lavoisier, Tec.&Doc., p :1228-1242.
- Richard H. et Peyron F., 1992.** Epices et aromates. Ed .Tec & Doc-Lavoisier.Paris.p :339.
- Richardmolard D., Cahagnier B., Poisson J.& Drapron R., 1979.** Evolution comparées des constituants volatils et de la microflore de maïs stockés sous différentes conditions de température et d'humidité. *Ann. Technol. Agric.*25 (1), p : 29-44.
- Roberts E.H., 1972.** Storage environment and the control of viability of seeds .*Cereal chem.* p:14-58.
- Roquebert M.F., 1997.** Les moisissures : nature, biologie et contamination. Ed. Université de Lyon. France.
- Rotimi V. O., Laughon B. E., Barlet J. S. & Mosadomi H. A. ,1988.** Activities of Nigerian Chewing sticks extracts against *Bacterioides gingivalis* and *Bacterioides melaninogenicus*.
- Ryall, A.L. and Lipton, W.J. 1979.** Handling, Transportation and Storage of Fruits and Vegetables. Westport, CT: AVI Publishing Co.p:22-59
- Sarantinos J., Hung T.V., Black R.G. & Brouwer J.B. 1996.** The effects of fungal infection on the chemical and functional properties of chickpeas (*Cicer arietinum*) and Faba beans (*Vicia faba*). *J. Sci. Food Agric.* 70,p: 197–203.
- Seri-Kouassi B.P , Kanko C. , Nondenot Aboua L.R , Bekon K.A, Glitho A.I, Koukoua G. & N'Guessan Y.T.,2004.** Action des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire sur *Callosobruchus maculatus* F. du niébé. *Compters. Rendus. Chimie* 7 , p :1043–1046.
- Shariffifar F. , Moshafi M.H. , Mansouri S.H., Khodashenas M. & Khoshnoodi M., 2007.** In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control* 18, p: 800–805.
- Sidi Boulenouar K. & Ziane A., 2003.** Etude phytochimique des huiles essentielles de *Lavandula stoechas* L. de la région de Tlemcen. Mémoire pour l'obtention du diplôme d'études supérieur en biologie. Option : Biochimie. Faculté des Sciences.univ.ABB.Tlemcen. 54 p.
- Sing R., Marimuthu P., De Heluani C.S & Catalan Ceser A.N., 2006.** Antioxidant and biocidal Activities of *Carum nigrum* (seed) Essential oil, Oleoresin, and Their Selected Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* .54, p:174-181.
- Siret C., 2000.** Structure des aliments. Techniques d'ingénieur. P :11

- Skoog D.A., Holler F.J. & Nieman T.A., 2003.** Principes d'analyse instrumentale. 1^{ère} édition, Ed. De Boeck Université,p: 945.
- Smith R., 2002.** Fungal identification guide. Departement of veterinary pathology, Texas university.p:24-26.
- Snowdon A.L. 1991.** A Colour Atlas of Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables ., *International Journal of Food Microbiology*. 23(3), p:3-28.
- Sud, D., Sharma, O.P. & Sharma, P.N. 2005.** Seed mycoflora in kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Himachal Pradesh. Seed Res. 33,p: 103–107.
- Sun Kim N.& Lee D.S.,2002.** Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from *Lavandula* species by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography* . 982. P:31–47
- Svoboda k.p. & Hampson J.B., 1999.** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Departement, SAC Auchincruive, Ayr ,Scotland, UK., KA6 5HW.
- Tabuc C., 2007.** Flore Fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse. 190p.
- Tatsadjieu N.L., Jazet Dongmo P.M., Ngassoum M.B. , Etoa F-X. , Mbofung C.M.F.& 2009 .** Investigations on the essential oil of *Lippia rugosa* from Cameroon for its potential use as antifungal agent against *Aspergillus flavus*. *Food Control*. 20 ,p:161–166.
- Terrain C.et Grallet H., 2003,** Séchage des grains en organisme stockeur,: guide pratique. ARVALIS institut du végétal et FFCAT.p :1-5.
- Thiam A.A., Drapron R.& Rrichardmolard D., 1976.** Causes d'altération des farines de mil et sorgho. Ann. Technol. Agric.25 (3), p : 253-271.
- Tranchant J., 1995 .** Manuel pratique de chromathographie en phase gazeuse. Ed. Masson. Paris.
- Tseng, T.C., Tu, J.C. & Tzean, S.S., 1995.** Mycoflora and mycotoxins in dry bean (*Phaseolus vulgaris*) produced in Taiwan and in Ontario, Canada. *Bot. Bull. Acad. Sinica* 36,p: 229–234.
- Twidwell E. K., Wagner J. J. & Thiex Nancy J., 2002.** Use a Microwave Oven to Determine Moisture Content of Forages. P:77-88.
- Utree A., Slump R.A, Steging G. & Smid E.J., 2002.** Antimicrobial activity of carvacrol on rice. *Journal of food protection*.63,p:620-624.

- Valnet M., 2005.**Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth International. Journal of Food Microbiology.85,p:73-81.
- Verma R.S., Laiq U. ,Rahman S., Chandan S. Chanotiya K., Rajesh K. Chauhan A., Yadav.A & Singh A. ,2009.**Essential oil composition of *Lavandula officinalis* cultivated in the mid hills of Uttarakhand, India. *J. Serb. Chem. Soc.* 75 (3)p: 343–348 .
- Verzele L., Moudachirou S.& Ramanoelina G.,1988** Perfumer and flavorist, *flavour and fragrance journal* .13, p:61-67.
- Villano D., Fernandez-Pachon M.S., Moya M.L. , Troncoso A.M.& Garcia-Parrilla M.C.,2007.** Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* .71 p:230–235.
- Vokou D., Kokkini S. & Bressiere J.M.,1988.** *Origanum onites*(Lamiaceae) in Greece Distribution , volatile oil yield, and composition . *Economy botanic.* 42, p:407-412.
- Wendakoon K.& Saguchi N.A., 1995.** Methods of asses quality and stability of oils and fat-containing foods .AOCS. press, champaign.
- Wiesenfeld E., 1999.** Aroma Profiles of Various *Lavandula* Species. SIS: Scientific Instrument Services. P :12 – 24.
- Wyllie G., Markham J. L. & Leach D. N., 1999.** The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Talanta* .14,p: 322-332.

Annexes

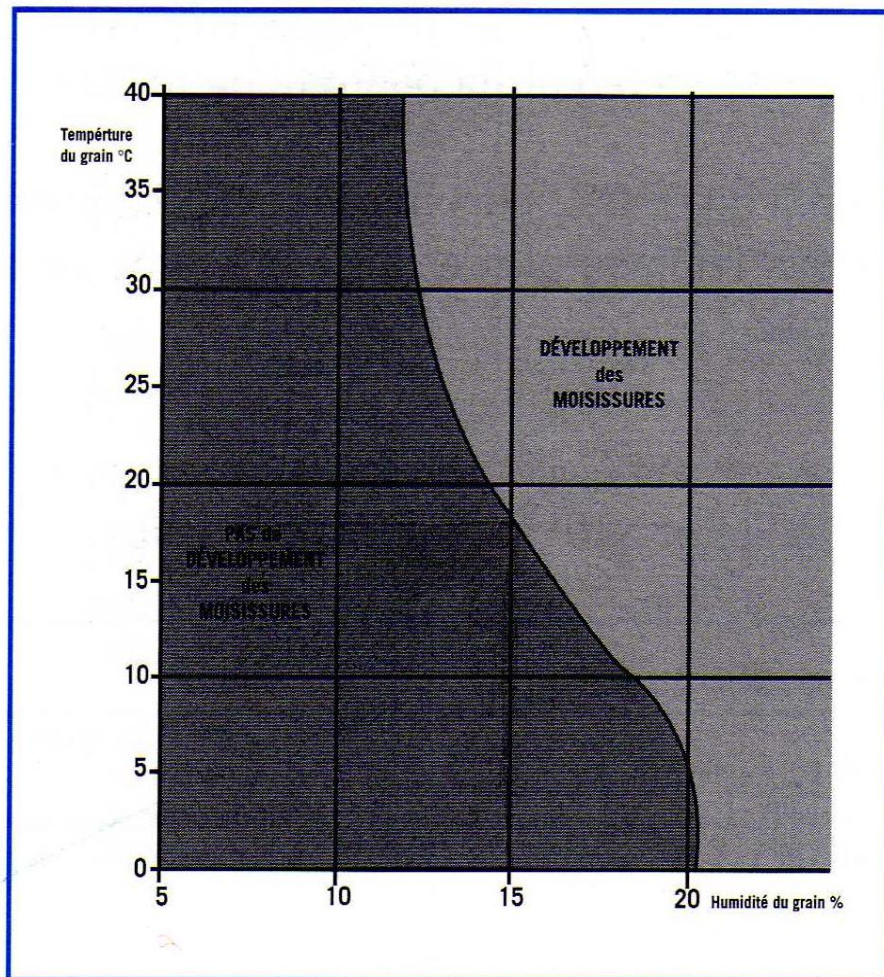
Annexe1 :Chromatographie en phase gazeuse



(a) :L'appareil utilisée pour la chromatographie type VARIAN CHROMPACK-CP 3800,(b) : un ordinateur menu d'un logiciel Nist,(c) :les bouteilles de gaz vecteurs utilisées pour la chromatographie en phase gazeuse,(d) tableau des paramètres de la colonne,(e) La colonne capillaire type CP-Chirasil-Dex CB fused silica WCOT,(f) micro-seringue d'injection.

Annexe 2 : Diagramme de développement des moisissures

(D'après BURGERS et BURREL 1964 Doc. ARVALIS-Institut du Végétal et FFCAT)



Annexe 3 : Composition des milieux

- **Milieu PDA**

Extrait de pomme de terre.....1000ml

Glucose.....20g

Agar20g

Ce milieu est stérilisé à l'autoclave à 120° C pendant 15mn.

- **Sabouraud gélosé**

Peptone.....40g

Agar.....20g

Eau distillée.....1000ml

Ce milieu est stérilisé à l'autoclave à 120° C pendant 15mn.

- **Sabouraud liquide**

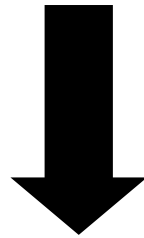
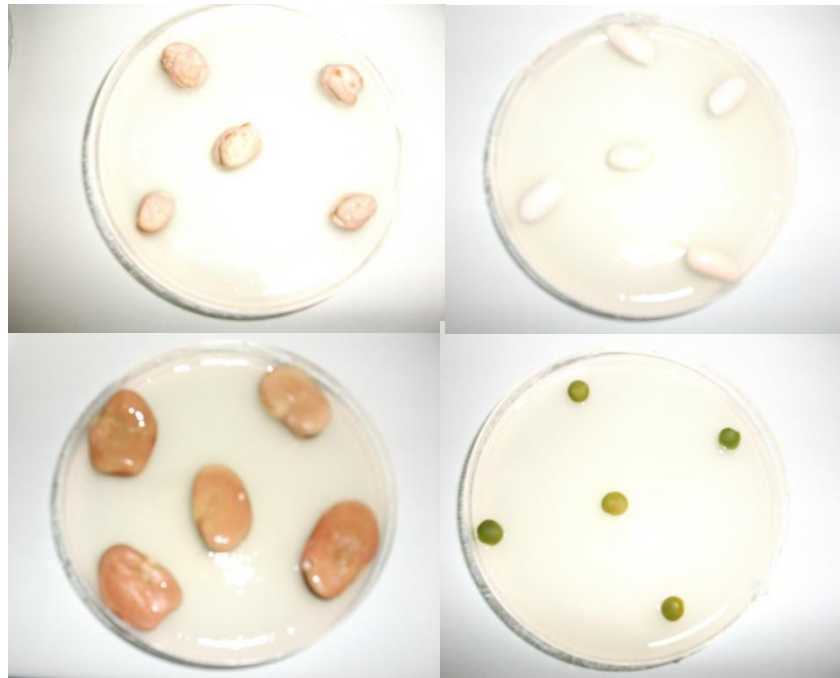
Néopeptone.....10g

Glucose.....20g

pH=5-5.6

Ce milieu est stérilisé à l'autoclave à 120° C pendant 15mn.

Annexe 4 : Isolement des moisissures des légumes secs



Incubation à 28 °C pendant
7jours



Résumé

Cette étude a pour objectif l'évaluation de l'activité antioxydante et antifongique des huiles essentielles de la lavande. L'extraction des huiles essentielles de *Lavandula officinalis* a été réalisée par hydrodistillation. Le rendement en HE augmente en fonction du temps puis se stabilise. Ce rendement est de $1.36 \pm 0.2\%$ et tend vers un palier après 80 minutes. L'analyse de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* par CPG a permis d'identifier 49 composés terpéniques. Linalyl acétate (15.26 %), Linalool (10.68%), 1,8- cineole (10.25%), γ -terpinene (11.2%) et camphor (11.25%) ont été les principaux composants. L'étude du pouvoir antioxydant par la méthode de DPPH• a montré l'existence d'une activité antioxydante de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis*. La détermination de l'humidité des échantillons des légumes secs a montré que ces grains sont favorables pour le développement des moisissures. La purification et l'étude microscopique des souches isolées ont donné la possibilité d'identifier 5 genres de moisissures à savoir : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* et *Alternaria*. L'étude de la contamination montre une dominance des genres *Penicillium* et *Aspergillus*. L'évaluation de l'activité antifongique a révélé l'inhibition de croissance des moisissures pour la plupart des souches testées. Les souches tests et les différents genres isolés des légumes secs n'ont pas une sensibilité similaire vis-à-vis de l'HE.

Mots clés : Huiles essentielles ; *Lavandula officinalis* ; Rendement ; CPG ; Activité antioxydante ; Activité antifongique ; Humidité ; Moisissures ; Hydrodistillation

Abstract

The aim of this study is the evaluation of Antioxydant activity and Antifungal activity of essential oils of lavender. The extraction of essential oils of *Lavandula officinalis* was carried out by hydrodistillation. The HE yield increases according to time then is stabilized. This yield is of $1.36 \pm 0.2\%$ and tends towards a stage after 80 minutes. The analysis of the essential oil of *Lavandula officinalis* by CPG made it possible to identify 49 terpenic compounds. Linalyl acetate (15.26%), Linalool (10.68%), 1,8 - cineole (10.25%), γ -terpinene (11.2%) and camphor (11.25%) were the main components. The study of the antioxydant power by the method of DPPH• showed the existence of an antioxydant activity of the essential oil of the dry flowers of *Lavandula officinalis*. The determination of moisture of the samples of dry vegetables showed that these grains are favorable for moulds growth. The purification and the microscopic study of the isolated stocks gave the possibility of identifying 5 kinds of moulds namely: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* and *Alternaria*. The study of the contamination shows a predominance of the kinds *Penicillium* and *Aspergillus* the evaluation of the antifungal activity revealed the inhibition of growth of the moulds for most stocks tested. The stocks tests and the various kinds isolated from dry vegetables do not have a similar sensitivity with respect to the essential oil.

Key words: Essential oils; *Lavandula officinalis*; Yield ; CPG; Antioxydant activity; Antifungal activity; Moisture; Moulds; Hydrodistillation

ملخص

هذه الدراسة تهدف الى تقييم النشاط ضد الاكسدة والنشاط ضد الفطريات للزيوت الاساسية للخرامة . استخراج الزيوت الاساسية للخرامة *Lavandula officinalis* تم بواسطة التقطير المائي. المرودية تتزايد بدلالة الوقت ثم تقيل الى مستوى مستقر. هذه المرودية تساوي $0.2 \pm 1.36\%$ و تميل الى الثبات بعد 80 دقيقة . تحليل الزيت الاساسي بواسطة CPG مكن من تحديد 49 مركب Terpeniques.

Linalool (10.68%), 1,8 - cineole (10.25%), γ -terpinene (11.66) : Linalyl acetate (15.26%), هي المركبات الاساسية.

الزيت الاساسي المستخرج من الزهور الجافة *Lavandula officinalis* اظهر وجود نشاط ضد الاكسدة باستعمال طريقة ارجاع DPPH• قياس رطوبة عينة البقول قد بينت ان هذه الحبوب تساعد على نمو الفطريات.

دراسة الفطريات المستخرجة بواسطة المجهر مكنت من تحديد خمسة انواع *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Alternaria*.

Aspergillus, *Penicillium* هي الاساسية. الزيت الاساسي اظهر وجود نشاط ضد الفطريات الاساسية سواء كانت فطريات معرفة او مستخرجة من البقول و لكن حساسيتها لهذه الزيوت مختلفة.

الكلمات المفتاحية

الزيوت الاساسية ، *Lavandula officinalis* ، المرودية ، CPG ، نشاط ضد الاكسدة ، نشاط ضد الفطريات ، الرطوبة، الفطريات، التقطير المائي.