

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLICUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار - عنابة  
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

## THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de DOCTORAT  
En Sciences  
Option : Biochimie appliquée

### THEME

**Bio-décontamination en agro-alimentaire par des  
molécules bio-actives naturelles d'une plante médicinale :**  
*Rosmarinus officinalis*

Présentée par: M<sup>me</sup> BAGHLOUL Faïza

Directeur de thèse : M<sup>r</sup>. DJAHOUDI Abdelghani Professeur, Université d'Aannaba

#### Membres de Jury:

Président : M<sup>r</sup>. BOUTEBBA Aissa Professeur, Université d'Aannaba  
Examineurs : M<sup>me</sup>. GRARA Nedjoud Professeur, Université de Guelma  
M<sup>me</sup>. METALLAOUI Sophia MCA, Université de Skikda

N° DBCH...../2018

Année universitaire : 2018/2019

## Remerciement

Je tiens d'abord à adresser toute ma gratitude et mes vifs remerciements à mon directeur de thèse Monsieur **le Professeur DJAHOUDI Abdelghani**, sans lequel ce travail n'aurait pu aboutir. Je le remercie pour ses qualités humaines, son soutien, pour ses conseils toujours pertinents, et sa disponibilité à toute épreuve. Je lui adresse toute ma reconnaissance pour sa patience, ses remarquables compétences, et sa participation active lors de la rédaction de l'article et de la thèse.

Je tiens à remercier très sincèrement :

Monsieur **BOUTEBBA Aissa**, Professeur à l'université Badji Mokhtar-Annaba, qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et reconnaissance.

Madame **METALLAOUI Sophia**, Maître de conférences à l'université de Skikda, qui me fait l'honneur de siéger à ce jury de soutenance de thèse et d'examiner ce travail. Je tiens à l'assurer de ma profonde reconnaissance et de tous mes remerciements pour l'intérêt qu'elle porte à ce travail. Je la remercie également de me consacrer de son temps et d'avoir accepté de se déplacer.

Madame **GRARA Nedjoud**, Professeur à l'université de Guelma, pour l'honneur qu'elle m'a fait de sa participation à mon jury de thèse, pour le temps consacré à la lecture de cette thèse, et d'avoir accepté de se déplacer.

Merci à M<sup>me</sup> **Mansori Rokaya**, M<sup>me</sup> **Tounsi** (CHU. Dorban-Annaba) **Mr Laaradj** (Laboratoire Botanique-Faculté de médecine-Annaba) pour le fait de m'avoir accueilli dans leur équipes, pour leur gentillesse et pour tous les secrets dévoilés de la mycologie microscopique et l'histologique du monde végétal.

J'exprime également mes remerciements et ma reconnaissance aux équipes des laboratoires de contrôle de qualité-Annaba et d'El Harouch-Skikda.

Mes remerciements à toutes les personnes avec qui j'ai partagé de bons moments et qui ont rendu plus agréable le travail au sein du laboratoire de Microbiologie- Chimie analytique et Biochimie, de l'université d'Annaba et de Skikda. Je leurs serai toujours reconnaissantes pour leur aide et leurs conseils. Enfin, je remercie tous ceux qui ont collaboré de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

---

## Résumé

Les nombreuses propriétés naturelles des huiles essentielles en font d'elles à la fois des ingrédients nutraceutiques et des agents de conservation très prometteurs pour l'industrie agro-alimentaire. Le recours à ces molécules s'avère être un choix adéquat, face à un risque précis ou à la nécessité de réduire ou remplacer les agents de conservation chimiques synthétiques connues par leurs nocivités sur la santé humaine.

Notre étude porte sur l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*, espèce très abondante dans la région de Hammamet-Youkous (Tebessa-Algérie). Elle fait partie du patrimoine médicinal et culinaire de cette localité, autre fois utilisée en médecine populaire, en cosmétique et en phytopharmacie. L'étude analytique de l'huile essentielle du romarin effectuée par CPG-SM, a montré que ces composants appartiennent à la classe biochimique des phénols et hydrocarbures mono-terpéniques. Aussi a révélé une prédominance du constituant 1,8 cinéole, ainsi confère à la plante son chémotype: *Rosmarinus officinalis* à 1,8 cinéol.

L'activité de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* sur les souches fongiques pathogènes et les puissants contaminants alimentaires (*Aspergillus sp.*, *Fusarium* et *Penicillium*) par la technique de fongigramme a montré qu'à de faibles concentrations, cette huile donne un bon résultat anti-fongique.

Le pouvoir antimicrobien de cette huile est très important, se caractérise par une action fongistatique et fongicide vis-à-vis des germes suscités. L'addition de l'huile essentielle du romarin « *Rosmarinus officinalis* » à « la pomme » et aux « olives » a donné un effet très significative, en augmentant leurs durées de conservation. Ceci nous conforte dans l'idée de proposer cette huile essentielle aromatique, comme source de molécules bio-actives conservatrices naturelles.

### Mots clés :

*Rosmarinus officinalis*- huile essentielle- contaminants alimentaires-conservation.

---

## Abstract

The many natural properties of essential oils make them both nutraceutical ingredients and very promising preservatives for the food industry. The use of these molecules proves to be an appropriate choice to face the risk of specific contaminations or to reduce (replace) synthetic chemical preservatives known for their harmful effects on human health.

Our study focuses on the essential oil of *Rosmarinus officinalis*, which is a very abundant species in the region of Tebessa-Algeria, it is used in folk medicine, cosmetics and phytopharmacy. The extraction of essential oils from rosemary was performed by steam distillation. The chemical study of these essential oils by CPG-SM revealed the richness of the latter in 1.8 cineole compared to other compounds. This confirms a chemotype: *Rosmarinus officinalis* at 1.8 cineol.

The activity of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* on fungal pathogenic strains by the fungigram technique has shown that at low concentrations, this oil gives a good result against fungal strains known as powerful food contaminants as: *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, and *Penicillium sp.*

The antimicrobial power of these oils is very important, it is characterized by a fungistatic and fungicidal action faces the sprouts. The addition of rosemary essential oil "*Rosmarinus officinalis*" to "apple" and "olives" has given a very significant effects, increasing their shelf life. This reinforces our idea of proposing this aromatic essential oil, as a source of natural conservative bio-active molecules.

Keywords :

*Rosmarinus officinalis* - essential oil - food contaminants – conservation.

## المخلص

للطبيعية خصائص عديدة و الزيوت الأساسية تجعلها مكونات غذائية و مواد حافظة و اعدة للغاية لصناعة الأغذية. يثبت استخدام هذه الجزيئات أنه الاختيار المناسب لمواجهة خطر تلوثات معينة أو لتقليل (استبدال) المواد الحافظة الكيميائية التركيبية المعروفة بآثارها الضارة على صحة الإنسان.

تركز دراستنا على الزيت العطري لإكليل الجبل وهو نوع و فير للغاية في منطقة تبسة-الجزائر و يستخدم في الطب الشعبي و مستحضرات التجميل و الصيدلة النباتية.

تم استخراج الزيوت الأساسية من إكليل الجبل عن طريق التقطير بالبخار و كشفت الدراسة الكيميائية

بواسطة تقنية CPG-SM عن ثراء هذا الأخير ب 1.8 سينول مقارنة بالمركبات الأخرى

هذا يؤكد النمط الكيميائي لإكليل الجبل : *Rosmarinus officinalis* 1.8 سينول .

أظهر نشاط الزيوت الأساسية لـ إكليل الجبل على سلالات مسببة للأمراض الفطرية بواسطة تقنية فونجيجرام أنه في التركيزات المنخفضة ، يعطي هذا الزيت نتيجة جيدة ضد

' السلالات الفطرية المعروفة باسم الملوثات

الغذائية القوية مثل *Penicillium* و *Fusarium sp.* و *Aspergillus sp.*

إن إضافة زيت إكليل الجبل العطري إلى "التفاح" و "الزيتون" قد أعطت تأثيرات مهمة للغاية

مما زاد من مدة صلاحيتها. هذا يعزز فكرتنا في اقتراح هذا الزيوت العطرية كمصدر للجزيئات الحيوية النشطة الطبيعية الحافظة.

الكلمات الدالة :

زيت أساسي - ملوثات غذائية - الحفظ - إكليل الجبل .

---

## Liste des abréviations

**AFNOR** : Association Française de Normalisation.

**CHU** : Centre Hospitalier Universitaire.

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice.

**CPG-SM** : Chromatographie en Phase Gazeuse -Spectrométrie de Masse.

**D.J.A** : Dose Journalière Admissible.

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde.

**DPFM** : Département de Pharmacie Faculté de Médecine.

**HE**: huile essentielle.

**HERO** : huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.

**ISO** : International Standard Organization.

**C°** : degré Celsius.

**MH** : Muller Hinton.

**MEC** : Concentration Minimale Effective.

**NIST** : National institute of Standards and Technology.

**PDA** : Potatos Dextrose Agar.

**pH** : Potentiel Hydrogène.

**UBMA** : Université Badji Mokhtar Annaba.

<b>LISTE DES FIGURES</b>		<b>Pages</b>
<b>Figure 1.</b> Aspect morphologique du romarin.		5
<b>Figure 2.</b> Deux types de tanins hydrolysables.		7
<b>Figure 3.</b> Structure de base des flavonoïdes.		8
<b>Figure 4.</b> Structure chimique des monoterpènes identifiés dans l'huile essentielle de romarin.		11
<b>Figure 5.</b> Structure d'un sesquiterpène le $\alpha$ bisabolol.		11
<b>Figure 6.</b> Localisation de la zone de Hammamet-Youkous.		30
<b>Figure 7.</b> Partie de la plante cueillie.		31
<b>Figure.8.</b> Schéma illustrant la réalisation d'une coupe transversale de la feuille.		34
<b>Figure 9.</b> Répartition des enquêtés selon le sexe.		55
<b>Figure 10.</b> Répartition des enquêtés selon l'âge.		56
<b>Figure 11.</b> Répartition des enquêtés selon la connaissance de la plante.		57
<b>Figure 12.</b> Répartition des enquêtés selon la source de connaissance.		58
<b>Figure 13.</b> Répartition des enquêtés selon la source de la plante.		59
<b>Figure 14.</b> Répartition des enquêtés selon les parties utilisées.		59
<b>Figure 15.</b> Répartition des enquêtés selon l'état de la plante.		60
<b>Figure 16.</b> Répartition des enquêtés selon la voie d'administration.		61
<b>Figure 17.</b> Répartition des enquêtés selon le mode de préparation.		62
<b>Figure 18.</b> Répartition des enquêtés selon l'usage.		63
<b>Figure 19.</b> Répartition des enquêtés selon la fréquence d'utilisation.		63
<b>Figure 20.</b> Répartition des enquêtés selon le moment d'administration.		64
<b>Figure 21.</b> Répartition des enquêtés selon l'utilisation de l'HE.		65
<b>Figure 22.</b> Répartition des souches fongiques test-objet selon leur origine alimentaire.		77
<b>Figure 23.</b> Répartition des souches fongiques retenues selon l'espèce.		79
<b>Figure.24.</b> Répartition des souches <i>A. niger</i> test-objet en fonction de la concentration de l'HE.		83

---

<b>LISTE DES PLANCHES</b>	<b>Pages</b>
<b>Planche 01.</b> Etapes de la double coloration des feuilles du romarin.	36
<b>Planche 02.</b> Schéma du protocole expérimental.	48
<b>Planche 03.</b> Photo du protocole opératoire (traitement des pommes par l'HE).	51
<b>Planche 04.</b> Structures anatomiques des feuilles de <i>R. officinalis</i> .	72
<b>Planche 05.</b> Résultat du fongigramme: (a) (a') <i>A. flavus</i> , (b) (b') <i>A. niger</i> , (c) (c') <i>Penicillium sp.</i>	82
<b>Planche.06.</b> CMI de la souche (a) <i>Fusarium sp.</i>	85
<b>Planche 07.</b> Aspect des olives traitée et témoin pendant un mois de conservation.	94



<b>LISTE DES PHOTOS</b>		<b>Pages</b>
<b>Photo.1</b> : Le romarin récolté de Hammamet-Youkous.		32
<b>Photo 2.</b> Les étapes de la réalisation des coupes transversales des feuilles.		34
<b>Photo 3.</b> Dispositif d'extraction de l'HE par hydro-distillation.		37
<b>Photo 4.</b> Des souches fongiques test-objet retenues		43
<b>Photo.5.</b> Les pommes test-objet.		49
<b>Photo.6.</b> Des olives test-objet mis en conservation.		53
<b>Photo 7.</b> Les deux préparations d'olives traitées et témoins.		54
<b>Photo 8.</b> <i>Rosmarinus officinalis</i> L. à l'état spontané.		69
<b>Photos 9.</b> Feuilles de romarin imprégnées dans une solution d'alcool.		70
<b>Photo 10.</b> Coupe transversale de la feuille de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. observée sous microscope optique (G : X 40).		71
<b>Photo 11.</b> Nervure principale de la feuille de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. observée au microscope optique (G : X 40).		71
<b>Photo 12.</b> Aspect macroscopiques de la souche <i>Fusarium sp.</i>		78
<b>Photo 13.</b> Aspect macroscopique de la souche <i>Penicillium sp.</i>		78
<b>Photo.14.</b> CMI des souches fongiques étudiées (a) <i>Penicillium sp.</i> ; (b) <i>A. Fumigatus</i> ; (c) <i>A. flavus</i> .		84
<b>Photo. 15.</b> Activité fongistatique de l'HE testées.		88
<b>Photo.16.</b> Résultat du test de révélation de la cire de synthèse sur deux variétés de pommes (a) et (b).		91
<b>Photo 17.</b> Variation de l'aspect des pommes en fonction du temps d'exposition à l'HERo.		91
<b>Photo.18.</b> Aspect macroscopique du biofilm sur les olives conservées.		93
<b>Photo.19.</b> Aspect microscopique de : <i>A. flavus</i> sous microscope optique (G : ×40).		93

---

<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>Pages</b>
<b>Tableau 01.</b> Classification botanique de l'espèce <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	4
<b>Tableau 02.</b> Les différents chémotypes du romarin.	12
<b>Tableau 03.</b> Identification des espèces du genre <i>Penicillium</i> selon la couleur des colonies	18
<b>Tableau 04.</b> Mycotoxines produites par le genre <i>Fusarium</i> .	21
<b>Tableau 05.</b> Différentes sources des souches fongiques collectées.	43
<b>Tableau 06.</b> Caractéristiques organoleptiques de <i>Rosmarinus officinalis</i> .	73
<b>Tableau 07.</b> Composition chimique de l'huile essentielle du romarin extraite en comparaison avec d'autres profils chromatographiques.	73
<b>Tableau 08.</b> Classes biochimiques des composants constitutifs de l'HE extraite de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Youkous-Hammamet).	76
<b>Tableau 09.</b> Résultat de l'identification macroscopique des souches fongiques.	79
<b>Tableau 10.</b> Résultat de l'aspect microscopique des souches d' <i>Aspergillus</i> .	80
<b>Tableau 11.</b> Variation du facteur inhibiteur de l'HE étudiée sur les souches fongiques test-objet en fonction des concentrations.	83
<b>Tableau 12.</b> Type d'activité de l'HE sur les souches fongiques étudiées.	89

---

## Table des matières

Résumé .....	I
Abstract.....	II
الملخص .....	III
Sommaire.....	IV
Liste des abréviations .....	V
Liste des figures .....	VI
Liste des planches .....	VII
Liste des photos .....	VIII
Liste des Tableaux .....	IX

Introduction.....	1
-------------------	---

### **Partie I : Analyse bibliographique**

#### **Chapitre I- Le romarin : aspects botaniques et extraits de *Rosmarinus officinalis***

1. Historique .....	3
2. Etymologie.....	3
3. Caractéristiques botaniques.....	4
3.1. Classification de la plante .....	4
3.2. Description botanique .....	4
3.3. Répartition géographique dans le monde et en Algérie.....	5
4. Usages en cosmétique, culinaire et en phytothérapie.....	6
5. Principaux constituants et rôles physiologiques.....	7
5.1. Tanins.....	7
5.2. Flavonoïdes.....	8
5.3. Huiles essentielles .....	9
5.3.1. Répartition botanique .....	9
5.3.2. Localisation et lieu de synthèse.....	9
5.3.3. Caractéristiques physico-chimiques .....	9
5.3.4. Constituants chimiques et notion de chémotype.....	10
5.3.4.1. Terpènes.....	10
5.3.4.2. Les composés aromatiques.....	11
5.3.5. Valeurs économiques .....	12

5.3.6. Effets anti-microbiens des huiles essentielles.....	13
--	----

## **Chapitre II- Moisissures et produits alimentaires**

1. Principaux genre fongiques de contaminations alimentaires.....	14
1.1. Le genre <i>Aspergillus</i> .....	14
1.1.1. Les principales espèces.....	15
1.1.2. Importance du genre <i>Aspergillus</i> .....	16
1.1.2.1. Potentiel toxigènes et pouvoir pathogène.....	16
1.1.2.2. Espèces utiles .....	17
1.2. Le Genre <i>Penicillium</i> .....	18
1.2.1. Importance du genre <i>Penicillium</i> .....	18
1.2.2. Espèces utiles-pouvoir pathogène et toxigène des <i>Penicillium</i> .....	19
1.3. Le genre <i>Fusarium</i> .....	20
1.3.1. Importance des principales espèces de <i>Fusarium</i> .....	20
1.3.2. Pouvoir pathogène et toxigènes.....	21

## **Chapitre III- Conservateurs alimentaires**

1. Conservateurs alimentaires et mécanismes d'action.....	22
2. Pathogénicité des conservateurs alimentaires de synthèse .....	23
3. Pathogénicité des micro-organismes.....	23
4. Conservation des fruits et légumes.....	23
4.1. Les contaminants de la pomme .....	24
4.1.1. La pourriture bleue .....	24
4.2. Conservation de la pomme par la cire .....	24
4.3. Les olives .....	25
4.3.1. Variétés d'olives .....	25
4.3.2. Paramètres affectant la qualité des olives .....	26
4.3.2.1. Le pH .....	26
4.3.2.2. Le biofilm .....	26
5. Usage des molécules bio-actives naturelles.....	26

## **Partie II : Etude expérimentale**

### **I. Matériel et méthodes**

1. Enquête ethnobotanique .....	28
---------------------------------	----

1.1. Lieux de l'enquête.....	28
1.2. L'enquête proprement dite.....	28
1.3. Analyse descriptive des enquêtés.....	29
2. Matériel végétal.....	29
2.1. Caractéristiques du lieu de la récolte.....	29
2.1.1. Position géographique.....	29
2.1.2. Climat de la région d'étude.....	30
2.1.3. Nature du sol .....	31
2.2. Drogue.....	31
2.2.1. Echantillonnage de la plante.....	31
2.2.2. Identification de l'espèce .....	32
2.2.3. Estimation de la teneur en eau .....	32
2.2.4. Description des coupes histologiques .....	33
2.2.5. Séchage et conservation de la plante.....	36
3. L'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	37
3.1. Extraction de l'HE.....	37
3.2. Estimation du rendement.....	38
3.3. Conservation de l'HE.....	38
3.4. Etude analytique de l'huile essentielle du romarin.....	39
3.4.1. Les propriétés organoleptiques .....	39
3.4.2. L'analyse chimique .....	39
4. Activités anti-fongique de l'huile essentielle extraite.....	41
4.1. Choix des souches fongiques test-objet .....	42
4.2. Origine alimentaire des souches. ....	42
4.3. Culture et conservation des souches .....	43
4.4. Détermination de l'activité anti-fongique .....	45
4.4.1. Fongigramme .....	45
4.4.2. Concentration minimale inhibitrice (CMI).....	46
4.4.3. Type d'activité .....	48
5. Applications de l'HE comme conservateur de produits alimentaires.....	48
5.1. La pomme .....	48
5.1.1. Révélation de la cire.....	48
5.1.2. Conservation par l'HE de <i>R. officinalis</i> .....	49

5.2. Les olives .....	52
5.2.1. Choix d'olives test-objet .....	52
5.2.2. Mise en évidence du biofilm et micro-organismes constitutifs.....	53
5.2.3. Usage de l'HE de <i>R. officinalis</i> extraite en qualité de conservateur alimentaire d'olives.....	53

## **II. Résultats et discussion**

I. Enquête ethnobotanique.....	54
1. Régions enquêtées.....	54
2. Répartition des enquêtés selon le sexe.....	55
3. Répartition des enquêtés selon l'âge.....	56
4. Perception du romarin.....	57
5. Répartition des enquêtés selon la source de connaissance de la plante.....	57
6. Répartition des résultats selon la source de la plante.....	58
7. Répartition selon les parties utilisées.....	59
8. Usage selon l'état de la plante .....	60
II. Zone d'échantillonnage.....	66
1. Coordonnées géographiques.....	66
2. Aspect climatique.....	67
3. Aperçu pédologique .....	68
III. Matériel végétal.....	69
1. Identification de l'espèce .....	69
2. Teneur en eau .....	70
3. Description anatomique.....	70
IV. Huiles essentielles.....	72
1. Extraction et rendement en huiles essentielles.....	72
2. Etude analytique de l'huile essentielle extraite.....	72
2.1. Propriétés organoleptiques.....	72
2.2. Composition chimique des huiles essentielle extraite.....	73
2.3. Les classes biochimiques de l'huile essentielle extraite.....	75
V. Activité anti-fongique de l'huile essentielle extraite.....	76
1. Souches fongiques test-objets.....	76

1.2. Identification des souches fongiques test-objet.....	77
1.2.1. Aspect macroscopique.....	78
1.2.2. Aspect microscopique .....	80
2. Activité antifongique .....	81
2.1. Fongigramme de l'huile sur les souches test-objet.....	81
2.2. Concentration minimale inhibitrice de l'huile extraite (CMI).....	82
2.3. Type d'activité .....	88
3. Résultat de l'application de l'huile essentielle en agro-alimentaire.....	90
3.1. Résultat de l'application sur la pomme .....	90
3.1.1. Résultat de la révélation de la cire de synthèse chez la pomme.....	90
3.1.2. Effet conservateur de l'HE étudiée sur la pomme.....	91
3.2. Résultat de l'application sur les olives .....	92
3.2.1. Effet inhibiteur de l'HE extraite sur la formation du biofilm.....	92
3.2.1.1. Révélation du biofilm.....	92
3.2.1.2. Effet conservateur de l'HE sur les olives.....	93
<b>Conclusion</b> .....	97

## **Références bibliographiques**

## **Annexes**

## **Travaux scientifiques**

## Introduction

Pour répondre à une demande grandissante en produits alimentaires, durant les années quarante des solutions souvent hâtives ont été adoptées telle, la mécanisation de l'agriculture, les grandes cultures, les monocultures...etc. Rapidement des récoltes considérables sont obtenues, satisfaisant plus ou moins les besoins de la population. Cependant, les méthodes de préservation et de conservation des récoltes n'étaient pas encore très adaptées et des pertes considérables sont enregistrées.

L'un des principaux agents causals de ces échecs sont les micro-organismes (bactéries, virus, parasites, moisissures...etc.) responsables de détériorations organoleptiques des denrées alimentaires produites. A cette époque, les sciences chimiques connaissent un essor considérable et la solution des conservateurs de synthèses (les anti-microbiens, les pesticides) s'est imposée donnant des résultats appréciables. Ces molécules ont permis à un certain degré de conserver l'aliment frais et transformé.

Quelques années plus tard, on a pu constater les limites de ces agents conservateurs qui n'ont pas empêché l'adaptation des micro-organismes par l'apparition de résistances plus accrues et plus large.

Alors, on s'est retrouvé face à des rapports faisant état de problèmes de santé, liés directement à la consommation de ces éléments de synthèse (cancer, mal formation ...etc.). Ce problème est beaucoup plus épineux dans les pays à faible rente, et qui ne maîtrisent pas la technologie de préservation des cultures.

Devant cette situation, le retour aux procédés usant des produits naturels que nos ancêtres ont toujours connus et maîtrisés se sont progressivement installés. Cette source fondamentale privilégiant l'emploi des plantes médicinales ou de leurs extraits (HE, tanins, eau florale ...etc.) faisant usage actuellement comme alternative aux conservateurs chimiques.

Le romarin (*Rosmarinus officinalis*) est l'une des plantes de choix ancestralement très connue, arbuste vivace de famille des labiées, originaire du bassin méditerranéen. Traditionnellement utilisé comme cataplasme soulageant ainsi les douleurs et souvent



efficace dans le traitement de diverses maladies infectieuses, digestives... etc. (Beloued, 1998).

L'Algérie est un vaste territoire caractérisé par des biotopes diversifiés, d'un climat méditerranéen au Nord et saharien au Sud, lui donnant ainsi une végétation différenciée. On trouve des cèdres, des pins, de la bruyère, des arbousiers et plusieurs espèces de chênes tels que le chêne-liège au nord. Les hauts plateaux sont recouverts de halfa, l'atlas saharien est planté de cyprès, de térébinthes, de palmiers et d'arbousier. Et enfin, le Sahara où poussent principalement des acacias mélange par endroit à des oliviers.

Et la wilaya de Tébessa (Hammamet-Youkous) est l'une des régions du pays très riche en plantes médicinales aromatiques et mellifères surtout le romarin, poussant de manière spontanée (Baba Aïssa, 1991). Zone favorisée par sa position géographique, son climat semi-aride et ses quatre étages bioclimatiques (Benarfa, 2005).

D'une part, l'Algérie est un grand producteur ancestral d'olive et de son huile, et jeune producteur de pommes. Ce sont des denrées d'importance capitale pour le consommateur. D'autre part, elles sont mal conservées et des pertes énormes sont toujours enregistrées.

Nous proposons l'usage de l'HE du romarin comme solution alternative aux conservateurs chimiques. En faisant une étude sur la plante *Rosmarinus officinalis* cueillis de Hammamet-Youkous, et caractérisation des composants chimiques de l'HE extraite. Aussi, la mise en valeur de l'activité anti-fongique de l'HE par fongigramme et leurs utilisations comme conservateurs du fruit de valeur nutritive importante « la pomme » et « les olives ».

*Partie I : Analyse bibliographique*

## Chapitre I- Le romarin : aspects botaniques et extraits de *Rosmarinus officinalis*

### 1. Historique

Selon la légende, le romarin était à l'origine d'une plante à fleurs blanches. Avant de donner naissance à l'enfant Jésus, Marie aurait déposé sa cape de couleur bleue sur un romarin planté devant l'étable. La cape aurait déteint sur l'arbrisseau et c'est ainsi que le romarin fleurit bleu. Certains voient dans cette légende une autre origine possible au nom Romarin à savoir « Rose de Marie » (l'appellation anglaise étant d'ailleurs *Rosemary*).

Il servait anciennement dans les cérémonies nuptiales, funéraires ou de célébrations profanes :

- Les mariées portaient des couronnes de romarin, symboles de fidélité.
- On mettait aussi des brins de romarin dans la tombe des pharaons afin de fortifier leur âme. Il était un symbole du souvenir et de l'amitié.
- Les étudiants grecs s'en confectionnaient des couronnes, qu'ils portaient durant les examens pour stimuler leurs mémoires.

• Parvenu en Europe au IX<sup>e</sup> siècle par l'intermédiaire des moines bénédictin, sa culture fut exigée dans l'ordonnancement rural « Capitulaire de villis » de Charlemagne.

• Durant les épidémies de peste : on faisait brûler des rameaux pour purifier l'air et l'on portait des sachets sur soi, que l'on respirait lorsqu'on passait dans les endroits touchés par la maladie.

• L'histoire veut aussi que la reine de Hongrie, qui souffrait de la goutte, ait été délivrée de ces problèmes grâce à « l'eau de Hongrie » (alcoolat à base de romarin) lorsqu'elle était âgée de 72ans (Botineau, 2010).

• Désormais principalement utilisée comme herbe aromatique en cuisine. Il était très estimé comme plante médicinale et condimentaire (Tessier, 2003).

### 2. Étymologie

Bien que le romarin se développe loin de la mer, d'après la légende, le romarin est une plante que l'on retrouvera seulement dans les régions où s'étend la rosée venant de la mer, au petit jour (Escuder, 2007). De ce fait, le nom « romarin » viendrait du latin :- « *ros marinus* » (rosée de mer) (Auguste Scheler, 1862) ;

- *Rosa marina* qui a donné son nom au genre (Escuder, 2007) ;
- « *rhus marinus* » sumac de mer;

Du grec : «*rhaps myrinos* » (buisson aromatique) (Helmut Genaust, 1996).

Nom français : Romarin, Encensier, Herbe aux couronnes, Herbe des troubadours (Huguette Max, 2008).

Nom anglais : Rosmary

- Le romarin comporte aussi plusieurs noms vernaculaires : Iklil Al Jabal , Klil, Hatssa louban, Hassalban , AzÎir, ,Aklel, iklil.

Nom tergui ou berbère : lazir, ouzbir, touzala, Azir (Damerdji, 2012).

### 3. Caractéristiques botaniques

#### 3.1. Classification de la plante

Nom scientifique : *Rosmarinus officinalis* est une espèce Eudicotes (Damerdji, 2012) (Tableau 1).

**Tableau.1.** Classification botanique de l'espèce *Rosmarinus officinalis* L.  
( Damerdji, 2012)

<b>Règne</b>	Plantae
<b>Embranchement</b>	Spermaphyte
<b>Sous embranchement</b>	Angiosperme
<b>Division</b>	Magnoliophyta
<b>Classe</b>	Dicotylédones (Magnoliopsida)
<b>Sous classe</b>	Eurosidées
<b>Ordre</b>	Tubiflorales
<b>Sous ordre</b>	Lamiales (labiales)
<b>Famille</b>	lamiaceae
<b>Genre</b>	<i>Rosmarinus</i>
<b>Espèce</b>	<i>Rosmarinus officinalis</i>

#### 3.2. Description botanique

Le romarin est un arbrisseau aromatique qui se reconnaît de loin par son odeur. Cette plante peut atteindre 2m de hauteur, toujours vert, très rameux.

\*Ces feuilles sont persistantes, coriaces, sessiles, linéaires, entières, enroulées par les bords, vertes et chagrinées en dessus, blanches-tomenteuses en dessous.

\* Ces fleurs sont d'un bleu pâle ou blanchâtre, subsessiles, rapprochées en petites grappes axillaires et terminales ;

- calice en cloche, bilabié, pulvérulent,
- corolle bilabée, à tube saillant, à lèvre supérieure en casque, bifide ;
- comprend deux étamines, à filets saillants, insérés à la gorge de la corolle,

munis vers la base d'une petite dent ; anthères linéaires.

\* La tige est tortueuse, anguleuse et fragile.

\* La racine est profonde et pivotante.

\* Le fruit est une baie ovale, sèche et lisse (Fig.1).

C'est une plante ayant des qualités et des propriétés stimulantes antiseptiques et insecticides. Il sert aussi à la fabrication des parfums (Benoît Bock, 2008).



**Figure 1.** Aspect morphologique du romarin (Quezel et Santa, 1963).

### 3.3. Répartition géographique dans le monde et en Algérie

La plante pérenne *Rosmarinus officinalis* (L.), est originaire des côtes méditerranéennes et le sud-ouest de l'Asie, a été ensuite transplanté à la Chine dans la dynastie Jin. Elle se développe et cultivé dans le monde entier surtout comme clôture dans les jardins (Waggas et Balawi, 2010).

On la trouve cultivée à large échelle en Espagne, en Tunisie, au Maroc, en Algérie, en Italie, en France, et au Portugal, principalement pour en extraire de l'huile essentielle. En Inde, la production de romarin s'est introduite à la fin des années 80, et qui s'est développée au cours des années 90 (Panda, 2009).

En Algérie, le romarin est l'une des espèces végétales excédant 50 000 hectares sur le territoire national (Zoubeidi, 2004).

#### **4. Usages en cosmétique, culinaire et en phytothérapie**

\* *En cosmétique* : L'utilisation du romarin en parfumerie est très ancienne. Le premier parfum alcoolique dont on connait l'existence est *l'eau de Hongrie*, alcoolat fréquemment utilisé au XVIIe siècle et qui pourrait dater du XIVe siècle, dont le romarin était l'un des principaux composants (Le Roi, 1859).

Le romarin entre dans la composition de parfums surtout masculins, hespéridés aromatiques (eaux de Cologne), boisés et fougères aromatiques.

\* *En gastronomie* : Les branches feuillues de romarin s'utilisent de préférence fraîches, mais peuvent également se conserver séchées.

S'emploient généralement :

- comme aromate (infusion dans les ragoûts, les civets, les soupes et les sauces).
- pour parfumer les grillades et la confection d'une marinade.
- pour fumer la viande ou le poisson en déposant quelques branches sur les charbons, ou pourembrocher des légumes avant leur cuisson. (Knockaërt, 2002).

Les fleurs ont une saveur plus douce et se consomment crues, saupoudrées pour parfumer un plat ou un dessert. Le romarin est parfois utilisé en infusion pour parfumer des desserts comme les flancs, les crèmes ou certaines confitures.

\* *En phytothérapie* : le romarin est présent dans toutes les pharmacopées mondiales et dans de nombreux médicaments, notamment comme cholagogue ou traitement symptomatique de troubles digestifs tels que : ballonnement épigastrique, lenteur à la digestion, éructations, flatulence.

Traditionnellement utilisé pour faciliter les fonctions d'élimination urinaires et digestive. Son action puissante est très utilisée afin de soulager les quintes de toux embarrassantes lors de certaines affections pulmonaires comme la bronchite aiguë. Il s'agit de l'une des plantes les plus recommandées à cette fin.

Selon l'OMS le romarin est reconnu pour de nombreuses finalités. Aussi, aide à traiter l'asthme, l'eczéma, et le rhumatisme (Fahim et al., 1999).

Les extraits de romarin possèdent de nombreuses activités biologiques, anti-microbiens (Bernardes, 2010 ; Rasooli et al., 2008) , anti-mutagène (anti-hyperglycémique, anti-ulcérogène et action d'antioxydant. (Rodrigo et al., 2014). La décoction de feuilles de romarin a été traditionnellement utilisée pour traiter les patients diabétiques sans beaucoup de preuves scientifiques de son utilité (El-Boshy et al., 2015).

## 5. Principaux constituants et rôles physiologiques

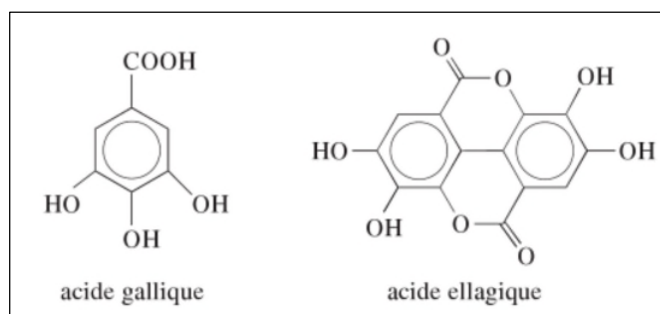
Les plantes aromatiques et médicinales comme le romarin représentent une source de métabolites secondaires biologiquement actifs tels que les polyphénols. Ces substances présentent plusieurs propriétés biologiques, telles que les activités antimicrobienne, anti-inflammatoire et anti-oxydante. Les principales constituantes sont les alcaloïdes, les phénols, les tannins, les flavonoïdes et vitamines (Yves, 2005).

Le romarin a été largement accepté comme l'un des espèces ayant l'anti-oxydant le plus élevé (Yesil et al., 2007). Spécifiquement les molécules responsable de cet effet sont : l'acide rosmarinique, le carnosol et le rosmaridiphénol se trouvant dans la fraction soluble dans l'éthanol (Yesil et al., 2007 ; Cheung, 2007 ).

### 5.1.Tanins

Les tanins sont des composés polyphénoliques, hydrosolubles, de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000, ayant la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre imputrescible. Cette propriété est liée à leur aptitude à se combiner à des macromolécules (protéines, polysaccharides....) (Gazengel et Orecchioni, 2012).

Parmi les connus sont l'acide gallique et acide ellagique (Fig.2).



**Figure 2.** Deux types de tanins hydrolysables (Gazengel et Orecchioni, 2012).

Les tanins sont classés en deux groupes selon leur structure chimique : tanins hydrolysables et les tanins catéchiques. Et tous les organes végétaux peuvent en

renfermer (racines, écorces, feuilles....), (Charnay et Tourmeau, 2007).

Ils présentent des propriétés astringentes, anti-diarrhéiques, anti-bactériennes et anti-fongiques. Certains montrent également des propriétés vitaminiques P.

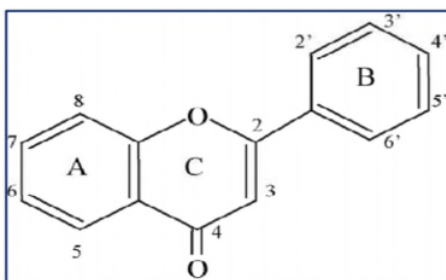
Aussi sont utilisés en thérapeutique, dans le traitement des maladies du système veineux et capillaire (Teetes et al., 1980).

## 5.2. Flavonoïdes

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme des composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (Seyoum et al., 2006). Ces métabolites secondaires constituent un groupe de plus de 6 000 composés naturels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles.

À l'état naturel les flavonoïdes se trouvent le plus souvent sous forme d'hétérosides (Ghestem et al., 2001 ; Bruneton, 1999). Du point de vue structurale, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, en effet plus de 6400 structures ont été identifiées (Heim et al., 2002).

*Structure* : Ce sont des dérivés benzo- $\gamma$ -pyranne (Skerget et al., 2005). Des composés dont la substitution par un noyau benzénique se fait en position 2 (Ghedira, 2005). Leur structure de base est celle d'un diphényle propane à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6), constitué de deux noyaux aromatiques qui désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, qui désigne la lettre C (Fig.3) (Dacosta, 2003).



**Figure 3.** Structure de base des flavonoïdes (Di Carlo et al., 1999).

La consommation quotidienne des flavonoïdes (fruits du genre Citrus, légumes, le thé et le café) module l'activité de certaines enzymes et de modifie le comportement de plusieurs systèmes cellulaires, exerce également des activités biologiques (anti-oxydantes, vasculo-protectrices, anti-hépatotoxiques, anti-allergiques, anti-inflammatoires, anti-ulcéreuses et même anti-tumorales significatives).



### 5.3. Huiles essentielles

L'huile essentielle (HE) est définie par la Pharmacopée européenne comme « un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale. Extraite soit par, entraînement à la vapeur d'eau, distillation sèche ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage».

#### 5.3.1. Répartition botanique

Les HEs n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Les genres capables d'élaborer les constituants qui composent les HEs sont répartis dans un nombre limité de familles comme les : Myrtacees, Lauracees, Rutacées, Lamiacees, Asteracees, Apiacees CupresSacees, Poacees, Zingiberacees et Piperacees (Bruneton, 1999).

#### 5.3.2. Localisation et lieu de synthèse

Tous leurs organes végétaux des plantes aromatiques contiennent de l'HE :

- \* les fleurs (orange, rose, lavande),
- \* les feuilles (eucalyptus, menthe, thym, laurier, sauge, sapin),
- \* les organes souterrains (racines : vétiver, rhizomes : gingembre, acore),
- \* les fruits (fenouil, anis, épicarpe des citrus),
- \* les graines (noix de muscade),
- \* le bois et les écorces (cannelle, santal, bois de rose).

Les HEs sont présentes dans des structures cellulaires spécialisées (cellules à HE), cellules à poils sécréteurs et canaux sécréteurs. Elles ont vraisemblablement un rôle défensif: protection du bois contre les insectes et les champignons, action répulsive contre les animaux herbivores (chèvres et les moutons). Seul l'homme et certains insectes sont attirés par l'odeur des plantes aromatiques (Paris et al., 1981 ; Bruneton, 1999).

#### 5.3.3. Caractéristiques physico-chimiques

Les huiles essentielles possèdent en commun un certain nombre de propriétés : elles sont volatiles, solubles dans l'alcool et dans l'huile, mais pas dans l'eau et ce sont des substances odorantes. Se caractérisent aussi par :

- Un point d'ébullition variant de 160° à 240C°.
- Une densité générale inférieure à celle de l'eau variant de 0,75 à 0,99.
- Elles sont dextrogyres ou lévogyres, rarement inactives sur la lumière polarisée.
- Sont très altérables et sensibles à l'oxydation.

- A température ambiante, elles sont généralement liquides, incolores ou jaunes pales. Cependant, il existe quelques exceptions exemple : l'huile essentielle à azulène est de coloration bleue.
- Une huile essentielle contient de nombreuses molécules chimiques différentes (Coste Hoppolite, 1998).

### **5.3.4. Constituants chimiques et notion de chémotype**

#### **5.3.4.1. Terpènes**

Les terpènes sont très répandus dans la nature. En effet, les plantes vasculaires produisent des terpènes volatils, notamment au niveau des organes foliaires (Charlwood & Banthorpe, 1991).

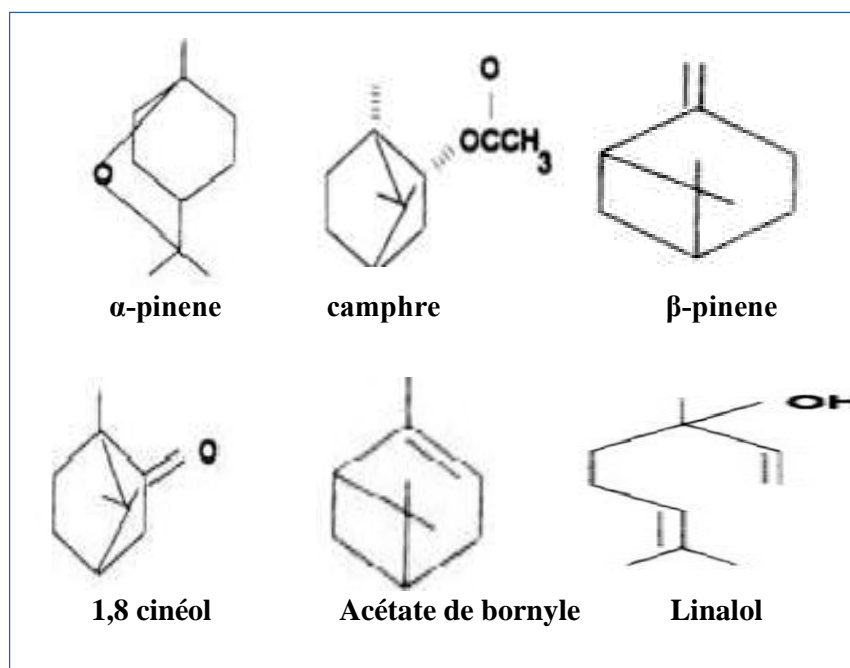
Ce sont des hydrocarbures formés à partir d'unités isopreniques ( $C_5H_8$ )<sub>n</sub>. En général, seul les terpènes de faible poids moléculaire (de 10 à 20 atomes de carbone) sont retrouvés dans les huiles essentielles :

- les monoterpènes, composés de 2 unités d'isoprènes ( $C_{10}H_{16}$ ),
- les sesquiterpènes de 3 unités isopreniques ( $C_{15}H_{24}$ ).
- et quelques diterpènes ( $C_{20}H_{32}$ ) pouvant être retrouvés, cela reste tout de même exceptionnel (Bruneton, 2008).

#### ➤ Les monoterpènes

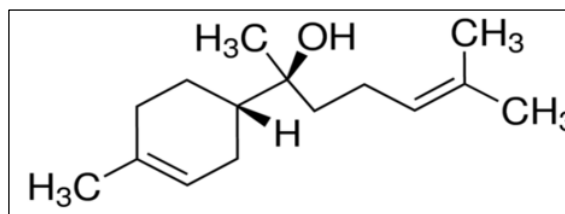
Les monoterpènes, métabolites secondaires des plantes, sont émis par les plantes vivantes. De plus, certains sont ajoutés dans divers produits de consommation utilisés dans notre environnement intérieur pour leurs propriétés physico-chimiques et odoriférantes (parfum, solvant...etc.) (Marlet, 2011).

Les carbures sont presque toujours présents. Ils sont acycliques, monocycliques ou bicycliques. Ils constituent parfois plus de 90% de l'huile essentielle (Bruneton, 1993) (Fig.4).



**Figure 4.** Structure chimique des monoterpènes identifiés dans l’huile essentielle de romarin (Bajaj, 1997).

➤ Les sesquiterpènes : sont un groupe de métabolites secondaires présent dans le matériel végétal et qui sont les plus réponsus dans quelques familles comme les cactaceae, les solanaceae...etc. (Ludwiczuk et al., 2017). Allongement de chaine qui accroît le nombre de cyclisation. Ainsi plus d’une centaine de squelettes différents a été décrit (Pirrung et al., 1997) (Fig.5).



**Figure 5.** Structure d’un sesquiterpène le  $\alpha$  bisabolol (Cara Weitstock, 2017)

#### 5.3.4.2. Les composés aromatiques

Ce sont des dérivés du phénylpropane ( $C_6-C_3$ ), beaucoup moins fréquents que les précédents. Un noyau aromatique est couplé à une chaîne de trois carbones (Bruneton, 1993).

➤ *Notion de chémotype*

Le romarin se présente en une seule espèce avec de nombreux chémotypes (sous espèce) (Laparé et Collin, 2000). Tout est lié à la nature chimique du constituant majoritaire de l'huile essentielle (Tableau.2).

**Tableau. 2.** Les différents chémotypes du romarin (Laparé et Collin, 2000).

	<b>Camphoriferum (R.o. à camphre)</b>	<b>Cineoliferum (R.o. à cinéole)</b>	<b>Verbenoniferum (R.o. à verbénone)</b>
<b>Origine</b>	France	Afrique du Nord	Corse
<b>Principaux constituants actifs</b>	Monoterpenes (camphène), oxydes (1,8 cineol), Mono- terpénones(camphre)	Monoterpenes, oxydes (1,8 cineol), mono-terpénones	Monoterpenes (alpha pinene), mono-terpinols (bornéol), Monoterpénones (verbenone)
<b>Propriétés</b>	Action neuromusculaire, mucolytique.	Anticatarracte, expectorant	Anti-catarracte, mucolipolytique, expectorante, antispasmodique, équilibrante endocrinienne
<b>Principales indications</b>	Crampes, contractures, rhumatismes musculaire	Otites, sinusites, bronchites, refroidissements pulmonaires	Sinusites, bronchites, insuffisance hépato- biliaire, hépatites virales.
<b>Contres indications</b>	Aucune connue	Aucune connue	Sujets hépatiques, femmes enceintes et enfants, (neurotoxique et abortive)

### 5.3.5. Valeurs économiques

L'alimentation, la cosmétique et l'aromathérapie sont les trois grandes destinations des huiles essentielles. D'ailleurs environ 150 huiles essentielles sont couramment commercialisées contre 300 il y'a 50ans.

Le Brésil est le premier producteur mondial de cet extrait en termes de volume, le deuxième étant vraisemblablement l'Inde pour sa production d'huile essentielle de menthe et aussi la chine (Moja et Jullien, 2014).

Dans quelques pays, une partie de la production du romarin est commercialisée

sous forme de feuilles sèches. Exemple, le Maroc exporte annuellement environ 60 tonnes de feuilles du romarin, le reste l'utilise pour l'extraction des huiles essentielles (Laparé et Collin, 2000). Toute plante médicinale ou son extrait, bien évidemment aura un impact important sur l'économie du pays producteur.

### 5.3.6. Effets anti-microbiens des huiles essentielles

Depuis l'antiquité les plantes médicinales et aromatiques sont connues pour leur qualité anti-microbienne (Anti-bactérien, anti-fongique, antiparasitaire, antiseptique, et antivirale).

Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20<sup>ème</sup> siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. Ces propriétés sont dues à la fraction d'huile essentielle contenu dans les plantes et même d'autres de ces extraits.

Par ailleurs, plusieurs auteurs décrit que le romarin (l'huile ou l'extrait aqueux de feuilles) a un effet thérapeutique important sur : la circulation sanguine (Rulffs et al., 1984), les muscles lisses (Aqel, 1991 et Al-Sereiti, 1992). Il aurait donc des effets antispasmodiques, permettrait aussi de prévenir et de limiter la progression de certains types de cancers (anti-tumorigénique et antioxydant) (Sereitia et al., 1999).

Aussi, possèdent de nombreuses activités biologiques, anti-microbien (Bernardes et al., 2010, Rasooli et al., 2008), antimutagène (Furtado et al., 2008) , anti-hyperglycémique (Al-Hader et al., 1994) anti-ulcérogène (Dias et al., 2000), et une action anti-oxydante (Ozcan, 2003 et Lucarini, 2014)

L'extrait alcoolique de *R. officinalis* a montré une activité anti-dépressive (tests d'immobilité de la souris) (Matsunaga et al., 1997). Le romarin est aussi recommandé pour traiter les divers cas d'asthénie.

Ces fleurs en macération est un produit de beauté tonique, connu pour son eau qui resserre les pores de la peau. Et ses bourgeons sont utilisés en gemmothérapie.

## Chapitre II- Moisissures et produits alimentaires

Il existe de très nombreuses espèces fongiques susceptibles de coloniser les aliments et d'en altérer leurs qualités organoleptiques. Leurs identifications ont été pendant longtemps exclusivement basées sur l'observation des caractères cultureux et morphologiques de l'espèce.

Toutefois, la complexité du règne fongique a fait que des progrès récents de la biologie moléculaire s'installent et d'autres outils d'aide sont proposés (révélation des mycotoxines...etc.). Mais, pouvant pas remplacer complètement l'examen morphologique, qui reste la base de l'identification (Tabuc, 2007).

### 1. Principaux genre fongiques de contaminations alimentaires

Les genres les plus fréquents dans la contamination alimentaires et qui ont des répercussions sur le domaine économique et médical sont les *Aspergillus*, les *Penicillium* et les *Fusarium*. On les retrouve principalement dans les céréales, mais aussi dans de nombreux autres produits végétaux et d'origine animale.

Ces dernières, sont aussi des champignons myco-toxinogènes pouvant affecter la chaîne alimentaire (Yenny et al, 2009).

#### 1.1. Le genre *Aspergillus*

Les moisissures du genre *Aspergillus* se multiplient d'autant plus rapidement que la température (jusqu'à 40°C) et l'activité de l'eau sont élevées (Feillet, 2000).

C'est un genre appartenant à la classe des *Ascomycètes*. Le thalle est hyalin ou coloré, présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, terminés en vésicule (Raper et Fennell, 1965).

Comprend environ 185 espèces réparties en 18 groupes morphologiquement, génétiquement et physiologiquement proches (Raper et Fennell, 1965 ; Botton *et al.*, 1990).

Les *Aspergillus* ont une large répartition géographique, mais sont le plus souvent associés aux régions à climat chaud (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002). Ils se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, le compost, les denrées alimentaires et les céréales. Aussi, présentent dans l'environnement humain, notamment dans la poussière et l'air (Morin, 1994).

Une vingtaine d'espèces est impliquée dans des pathologies animales et humaines, en étant capables d'envahir les tissus vivants et provoquer des aspergilloses.

Par exemple : - *Aspergillus fumigatus* est responsable de mycoses pulmonaires ;

- *Aspergillus niger* est responsable d'aspergillose du conduit auditif (Morin, 1994).

### 1.1.1. Les principales espèces

#### ➤ *Aspergillus flavus*

\**Caractères culturaux* : le champignon se développe rapidement sur les milieux classiques (géloses au malt et Sabouraud) à 22-25°C. La température optimale de croissance est 37°C.

Sur le milieu de culture, *A. flavus* forme des colonies duveteuses à poudreuses, d'abord blanches, puis jaune, puis vert-jaune. Le revers peut être incolore, rosâtre ou brun-rouge foncé pour les souches productrices de sclérotés.

#### \* *Morphologie microscopique* :

- Les têtes conidiennes sont unisériées ou bisériées, d'abord radiées, puis réparties en plusieurs colonnes de spores, jaunâtres au début, puis vert-jaune foncé.
- Les conidiophores hyalins, verruqueux, atteignent 1 à 2,5 mm de long.
- Les vésicules sont sub-globuleuses, et mesurent 25 à 45 µm de diamètre.
- Les phialides sont insérées directement sur la vésicule (unisériées) ou portées par des métules.
- Les conidies sont globuleuses à sub-globuleuses, de 3 à 6 µm de diamètre, de couleur verte pâle, verruqueuses.
- Les sclérotés, fréquents dans les isolats récents, sont globuleux à sub-globuleux, d'abord blanc puis virant au brun-rouge foncé et au noir.

#### ➤ *Aspergillus fumigatus*

#### \* *Caractères culturaux* :

*A. fumigatus* est une espèce thermo-tolérante dont la température de croissance est comprise entre 15 et 48°C. Peut se développer même à une température allant jusqu'à 57°C. Mycélium à croissance rapide sur les milieux de culture classiques (Morin, 1994).

Elle forme des colonies d'abord blanches, puis bleu-vert enfin vert foncé-gris noirâtre. Le revers peut être incolore, jaune, vert ou brun-rouge selon les souches.

#### \* *Morphologie microscopique* :

- Les têtes conidiennes, strictement unisériées, en colonne compacte sont d'abord bleu-vert puis virant au vert bronze.

- Les conidiophores sont courts (300-500  $\mu\text{m}$ ), lisses, s'élargissent insensiblement au sommet en formant des vésicules sub-hémisphériques. Ces dernières (20-30  $\mu\text{m}$  de diamètre), vertes, sont fertiles dans leur moitié supérieure.

- Les phialides dressées, sont densément groupées, de couleur verte.

- Les conidies sont globuleuses à sub-globuleuses, mesurent 2 à 3,5  $\mu\text{m}$  de diamètre, et sont échinulées.

### ➤ *Aspergillus niger*

\* *Caractères culturaux* : ce champignon pousse rapidement (2-3 jours) sur les milieux de culture classiques (géloses au malt et Sabouraud). La température optimale de croissance varie généralement entre 25 et 30°C. Aussi, il peut se développer même à 42°C. Les colonies d'*A. niger* sont granuleuses, blanches au début, puis jaunes et à maturité elles deviennent noires.

Le revers des colonies est incolore ou jaune pâle. Sur le milieu Czapek forme des colonies à mycélium blanc ou jaune, et revers souvent incolore.

#### \**Morphologie microscopique* :

- les têtes conidiennes, bisériées, radiées, sont disposées en plusieurs colonnes brunâtres ou noires.

- Les conidiophores sont longs atteignant 1,5-3 mm, lisses, hyalins ou brunâtres dans leur moitié supérieure.

- Les vésicules sont globuleuses et entièrement fertiles.

- Les phialides (7-10 x 3-3,5  $\mu\text{m}$ ) sont portées par des métules brunâtres, de dimensions variables.

- Les conidies sont habituellement globuleuses, parfois légèrement aplaties. Elles mesurent 3,5-5  $\mu\text{m}$  de diamètre, sont brunes, échinulées à très verruqueuses.

- Les sclérotés parfois différenciés, sont crème à chamois foncé au début, puis virent au chamois.

## **1.1.2. Importance du genre *Aspergillus***

### **1.1.2.1. Potentiel toxigènes et pouvoir pathogène**

#### ➤ Potentiel toxigènes :

De nombreuses espèces appartenant au genre *Aspergillus* sont connues pour leur capacité à produire certaines mycotoxines (Pitt, 2000).



*Aspergillus flavus* et *A. parasiticus* sont les principaux producteurs d'aflatoxines. Comme l'aflatoxine B1 qui est classée comme cancérigène chez l'homme et l'animal (IARC, 1993).

*Aspergillus fumigatus* synthétise plusieurs métabolites très toxiques comme la fumagiline, l'acide helvolique, la gliotoxine, les dérivés quinoniques, des alcaloïdes voisins de ceux de l'ergot de seigle.

*Aspergillus niger* peut produire de l'acide oxalique, des malformines et certaines souches des aflatoxines.

*Aspergillus ochraceus* est le principal producteur d'ochratoxine A. Il colonise lui aussi de très nombreux substrats.

*Aspergillus terreus* élabore des substances anti-bactériennes, de toxicité variable (flavipine, terréine, citrinine, erdine et molécules voisines, clavacine) (Botton et al., 1990).

➤ Pouvoir pathogène :

Certaines espèces d'*Aspergillus* sont des pathogènes opportunistes ; leur développement nécessite des conditions locales favorables. Induisent des cavernes tuberculeuses, cancer broncho-pulmonaire, broncho-pneumopathies chroniques obstructives, emphysèmes, mucoviscidose, ou corticothérapies prolongées, hémopathies malignes, ...etc (Badillet et al., 1987 ; Morin, 1994).

Les principales espèces responsables de mycoses (aspergilloses) sont : *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* (Baculard et Tournier, 1995) ; *Aspergillus niger* (Morin, 1994) ; *Aspergillus sydowi* (Botton et al., 1990) ; *Aspergillus terreus* (Baculard et Tournier, 1995 ; Khan et al., 1999).

### 1.1.2.2. Espèces utiles

Certaines espèces d'*Aspergillus* sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie des produits biotechnologiques notamment pour la fermentation de divers substrats et la production d'enzymes ou d'acides organiques :

- *Aspergillus awamori*, agent lipolytique d'oléagineux, est utilisé fréquemment au Japon pour la fermentation alcoolique.

- *Aspergillus niger* est utilisé dans les processus biotechnologiques pour la synthèse de différents acides, comme l'acide citrique et l'acide gluconique ainsi que pour la production d'enzymes : alpha-amylase, beta-glucanase, catalase, glucose oxydase, lipase, pectinase, poly-galacturonase.

- *Aspergillus oryzae* est utilisé, dans les pays asiatiques, pour la fabrication de produits fermentés à base de soja. Il est utilisé aussi dans des processus biotechnologiques pour la production de certaines enzymes comme : alpha-amylase, beta-glucanase et lipase (Botton et al., 1990).

### 1.2. Le Genre *Penicillium*

Les champignons appartenant au genre *Penicillium* sont parmi les plus omniprésents des organismes sur la terre.

Ces champignons du sol, existent dans l'aliment seulement comme contaminants de produit alimentaire, causant ainsi un gaspillage de nourriture si les conditions s'avèrent favorables (Pitt, 2006)

#### 1.2.1. Importance du genre *Penicillium*

Le genre *Penicillium* et particulièrement *Penicillium chrysogenum* est généralement exploité pour ses capacités antibiotiques. Il produit le composé  $\beta$ -lactame hydrophobe pénicilline (Xu et al, 2005).

\*Caractères cultureux :

Les *Penicillium* se développent rapidement et facilement sur les milieux de culture utilisés en routine (géloses au malt, Sabouraud). Ils se développent à des températures modérées de l'ordre de 20-27°C. Après 2 jours d'incubation, on observe des petites colonies plates, formées de courts filaments aériens, habituellement blancs. Après 3 à 4 jours d'incubation, la sporulation va conférer aux colonies leur teinte. Cette couleur permet une première orientation dans l'identification d'espèces (Tableau 03).

**Tableau 03:** Identification des espèces du genre *Penicillium* selon la couleur des colonies (Chermette et Bussieras, 1993).

Couleur	Espèces correspondantes
Vert-gris	<i>P. citrinum</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P. italicum</i> ,
vert-jaune	<i>P. chrysogenum</i> ,
Vert sombre	<i>P. roquefortii</i> , <i>P. fellutatum</i> ,
Jaune pâle, chamois	<i>P. nalgiovense</i> ,
Jaune vif à rouge	<i>P. purpurogenum</i> ,
Orange et verdâtre	<i>P. islandicum</i> ,
Blanche	<i>P. camembertii</i> .

Le revers des colonies peut être incolore, jaune, rouge, brun ou noir et parfois le pigment diffuse dans le milieu de culture (Chermette et Bussieras, 1993).

### 1.2.2. Espèces utiles-pouvoir pathogène et toxigène des *Penicillium*

#### ➤ Pouvoir pathogène et toxigène

Les *Penicillium* sont rarement incriminés en pathologie animale et humaine, parce que la température de croissance de la plupart des espèces est inférieure à 30°C. (Hennequin et Lavarde, 1998).

Les infections dues à ce genre sont habituellement provoquées par l'inhalation des spores. Les premiers signes sont souvent pulmonaires. Ils sont responsables de : kératomyose (inflammation de la cornée), d'otomyose (infection de l'oreille externe), d'onychomyose (infection des ongles) et parfois d'infections profondes (Hennequin et Lavarde, 1998).

Une seule espèce *Penicillium marneffei*, rencontrée exclusivement en Asie du Sud-Est (Chine, Thaïlande, Laos, Birmanie) a pu être isolée chez des personnes immunodéprimées, notamment les patients infectés par le VIH.

Cette espèce est alors responsable d'infections systémiques touchant la peau et les organes profonds (foie, rate, ganglions, os...etc.) (Rosenthal et al., 2000).

#### ➤ Espèces utiles :

De nombreuses espèces de *Penicillium* sont utilisées au niveau industriel pour la fabrication de fromages et salaisons ou pour la production des différents métabolites d'intérêt :

- *Penicillium camembertii* est utilisé dans la fromagerie pour la fabrication des fromages à pâte molle et croûte fleurie ;

- *Penicillium roquefortii* pour l'affinage des fromages à pâte persillée ;

- *Penicillium nalgiovense* pour l'amélioration des qualités organoleptiques des saucissons ;

- *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium notatum*, *Penicillium jensenii* (*P. nalgiovense*), sont utilisés pour l'obtention de différentes substances antibiotiques (Botton et al., 1990).

\*Les espèces principales qui produisent de la patuline et plus important du point de vue sanitaire et économique sont: *Penicillium expansum*.

Cette substance (patuline) est reconnue pour provoquer des désordres gastro-intestinaux avec ulcérations, distensions et hémorragies, voire des perturbations de la fonction rénale, à plus forte dose.

### 1.3. Le genre *Fusarium*

Ce genre inclue des champignons imparfaits appartenant à la classe des *Deutéromycètes*. Les formes parfaites ou téléomorphes de quelques espèces de *Fusarium* sont connues, et appartiennent à la classe des *Ascomycètes* (ordre des *Hyphocreales*, famille des *Nectriaceae*, genres *Gibberella*, *Calonectria* et *Nectria*).

Pour plusieurs espèces de *Fusarium*, le stade parfait n'est pas connu. Le genre comprend près de 40 espèces souvent largement répandues (Nelson et al., 1983).

Sur le plan économique le genre *Fusarium* est très important parce qu'il regroupe beaucoup d'espèces phyto-pathogènes, susceptibles d'induire des maladies (fusarioses) chez de nombreuses plantes.

De plus, beaucoup d'espèces saprophytes sont capables de se développer en tant que pathogènes secondaires sur des tissus végétaux sénescents. Ils peuvent ainsi attaquer les céréales (maïs, blé, orge, avoine), les légumes, les plantes ornementales et beaucoup d'arbres fruitiers.

La majorité des espèces de *Fusarium* sont susceptibles de produire des mycotoxines et sont ainsi impliquées dans des intoxications chez les animaux d'élevage.

#### 1.3.1. Importance des principales espèces de *Fusarium*

Compte tenu de leur fréquence dans les différents substrats, notamment les céréales, de leur potentiel toxigène et de leur pouvoir pathogène, les principales espèces de *Fusarium* sont : *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* et *F. verticilloides* (*F. moniliforme*) et *Fusarium culmorum*.

*\*Caractères culturaux:* Cette moisissure pousse rapidement sur géloses PDA (Potato Dextrose Agar) et au malt. Les colonies sont duveteuses, d'abord blanches à jaunâtres ou roses puis ocracées à rouges brunâtre. Le revers est rouge à pourpre.

*\* Morphologie microscopique :*

Toutes les espèces produisent des spores en forme de canoë appelées macroconidies, formés dans des masses de spores appelées sporodochies, à partir des quelles sont éclaboussés sur de courtes distances. Ces macroconidies sont multicellulaires.

Beaucoup d'espèces aussi forment de petites spores appelées microconidies qui sont formées séparément ou dans des chaînes délicates. Les microconidies de certaines espèces sont dispersées dans l'air sec, probablement sur de longues distances.

Des ascospores et pour certaines espèces forment également des spores de survie à paroi épaisse appelées chlamydo-spores, adaptées à la persistance à long terme dans le sol (Burgess et Bryden, 2012).

### 1.3.2. Pouvoir pathogène et toxigènes

#### ➤ Pouvoir pathogène

Les *Fusarium* sont principalement des phyto-pathogènes. Ces champignons contaminent les céréales, les légumes, les arbres fruitiers provoquant des maladies nommées fusarioses. Les *Fusarium* sont généralement impliqués dans la pourriture des racines, tiges et fruits ; dans la dégradation du système vasculaire (Trenholm et al., 1988). Le pouvoir pathogène chez l'homme et les animaux est varié.

*Fusarium oxysporum* est un agent d'onyxis, de kératites, d'endophtalmies, de péritonites et d'infections disséminées chez les patients atteints d'hétopathie maligne.

D'autres espèces (*F. solani*, *F. moniliforme*) sont impliquées dans des infections systémiques (Guarro et Gene, 1992).

*Fusarium verticillioides* peut être un agent de fusarioses disséminées chez les patients infectés par le HIV (Duran et al., 1989).

*Fusarium solani* est l'espèce la plus commune, impliquée dans les fusarioses rencontrées aux patients diabétiques. Il peut également être responsable des ulcères cornéens (Gari-Toussaint et al., 1997).

#### ➤ Potentiel toxigènes

Le genre *Fusarium* comprend des espèces capables de produire de nombreuses mycotoxines (Tableau 04).

**Tableau 04:** Mycotoxines produites par le genre *Fusarium* (Pitt, 2000).

Mycotoxines	Espèces
Fumonisines	<i>Fusarium verticillioides</i> ( <i>moniliforme</i> ) et <i>F. proliferatum</i>
Trichothécènes de types A et B	<i>Fusarium poae</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. crookwellense</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i>
Zéaralénone	<i>Fusarium culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> <i>F. oxysporum</i> et <i>F. sporotrichioides</i>

Ces métabolites sont à action toxique même à faible dose.

### Chapitre III- Conservateurs alimentaires

Nos aliments sont rarement stériles. Ils contiennent habituellement des micro-organismes qui pour la plupart sont inoffensifs, certains d'entre eux sont mêmes essentiels au développement de la saveur. C'est le cas pour de nombreux produits laitiers (fromages, yaourt) ou végétaux le cas du pain, pour lesquels la flore microbienne est dite positive.

En revanche, d'autres micro-organismes peuvent avoir un effet négatif sur un aliment. On distingue les micro-organismes d'altération qui peuvent être à l'origine de dégradations organoleptiques ou nutritionnelles (fermentations ou développement d'arômes indésirables) et entraînent une diminution de la durée de vie des aliments. Et des microorganismes pathogènes (des bactéries, des champignons, des parasites et des virus) qui prolifèrent ou libèrent des toxines en causant ainsi des infections ou des intoxications après ingestion par le consommateur. Et là les conservateurs sont nécessaires.

#### 1. Conservateurs alimentaires et mécanismes d'action

Un conservateur est un additif : substance chimique minérale ou organique, ajoutée à une denrée alimentaire dans le but de la protéger des altérations due au micro-organisme (Hudson, 2018).

On cite quelques agents conservateurs :

- **Minéraux** : les nitrates et nitrites, les sulfites, l'anhydride sulfureux...etc.
- **Organiques** : les benzoates comme : E210, E211, E212 et E213 sont des conservateurs qui bloquent le développement de certaines levures et moisissures. Ils sont additionnés à plusieurs produits alimentaires pour prolonger leur durée de conservation (Gouget, 2011).

Le mélange de conservateurs présentent de nombreux avantages comme la possibilité de diminuer la concentration de chaque éléments et par là, même les éventuelles effets secondaires, et augmenter l'efficacité par synergie (Rancé et Bermond, 1996).

#### ➤ Mécanisme d'action

L'action du conservateur peut se situer au niveau de la paroi bactérienne, des membranes, au niveau ribosomal, sur la synthèse des protéines, ou au niveau des

acides nucléiques et des enzymes associées (Martini et al., 1999).

## 2. Pathogénicité des conservateurs alimentaires de synthèse

Les conservateurs sont omniprésents, on les trouve dans les aliments, les produits cosmétiques ou les médicaments. Aujourd'hui, la plupart de ces additifs sont plus au moins inoffensifs, d'autres sont plutôt douteux, voire même dangereux selon des rapports d'études (Marie-Laure Andre, 2013).

Ces conservateurs constituent un sujet récurrent d'interrogation et de débats, une fois abordée, de nombreux consommateurs associent ces substances à des produits chimiques dangereux.

Prenant l'exemple des benzoates existant dans de nombreux produits, les facilités avec laquelle la DJA (Dose journalière Admissible) est atteinte, en font de lui un additif particulièrement dangereux pour la santé, notamment pour les enfants (Gouget, 2011).

## 3. Pathogénicité des micro-organismes

Le facteur classé en premier rang comme contaminant alimentaire est le micro-organisme. Il est à l'origine de dégradations organoleptiques, nutritionnelles (fermentations ou développement d'arômes indésirables) ou de pathogénèses pour le consommateur (toxi-infections, intoxications).

a. **Les toxi-infections** alimentaires sont des maladies contractées en consommant des aliments dans lesquels les germes pathogènes présents se sont par la suite multipliés dans le contenu intestinal.

b. **Les intoxications** sont provoquées par l'ingestion d'aliments contenant une ou des toxines, produites par des micro-organismes pathogènes. Cependant, la diversification de notre alimentation empêche l'absorption régulière de doses suffisantes de toxines pour être réellement dangereuses (Bourgeois et al., 1996).

Ainsi, le lavage soigneux des fruits et légumes frais avant consommation est très recommandés.

## 4. Conservation des fruits et légumes

Les fruits ou légumes frais peuvent être contaminés pendant la récolte, dans les magasins ou lors du transport, donc le lavage soigneux avant de les consommés est recommandé. Certes leur conservation au réfrigérateur va prolonger leur durée de vie car la plupart des types de moisissures se développent rapidement à des températures

plus élevées mais le problème qui se pose est que les légumes et fruits développent de la pourriture même à l'intérieur d'un local frais.

#### **4.1. Les contaminants de la pomme**

L'un des risques les plus connus proviennent de la présence éventuelle de la toxine "**patuline**" sécrétée par *Aspergillus clavatus* ou *Penicillium expansum* dans les **pommes altérées** ou les jus de fruits (ICMSF, 1996). Ces intoxications sont de véritable problème de santé publique, et également responsables de lourdes pertes économiques (retrait ou destruction de produits).

*P. expansum* est présent sur les fruits sains mais, il ne produit des quantités significatives de patuline qu'en se développant sous forme de nécrose en disque sur le fruit. Ce champignon saprophyte de la pomme est le responsable majeur de la contamination par la patuline (des jus de fruits, compotes et autres produits de la transformation des pommes). Sa production est aussi favorisée par la blessure des fruits (chocs, attaques d'insectes, etc.) (ANSES, 2011).

##### **4.1.1. La pourriture bleue**

Plus de 100 000 tonnes de pommes sont perdues chaque année en France (FAO, 2002) et aussi dans d'autres pays, l'équivalent de 5 % de la production totale. Ces pertes, occasionnées le plus souvent en conservation, sont principalement dues aux attaques par des espèces fongiques. Principalement, on cite les *Penicillium* spp. qui constituent un groupe redoutable et qui est à l'origine d'une large partie des infections (Amiri et Bompeix, 2004).

Bien que les espèces *P. solitum* et *P. verrucosum* aient été répertoriées comme pathogènes en Australie (Penrose et al., 1984 ; Holmes, 1990), la principale espèce pathogène sur pommes demeure *P. expansum*.

Cette dernière provoque une infection de type humide, circulaire, de contour souvent net et d'une couleur brun-clair extérieurement et intérieurement. Après la sporulation, la fructification prend un aspect blanchâtre puis verdâtre, puis bleuâtre en fin de cycle, d'où le nom de la pourriture bleue (Amiri et Bompeix, 2005).

#### **4.2. Conservation de la pomme par la cire**

La pomme est un fruit comestible à pépins d'un goût sucré et acidulé et a une propriété plus ou moins astringente selon les variétés. C'est ce qui attire aussi les insectes et micro-organismes.



Pour profiter des bienfaits de la pomme, il est préférable de manger le fruit cru avec sa peau riche en vitamines, en polyphénols antioxydants (2 à 6 fois plus élevé que celui de la chair) et en micronutriments anti-cancer. Dans la chair restera surtout l'eau et le sucre, avec la pectine. Mais quel dommage de jeter «le meilleur de la pomme» (Denis, 2015) à cause d'altération par micro-organismes, la cire ou autres pesticides.

Généralement, les professionnels utilisent la cire pour enduire les fruits afin de les conserver et leur donner une meilleure apparence. Dans le cas des pommes, après la cueillette, elles sont entreposées en vrac dans de grandes bennes. Les emballeurs, qui peuvent aussi être producteurs, prennent ensuite le relais et trempent les pommes dans un bain de cire (Mercader, 2002). Cependant, elle montre une toxicité potentielle, elle contient de la morpholine ; cette dernière permet l'étalement uniforme de la cire sur les fruits et les légumes. C'est un produit non recommandé par l'Organisation Mondiale de la Santé (WHO, 2002).

### **4.3. Les olives**

L'olivier est une culture millénaire ancestrale à la conquête de grands espaces, arbre emblématique des zones montagneuses de l'Algérie. Sa culture couvre un large territoire. Il est depuis près d'une décennie en train de peupler la steppe du côté de Djelfa et en phase de concurrencer le palmier dans le sud.

Il peut être affecté par différentes maladies : le pourridié, la verticilliose, la fumagine, le cycloconium, le chancre de l'olivier. (Desfemmes, 2018).

#### **4.3.1. Variétés d'olives**

La région méditerranéenne est la zone de production la plus importante pour les olives de tables. L'Algérie dispose d'une plus de trentaines de variétés d'olives, la couverture des besoins des consommations est assurée à 100% par la production nationale.

La variété d'olive la plus répandue est l'*oléa europeae L.* ayant atteint le stade de maturité pouvant être destiné à la consommation direct en tant qu'olives de table. Sont cueillies à différentes stades de maturité, puis traitées et préparées de différentes manières. Les plus demandées sont les olives vertes traitées en saumure ou noires naturelle (Sánchez Gómez et al., 2006) .

### 4.3.2. Paramètres affectant la qualité des olives

Le facteur qualité des olives de table est important, doivent présenter une bonne saveur, odeur, couleur et une texture caractéristique d'un produit fini près à la consommation.

#### 4.3.2.1. Le pH

- Si la diminution du pH au cours des premiers jours de fermentations n'est pas assez rapide, une détérioration des olives peut rapidement s'installer, du fait que des entéro-bactériacées et d'autres groupes microbiens pouvant atteindre des densités cellulaires élevées et formant ainsi des « poches de gaz » entraînant un ramollissement, une rupture de la cuticule et d'autres défauts.

- Un pH élevé peut également contribuer au développement de *Clostridium*, ce qui entraîne une fermentation dite putride (rappel de l'odeur de matière organique en décomposition) ou butyrique (rappel de l'odeur de beurre rance) (Lanza, 2013).

#### 4.3.2.2. Le biofilm

C'est une structure microbienne englobée dans une matrice extracellulaire, fixées sur des surfaces naturelles ou artificielles (Roux, 2006). Ce dernier est riche en micro-organismes entre autre les champignons.

L'un des problèmes conçu dans la préparation des olives en saumures faite en foyer est la formation du biofilm.

## 5. Usage des molécules bio-actives naturelles

Les pommes, saumure d'olives ou autres fruits, légumes et conserves ne doivent présenter aucun signe de détérioration micro-biologique. Un suivi de la fermentation et une bonne conservation sont essentiels.

Les extraits naturels pouvant remplacer les conservateurs chimiques de synthèse sont nombreux comme les huiles essentielles issues de plantes médicinales aromatiques.

Plusieurs huiles essentielles ont en laboratoire une activité anti-microbienne avérée. Mais, avant leur adoption en tant qu'agent de conservation alimentaire, il convient de vérifier les résultats expérimentaux dans l'aliment sélectionné.

En général, les résultats expérimentaux obtenus en milieu modèle se confirment sur les aliments, mais avec des concentrations d'huiles essentielles un peu plus élevées. Les études faites à travers le monde, montrent que les huiles essentielles peuvent être ajoutées à peu près à tous les aliments (Oussalah et al., 2007).

Certes l'huile végétale est plus recommandable au point de vue écologique ; son coût est cependant très élevé et elle est donc peu utilisée en agriculture à la place des pesticides d'origine chimique. Néanmoins, l'utilisation de l'huile essentielle issue de plante dite 'médicinale' comme conservateur alimentaire est beaucoup plus intéressante.

*Partie II : Etude expérimentale*

## **I. Matériel et méthodes**

L'usage des drogues naturelles est très répandu au nord-Est-Algérien, précisément Tébessa (Hammamet-Youkous). C'est une région très riche en plante médicinale aromatique entre autres le romarin qui pousse de manière spontanée.

Beaucoup de travaux ont été réalisés sur les aspects anti-microbiens de cette plante. Cependant très peu d'études ont été consacrées à la recherche et à l'inventaire de cette espèce endémique en Algérie ni à l'usage de ces molécules bio-actives.

Ce travail s'inscrit dans la perspective de valorisation des huiles essentielles (HEs) de l'Algérie en vue de leur utilisation en agro-alimentaire. De ce fait, nous nous sommes proposé de chercher une éventuelle activité de l'huile essentielle (HE) de romarin de la zone de Youkous-Hammamet comme un anti-fongique, et son application en substitution de conservateurs alimentaires de synthèse de nature chimique.

### **1. Enquête ethnobotanique :**

Dans le but de chercher le degré de connaissance et d'utilisation du romarin dans deux régions de l'Est, on a établi un questionnaire détaillé sous forme d'une fiche d'enquête (Annexe 1).

Globalement, la fiche rassemble des informations sur la place qu'occupe le romarin dans notre patrimoine, les différents usages de la plante et de son extrait en domaine culinaire et en phytothérapie.

#### **1.1. Lieux de l'enquête**

L'enquête ethnobotanique était réalisé dans deux wilaya de l'Est Algérien, caractérisées d'une population assez importante: Annaba et Tébessa.

Ces deux localités sont différentes par leurs reliefs diversifiés, la couverture forestière et leur climat. Le romarin dans la région de Hammamet-Youkous (Tébessa) se trouve à l'état spontané alors que ce n'est pas le cas à Annaba.

#### **1.2. L'enquête proprement dite**

Le questionnaire était basé sur dix-sept (17) paramètres.

- D'abord, l'information sur la connaissance de la plante d'étude (le romarin) était primordiale pour poursuivre l'enquête.

- Ensuite, était nécessaire de s'informer sur les habitudes thérapeutiques de la population, nom locale, les parties de la plante utilisées, les indications thérapeutiques, les méthodes de récoltes, les recettes et les modes d'administration, les effets indésirables et surtout sur l'emploi de son extrait (HE) ...etc.

### **1.3. Analyse descriptive des enquêtés**

- Nous avons donné notre fiche d'enquête ethnobotanique à un échantillon aléatoire de 100 sujets par région.

- La population de l'étude est constituée de toute personne de plus de 18ans et habitant l'arrondissement au cours du déroulement de l'enquête.

- Aucune attention particulière sur sexe ni couches socio-économique et intellectuelle n'a été pris en compte.

## **2. Matériel végétal**

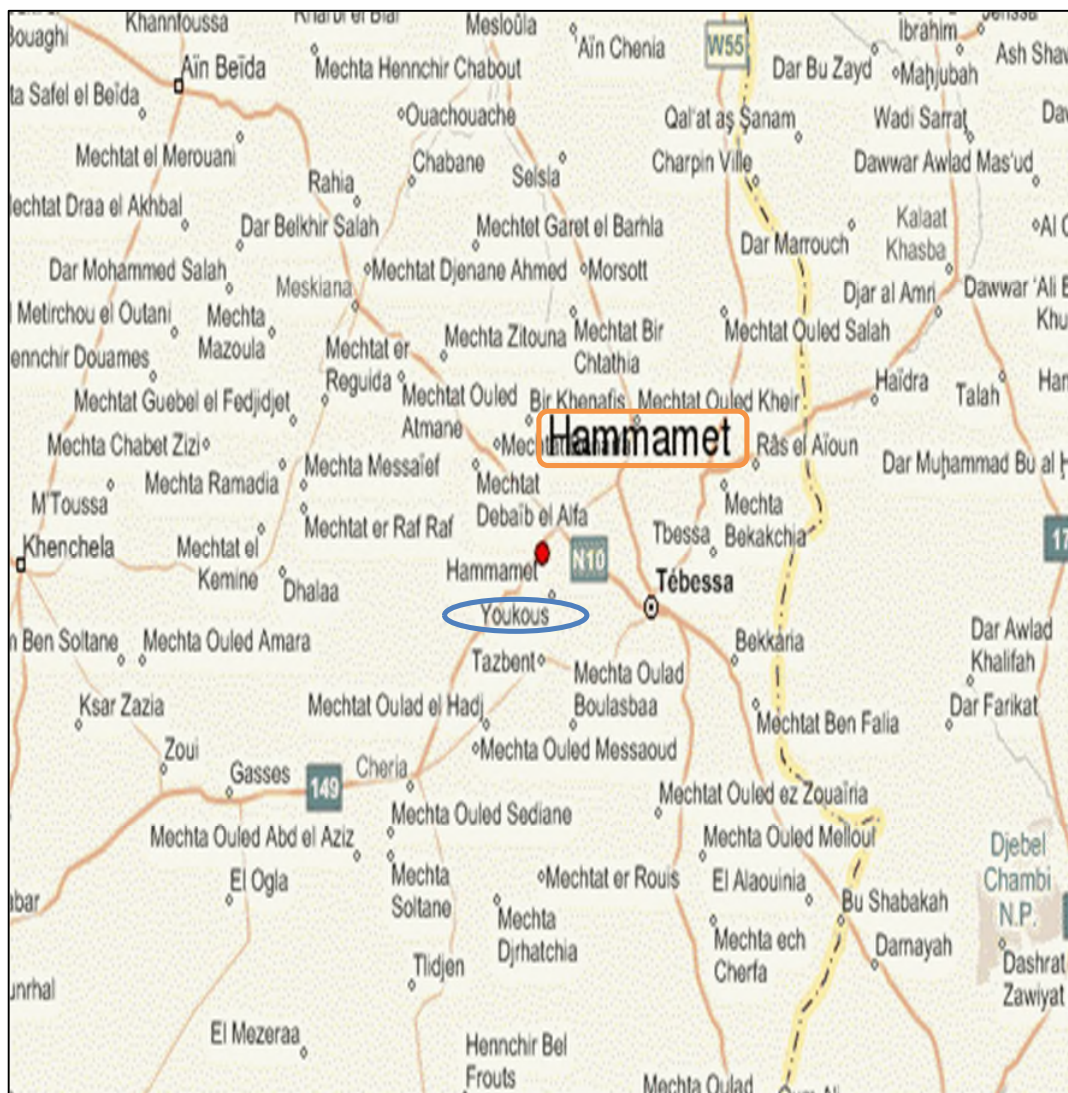
Le romarin (*Rosmarinus officinalis*), arbuste vivace à feuilles persistantes cultivé dans de nombreuses régions du monde, et se trouve spontanée sur le pourtour méditerranéen.

En se basant sur les renseignements des experts de plante, herboriste et spécialiste en botanique, nous avons retenu la zone géographique Hammamet-Youkous (Tebessa-Algérie). Dans cette région la plante ornementale, aromatique et médicinale pousse à l'état spontané et elle n'est pas exploitée.

### **2.1. Caractéristiques du lieu de la récolte**

#### **2.1.1. Position géographique**

On a choisie comme zone d'étude la ville de Youkous-Hammamet, située au Nord-est Algérien, frontière Algéro-tunisienne (Fig.6).



**Figure 6.** Localisation de la zone de Hammamet-Youkous.

On a cherché les caractéristiques géographiques du lieu de récolte de la plante précisément l'altitude qui est un facteur essentiel d'influence direct sur : la croissance et l'évolution du végétal, sur la composition chimique des molécules bio-actives (quantitativement et qualitativement) et surtout sur le rendement en HE.

### 2.1.2. Climat de la région d'étude

Pour mieux connaître les conditions climatiques de la région de récolte de romarin, nous nous sommes intéressés aux paramètres suivants :

- La température moyenne,
- la pluviométrie,
- taux d'humidité.

### 2.1.3. Nature du sol

Dans le but de mieux connaître l'environnement où le romarin se développe, nous avons rassemblé le maximum d'information sur les spécificités du sol de la zone d'échantillonnage, les paramètres conditionnant le développement des espèces botaniques et assurant une activité physiologique et biologique optimum :

- composition du sol,
- rétention de l'humidité,
- fertilité,
- pH,
- les conditions édaphiques qui représentent autant de causes potentielles de

variations de la composition chimique d'une plante aromatique donnée (Mohammad et al., 2009 et Aprotosoia, 2010)

### 2.2. Drogue

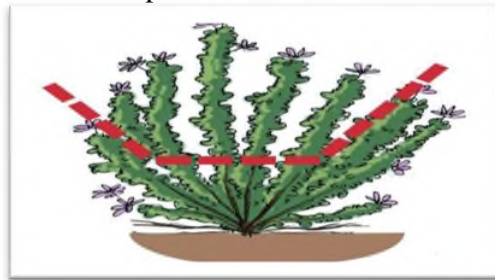
Les drogues synthétiques sont de plus en plus représentés à faire plus de mal que de bien. Cependant, en cherchant un remède naturel et qui aide à prévenir, à soulager et pourquoi pas à guérir plusieurs maladies les plus redoutés de notre temps on a toujours retour aux plantes médicinales.

Spécifiquement la plante choisie appartenant au genre *Rosmarinus*, de la famille des lamiacées. C'est l'une des espèces de qualité typique de la flore Algérienne précisément le Nord-Est. Elle est très utilisée en culinaire et en thérapie traditionnel.

#### 2.2.1. Echantillonnage de la plante

La récolte de nos échantillons de romarin était faite au moment de la floraison, entre début mai et fin Novembre de bon heure et à temps sec pour éviter l'évaporation et la dégradation de l'HE.

Seulement la partie aérienne du romarin qui a été récoltée pour permettre l'activité apicole qui favorise la production des semences et de miel (Fig.7).



**Figure 7.** Partie de la plante cueillie (Projet des Plantes Aromatiques et Médicinales, 2014).



Fraichement récoltés, se sont mises à l'identification botanique et à l'étude anatomique au niveau du laboratoire de biologie végétale et toxicologie du département de pharmacie, faculté de médecine (DPFM)-Université Badji Mokhtar-Annaba (UBMA) (Photo.1).



**Photo.1** : Le romarin récolté de Hammamet-Youkous (BAGHLOUL, 2011).

Les critères botaniques pris en compte sont l'aspect macroscopique de la plante entière ainsi que microscopique concernant les feuilles.

### **2.2.2. Identification de l'espèce**

La recherche de l'espèce botanique du végétal est une nécessité ; elle doit comprendre les noms du genre et d'espèce suivis de la variété si elle existe.

D'abord, on devait connaître l'ensemble (Arbuste, arbre..) puis indiquer les critères botaniques morphologiques macroscopiques spécifiques de l'espèce (tige, feuille, fleur, calice et corolle).

### **2.2.3. Estimation de la teneur en eau**

La teneur en eau des feuilles a été effectuée dès que l'échantillon est introduit au laboratoire de botanique.

➤ *Principe* : par dessiccation du matériel végétal

- Mettre la matière végétale à température élevée jusqu'à ce qu'elle aura une masse constante.

- La quantité d'eau contenue dans la plante ou l'organe, est obtenue en faisant la différence de masse entre la matière fraîche et la matière sèche.

➤ *Technique* : Séchage à l'étuve.

- Placer une quantité déterminée du matériau humide à tester dans une boîte de Petri préalablement numérotée et tarée ;

- Peser l'ensemble et l'introduire dans une étuve pendant 24 heures sous une température de 105° Celsius,

- Après dessiccation, on pèse l'ensemble une seconde fois,

- Déduire les masses humide et sèche de l'échantillon.
- Déterminer la teneur en eau de la plante par le calcul de la différence de poids selon la formule suivante :

$$H (\%) = ((M_1 - M_2) / M_1) \times 100$$

(H) = taux d'humidité (en pourcentage) ; - (M<sub>1</sub>) = poids de l'échantillon après la récolte (en gramme) ;

- (M<sub>2</sub>) = poids de l'échantillon après séchage (en gramme) ;

#### 2.2.4. Description des coupes histologiques

Dans le but de localiser et étudier les structures anatomiques sécrétrices de l'HE de *Rosmarinus officinalis* au niveau des feuilles, qui sont bien évidemment l'objet de distillation. On a réalisé des coupes histologiques transversales, ensuite on les a coloré par la technique de double coloration (Faugeras, 1965 ; Mekki, 2008).

##### ➤ *Principe de la méthode*

La double coloration a pour but de renforcer le contraste et de rendre plus clair les différents constituants tissulaire. La destruction des organites cellulaire et la conservation des parois est assurées par la réaction successive sur les coupes fines des solutions d'hypochlorite de sodium dilué.

On obtiendra une coloration en rose des membranes celluloses (parenchyme cellulosique, liber et collenchyme) et en vert les membranes lignifiées ou sclérifiées (bois et sclérenchyme).

##### ➤ *Technique :*

L'étude histologique était réalisée selon les étapes suivantes :

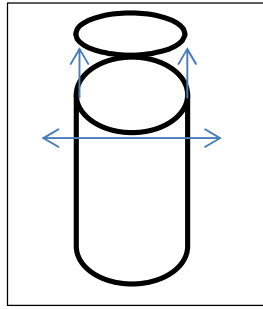
##### \* Fixation des organes à étudier:

- Les feuilles de romarin sont immédiatement conservées après la récolte dans de l'éthanol à 70° additionnée d'eau.
- Laisser quelques jours, pour qu'elles libèrent le maximum de chlorophylle.

##### \* Réalisation des coupes transversales :

- En collectant à l'aide d'une pince quelques feuilles imprégnées au préalable dans l'eau et de l'alcool , et les mettre dans une boîte de Pétri en verre stérile contenant de l'eau pure.

- On essaye de réaliser plusieurs coupes transversales de chaque feuille (Fig.8).



**Figure.8.** Schéma illustrant la réalisation d'une coupe transversale de la feuille.

- Ensuite, on procède à la technique de double coloration (Coloration des parois cellulaires).
- Observation au microscope optique (G :  $\times 10$ ) et (G :  $\times 40$ ).
- Et enfin, description des différentes structures.

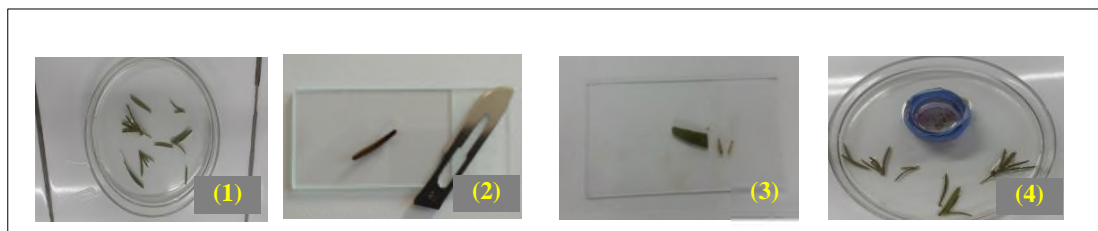
Il est possible de faire le montage de l'échantillon directement dans une goutte d'eau ou mieux dans une goutte de glycérine.

Cependant, la double coloration permet d'aboutir à une observation de qualité.

➤ **Mode opératoire :**

- *Préparation des coupes*

A l'aide d'une lame de rasoir neuve, on effectue des coupes transversales très fine sur l'échantillon végétal (feuilles de romarin) dans le but d'une meilleure observation des différentes structures. Ensuite les coupes de feuilles réalisées disposées dans un tamis sont prêtes à la coloration (Photos.2).



**Photo 2.** Les étapes de la réalisation des coupes transversales des feuilles

(Labo.Botanique).

- *Coloration et montage des coupes*

Les coupes sont placées successivement dans:

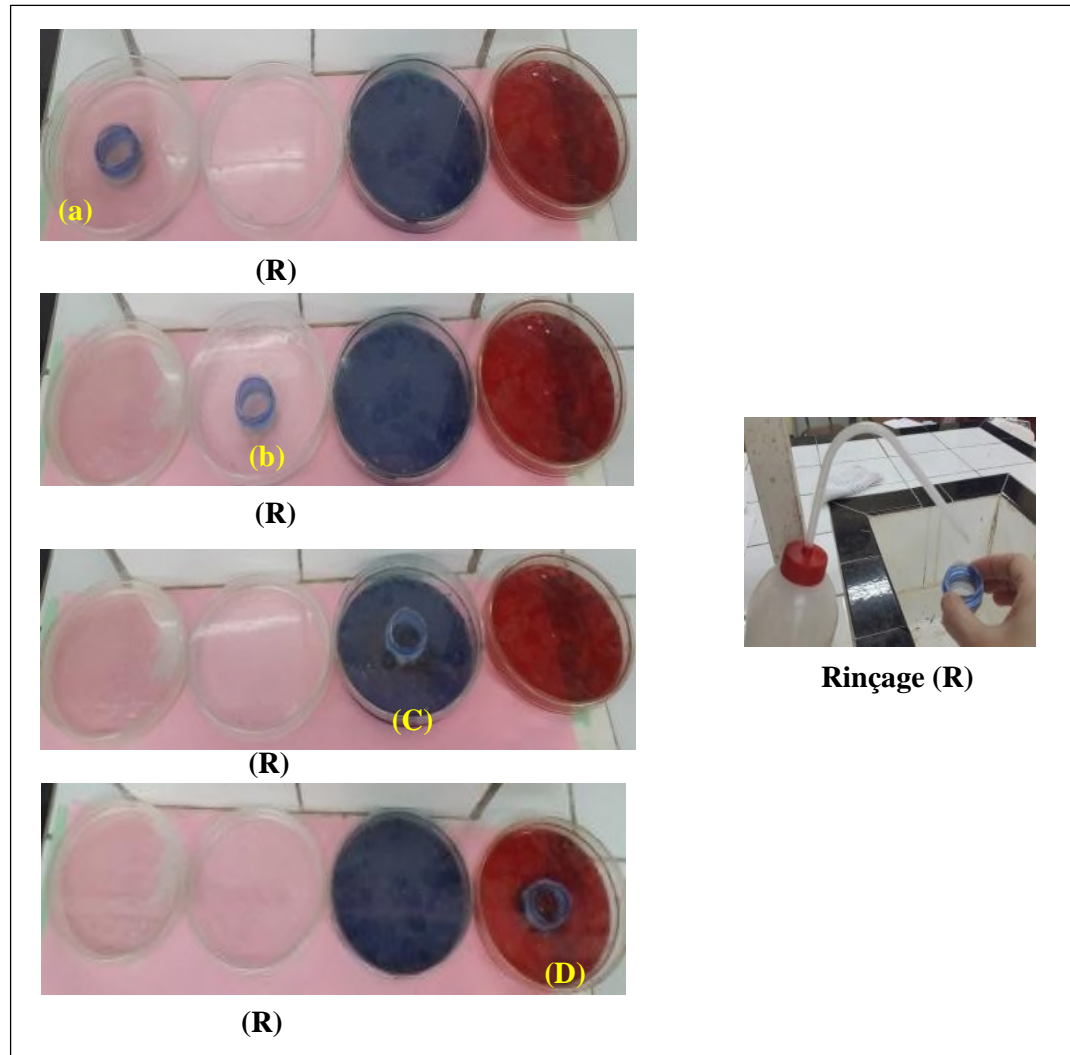
a- L'hypochlorite de sodium dilué au 1/2, (eau de javel à 12°) pendant 15 à 20 minutes dans le but de détruire le contenu cellulaire et n'avoir que les parois squelettiques.

b- Après rinçage soigneux des coupes à l'eau distillée pour enlever l'excès d'hypochlorite de sodium, les coupes sont mises dans de l'eau additionnée de quelques gouttes d'acide acétique pendant 1 à 2 minutes, ce qui neutralise le réactif alcalin précédent et permet une bonne fixation du colorant ; et puis on lave à l'eau distillée.

c. Ensuite, on passe au traitement des coupes au vert de méthyle à 1% pendant 5 à 10 minutes (pour colorer les parois lignifiées sclérifiées en vert, bleu ou violet selon le degré de lignification et en jaune verdâtre ou brun la cuticule et les parois subérifiées).

d. Après un lavage rapide à l'eau distillée afin d'éviter l'excès du colorant, les coupes doivent être colorées par le rouge Congo à 1% pendant 8 à 10 minutes. Ce réactif en se fixant sur les glucanes, colore les parois celluloses en rose. Lavage à l'eau distillée pour éliminer l'excès du colorant.

Les étapes de la double coloration des coupes transversales des feuilles de romarin réalisées sont illustrées par la planche 1 .



**Planche 01.** Etapes de la double coloration des feuilles du romarin (Labo. Botanique).

Enfin, on doit faire le montage des coupes histologique les plus fines entre lame et lamelle dans une goutte de glycérine ;

- Observation faite au microscope optique, aux différents grossissements (G : x10) et (G : x40), dans le but de décrire les différents tissus existants.

#### **2.2.5. Séchage et conservation de la plante:**

La dessiccation été faite par la technique de séchage à l'air libre et sous abris dans un endroit bien aéré pendant trois mois.

Puis on a effectué plusieurs paquets (sac en papier) dont chaque sac contient 100g de feuilles séchées dans le but d'extraire l'HE. Conservation faite à l'abri de l'humidité (Schauenburg et Paris, 1973).

### 3. L'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*

#### 3.1. Extraction de l'huile essentielle

L'extraction de l'HE peut être faite par différents méthodes parmi elles : l'entraînement à la vapeur d'eau, l'hydro-distillation, le chauffage aux micro-ondes sous vide, l'enfleurage et l'extraction par gaz supercritique...etc.

Dans notre étude nous avons procédé à une extraction de l'HE du romarin par hydro-distillation à partir des feuilles séchées à l'aide d'un appareil de type LICKENS NICKERSON (Photo 3) au laboratoire de chimie analytique du DPFM ainsi qu'au niveau du laboratoire de chimie organique, faculté des sciences-UBMA.

A chaque fin d'extraction on calcule le rendement en HE.



**Photo 3.** Dispositif d'extraction de l'HE par hydro-distillation (Labo. Chimie analytique)

Ce n'est pas un appareillage coûteux et le principe de la méthode est très simple.

➤ *Principe:*

L'hydro-distillation est utilisée pour l'extraction des HEs et consiste à séparer les produits volatils contenus dans les drogues végétales sous l'action d'un courant de vapeur saturée, sans macération préalable ; l'eau saturée d'HE traverse un serpentín froid où elle se condense.

Pour donner deux phases : l'eau florale et l'HE ; qui seront séparés selon la densité (Quezel et Santa, 1963).

➤ *Technique :*

- On pèse deux cent grammes du matériel végétal pour la distillation, le placé dans un ballon de deux litres et le rempli avec un litre d'eau.
- En chauffant, l'eau s'évapore entraînant avec elle les molécules aromatiques.

- En passant dans un réfrigérant, l'eau se condense rapidement et se retrouve dans l'ampoule à décantation qui permet la séparation immédiate de l'essence par sa densité.

- Après 1h30min à 2heures d'extraction, on récupère l'HE.

### 3.2. Estimation du rendement

Le rendement en HE est fonction de plusieurs facteurs : la température, l'humidité relative, la durée totale d'insolation et le régime des vents. Ils exercent une influence directe, surtout chez les espèces qui possèdent des structures histologiques de stockage superficielles comme les pélagoniums odorants (Demarne, 1985).

#### ➤ *Principe :*

Le rendement en HE est le rapport entre le poids de l'HE extraite et le poids du matériel végétal traité (AFNOR, 1986 ; Neffar et Benabdrrahmane, 2013).

#### ➤ *Technique :*

On a calculé le rendement en HE exprimé en pourcentage selon la relation suivante :

$$R\% = M_{HE} / M_S \times 100$$

(R) : rendement en HE (en pourcentage) ; - (M<sub>HE</sub>) : quantité de l'HE récupérée (en gramme) ;

- (M<sub>s</sub>) : quantité de la drogue utilisée pour l'extraction (en gramme).

### 3.3. Conservation de l'huile essentielle

Les HEs sont des molécules bio-actives qui conservent leurs vertus aromatiques et thérapeutiques si elles sont stockées dans de bonnes conditions. En revanche, c'est l'instabilité relative de leurs molécules constitutives et la possibilité de leur dégradation, qui rend leur conservation très délicate (Bruneton et al., 1993).

Nous avons pris en considération les trois éléments (la température, la lumière et l'oxygène) indispensables à retenir pour une bonne conservation de l'HE et qui interviennent dans leurs détériorations.

Notre HE était stockée dans un local frais (basse température entre 4°C et 8°C), faite dans des flacons de faible volume en verre brun sombre, et conservée dans l'obscurité, afin d'éviter le phénomène d'oxydation.

Le flacon est entièrement remplis et fermés de façon étanche car les HEs sont très volatiles, et pour éviter que l'oxygène entre en contact avec l'HE et probablement empêche la jonction des anti-oxydants (Chemat et al., 2009 ; Baba Aissa, 1991 ; Quezel et Santa, 1963).

La durée de conservation permise est de 2 à 5ans.

### **3.4. Etude analytique de l'huile essentielle du romarin**

Dans le but d'estimer la qualité et la composition chimique de l'extrait d'HE extraite, nous avons effectué une étude analytique : en premier lieu on devait chercher les caractéristiques organoleptiques, ensuite on est passé à l'analyse chimique.

#### **3.4.1. Les propriétés organoleptiques**

La détermination des caractères organoleptiques était basée sur l'aspect des essences extraites, couleur et odeur.

#### **3.4.2. L'analyse chimique**

La diversification des HE ne peut être envisagée que si la caractérisation de ces substances naturelles est réalisée et celle-ci par la connaissance de leur composition chimique, qui constitue un facteur déterminant en vue de leur vertus.

La caractérisation de ces substances naturelles nécessite la mise en œuvre de technique analytiques fiable qui permettent non seulement d'apprécier ses valeurs, mais aussi de réaliser le contrôle de la qualité ou encore de mettre en évidence une éventuelle spécificité.

L'identification de la composition chimique de notre HE extraite était réalisée au laboratoire de chimie analytique, département de pharmacie La Timone-Marseille-France. Par une technique analytique la plus utilisée dans le domaine des HEs, qui est la chromatographie en phase gazeuse (CPG), couplée à la spectrométrie de masse (SM).

Le couplage CPG-SM est une technique séparatives de pointe qui permet de réaliser à la fois la séparation, l'identification et la mesure quantitative des différents constituants chimiques des HEs extraites.

➤ *Principe :*

Le principe est basé sur les différences d'affinité des constituants du mélange.



- la première étape correspond à l'injection du composé dans la colonne.
- la séparation des composés se déroule dans le temps, les molécules étant éluées de manière séquentielle selon des critères chimiques de polarité et de solubilité dans la phase stationnaire de la colonne.
- la molécule séparée des autres constituants du mélange est ensuite ionisée dans la source d'ionisation du spectromètre de masse.
- La dernière étape, l'identification, est réalisée par un analyseur de masse (Fay, 1998).

Le couplage CPG-SM permet de connaître la masse moléculaire d'un composé et d'obtenir des informations structurales relatives à une molécule à partir de sa fragmentation (Stashenko et Martinez, 2014 ; Constantin, 1996).

Dans la source d'ionisation, les molécules sont bombardées à l'aide d'électrons, conduisant ainsi à la formation des ions en phase gazeuse. Les ions sont ensuite dirigés vers la partie analytique de l'appareil : le quadripôle.

Ce dernier utilise la stabilité des trajectoires pour séparer les ions selon le rapport masse sur charge ( $m/z$ ) par l'application d'un champ magnétique et/ou électrique, puis seront collectés par détecteur (Stashenko et Martinez, 2014 ; De Hoffmann et al., 1999 ; McLafferty et Turecek , 1993).

L'ordinateur enregistre les données provenant du spectromètre de masse et les convertit en valeurs des masses et des intensités des pics et en courant ionique total. Il permet l'examen des données enregistrées et leur manipulation (spectre de masse, chromatogrammes reconstitués, soustraction d'un spectre par rapport à un autre, calcul d'une moyenne sur plusieurs spectres, etc.).

Les spectres de masse ainsi obtenus sont ensuite comparés avec ceux des produits de référence contenus dans les bibliothèques informatisées disponible (Cavalli, 2002).

Pour que cela soit possible, il faudrait que le niveau de similitude des spectres (inconnu et référence) soit suffisant et que les indices de rétention soient identique (Bouchonnet et al., 1999).

➤ *Protocol opératoire (CPG-SM) :*

L'analyse était effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée

à la spectrométrie de masse (CPG-SM), à l'aide d'un appareil de type GC Varian 3400, MS Saturn à *ion trap*, avec la librairie commerciale NIST (National Institute of Standards and Technology).

L'appareil est équipé d'une colonne DB5-MS (25 mm de long, 0,32 mm de diamètre interne, 1,0 µm d'épaisseur de film). 5% phényl - 95% (diméthylepolysiloxane).

La température initiale de 60°C était maintenue pendant une minute, puis on avait réalisé un chauffage à 3°C/min jusqu'à 200°C ; cette température finale quand-à-elle était maintenue 15min.

Les températures de l'injecteur et du détecteur étaient respectivement de 250 et 285°C.

La pression du gaz vecteur hélium en tête de colonne était fixée à 138KPa. La quantité injectée de l'HE était de 1µl en mode splitless. Le dosage était fait par normalisation interne (Kaloustian et al., 2008).

Ensuite on a cherché les classes biochimiques auxquelles appartiennent les composés retrouvés.

#### **4. Activités anti-fongique de l'huile essentielle extraite**

Les HEs ont été pour longtemps utilisées pour aider à éradiquer les micro-organismes fongiques responsables de différentes maladies. In vitro, pour mettre en évidence leurs effets anti-fongiques et selon les recherches scientifiques effectuées ; il y a eu recours à différentes méthodes.

D'autre part, les HEs non seulement sont conditionnées par leurs insolubilité dans les milieux aqueux et elles doivent être testées à de faibles concentrations, elles sont aussi instables et volatiles (Burt, 2004).

De ce fait, nous avons choisie l'une des méthodes les plus utilisées qu'est l'incorporation de l'HE en milieu solide 'fongigramme' inspiré de l'aromatogramme méthode décrite par Vincent en 1991. C'est la plus rencontrée en littérature, car elle présente beaucoup d'avantages : rapide, pas chère, facilement reproductible et n'exige pas un grand équipement de laboratoire.

Les aliments peuvent être contaminés par divers micro-organismes, principalement les bactéries, levures et moisissures. On s'intéresse en ce travail aux

souches fongiques de type moisissures ou les mycètes, sont des organismes eucaryotes uni- ou pluricellulaires, d'aspect filamenteux ou lévuriforme.

Ces derniers peuvent devenir visibles lorsque leur développement est important. Mais, qui n'ont malheureusement pas que des effets bénéfiques, elles peuvent aussi provoquer d'importantes détériorations notamment dans les domaines agronomiques, et alimentaires. Exemple : l'*Aspergillus sp.* est classé parmi les micro-organismes toxigènes les plus rencontrés au niveaux des denrées alimentaires.

#### **4.1. Choix des souches fongiques test-objet**

Quatre vint (80) souches fongiques d'origine diverse et contaminant différents denrées alimentaires ayant des répercussions sur la santé du consommateur ont été collectées durant une période de trois ans (2012-2015).

Ces dernières sont issus d'aliments moisissés et d'autres ont été offertes par des laboratoires de contrôle de qualité d'El Harrouche et celui du cite Wilaya d'Annaba ( contrôle de qualité et répercussion des fraudes).

Sur les quatre-vingt souches fongiques collectées trente-cinq ont été retenues pour notre étude ce sont les genres les plus importants de point de vue économique et médical (*Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*). Connues par leurs effets néfastes sur la santé humaine et les plus fréquents et incriminés dans la détérioration des aliments.

On les retrouve principalement dans les céréales, mais aussi dans de nombreux autres produits végétaux et d'origine animale.

#### **4.2. Origine alimentaire des souches.**

On a collecté les souches fongiques de différents aliments : ail, oignon, carotte, confiture, citron, fromage, galette, Harissa, lait, pain, câpres, Thon, Yaourt, Jus, crème dessert, tomate, arachides, les patates, blé et semoule.

Les souches retenues ainsi que leurs origines sont décrits dans le Tableau 5.

**Tableau 5** : Différentes sources des souches fongiques collectées.

Espèces	Sources d'isolement
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Jus, Tomate
<i>Aspergillus flavus</i>	Tomate
<i>Aspergillus niger</i>	Confiture, galette, oignon.
<i>Fusarium</i>	Cacahuètes, blé, semoule.
<i>Penicillium sp.</i>	Blé, semoule, confiture, fromage, lait.

Par contre, d'autres souches fongiques ont été collectées de différentes origines alimentaires, identifiées et conservées mais en les réactivant n'ont pas poussées. Et de ce fait n'ont pas été retenues comme : *Candida albicans* (Blé), *Cladosporium sp.* (Crème dessert), *Clostridium sulfitoreducteur* (Lait en poudre), *Mucorale* (Semoule), *Aspergillus cereus* (Tomate), *C. famata*(Citron).

#### 4.3. Culture et conservation des souches

Une part des souches fongiques test-objet sont identifiées au préalable au laboratoire de contrôle de qualité alimentaire d'El Harrouche-Skikda et le laboratoire de contrôle de qualité et répercussion des fraudes-Annaba (Photo.4)



**Photo 4.** Des souches fongiques test-objet retenues (Labo. Microbiologie).

Alors que les autres souches leurs isolement direct de l'aliment moisie été fait par nous-même au niveau du laboratoire de microbiologie faculté des sciences-université de Skikda ainsi que celui de la faculté de médecine-UBMA, et leurs identification a été fait au laboratoire de Parasitologie-Mycologie CHU-Annaba

Concernant le type de milieu pour la mise en culture des prélèvements, on a utilisé deux milieux favorables pour la poussée des souches fongiques : le Sabouraud et le milieu PDA (Potatos Dextrose Agar) ce dernier était préparé au niveau du laboratoire.

➤ *Préparation du milieu de culture PDA*

La gélose glucosée à l'extrait de pomme de terre Potatos Dextrose Agar (PDA), est utilisée pour l'isolement, la culture et le dénombrement des levures et des moisissures dans les produits alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques.

➤ *Procédure*

- Infusion de pomme de terre : se prépare en faisant bouillir dans l'eau 300g de pomme de terre lavées et tranchées non pelées au préalable.
- Obtention d'un bouillon par filtrage à travers un coton à fromage.
- Dilution du bouillon en ajoutant de l'eau distillée pour un volume final d'un litre.
- Ajout de 20g de dextrose et autant d'agar-agar en poudre avant une stérilisation par autoclave à 100 KPa pendant 15 minutes, répartir le milieu en flacon ou en tube (incliné) (Quezel et Santa, 1963 ; Beever et Bollard, 2000).

L'identification est basée sur les caractéristiques microscopiques et macroscopiques (Cahagnier et Richard-Molard, 1998) :

- Macroscopique (aspect et couleur des colonies).
- Microscopique (Tête aspergillaire, vésicules, phialides, conidies, et conidiophore), se déroule en effectuant une propagation de l'échantillon entre lame et lamelle, puis la préparation est colorée au coton bleu.

L'objectif 40 est utilisé pour observer et mettre en évidence et identifier les éléments les plus importants.

➤ *Conservation*

A l'aide d'une anse de platine préalablement flambée on repique quelques colonies fongiques et on les ensemence dans des tubes inclinés de gélose et puis on les laisse à température ambiante jusqu'au développement des souches, elles sont observées quotidiennement pendant 5 jours, ensuite on les conserve dans un local frais.

Au moment de recherche d'une éventuelle activité de l'HE de romarin extraite vis-à-vis des souches fongiques choisies et conservées, elles doivent être de nouveau repiquées pour avoir de jeunes colonies.

#### **4.4. Détermination de l'activité anti-fongique**

Les HEs et leurs constituants ont une longue histoire comme agents anti-microbiens. Cependant, l'étude de l'activité anti-fongique de l'HE de la plante aromatique et médicinale de la flore Algérienne *Rosmarinus officinalis* de la région de Youkous-Hammamet (Tébessa) vis-à-vis des trente-quatre moisissures caractérisées et conservées au préalable contaminants notre alimentation a été réalisé selon la technique ci-dessous.

##### **4.4.1. Fongigramme**

Le mot fongigramme est tiré de l'aromatogramme qu'est une technique simple qui consiste à noter le devenir d'un germe au contact d'un extrait d'HE végétale naturelle vis-à-vis des souches fongiques.

La technique permettant de rechercher une éventuelle activité sur des souches fongique (moisissure) est le fongigramme. Se reposant sur le principe de la technique aromatoigramme elle-même tirée de l'antibiogramme selon les recommandations du (CLSI) et conforme aux recommandations du [CASFM - EUCAST ; 2014- V2], par diffusion en milieu gélosé, où les disques d'antibiotiques sont remplacés par des disques imbibés d'extraits concernant les souches bactériennes et par incorporation dans le milieu gélosé concernant les souches fongiques (Egon et al., 2000).

Il n'est qu'un examen complémentaire pratiqué au laboratoire et quel que soit sa spécificité, il n'apporte au clinicien qu'un complément d'information : confirme le diagnostic, l'étaye et l'oriente (Baba Aissa, 1991).

Pour mettre en évidence l'activité anti-fongique de l'HE du romarin extraite vis-à-vis des moisissures collectées de différents aliments, nous avons utilisées la méthode d'incorporation de l'HE dans le milieu gélosé.

##### **➤ Réactivation des souches test-objet.**

L'activité anti-fongique doit être réalisée sur des souches fongiques jeunes. Une réactivation des souches est effectuée par repiquage à la surface de la gélose Sabouraud

pré coulée en boîte de Pétri tri-compartimentée, ensuite incubée à température ambiante pendant 5 jours.

➤ **Préparation du milieu de culture**

On devait incorporer une quantité d'HE dans de la gélose Sabouraud.

➤ *Principe:*

- Mettre 1 µl de l'HE dans un (Becher) en lui rajoutant 1 µl DMSO et 18ml du milieu de culture PDA.
- Homogénéiser le mélange par mouvements rotatoires (Vortex).
- Laisser solidifier.
- Tracer les boîtes de Pétri par-dessous on zigzag ou en ligne droite.

➤ *Ensemencement :*

Les souches fongiques réactivées sont prêtes à être tester vis-à-vis de l'HE.

- Ensemencer les boîtes de Pétri en raclant la moisissure à l'aide d'une anse de platine stérile en suivant le tracé numéroté.

➤ *Incubation :*

- L'incubation est faite à température ambiante pendant 5 jours.

➤ *Lecture :*

Au bout de cinq jours :

- si l'HE a une activité sur la souche fongique, aucune observation ne sera détectée.
- en revanche, on observe un aspect filamenteux avec une coloration spécifique de l'espèce si l'HE n'a pas présenter d'effet.

**4.4.2. Concentration minimale inhibitrice (CMI)**

Les souches conservées et identifiées préalablement et qui n'ont pas poussé en test fongigramme ont été testées en préparant un graduant de concentration d'HE extraite et incorporé dans la gélose Sabouraud favorable à leurs poussées (CMI).

Après avoir repiqué les souches conservées et attendre leur poussée on les mettant à température ambiante dans le but d'avoir des souches jeunes, on a procédé à la recherche de CMI.

La CMI de l'HE est déterminée par la méthode d'incorporation dans l'agar; (Guinoiseau , 2010) l'ensemencement est effectué comme recommandé par le document de l'Institut des normes cliniques et de laboratoire. (CLSI, 2008 et Amrouni, 2014).

➤ *Préparation des dilutions*

La méthode par dilution a pour but d'évaluer des CMI. Elle consiste à déterminer la plus faible concentration de l'HE, nécessaire pour inhiber la croissance d'un micro-organisme (Oussou et al., 2008 ; Derwich et al., 2010).

Une gamme de dilution de l'HE est préparée comme suite :

- diluée l'extrait dans le diméthylsulfoxyde (DMSO).
- ensuite incorporée dans le milieu Sabouraud préalablement fondu et refroidi à 45°C de manière à obtenir une série de dilution de : 0,25%, 0,5%, 0,75% et 1%.

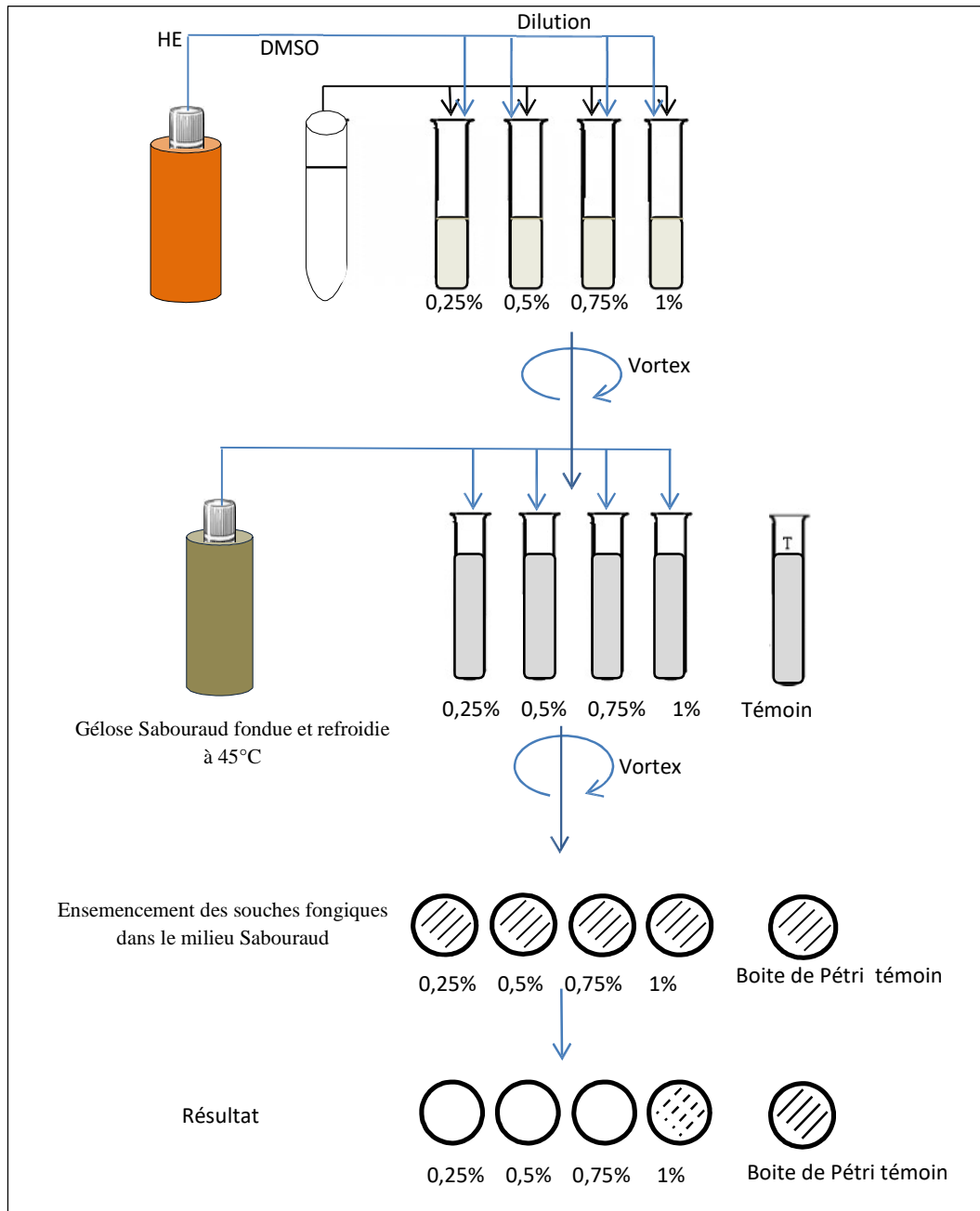
➤ *Ensemencement :*

Les souches repiquées sont ensuite été inoculées à la surface du milieu gélosé par des bandes larges (pas plus de quatre souches par boîte de pétri).

Les mêmes souches testées dans chaque boîte de Pétri ont été ensemencées sur milieu Sabouraud exempt d'HE (Boite témoin) dans le même ordre en ligne droite.

➤ *Incubation :* Les boîtes de Pétri inoculées ont été incubées à température ambiante, et l'observation a été faite tous les jours pendant 5 jours (Planche 02).





**Planche 02.** Schéma du protocole expérimental (BAGHLOUL, 2015).

Si aucune croissance fongique n'est observée à l'œil nu, semblable à la croissance de la même souche sur la boîte témoin cela signifie que c'est la CMI (CLSI ; CA-SFM ; EUCAST ; 2014-V2 ; Guinoiseau, 2010).

#### 4.4.3. Type d'activité

Le type d'activité de l'HE extraite sur chaque souche fongique sensible a été recherché (fongicide ou fongistatique).

Pour ce faire, un repiquage a été effectuée à partir des zones d'inhibition si existant (en suivant le tracé fait au préalable) sur un milieu Sabouraud exempt d'HE.

Après incubation à température ambiante on passe à l'observation:

- Lorsqu'il n'y a pas de repousse, la concentration est indiquée fongicide (arrêt définitif de la croissance et donc activité létale).
- Si la souche pousse, l'activité est dite alors fongistatique (inhibition de la croissance) (Djabali Et Barkat, 2012).

## 5. Applications de l'HE comme conservateur de produits alimentaires

Pour appliquer L'HE extraite en tant qu'agent de conservation alimentaire, il convient de vérifier et confirmer les résultats expérimentaux sur l'aliment sélectionné. Cela est possible d'après plusieurs études faites à travers le monde, montrant que les HEs peuvent être ajoutés à tous les aliments mais avec des concentrations un peu plus élevées. (Oussalah et al., 2007).

De ce fait, la CMI de l'HERo extraite obtenus vis-à-vis des souches fongiques contaminants les différents denrées alimentaires testées in vitro est de 0,25%, donc et selon l'hypothèse citée, est nécessaire d'augmenter la concentration qu'on a estimé de 0,5% pour l'appliquer en agro-alimentaire.

### 5.1. La pomme

#### 5.1.1. Révélation de la cire

➤ Protocole : Deux pommes ont été choisie, elles sont différentes par leur aspect et texture (Photo.5).



**Photo.5.** Les pommes test-objet (BAGHLOUL, 2017).

Ces pommes sont lavées au préalable pour enlever la cire naturelle couvrant le fruit à l'origine.

- On a versé de l'eau tiède sur les deux variétés de pommes.
- Les laissées imprégner pendant quelques minutes.

- Observation faite à l'œil nu.

Au vu de la toxicité par les traitements fongicides de synthèse et dans le but de prolongé la durée de conservation de la pomme, on propose leur pulvérisation après récolte par des molécules bio-actives naturelles.

### **5.1.2. Usage de l'HE de *R. officinalis***

#### **➤ Préparation des pommes**

Au départ, il était nécessaire de chercher comment désinfecter la pomme après collecte sans l'affecter. Et au regard de l'ensemble des revus bibliographiques trouvé, il est indiqué que:

- il ne faut pas utiliser l'eau distillée lors du lessivage, car il y aura un transfert de matière.
- éviter le traitement thermique puisqu'il a une incidence sur le parenchyme des pommes et il y aura une diffusion des composés phénoliques (Kebe, 2014).
- Et de ce fait, on a pensé au lessivage à l'eau de Javel.

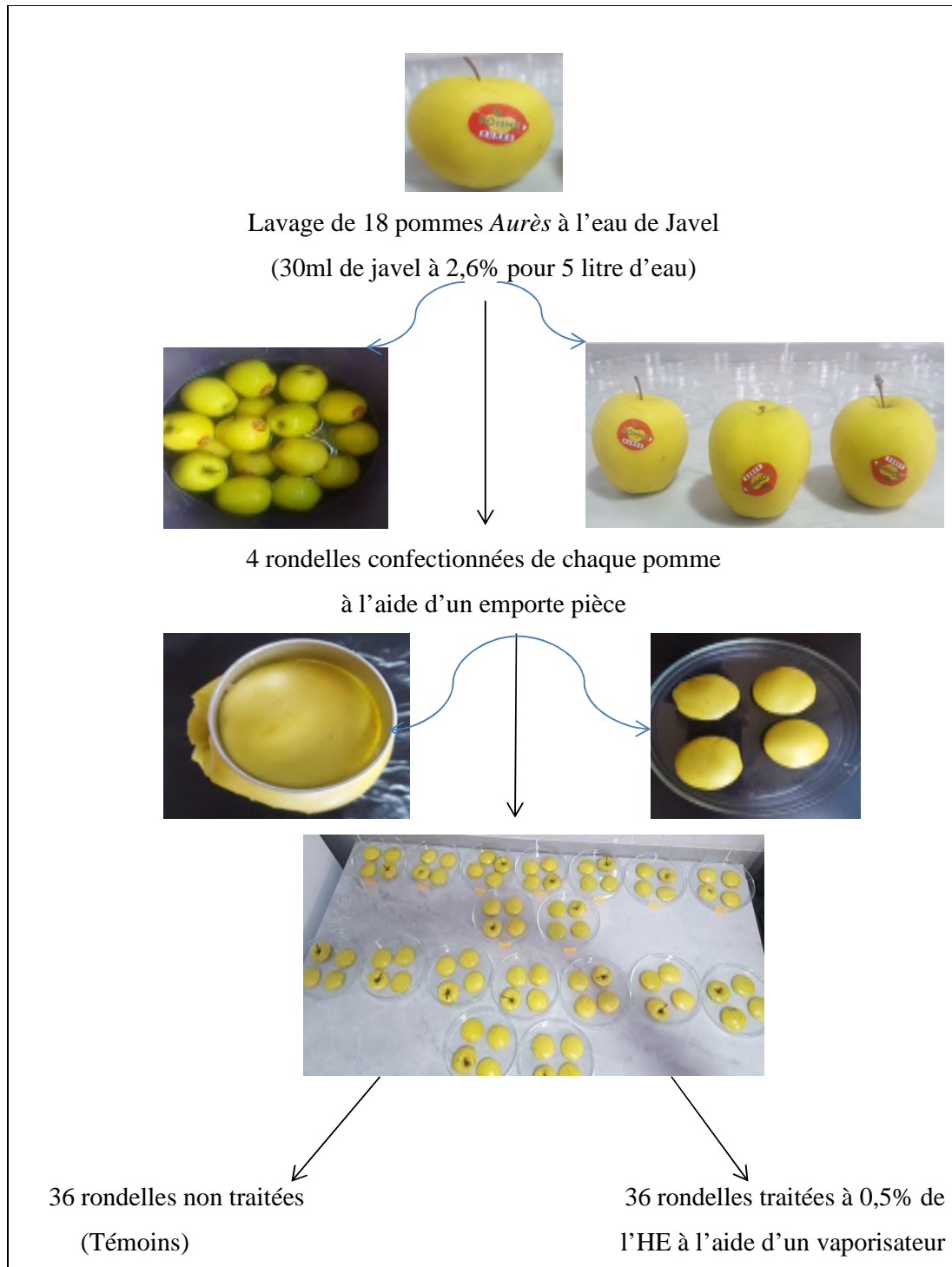
#### **➤ Protocole**

Dix-huit pommes fraîchement collectées, sont nettoyées et immerger quelques minutes dans une solution désinfectante : 30ml de javel à 2,6% pour 5 litre d'eau, puis rinçage abondant à l'eau (CPIAs, 2017).

- On a immergé les pommes dans un bain d'eau bouillie et refroidie,
- le séchage est fait par du papier absorbant stérile.
- On a confectionné des rondelles de pommes à l'aide d'un emporte-pièce en fer stérile et un couteau. Ces derniers sont flambés à chaque usage.
- La dernière étape est importante, pour qu'on puisse toucher toutes les parties de la pomme. On aura donc, dans chaque boîte de Pétri en verre stérile quatre rondelle de la même pomme.

Dans l'ensemble, 72 rondelles de pommes nettoyées sont confectionnées :

- la moitié du nombre (36) sont traitées par un pulvérisateur stérile contenant l'HE de *Rosmarinus officinalis* étudiée à 0,5%, préparée au préalable.
- Et le reste (36 rondelles) est destiné à être témoin (Planche.2).



**Planche 03.** Photo du protocole opératoire (traitement des pommes par l'HE)  
(BAGHLOUL, 2017).

- *Incubation* : à l'air ambiant.
- *Observation* : faite chaque jour pour repérer tout changement d'aspect des échantillons de pommes traitées en les comparants aux témoins.

## 5.2. Les olives

Certes il y'a l'aspect bénéfiques des biofilms exemple celui d'*Aspergillus* qui a été démontré par les mycologues industriels (Villena & Gutierrez-Correa, 2007). Par conséquent, il est clair que ces microflore ont développé des moyens de coordonner leur comportement pour former des biofilms, qui ont un impact sur la médecine clinique et les processus industriels.

Aussi, d'une part les avantages nutritionnels des olives ont été prouvés par de nombreux scientifiques, et se révèlent importantes pour la santé: bienfait cardiovasculaire aux propriétés anti-microbiennes, anti-cancéreuses, anti-oxydantes...etc. (Victor Preedy, 2010).

D'autre part, les méthodes de récoltes, de transport, de conservation et de vente des olives permettent leur contamination par les moisissures (Maouni et al., 2002).

Plusieurs analyses mycologiques ont été réalisées auparavant, soit sur toute la microflore des olives soit uniquement sur le genre *Aspergillus* (Tantaoui-Elaraki et al., 1990)

### 5.2.1. Choix d'olives test-objet

Le degré de détérioration des olives est différent, selon les variétés, état de conditionnement ...etc. D'ailleurs selon la littérature décrite on constate que :

- Les olives mure, de couleur noire, sont plus contaminées, que les vertes ou rouges.
- Les olives noires intactes sont moins contaminées que celles dénoyautées.
- Il semble aussi, que les traitements phytosanitaires et le mode de conservation interviennent principalement et que l'ouverture des olives favorise l'accès des moisissures aux substances nutritives.

- Aussi, et ce qui est important à signaler est que : *les olives préparées dans les foyers sont plus contaminées que celles du commerce selon Maouni et al. en 2002.*

- Dans ce contexte, on propose l'usage de notre HE de romarin extraite sur des olives vertes préparées aux foyers, en améliorant les conditions de conservation et dans le but aussi de limiter les détériorations et les pertes causées par différents micro-organismes.

Le problème posé est que : après une certaine durée de conservation des olives en saumure, il y a développement d'une nappe de microflore à la surface appelée biofilm.

### 5.2.2. Mise en évidence du biofilm et micro-organismes constitutifs

Des olives vertes intact avec leurs noyaux, sont mises en conservation dans un bocal remplis d'eau. On laisse quelques jours à l'obscurité et à température ambiante (Photo.6).



**Photo.6.** Des olives test-objet mis en conservation (BAGHLOUL, 2017).

- observation macroscopique sera nécessaire après quelques jours.  
Après développement du biofilm, il était nécessaire de spécifier l'espèce apparente sur nos olives.
- Passage à l'observation microscopique.
  - Procédure :
- Préparation de plusieurs échantillons repiqués de la surface du bocal et les mettre sur lame.
- Coloration avec une goutte de glycérine
- Couvrir avec une lamelle.
- Observation objectif (G :  $\times 40$ ).

### 5.2.3. Usage de l'HE de *R. officinalis* extraite en qualité de conservateur alimentaire d'olives

#### ➤ *Protocole*

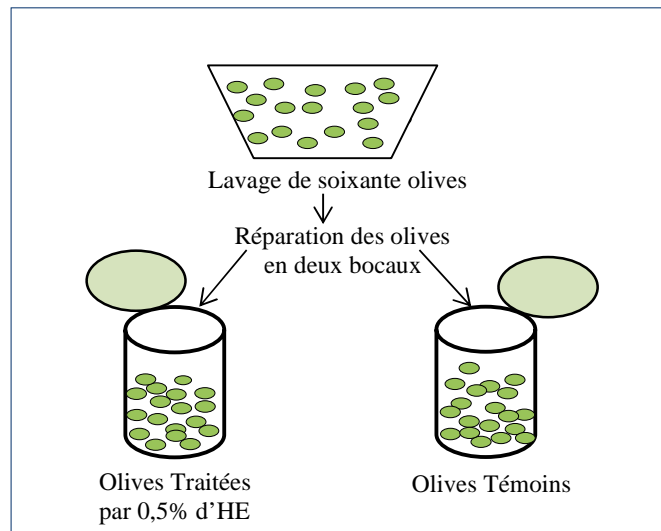
- D'abord, on doit préparer la dilution en HE extraite:
- Dans un tube stérile on met une quantité d'HE ainsi que de DMSO de façon à obtenir une concentration de 0,5%.
- Agitation au vortex.

#### ➤ *Préparation des olives-Test*

Soixante olives intact vertes avec leurs noyaux et de même taille, sont lavées soigneusement et réparties dans des bocaux en verres stériles remplis d'eau bouillie et refroidie. Trente olives dans chaque bocal :

- Un bocal on lui rajoute de l'HE diluée à 0,5%, agité par Vortex.

- l'autre bocal reste témoin (Planche 4 et Photo.7).



**Planche 04.** Schéma illustrant le protocole du traitement des olives (BAGHLOUL, 2017).



**Photo 7.** : Les deux préparations d'olives traitées et témoins (Labo. Microbiologie).

➤ Incubation :

- les deux bocaux sont maintenus à l'obscurité et à température ambiante.
- Observation de l'aspect chaque 5 à 10 jours.

## **II- Résultats et discussion**

### **I. Enquête ethnobotanique**

Le romarin est une plante très connue, appréciée, spontanée sauvage ou cultivée en pépinière, se développant dans de nombreuses parties du monde. Elle fait partie du paysage méditerranéen, riche en flore diversifiée où l'on dénombre près de 3232 espèces aromatiques, dont 600 sont des plantes médicinales. Ces dernières sont cultivées dans des parcelles dédiées à la réalisation d'études expérimentales (Mokkadem, 1999).

A l'instar des pays du bassin méditerranéen, en Algérie la région des hauts plateaux et de l'Atlas saharien constituent le lieu de pousse de prédilection de cette plante (O.Zanndouche ,2015). Cette ressource naturelle renouvelable se différencie à travers le territoire selon un gradient climatique et continentalité. Malheureusement, il n'existe pas de mise au point permettant d'avoir une idée précise de cette richesse floristiques.

#### **1. Régions enquêtées**

Notre enquête ethnobotanique s'est déroulée sur deux wilayas de l'Est algérien : Annaba et Tébessa. Distantes l'une de l'autre par 218 kilomètre, les deux localités sont différentes par leurs aspects climatique et culturel.

Tébessa est une ville antique, en grecs plutôt connue sous le nom de Tebeste appelé autrefois en latin Theveste. Située seulement à 20 Kilomètre à l'ouest de la frontière Tunisienne, s'étend sur une superficie de 13 878Km<sup>2</sup> et peuplée par 648 703 Habitants. Elle est prise par les Berbères en 597, par les Arabes en 682, puis par les français à partir de 1851.

Se distingue par ces monts de l'Atlas, les hauts plateaux et les hautes plaines au nord, et le domaine saharien au sud. Ces monts sont situés entre la dorsale tunisienne du Nord-Est et les monts de Nememcha au Sud-Ouest constituant une partie de l'Atlas Saharien. Se caractérisant par la simplicité des chainons, leur faible longueur, leur discontinuité et la variabilité de leur orientation.

Cette zone est caractérisée par un climat de steppe, zone de transition météorologique (quatre étages bioclimatiques : le sub-humide, semi-aride, le sub-aride, l'aride ou saharien doux).



Région agropastorale, célèbre par la qualité de son mouton et la majesté de son cheval. Caractérisée par un foyer artisanal (la splendeur de ses tapis algériens traditionnels) et un important centre commercial et agricole, possède un grand nombre de ressource minière de notoriété mondiale (fer et phosphate) ainsi que forestières. Connue aussi par les ruines romaines.

Principalement la région de Youkous-Hammamet très riche en plantes médicinales aromatique poussant spontanément, entre autre l'arbuste romarin.

La région d'Annaba anciennement appelée Bône, ville côtière du Nord-Est de l'Algérie, s'étalant sur une superficie de 3090.51Km<sup>2</sup>. C'est une métropole littorale dont la population dépasse les six-cents mille habitants.

Son relief est constitué principalement de montagnes, son climat est chaud et tempéré (température et pluviométrie annuelle moyennes sont respectivement de 18,4°C, 712mm).

Sa vocation industrielle et son statut de capitale de l'acier, font d'elle l'une des régions les plus polluées du pays. Par ailleurs, réputée généralement par ces plages pittoresques et l'aspect culturel et artistique théâtrale. Le romarin dans cette région est généralement cultivé ou vendu par les herboristes.

## 2. Répartition des enquêtés selon le sexe

En Algérie, les traditions d'une façon générale et spécifiquement l'usage des plantes médicinales aromatiques sont hérité d'une génération à l'autre, et sont beaucoup plus conservées par les femmes.

D'ailleurs, il ressort de l'enquête que sur les 200 personnes enquêtées choisie aléatoirement sans considération de leur niveau sociale ni culturel ; une fréquence de 134 femmes (soit 67% de sexe féminin) qui utilisent les plantes comme remède (Fig.9).

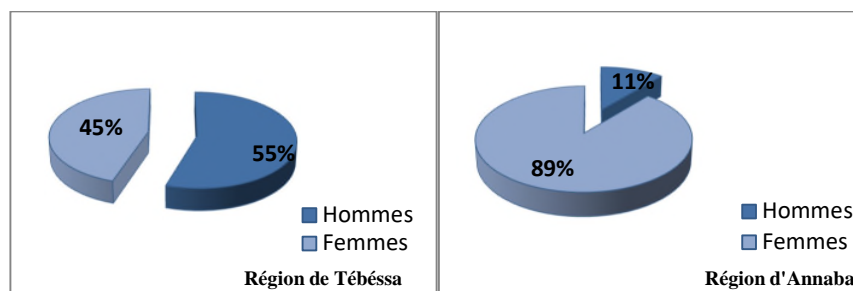


Figure 9. Répartition des enquêtés selon le sexe.

Dont 89 de proportion féminine caractérisant les enquêtés de la ville d'Annaba, estimé dominante par rapport à celle des hommes (11% de l'échantillon).

Alors que, la lecture des données de la région de Tébessa selon l'échantillon interrogé a démontré un rapport presque identique homme (55%) /femme (45%).

Les hommes ainsi que les femmes à Tébessa sont reconnaissants et possesseurs en phytothérapie traditionnelle. Leurs réceptivité au questionnaire était intéressante et avait la capacité de transmettre l'information d'une façon simple et claire.

### 3. Répartition des enquêtés selon l'âge

De l'enquête il ressort, que les personnes âgées sont la source principale d'information conduisant au sujet de l'usage des plantes aromatique médicinales en mode traditionnelle.

Cette proportion d'âge (>50ans) est réduite, représente respectivement 15% et 9% pour les deux régions Tébessa et Annaba. Mais, ont fourni plus de connaissances en plantes médicinales par rapport aux autres classes d'âges. Et ont donné un bon concept sur les remèdes naturelles qu'ils le maintien jusqu'à ce jours, en revanche, ils sont charmés aussi par la phytothérapie moderne.

L'intervalle d'âge [19-30] ans ont été les plus questionnées pour les deux régions. Ça se traduit par le fait que le maximum de fiches d'enquêtes était distribué au sein des universités (El Arbi Tbessi -Tébessa et Badji Mokhtar-Annaba) englobant des enquis étudiants. Cette tranche d'âge représente une proportion de 74% pour la ville de Tébessa estimé élevée par rapport à celle d'Annaba 48%.

Suivi de la population âgée entre [31-49] ans, avec une proportion de 27% et 17%, respectivement pour les deux régions (Fig.10).

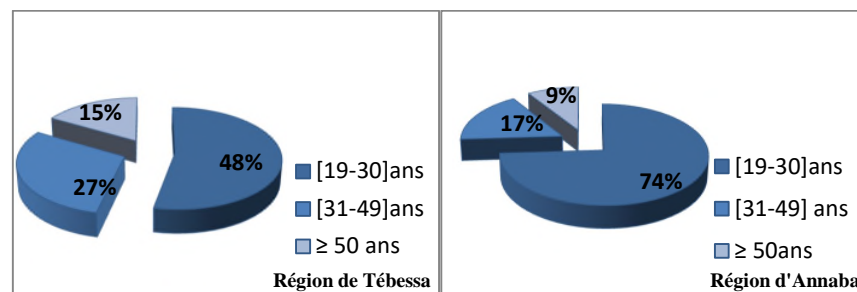


Figure 10. Répartition des enquêtés selon l'âge.

Malgré que les deux dernières tranches d'âge citées soient d'une proportion minime, reste une source d'information importante. Elle englobe la population des femmes au foyer et retraités ainsi que des pharmaciens, professeurs, laborantins,

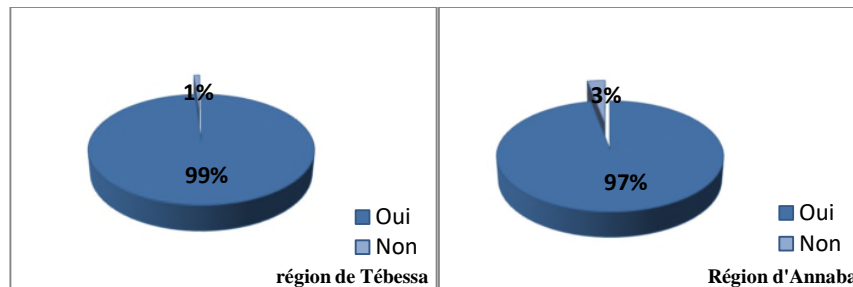
inspecteurs, commercent, électriciens, chefs cuisiniers, agents de sécurités, des administrateurs (comptable, informaticiens, justice).

Les jeunes questionnés s’emblent être ne pas trop y croire en cette médecine traditionnelle ni moderne et préfèrent l’antibiothérapie.

#### 4. Perception du romarin

Sur les 200 personnes interrogées, 2 % seulement ne le connaissent pas (Fig.11).

L’ignorance de la plante par cette proportion minime de la population est due à une certaine confusion d’information avec d’autres variétés de plantes aromatiques. Ce résultat témoigne l’abondance et la large répartition géographique de cet arbuste, lui donnant ainsi certaine réputation comme plante aromatique très appréciée.



**Figure 11.** Répartition des enquêtés selon la connaissance de la plante.

On note que, malgré la diversité de la phytothérapie traditionnelle pour les deux régions, ils prennent le nom général commun de cette plante : « *Klil* ».

La proportion dominantes avec un taux de 72% d’interrogées connaissant le romarin sont les femmes. Ceci peut être expliqué par leurs utilisations des plantes médicinales dans le domaine thérapeutique ainsi que culinaire, et utilisent ses dernières aussi comme premier soin pour leurs enfants en particulier pour apaiser leurs maux grippaux ou autres.

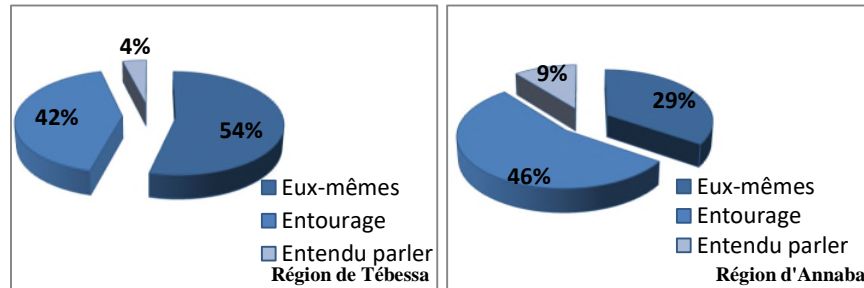
#### 5. Répartition des enquêtés selon la source de connaissance de la plante

La vente des plantes médicinales par les herboristes, la connaissance scientifique (média) ou l’entourage sont important pour que les consommateurs prennent de ces drogues un remède pour leurs maux.

Globalement, sur les 200 enquêtés qui connaissent le romarin 13% l’utilise car c’est juste entendu parler de ces vertus.

Pour la région de Tébessa 54% des enquêtés utilisent eux-mêmes la plante, représentant une proportion élevée par rapport à celle de la population d’Annaba (29%).

Alors que la consommation de la plante d'étude par l'entourage des deux populations enquêtées est presque identique (Tébessa 42% et d'Annaba 46%). Ces enquis se réfèrent à d'autres sources telle que l'herboriste ou bien, vu l'existence de nombreuse plante médicinales dans leurs entourage. Ils se basent sur leur propre expérience (Fig.12).



**Figure 12.** Répartition des enquêtés selon la source de connaissance.

La plante est très appréciée est plus reconnaissante par la population Tébessi, lui donne un intérêt important dans les différents remèdes naturels et en usage gastronomique du fait qu'elle rajoute une bonne saveur au plat.

Cette population, constituant une source d'information principale, elle préserve jusqu'à ce jour la connaissance hérité de la plante par leurs ascendants familiaux (transmission des pratiques traditionnelles d'une génération à l'autre). Ce que démontre le statut endémique qu'a pris le romarin depuis longtemps surtout par rapport à ses vertus thérapeutiques.

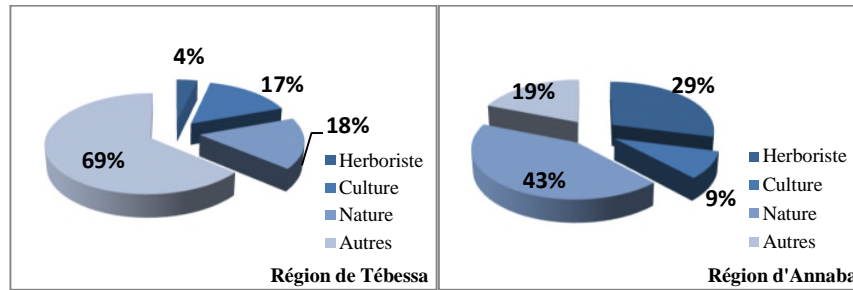
### 6. Répartition des résultats selon la source de la plante

Les résultats recueillis concernant la source de la plante dans les deux régions semblent être totalement différents. L'habitat naturel de cette plante est évidemment une caractéristique de la zone de Tébessa, alors que ça représente que 18% de l'échantillon enquêté cela peut être par conséquence à la distance que doivent parcourir à le recueillir.

Cependant, les enquêtés d'Annaba (43%) se déplacent dans d'autre régions pour procurer la plante, font séchée et la conservée en cas de besoin.

Il faut noter que, l'herboriste-source représente 29% des interrogés d'Annaba et un pourcentage minime de 4% pour Tébessa. La culture de la plante du romarin en tant que plante aromatique savourée ainsi que décorative dans les jardins représente globalement que 13% de l'échantillon enquêté. Un taux élevé d'enquêtés de Tébessa

(69%) procure le romarin de différentes sources par rapport à ceux d'Annaba (19%) (Fig13).



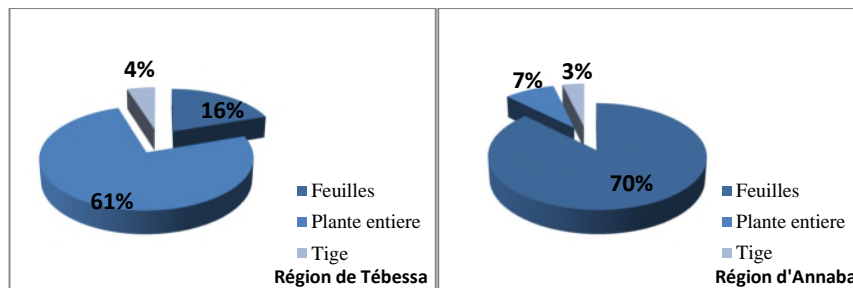
\*Autres : différentes sources à la fois.

**Figure 13.** Répartition des enquêtés selon la source de la plante.

### 7. Répartition selon les parties utilisées

La plante peut être utilisée entièrement comme en partie précise : en cuisine, en cosmétique ou en phytothérapie et cela varie selon les enquêtés.

La population enquêtée d'Annaba (70%) consomme précisément les feuilles, suivie des parties aériennes de la plante. Les racines, la tige ou la plante entière sont peu utilisées (12%). Alors que les parties aériennes, les sommités fleuries n'ont pas été citées (Fig.14).



**Figure 14.** Répartition des enquêtés selon les parties utilisées.

Cette prédominance d'utilisation des feuilles du romarin est préférable, c'est le lieu de la majorité des réactions photochimiques et le réservoir de la matière organique qui en dérive (Chamouleau, 1979). C'est une partie contenant beaucoup plus de principes actifs et donc exploitée en aromathérapie pour en extraire également son HE.

Alors que, la plante entière y compris les feuilles et les autres parties de la plante sont les plus utilisées par les enquêtés de Tébessa (61%). Il faut noter que cette collecte à long terme contribue à la raréfaction et la disparition de ces espèces de romarin. Cependant, 16% prennent les feuilles, 9% les sommités fleuries et enfin la tige 4%.

Les racines et parties aériennes n'ont pas été citées.

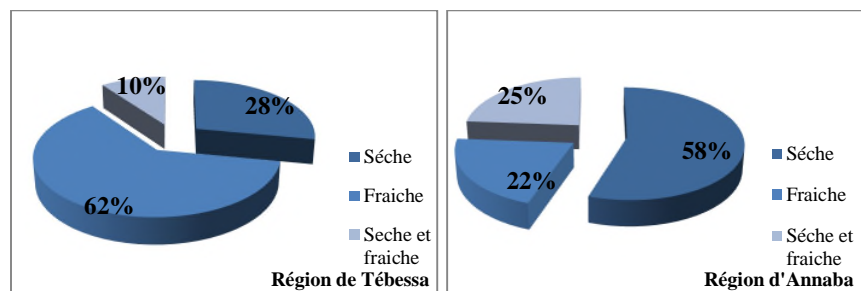
### 8. Usage selon l'état de la plante

Selon la population d'Annaba avec un taux dominant de 58% par rapport aux 28% de Tébessi, font déshydrater le végétal en mettant la plante à l'air libre. Cette technique de séchage des plantes médicinales est très ancienne, alors que les enquêtes ignorent que pour un meilleur résultat certaines conditions constituent des facteurs primordiaux et doivent être respectées : une température relativement chaude et stable comprise entre 30 et 40°C et que l'humidité relative de l'air soit minimal (Vidal, 2010).

Ce séchage est aussi souhaitable si on veut préparer des huiles végétales, également les plantes déshydratées sont plus concentrées en principes actifs.

En outre selon la disponibilité la plante du romarin existante tout au long de l'année est utilisée fraîche, 62% des Tébessi la consomment en cet état, taux estimé élever par rapport aux 22% des Annabi interrogées. Ça peut être dû à l'abondance, la spontanéité et la disponibilité de la plante dans la région d'étude.

Ce cas est préférable quand la saison le permet, notamment pour préparer des tisanes. Globalement, 35% la consomment selon la disponibilité fraîche ou sèche (Fig.15).

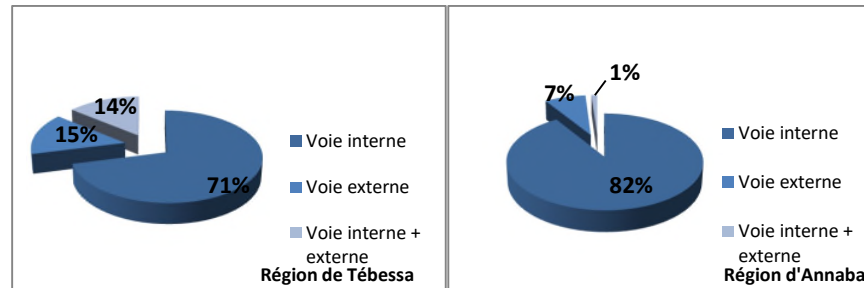


**Figure 15.** Répartition des enquêtés selon l'état de la plante.

Selon la maladie que l'on souhaite traitée, la potion pourra prendre différentes formes. Les tisanes et les boissons à base de plantes (fleurs, feuilles, racines, tiges ou la plante entière) ont des propriétés particulières sur l'organisme : apaisantes, calmantes, amaigrissantes, diurétiques, digestives, relaxantes ...etc.

Elles constituent sans aucun doute la forme la plus communément employée en phytothérapie. C'est aussi la méthode la plus simple pour tirer parti des bienfaits d'une plante.

La voie interne constitue l'administration à la fois orale et par inhalation, elle représente un taux prédominant pour les deux populations : 71% pour la région de Tébessa et 82% pour la région d'Annaba (Fig.16).



**Figure 16.** Répartition des enquêtés selon la voie d'administration.

L'huile de romarin administrée par cette voie stimule l'activité du système nerveux central, respiratoire et locomotrice chez la souris (Kovar, 1987).

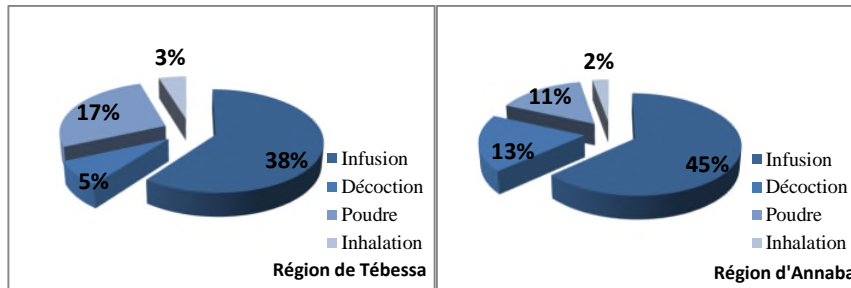
Alors que la voie externe est peu utilisée, regroupe dans l'ensemble 12% des enquis pour les deux régions. Le mode utilisé est la teinture mère ou alcoolique (cataplasme ou masque), la plantes ou l'huile du romarin dans un bain, stimulant ainsi la circulation dermique et améliorant l'hémodynamique pour les problèmes d'occlusion artérielle (effet sur la circulation sanguine) (Rulffs et al., 1984). Il ne faut pas oublier que l'huile de massage s'impose aussi, est efficace pour le coté détente.

Il existe une tranche de la population enquêtée qui utilise les deux voies d'administration avec un pourcentage amoindri totale de 15%.

Également, le mode de préparation d'un traitement à base de la plante du romarin est différent selon ce qui est ciblé pour être remédié. Dans la thérapeutique traditionnelle, une tisane à base de plante peut se préparer de trois façons différentes : la décoction, macération ou en infusion.

Il ressort de notre enquête, que le mode de préparation le plus fréquemment utilisé par les enquêtés est l'infusion, c'est le fait de verser de l'eau bouillante sur la plante et laisser se reposer quelques minutes avant de filtrer et boire. Ça représente 38% pour Tébessa et 45% pour Annaba.

Malgré que la décoction soit le procédé permettant d'extraire un maximum de principe actif, et qui consiste à faire bouillir les plantes pendant quelques minutes. Elle est peu utilisée par la population enquêtée. Représentant un minimum de la population de Tébessa 5% suivi de l'inhalation 3%. Ainsi que pour la région d'Annaba 13% et 2% respectivement (Fig.17).



**Figure 17.** Répartition des enquêtés selon le mode de préparation.

La plante du romarin (feuilles) se prête davantage à l'emploi sous forme de poudre selon la liste exhaustive, et sont 14% dans l'ensemble de la population enquêtée qui l'utilise sous cette forme. C'est une façon de prendre la plante, destinée à être absorbée dans une capsule (gélules de plantes), elle peut être aussi consommé en la mélangeant avec un liquide (jus de fruits, laitage, ...etc), mais il ne faut jamais l'absorbée telle quelle car il y a risque d'étouffement.

En fin, il faut noter que pour les deux régions 48% utilisent différentes modes de préparations à la fois avec une prédominance d'infusion, et 15% n'ont rien mentionné. Cela peut-être dû par ignorance de l'appellation scientifique du mode ou bien cette tranche l'utilise par d'autres fins comme la macération qui n'a pas été proposé dans notre fiche d'enquête.

**\* Application thérapeutique ou culinaire ?**

Le romarin fait partie de notre patrimoine culturel, occupent une large place dans la médecine traditionnelle. C'est connu qu'il traite différentes pathologies : asthme, eczéma, rhumatisme...etc (Fahim et al., 1999). Les enquêtées utilisent ces feuilles et tiges en infusion ou en décoction pour apaiser leurs maux.

On note toujours une reconnaissance et une possession du savoir phytothérapeutique traditionnel par les femmes. Cela est dû à leurs responsabilités en tant que mères donnant soin à leurs enfants, et leurs usages des plantes médicinales dans d'autres domaines que la thérapie.

D'ailleurs, on remarque une prédominance de l'usage thérapeutique de la plante dans les deux régions Tébessa et Annaba, 69% et 41% respectivement.

Malgré que l'usage régulier de diverses labiées méditerranéennes dans la cuisine est conseillé pour maintenir élevée la défense immunitaire de l'organisme, et retarder le



vieillesse des tissus (action anti-radicalaire).Son application en culinaire est minimale et presque à une proportion identique (30% et 27%) (Fig.18).

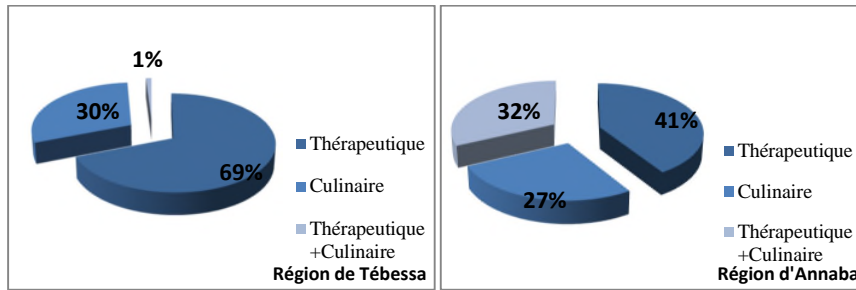


Figure 18. Répartition des enquêtés selon l'usage.

Il est rajouté à de nombreux plats, dans les eaux de cuisson des pâtes, du riz ou des légumes, mais à forte dose il peut être un peu amer.

La population Annabi (32%) procure à l'usage thérapeutique ainsi que culinaire à la fois alors que ce n'est pas le cas pour les enquêtée de Tébessa.

Le romarin est utilisé de temps en temps juste en cas de nécessité pour la majorité de la population enquêtée (67% et 77%). Ce qui est logique pour les personnes qui n'ont pas de maladies chronique. Cependant fréquemment utilisée à 28% pour les Tébessi et seulement 7% pour l'échantillon enquêté d'Annaba et un usage modéré (rarement) 5% et 16% respectivement (Fig.19).

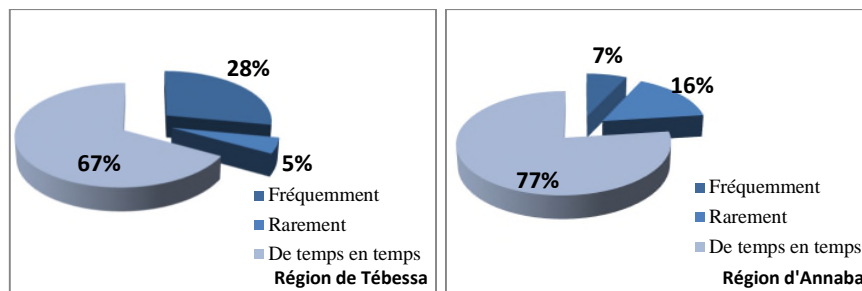


Figure 19. Répartition des enquêtés selon la fréquence d'utilisation.

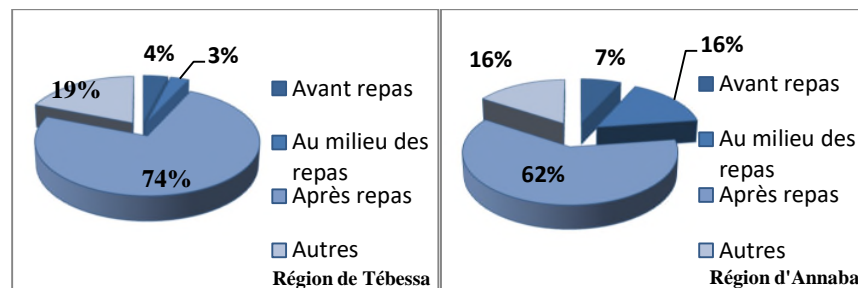
Le romarin est reconnu pour de nombreuses finalités est indiqué pour traiter ou remédier plusieurs maladies. Des études diverses ont montré ces effets sur différentes parties de l'organisme : hépato-protecteur et cholérétique (Joyeux, 1990), anti-mycosique (Steinmetz, 1988; et Durakovic & Durakovic, 1979) et anti-bactérien (Akroum, 2008)...etc. Sa composition chimique limite le développement de certains agents pathogènes.

Nos enquêtés utilisent le romarin pour soulager différentes quintes d'une manière traditionnelle comparable : en cas de grippe (soulage la toux, maux de gorge, tête), problèmes digestive (douleur d'estomacs, troubles intestinaux), stimulation de la circulation sanguine (tension artérielle), atténuation des muscles douloureux, la fatigue et le stress. Aussi pour inciter la concentration et en cas de chute de cheveux.

Par ailleurs, chaque population à part a donné aussi d'autres vertus : les Tébessi interrogés citent que la plante est efficace pour traiter les troubles respiratoires (les allergies), l'inflammation du foie, les rhumatismes (jambe et main) et les maux du dos.

Et pour ceux d'Annaba rajoute que : c'est un antioxydant, désinfectant oculaire (conjonctivite), traite la colopathie, diarrhée, douleur de ventre et diabète. Aussi, est une teinte pour les cheveux blancs et un amincissant.

Sa prescription peut être avant, au milieu ou après les repas. Les enquêtés de Tébessa et d'Annaba prennent la plante après les repas 74% et 62% respectivement suivi de la tranche qui le consomme en cas de nécessité c'est-à-dire sans considération du moment des repas 19% et 16% presque à un taux identique. Au milieu des repas 3% et 16% et avant les repas taux minime 4% et 7% (Fig.20).



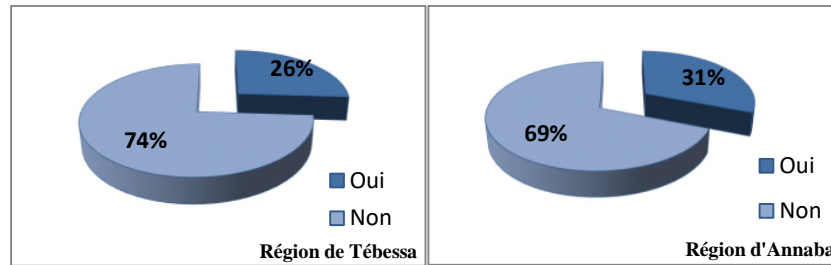
\*Autres : en cas de nécessité.

**Figure 20.** Répartition des enquêtés selon le moment d'administration.

Généralement, l'HE de romarin diffuse dans une huile végétale, conseillée pour masser le dos et la plante des pieds et indiquée contre la fatigue.

Mais nos interrogés préfèrent et connaissent mieux l'effet et le mode de préparation de la plante aromatique que ces extraits (HE). Notre résultat est rationnel, l'HE au marché Algérien est non disponible et si elle existe se vend à des prix chères.

D'ailleurs nos résultats le confirme, l'usage de l'HE de romarin est infime dans les deux régions : 26% (Tébessa) et 31% (Annaba) (Fig.21).



**Figure 21:** répartition des enquêtés selon l'utilisation de l'HE.

En même temps, le peu d'interrogés qui l'appliquent rarement, ont donné différentes façons :

*Pour Tébessa (26%):* l'utilise en application locale ; soin des cheveux une fois par semaine, en massage corporel sur tout le corps et en inhalation. Aussi, mettent deux gouttes d'HE sur un morceau de sucre ou du miel pour avoir une meilleure concentration.

*Pour Annaba (31%):* l'indique pour déstresser en buvant une goutte d'HE du romarin dans de l'eau. Egalement, pour les douleurs articulaires, arthrose et soin pour les cheveux.

Aussi, est rajouté en milieu de culture microbiologique, extraits commerciaux et parfum.

Ces enquêtés qui optent pour l'usage de la plante entière du romarin ainsi que son extrait, ont donné quelques recettes (usage thérapeutique ainsi que culinaire). Les résultats trouvés sont plus ou moins différents.

*a. Pour les enquis de Tébessa l'utilisent:*

***En massage :***

- \* Huile d'olive + romarin ;
- \* poudre de romarin + huile de romarin ou ;
- \* sur le cuir chevelu, HE de romarin pur puis mettre une serviette chaude laissez pendant 30 minutes (lavage au champoing).

***Pour traiter les maux de gorge :***

- \* Poudre de romarin + miel ;
- \* Poudre de romarin + poudre de limon + miel.
- \* 250g de romarin dans un litre d'eau en infusion.

***En culinaire :***

- \* Pour donner un meilleur goût aux plats au four et à la pizza.

*b. Pour les enquêtes d'Annaba l'utilisent:*

***En bain.***

***Prescrit pour traiter les bronchites :*** romarin + huile d'olive en patte.

***Hypoglycémiant :***

\* Une dose de la plante en deux doses d'eau (infusion).

***Pour améliorer la croissance des cheveux***

\* l'HE+ huile d'olive + cannelle.

***En culinaire :***

\* L'eau de riz + HE.

\*Arôme pour les plats au four, pain, pizza, et viandes grillées.

Toute la population de Tébessa assure que la plante du romarin est très efficace, et comme tout médicament 17% d'entre eux mentionnent qu'elle peut provoquer des dommages rénaux, irritation de l'estomac et de l'intestin...etc. Cependant 20% des Annabi les contrariées et disent que le romarin n'est pas tellement efficient.

## **II. Zone d'échantillonnage**

La région d'échantillonnage Youkous-El Hammamet (Tébessa) fait partie des régions Algériennes de l'Est, d'un massif montagneux (d'importantes forêts) parallèle à la côte nord de la Tunisie. Région rocheuse et d'un sol calcaire, son climat est semi-aride. La population se caractérise par son extrême jeunesse et son fort taux d'urbanisation. Zone riche en plante médicinales aromatiques entre autre le romarin.

Les conditions externes soit géographiques (latitude, altitude), édaphiques (nature du sol) ou climatiques (ensoleillement ou photopériodisme, température, pluviométrie) ont un effet sur la composition des essences (Olle and Bender, 2010).

### **1. Coordonnées géographiques**

La superficie globale de la Wilaya de Tébessa est de 13.878 Km<sup>2</sup> (Medarag et Boubir, 2012) situé au Sud-Est Algérien, appartient au domaine de l'Atlas saharien oriental aux confins Algéro-Tunisiens (Seghir, 2014). Aux coordonnées géographiques suivantes : latitude 35,42° nord, longitude 8,12° ouest, altitude 863m (Brunet et al. 2014). La position géographique décrite est favorable pour le développement de la plante du romarin, poussant en étage végétal méso-méditerranéen où l'altitude est comprise entre 600m et 1000m (Zanndouche, 2015).

La zone Hammamet est subdésertique, ces coordonnées géographiques sont 35°26'56''N et 7°57'23'' E en DMS (degrés, minutes, secondes) fait partie du bassin versant de l'Oued Medjerda, sous bassin de l'oued ksob. Appartient au domaine des hautes plaines de l'Est algérien précisément sur la zone de Nememcha.

Youkous, la zone d'étude est située à quatre kilomètres du chef-lieu de la commune de Hammamet à une vingtaine de kilomètre au sud-ouest du chef-lieu de la wilaya de Tébessa. Elle occupe une superficie totale de 22 hectares dont 1,9 hectares abritent deux pôles d'habitants, Ras Essour et El Medda.

Région caractérisée par une source d'eau minérale jaillissant d'une zone montagneuse culminant à 1300mètres d'altitude, connue pour ses eaux minérales, et une admirable forêt appelée localement « El Ghaba » traversée par l'oued Bouakouz. Fut découverte par les romains qui ont fondé la ville de theveste aujourd'hui Tébessa.

- Au Sud: la ligne de partage des eaux des deux bassins Chéria-Tébessa.
- A l'Est: Djebal Mestiri et Djebal Estah
- A l'Ouest: Djebal Gaagaa

Elle est drainée principalement par l'oued Kebir et l'oued Chabro.

## **2. Aspect climatique**

Le climat tient une place essentielle dans l'interface nature-culture. Ça se traduit par le facteur clé de croissance et de développement des plantes qu'est l'exigence thermique.

La région de Tébessa est caractérisée dans la période comprise entre les années 1972-2009 par une température moyenne de 15 °C, annuelle moyenne 15,7°C et 16,3°C précisément à Youkous. Cette température est idéal pour la poussé du romarin et pour l'étude de l'évaporation et de l'évapotranspiration qui intervient dans le développement du rythme biologique des végétaux d'une façon générale (Benini, 2007).

D'autre part, le climat de Youkous est subtropical humide sans saison sèche selon la classification de Köppen-Geiger. Cela est favorable pour que les végétaux puissent essentiellement l'eau à leur survie dans la terre et absorbent l'humidité présente dans l'air. Tout dépend de l'hygrométrie du lieu et des origines de la plante.

D'ailleurs, la pluviométrie annuelle de la région de Tébessa n'excédant pas les 350 mm, et les précipitations variait de 307 à 625mm. Celle de Youkous sont peu importante (371mm).

On remarque une petite différence concernant la température et les précipitations de la zone d'étude par rapport à la ville.

Région ensoleillée, les rayonnements pénètrent dans les tissus, donnant ainsi la vie aux plantes soumises à son action variable avec l'opacité et la transparence des organes. C'est un agent favorable à la vie du végétal spécifiquement le romarin.

Tous ces paramètres climatiques sont importante pour l'évolution de l'espèce végétale, offre à la fois possibilités de se développer pour l'une et contrainte pour d'autres.

### **3. Aperçu pédologique**

Les pédologues qualifient de sol les décimètres supérieurs de la surface de la terre, généralement très vivants et poreux. Constitue un support où les plantes prennent racines et fournit des éléments nutritifs (eau, minéraux et oligo-élément) essentiels pour leurs croissances. Ces caractéristiques du sol sont souvent un facteur déterminant de la nature de végétation et aux cultures les plus adaptées, et pouvant donner un bon rendement.

- Le sol de la région de Hammamet est constitué de cailloutis de calcaires enveloppés dans une matrice plus ou moins argileuse.

- La rétention de l'humidité : le sol de Youkous-Hammamet est humide, cela s'explique par l'origine des eaux minérales qui s'infiltrent profondément dans le sous-sol pendant des années. Aussi vu la nature argileuse du sol dotée de nombreux cailloux et du calcaire, lui donne ainsi une capacité de retenir de l'eau qui permet aux plantes de survivre. En absence de cette rétention, l'eau s'épuise rapidement dans le sol.

- Le sol à Hammamet-Youkous est fertile vu sa richesse en oligo-éléments venant des sources minéraux.

- Le pH du sol de la région d'étude est 7,5 ce qui concorde avec les besoins de la culture du romarin, qui affectionne un endroit ensoleillé, dans un sol bien drainé dont le pH varie de 5 à 7,5. De ce pH dépendra le choix des végétaux car, il a une influence sur la capacité de la plante à assimiler les divers nutriments.

Tous ses paramètres conditionnent le développement des espèces botaniques et assurent une activité physiologique et biologique optimum. Ils sont favorables à la poussée du romarin ainsi que pour d'autres espèces spécifiques à la région d'étude.

Les conditions édaphiques représentent autant de causes potentielles de variations de la composition chimique d'une plante aromatique donnée (Mohammad et al., 2009 et Aprotosoia, 2010). Ainsi, les forêts de Hammamet sont essentiellement peuplées de pin d'Alep et de romarin, et des plantes qui s'adaptent le mieux aux conditions climatiques de la région, elles n'exigent pas beaucoup d'eau et s'adapte un sol à base calcaire.

### III. Matériel végétal

#### 1. Identification de l'espèce

La plante du romarin cueillis de Youkous appartient à la famille des lamiacées, le genre *Rosmarinus* dérivant du grec « ros » et « marinus » faisant référence à son origine balnéaire d'origine méditerranéenne. Appartient à l'ensemble des arbustes vivaces touffus, principalement la plus répondeu en Algérie précisément Tébessa (Photo.8).



**Photo 8.** *Rosmarinus officinalis* L. à l'état spontané.

Ces critères botaniques morphologiques macroscopiques spécifiques de l'espèce sont :

- Les feuilles de la plante cueillie sont persistantes, opposées, érigées et touffues sur les branches, rigide et de couleur vert luisant foncé au-dessous et clair tomenteuse au-dessus. Elles sont étroites aromatique et parfumé lors de l'écrasement.
- Ses tiges sont quadrangulaire cotonneuse.
- Les sommités sont axillaires.
- Ces fleurs sont violettes.

Il existe de nombreuses formes et couleurs de romarin mais, après cette description botanique nous avons pu confirmer qu'il s'agit effectivement de *Rosmarinus officinalis* L. C'est l'espèce la plus connus du genre (Guzman, 1999).

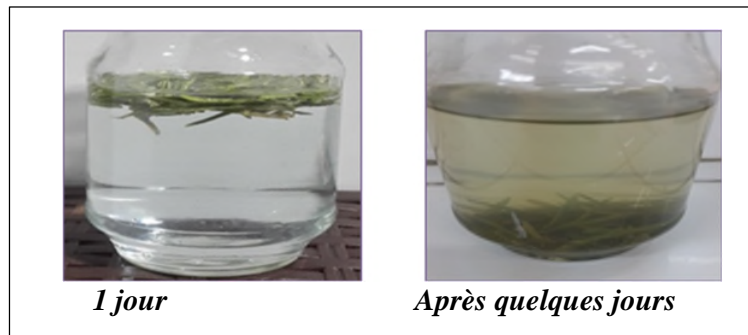
## 2. Teneur en eau

La teneur en eau dans l'échantillon du romarin de la région de Tébessa récoltée en mois de juin 2011 est de 21,7%. Cette valeur est estimée supérieure par rapport à la norme de la pharmacopée européenne (2005) qui est de 10% (Pharmacopée Européenne 2005).

La valeur signalée par la bibliographie correspond à la moyenne de plantes récoltées, la récolte était faite à différentes saisons du développement de la plante. En plus, les conditions édapho-climatiques et l'âge de la plante ne sont pas les mêmes.

## 3. Description anatomique

➤ après quelques jours de l'imprégnation de nos feuilles fraîches du romarin dans de l'alcool et de l'eau, on remarque que les feuilles ont précipitées et la solution est devenue trouble, témoin d'élimination du maximum de chlorophylle (Photo.9)



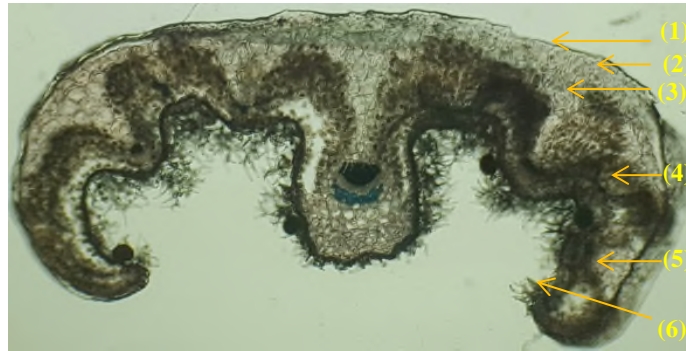
**Photos 9.** Feuilles de romarin imprégnées dans une solution d'alcool (Labo. Botanique).

➤ l'examen microscopique des coupes histologiques des feuilles réalisées et colorées nous a permis l'observation des structures suivantes :

- (1) Cuticule.
- (2) Epiderme supérieur.
- (3) Parenchyme palissadique.
- (4) Parenchyme lacuneux.
- (5) Epiderme inférieur.
- (6) Poils tecteurs et sécréteurs (Photo 10).

Contrairement à la tige et à la racine, la feuille est plate et, par conséquent l'anatomie diffère.

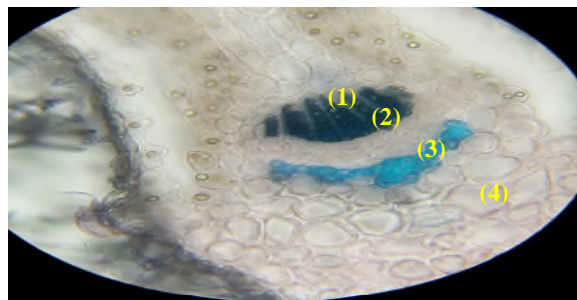




**Photo 10.** Coupe transversale de la feuille de *Rosmarinus officinalis* L. observée sous microscope optique (G : X 40) (Lab. Botanique)

La coupe histologique transversale de la feuille de *Rosmarinus officinalis* présente :

- a. Une nervure principale, formée essentiellement par un faisceau. Elle comprend :
  - (1) Un protoxylème ;
  - (2) Un métaxylème ;
  - (3) Un phloème ;
  - (4) Un collenchyme (Photo.11).



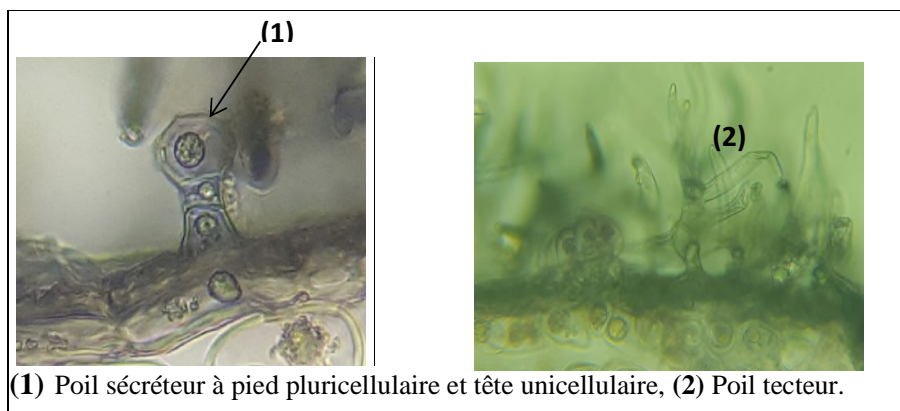
**Photo 11.** Nervure principale de la feuille de *Rosmarinus officinalis* L. observée au microscope optique (G : X 40) (Lab. Botanique).

b. Un Mésophile hétérogène composé d'un parenchyme palissadique ou chlorophyllien sur la face supérieure, siège de la photosynthèse, et d'un parenchyme lacuneux ou aérénchyme sur la face inférieure, siège des échanges gazeux (Photo.10).

c. Des épidermes supérieur et inférieur. Ils sont pourvus de poils épidermiques de deux types :

\* *Les poils tecteurs* : ils sont unicellulaires unisériés, ils jouent un rôle de protection car ils servent à limiter les pertes en eau par transpiration.

\* *Les poils sécréteurs* : caractéristique de la famille des Lamiacées, ils sont très abondants, et accumulent dans leurs cytoplasmes des essences, souvent sécrétées sous la cuticule (Planche 4).



**Planche 4.** Structures anatomiques des feuilles de *R. officinalis* (Labo. Botanique).

Les caractéristiques anatomiques de cette espèce du romarin dénotent une richesse en poil plein d'huile essentielle.

#### IV. Huiles essentielles

##### 1. Extraction et rendement en huiles essentielles

L'extraction de l'HE des parties aériennes (feuilles) par hydrodistillation a donné un rendement variant de 1,69ml d'HE /100g de matière sèche à 2,08ml d'HE/ 100g de matière sèche.

En moyenne nous avons obtenu un rendement de 1,94ml d'HE/100g de matière sèche.

La confrontation des résultats avec ceux obtenus par GARNERO en 1996, sur des échantillons procurés de la Tunisie (0,27-0,46ml/100g de matière sèche) a révélé l'existence d'une différence nette.

##### 2. Etude analytique de l'huile essentielle extraite

###### 2.1. Propriétés organoleptiques

Les caractéristiques organoleptique de notre HE de *Rosmarinus officinalis* récoltée dans la région de Youkous-Hammamet (Tableau 6) concordent avec ceux décrites par l'arommatologue Stéphanie Monnatte Lassus et Joelle Le Guehenec, présidente de l'école française d'aromathérapie Intégrative (EFAI, 2017). Qui notent que, cette huile qui est jaune très clair à jaune verdâtre et dégage un parfum frais, agreste et légèrement camphré est une spécificité de l'HE de Romarin à cinéole, cela donne une idée sur le chémotype de la plante.

**Tableau 6.** Caractéristiques organoleptiques de *Rosmarinus officinalis*.

	Aspect	Couleur	Odeur
<b>Norme AFNOR</b>	Liquide mobile, limpide	Presque incolore, jaune pale	Caractéristiques fraîches, plus ou moins camphré selon l'origine.
<b>HE-Youkous</b>	Liquide mobile	Jaune très clair	Camphrée

## 2.2. Composition chimique de l'huile essentielle extraite

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CPG/SM) de l'échantillons d'HE de romarin considéré, a permis d'identifier plus de 96,46% des constituants avec trois non identifiées (3,54%).

Notre HE renferme du camphre, de cinéol, et de pinène en quantité prédominante par rapport aux autres composants (Tableau 7).

**Tableau 7 :** Composition chimique de l'huile essentielle du romarin extraite en comparaison avec d'autres profils chromatographiques.

Composants Régions	$\alpha$ pinène	$\beta$ pinène	p-cymène	Limonène	1,8 cinéol	Camphre	Borneol	4-terpineol	$\alpha$ -terpineol	Bornyl acetate	Bisabolol
	(Tébessa-Algérie)	4.93	4.55	0.46	0.61	<b>63.65</b>	14.23	1.80	0.64	4.24	0.49
Arabie Saoudite	19.48	1.20	1.28	/	23.16	4.10	4.51	/	2.43	/	/
Espagne	18-26	/	/	2.5-5	16-25	13-21	2-4.5	/	/	0.5-2.5	/
Maroc-Tunisie	9-14	/	/	1.5-4	38-55	5-15	1.5-5	/	/	0.1-1.5	/
Suisse	20.61	/	/	3.73	17.95	12.99	13.27	/	/	4.77	/

Globalement, le profil biochimique de l'HE est plus ou moins différent du point de vue qualitatif et quantitatif, par rapport aux autres décrites au tableau 7. Cependant sa richesse en 1,8 cinéol (63,65%), qui le compose principalement le caractérise ; la plante est alors de chemotype *R. officinalis* à 1,8 cinéol. Suivi du camphre (14,23%).

L'étude comparative de l'analyse chimique de notre HE de *R.officinalis* avec ceux d'Arabie Saoudite (Guetat et al., 2014), Espagne, Maroc-Tunisie et Suisse (Carron et al., 2013), a montré que le bisabolol et le 4-terpinéol n'apparaît que dans le romarin de Tébessa-Algérie. On note également une teneur plus faible en  $\alpha$ -pinene (4,93%).

Par ailleurs, l' $\alpha$  terpinéol,  $\beta$  pinène, et p-cymène sont présent que dans notre échantillon et celui de l'Arabie saoudite.

Le camphre a un taux de 14,23%, est comparable à celui destiné par la pharmacopée européenne échantillon type Espagne, Maroc-Tunisie.

L'HE considérée ne renferme que des constituants terpéniques où la majorité sont des mono-terpènes (95,6%) et un seul sesquiterpène le bisabolol (0,86%).

L'étude comparative de notre résultat par rapport à d'autres profils a montré que :

La composition chimique de notre HE est comparable à celle d'autre pays comme la Tunisie, huiles grecques et aux normes commerciales indiquée par les auteurs Boelens en 1985 et Arnold et al. en 1997. Celui de la Tunisie est riche en cinéole (40,1% - 55,1%) et contient les monoterpènes habituels (Lawrence, 1997).

Comparativement, les romarins marocains présentent une teneur importante en l'un des trois composées : ( $\alpha$  pinène 37,0 % - 40%, Rabat) ; (cinéole 58,7% - 63,7%, El Ateuf) ; Le camphre (41,7% - 53,8%, Taforhalt) (El Amrani et al., 2000).

Par contre en Egypte, on trouve deux composition l'une dominée classiquement par le camphre l'  $\alpha$  pinène et cinéole. L'autre riche en verbénone, acétate de bornyle et en camphre (Soliman et al., 1994).

Le romarin cultivé du Nort - Est d'Espagne présente une HE parmi lesquelles le camphre et l'  $\alpha$  pinène sont les constituants majoritaires (Guillen Maria et al., 1995).

En fin le romarin de Corse et de Sardaigne contient une HE riche en Verbénone, acétate de bornyl et  $\alpha$  pinène.

L'HE de romarin d'Algérie a fait également objet de quelques études ainsi :

Le résultat de l'étude analytique réalisée par Boutekedjiret et al. en 2003, concernant l'extrait de romarin de la région de Bibans, située à 200 km à l'Est de la wilaya d'Alger, a révélé la présence d'hydrocarbures mono-terpéniques, mono-terpènes oxygénés et sesquiterpènes. Par rapport à nos résultats, la différence de ces composants est quantitative.

La composition de l'HE de romarin de Tlemcen (plante cultivée) le camphre est le composé principal 13,8% et Honeine (état spontanée de la plante)  $\alpha$  pinene 23,1%

composé majoritaire (Atik Bekkara, 2007). Les autres constituants sont plus ou moins comparable qualitativement à celui de Youkous Hammamet.

L'échantillon provenant de Bourdj Bouariridj ne contient que : cinéol 7,5%, camphre 21,1%, bornéol 10,1%,  $\alpha$  tepinéol 9,5% et existence du (E)- $\beta$ -caryophyllène (Benhabiles, 2001). Peu de composants mais comparable à notre échantillon avec des proportions bien différentes.

Toutes ces variations (qualitatives et quantitatives) rencontrées dans la composition chimique de l'HE de *R. officinalis* (Youkous-Hammamet) par rapport à certains travaux antérieurs, peuvent être dues à certains facteurs écologiques environnementales tels que : le climat, la nature et les composants du sol, l'altitude etc.

D'autres facteurs peuvent aussi influencer la composition chimique de l'extrait : la partie de la plante utilisée, l'âge de la plante, la période de la récolte, les techniques d'extractions, les conditions de stockage, les paramètres d'analyses lors de l'identification des composés et la période du cycle végétatif, ou mêmes des facteurs génétiques. (Bruneton, 2009; Karoussou et al., 2005).

Et de ce fait, la composition chimique de l'HE de la plante peut varier à l'intérieur d'une même espèce. Cette variété chimique est communément appelées chémotype.

### **2.3. Les classes biochimiques de l'huile essentielle extraite**

Les composants chimiques de l'HE de l'espèce du genre *Rosmarinus* étudiée sont caractérisés principalement par la classe biochimique des phénols mono-terpénique (80%), des hydrocarbures mono-terpéniques et presque une absence totale d'esters.

Par ailleurs, l'HE étudiée est riche en mono-terpènes phénoliques principalement le 1,8 cineol (Tableau 8). Il rend la peau perméable et affecte l'application topique de médicaments comme l'halo1péridol en améliorant la perméabilité cutanée (Buckle J., 2003)

Il faut mentionner aussi que les phénols ce sont les antimicrobiens les plus connus décrits à ce jour (Kempf et al., 2011).

**Tableau 8.** Classes biochimiques des composants constitutifs de l'HE extraite de *Rosmarinus officinalis* (Youkous-Hammamet).

Classes biochimiques	Types	Composés
<b>Monoterpènes</b>	Acycliques	myrcène , linalol
		Myrcène linalol
		terpinéol-4, $\alpha$ -terpinéol cinéole , limonène
	Aromatiques	P-cymène
	Bicycliques	$\alpha$ -pinène , camphène verbénone , camphre bornéole , acétate de bornyle
<b>Sesquiterpènes</b>		Bisabolol

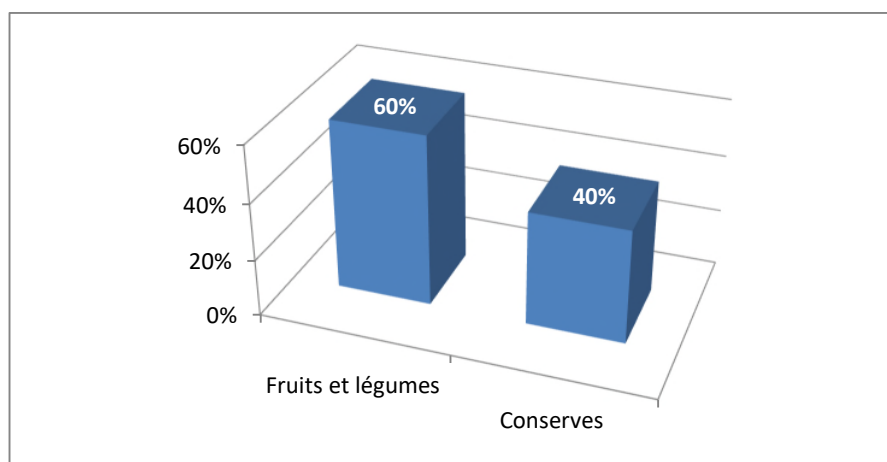
En tant que métabolites secondaires des plantes, les monoterpènes présentent une diversité chimique très importante, permettent à la plante de se défendre face aux facteurs de stress biotique et abiotique, constituent des signaux chimiques à travers lesquels la plante communique avec son environnement (plantes et autres organismes), n'ont pas de fonction universelle et sont différemment représentés dans les divers familles, genres et espèces, ce qui permet de les utiliser comme marqueurs chémotaxonomiques (Marlet , 2011)

## V. Activité anti-fongique de l'huile essentielle extraite

Les produits alimentaires peuvent être dégradés par une multitude de micro-organismes. Pour être au plus près de cette réalité, dans notre étude nous avons retenues des souches fongiques connues d'être des contaminants alimentaires de premier degré. Consommées à long terme deviennent une principale cause de différentes pathologies.

### 1. Souches fongiques test-objets

Nous avons répartis la microflore collectée aléatoirement selon leur origine alimentaire ; le résultat montre que le degré de contamination des légumes et fruits produits consommés quotidiennement est élevé (60%) par rapport à celle des conserves (40%) (Fig.22).



**Figure 22.** Répartition des souches fongiques test-objet selon leur origine alimentaire.

Ce résultat témoigne que la protection naturelle par la peau des végétaux peut être brisée et des infections peuvent survenir au verger (leurs revêtements externes abritant de nombreux micro-organismes de la flore du sol, de l'eau, et même des contaminants de l'air).

Toutes ces détérioration ne se révèlent qu'après récolte, au cours des opérations de triage, d'emballage et en entrepôt, et parfois même à l'échelon domestique quelque jours seulement avant leur consommation.

Par ailleurs, le bon conditionnement industrielle (boîtes hermétiquement clos et étanche vis-à-vis les échange atmosphériques et microbiologique qu'elles peuvent avoir lieu entre le milieu externe et le contenu de la boîte) et l'ajout d'additifs alimentaire, laisse apparaître peu de contaminants. Permettant ainsi, de répondre aux exigences du consommateur comme un produit disponible toute l'année. Les incidents sont rares sauf cas de mauvaise conservation thermique ou boîte endommagé lors de l'entreposage.

### **1.2. Identification des souches fongiques test-objet**

Le résultat global de l'identification a permis d'intégrer toutes les souches collectées à la famille des champignons filamenteux.

Les isolats ont été identifiés sur la base des caractères macroscopiques et microscopiques. L'observation de la couleur et la texture de la colonie, ainsi que leurs structures micro-morphologiques permettent généralement de faire la distinction entre les genres de souches fongiques.

### 1.2.1. Aspect macroscopique

A partir du troisième jour après ensemencement, on remarque une légère poussée de toutes les souches fongiques presque identique et de couleur blanche.

Ensuite, la texture y compris la couleur des filaments fongiques a pris de l'ampleur et de spécificité. Cette dernière se différencie d'une souche à l'autre selon le genre et l'espèce de la microflore testée.

Après un délai de culture de 5 à 7 jours à température ambiante, on remarque :

- Le genre *Aspergillus* a poussé rapidement. Il est différent par sa morphologie macroscopique : ras à poudreux, veloute et parfois cotonneux, de couleur variée en fonction de l'espèce.

- *Fusarium sp.* s'est développé rapidement sur la gélose à la pomme de terre et au dextrose (PDA). Ces colonies sont de couleur blanches ensuite les mycéliums aériens sont devenus teinter en rose (la couleur change facilement) avec des surfaces veloutées à cotonneuses (Photo. 12).



**Photo 12.** Aspect macroscopiques de la souche *Fusarium sp* (Labo. Mycologie-CHU).

- *Penicillium sp.* : la croissance de ces colonies était rapide, d'aspect poudreux, et sa couleur est de tons vert et parfois blanc (Photo.13).



**Photo 13.** Aspect macroscopique de la souche *Penicillium sp.* (Labo. Mycologie-CHU).

Les résultats de l'identification macroscopique des souches fongiques, observées sur la surface du milieu de culture favorable à la poussée des espèces sont comparables



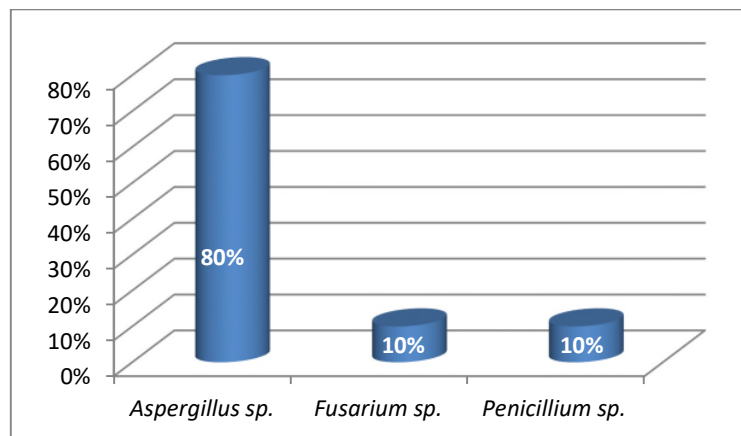
à ceux décrit par Cahagnier et Richard-Molard en 1998 (Tableau 9).

**Tableau 9.** Résultat de l'identification macroscopique des souches fongiques.

Observation macroscopique		
Souches	Couleur des colonies	Aspect des colonies
<i>Aspergillus niger</i>	Blanches puis jaune et enfin noirâtre.	Granuleux
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Blanches puis vert foncé à vert-gris.	Poudreux
<i>Aspergillus flavus</i>	Blanches puis jaune à jaune-vert.	Poudreux
<i>Fusarium sp.</i>	Blanches puis rose-violet	Cotonneuses
<i>Penicillium sp.</i>	Blanches	Poudreux

On y trouve que la majorité des souches retenues appartiennent au genre *Aspergillus* : 17 souches d'*Aspergillus niger*, 12 d'*Aspergillus fumigatus* et 3 d'*Aspergillus flavus*, 2 *Fusarium sp.* et 1 *Penicillium sp.* Ces souches sont connues d'être la cause de différentes maladies.

Quatre-vingt pourcent des souches collectées et retenues dans cette étude appartiennent au genre des *Aspergillus*, les *Penicillium sp.* et les *Fusarium sp.* représentent le même taux estimé à 10% chacun (Fig.23).



**Figure 23.** Répartition des souches fongiques retenues selon l'espèce.

Ces trois espèces identifiées sont connues d'être les principales moisissures susceptibles d'altérer les denrées alimentaires et de produire différentes mycotoxines.

Elles engendrent ainsi un risque pour la santé humaine et les animaux supérieurs et des pertes économiques non négligeables pour différents maillons de la chaîne alimentaire.

La dominance du genre *Aspergillus* trouvée après collecte aléatoire est commune. Malgré que ces espèces soient d'importance industrielle, ce genre comprend un grand nombre d'espèces pathogènes opportunistes et de toxines qui représentent la majorité de la pollution agricole ayant un impact économique considérable (Maribel et al., 2014).

La croissance de ce genre considéré est devenu défavorable au développement des industries agro-alimentaires, principalement celle de rang toxigènes élaborant des mycotoxines (aflatoxine B1, B2, G1 et G2) substances connu comme les plus toxique (hautement cancérigènes, affectant le foie...etc). Elles sont particulièrement produites par *A. flavus*. (AE/40, 1999 ; Sheikh-Ali SI et al., 2014)

### 1.2.2. Aspect microscopique

a. *Aspergillus sp.* : au sein du même genre d'*Aspergillus* on trouve des aspects microscopiques différentes qui spécifie l'espèce (Tableau 10).

**Tableau 10.** Résultat de l'aspect microscopique des souches d'*Aspergillus*

	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>
<b>Tête aspergillaire</b>	Unisériée, en colonne compacte, assez grande	Unisériée ou bisériée, petite en colonne	Bisériée radiée, noire à maturité
<b>Vésicule</b>	hémisphérique	sphérique	globuleuse
<b>Phialides</b>	Directement portées par la vésicule, dressées	Directement portées par la vésicule (unisériée) ou portées par des métules (bisériées)	Insérées sur la vésicule par des métules (bisériée) disposées sur tout le pourtour de la vésicule
<b>Conidies</b>	Globuleuses, vertes, échinulées, petites.	Globuleuses à subglobuleuses, vert pâle, échinulées	Globuleuses, brunes, échinulées, souvent disposées en chaîne
<b>Conidiophore</b>	Court, lisse et incolore, évasement progressif au sommet	Long, hyalin, verruqueux avec des aspérités.	Lisse, hyalin ou brunâtre dans sa moitié supérieure, très long

L'analyse microscopique de la culture a mis en évidence le conidiophore et la tête aspergillaire, dont les caractéristiques ont affiné l'identification.

Selon les résultats trouvé et regroupés au Tableau 10 : la forme des têtes aspergillaire est soit unisériées ou bisériées, portant des vésicules globuleuses sphérique

ou hémisphérique, des phialides, conidies et conidiophores bien distinct d'une souche à l'autre.

Ce qui a dévoilé la présence de trois espèces différentes d'*Aspergillus* collectés: *A. niger*, *A. fumigatus* et *A. flavus*. Cela confirme nos conclusions macroscopiques.

**b. *Penicillium* sp.** : au microscope ce genre est à mycélium colonisé ; conidiophores isolés et ramifiés ; ces phialides sont branchés directement à l'extrémité du conidiophore hyalin, lui donnant ainsi un aspect de brosse (un pénicillus), et la chaîne des conidies est unicellulaires.

**c. *Fusarium* sp.** comprend :

- des hyphes filiformes dans les tissus ressemblent à ceux d'*Aspergillus* sp.
- ces filaments sont hyalins, septés, se ramifie aux angles aigus et droits.
- des macroconidies fusoides (grappes hyalines, multicellulaires, ovoïdes à cylindriques dans une tête). C'est une caractéristique du genre *Fusarium*.
- Présente des microconidies et des chlamydoconidies.

Cet aspect microscopique est comparable à ceux décrit par Marcio Nucci et al., 2009 et confirme qu'il s'agit du genre *Fusarium*.

Il faut noter que nos souches de *Fusarium* étaient repiquées du blé, cacahuètes et semoule. On peut dire qu'il peut s'agir de l'espèce *Fusarium graminearium* connue comme agent pathogène de la fusariose du blé (Marcio Nucci, 2009).

Cette espèce est présente dans le sol, peut jouer le rôle de saprophyte ainsi qu'agent pathogène agressif en affectant les racines, les graines et les jeunes plants chez une grande variété d'hôte (cultures économiquement importantes) entraînant en conséquence des pertes dues aux semences non viables et à l'affaiblissement ou la mort des plantules.

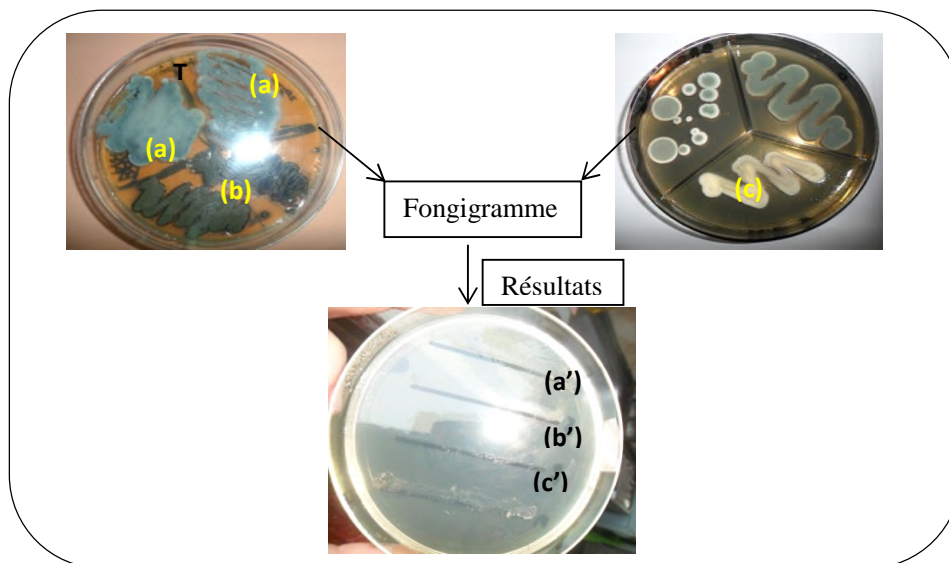
Cette menace que présentent généralement les champignons pourrait éventuellement affecter les semis (Kateryna et al., 2018)

## **2. Activité antifongique**

### **2.1.Fongigramme de l'huile sur les souches test-objet**

Il est connu qu'au sein d'un même genre, plus encore d'une même espèce de plante aromatique l'HE peut avoir des activités variables selon le micro-organisme considéré et les conditions environnementales de la plante. Ceci est rapporté par plusieurs auteurs entre autres Oussalah et al., en 2007.

Ce qui n'est pas le cas dans notre étude ; comparativement aux témoins le résultat du fongigramme a révélé une absence totale de croissance de toutes les souches fongiques test-objet considérées. Ce qui témoigne l'activité certaine de notre HE extraite de *R. officinalis* (Planche.5).



**Planche 5.** Résultat du fongigramme: (a) (a') *A. flavus*, (b) (b') *A. niger*, (c) (c') *Penicillium sp.* (Labo.Microbiologie).

Par ailleurs, des études antérieures sur l'HE de romarin révèlent une activité antimicrobienne avérées et indiquent des résultats similaires par rapport à celle trouvée dans notre étude sur les souches fongiques testées (Moreira et al., 2005 ; De Billerbeck et al., 2007 ; Ouibrahim et al., 2013 ; Lagrada et al., 2013 ; Boutabia et al., 2016).

En revanche la caractérisation quantitative de l'HE active à laquelle toute croissance fongique est stoppée est nécessaire.

### 2.2. Concentration minimale inhibitrice de l'huile extraite (CMI)

Il est connu, que l'HE contient plusieurs composants chimiques, très efficaces mais aussi dangereux. Certaines de ces essences utilisées en quantité élevée, peuvent représenter un risque de toxicité aigüe tel que coma, crise d'asthme, eczémas et irritations de la peau ...etc.

De ce fait, les résultats des CMI obtenues (tableau.11) de l'HE de *Rosmarinus officinalis* (Youkous-Hammamet) étudiée laissent apparaître une action anti-fongique intéressante. Ainsi, quelle que soit la souche fongique considérée on note des

modifications de l'aspect macroscopique et une dépigmentation des colonies déjà à la plus faible concentration (0,25%).

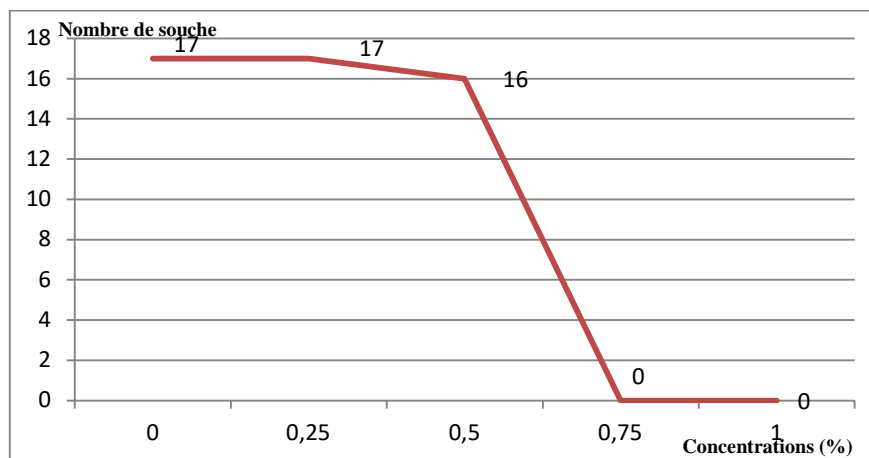
**Tableau 11.** Variation du facteur inhibiteur de l'HE étudiée sur les souches fongiques test-objet en fonction des concentrations.

Espèces [HE](%)	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Fusarium sp.</i>
0,25	+	+	+	+	+
0,50	++	++	++	+++	++
0,75	+++	+++	+++	+++	++
1	+++	+++	+++	+++	+++

+ : modification de l'aspect    ++ : diminution de croissance    +++ : absence de croissance

L'utilisation de concentrations supérieures de l'huile dans le milieu conduit à une intensification de l'activité inhibitrice qui sur la majorité des souches se traduit par une absence totale de croissance. En effet, considérant chaque espèce à part on note:

➤ Pour *A. niger* : comparativement aux cultures dans les boîtes témoins, les colonies des dix-sept souches d'*Aspergillus niger* ont montré une dépigmentation visible et une croissance diminuée avec des colonies de très petites tailles (Fig. 24).



**Figure.24.** Répartition des souches *A. niger* test-objet en fonction de la concentration de l'HE.

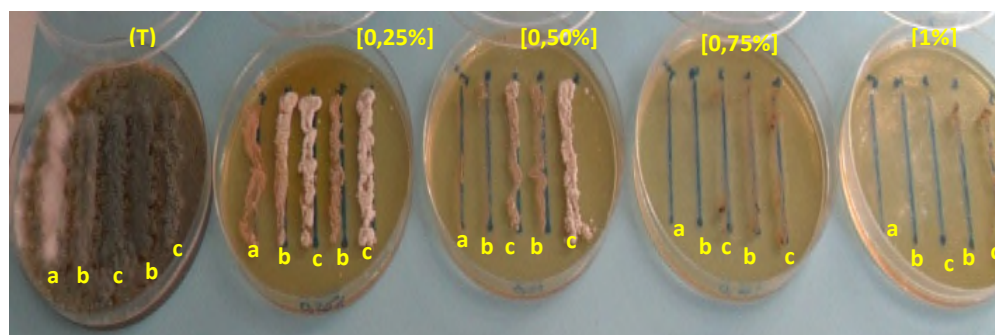
Ainsi, l'activité anti-fongique de l'HE est significative et est constante pour toutes les souches d'*Aspergillus niger* testées pour des concentrations de 0,25% et 0,50% excepté pour une seule souche pour laquelle la concentration de l'HE nécessaire à l'arrêt totale de la croissance avoisine les 0,75%.

A partir de la concentration 0,75% d'huile on note une absence totale de la poussée de la culture de toutes les souches testées. Donc, globalement pour les *A. niger* les CMI oscillent dans un intervalle allant de 0,25 à 0,75% (Tableau.10 ci-dessus).

On conclut que, même au sein d'espèces identique *Aspergillus* testées dans les mêmes conditions les résultats sont plus ou moins différents. Cet intervalle de concentration nécessaire pour l'inhibition de toute croissance fongique, témoigne un manque de spécificité de l'action anti-fongique de l'HE étudiée sur la cellule.

➤ Pour *A. fumigatus* et *A. flavus* : se caractérisent par un comportement comparable aux concentrations d'huile testée sur les espèces *A. niger*.

Après leurs dépigmentations visibles à 0,25% d'huile signifiant la CMI, on remarque une absence totale de croissance à 0,75% (Photo.14).



**Photo.14.** CMI des souches fongiques étudiées (a) *Penicillium sp.* ; (b) *A. Fumigatus* ; (c) *A. flavus*. (Labo. Microbiologie-UBMA).

Ce pouvoir anti-fongique sur *A. fumigatus* pourrait s'expliquer par la présence du 1,8 cinéol produit majoritaire de la composition chimique (Koffi et al., 2013). Situation décrite aussi par Hammer et al., en 2003.

On déduit que l'activité de l'HE de *R. officinalis* étudiée par fongigramme sur le genre *Aspergillus* révèle un aspect macroscopique similaire (dépigmentation) à une CMI identique, mais un arrêt de croissance de souche à de différentes concentrations selon l'espèce considérée.

*Penicillium sp.* s'est dépigmentée et sa croissance s'est considérablement dégradée à une concentration de 0,25% d'HE par rapport au témoin. Par contre, l'arrêt total de croissance s'est produit à 0,5% (Photo.13 ci-dessus).

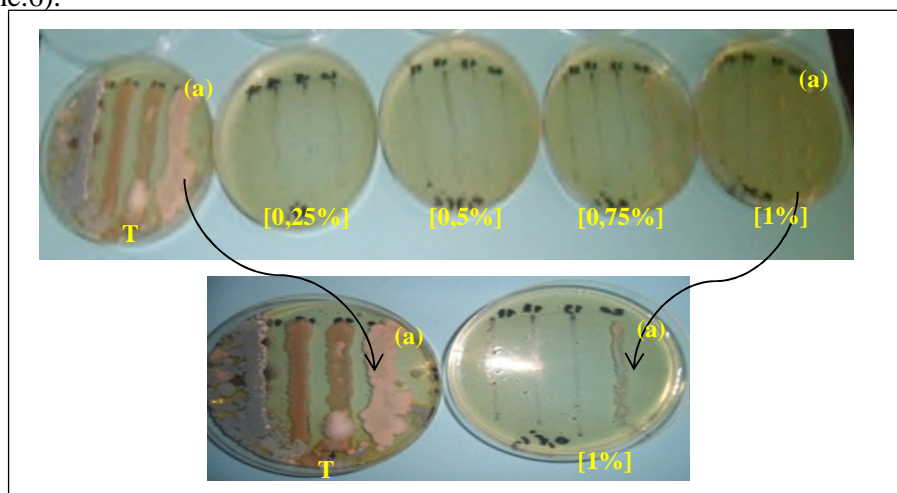
En revanche, Attrassi K. en 2017 a dévoilé l'activité du produit chimique perydroxan (mélange d'acide péracétique et de peroxyde d'hydrogène) sur *Penicillium sp.* Ce dernier conçu pour assainir les surfaces qui entrent en contact avec les produits alimentaires. Le test était réalisé in vitro à une large gamme de concentration sur la souche considérée. La réduction de la croissance mycélienne et l'inhibition totale était observé à une dose très élevée de 2,5%.

Cependant *Penicillium sp.*, souche responsable de maladie humaine et altération des fruits en post-récolte a subit une inhibition très efficace à de très faible concentration de l'HE (0,25%) de romarin de Hammamet-Youkous étudiée.

Compte tenu des résultats comparatives ; le cou des produits anti-fongiques est différent, les HEs sont plus cher mais leurs efficacité in vitro même à double dose reste une concentration faible et fiable par rapport aux produits chimiques de synthèse utilisés.

De ce fait le traitement par ces molécules bio-actives de notre extrait sera maintenu et répété.

➤ *Fusarium sp.* réagit différemment à l'HE testée, la souche a subit une dépigmentation à 0,25% (CMI). Alors que l'arrêt de la croissance est constaté à une concentration d'huile de 1%, estimée plus élevée par rapport aux autres souches testées (Planche.6).



**Planche.06.** CMI de la souche (a) *Fusarium sp.* ( Labo. Microbiologie-UBMA)

Au regard des résultats trouvé concernant toute la microflore testée par fongigramme, on note que la dépigmentation est observée à une concentration identique (0,25%). Cela reste un facteur majeur et déterminant faisant affaiblir la cellule.

Par conséquence le processus biochimique essentiel est inhibé, les spores deviennent inactives et ne posent pas un danger immédiat pour l'objet et donc il n'y aura pas de contamination probable par rapport à d'autres aliments.

Cet activité est du certainement aux composants de l'HE testée, se manifestant par modifications morphologiques des hyphes et perturbation directe de la membrane cellulaire fongique. Ce qui est indiqué par la majorité des rapports entre autre celle de Makhoulfi en 2008, cet action témoigne nos résultat.

D'autre part et après dépigmentation, on constate que le mécanisme d'action de l'HE étudiée par effet inhibiteur de croissance des colonies est différent d'une espèce à l'autre (*Aspergillus sp.* [0,50% - 0,75%], *Penicillium sp.* [0,5%] et *Fusarium sp.* [1%]).

La plus haute concentration est celle des *Fusarium* (1%), espèce récemment cité comme pathogènes opportunistes responsable d'infection superficielle ainsi que profonde. Connue en agro-alimentaire comme responsable de détérioration de la poussée de plante d'une façon générale (fusariose). Non seulement cet espèce agit différemment au contact de divers anti-fongiques mais également a développée des résistances à de nombreux d'autres même en état associée (Mallie, 2007).

Cela peut être expliqué par ces caractéristiques morphologiques structurales distinctes: parfois les filaments spécialisés chez les *Fusarium* portent des conidiophores à la fois microconidies unicellulaire ainsi que des macroconidies pluricellulaires. Aussi, la plupart de ces espèces sont connues pour avoir différentes types de spores macroconidies, microconidies, et ascospores (Gabriele Schiro et al., 2018).

Par ailleurs, Arikian et al. en 2001 a réalisé une étude comparative entre des souches *Aspergillus* ainsi que *Fusarium* en déterminant la concentration minimale effective (MEC) comme étant la plus faible concentration d'anti-fongique responsable sur la formation d'extrémités anormale d'hyphes. Les valeurs obtenues sont basses pour les *Aspergillus* et supérieures pour les *Fusarium*. Ce qui est équivalent à nos résultats.

Le mode d'action de l'huile se traduit par sa capacité de pénétrer et perturber la paroi cellulaire fongique, perméabilise les membranes cytoplasmiques et finalement endommage les membranes mitochondriales. En induisant un changement dans le flux



d'électrons à travers le système de transport, les teneurs en lipides, protéines et acides nucléiques des cellules fongiques (Arnal-Schnebelen et al., 2004).

Pourrait également perturber la dépolarisation de la membrane mitochondriale affectant les canaux ioniques, réduit le pH, affecte la pompe à proton et le pool ATP.

Ce changement de fluidité membranaire entraîne la fuite des radicaux, cytochrome C, les ions calcium et les protéines. Ainsi, la perméabilisation mitochondriale externe et interne des membranes entraînent la mort cellulaire par apoptose et nécrose (Yoon, Moon et al., 2000 ; Aktar et al., 2014).

On rajoute aussi, que le caractère lipophile du squelette hydrocarboné de l'extrait et l'hydrophilie de leurs groupes fonctionnels influence l'activité anti-microbienne (Agnieszka Nowak et al., 2012). Ces composants hydrophobes augmentent la perméabilité de la membrane cellulaire, en provoquant la fuite du contenu des cellules bactériennes et fongiques (Cox et al., 2000). Aussi, les hydrocarbures et la structure cyclique ont un rôle sur cette activité.

On note également que, la richesse de notre HE en sesquiterpène et son chémotype *Rosmarinus officinalis* à cinéol lui confère cette efficacité anti-fongique. Qualité rapportée par ailleurs, par Wilson et al. qui a dévoilé l'efficacité de 49 HE riches en alcools et lactones sesquiterpéniques sur *Botrytis cinerea* et détermine que l'extrait de romarin cinéol est l'un d'excellents inhibiteurs fongiques.

Calsamiglia et al., 2007 et Malecky, 2008. montrent que cet oxyde monoterpénique 1,8 cinéol, composé majoritaire (65,63%) de l'extrait étudié, lui confère une capacité anti-fongique par excellence. Son action est à l'origine de l'augmentation de la perméabilité membranaire, facilitant ainsi l'entrée d'autres composés connus comme actifs et notamment le 4-terpinéol (Carson et al., 2006). Ce composé considéré mineur (0,64%) par rapport aux taux des composants chimiques de l'huile extraite, contribue significativement à l'activité des HE par action synergique (Laghchimi, 2014 et Kehal Farida, 2013).

L'activité peut être aussi associée au camphre (14,23%) composé connu comme fongicide et aussi anti-bactérien (Bencheqroun, 2012).

Par ailleurs, on ne peut pas négliger le rôle du limonène (0,61%) responsable de l'action sur la perméabilité de la membrane cytoplasmique des cellules fongiques en

provoquant une perte des inclusions (Kehal, 2013).

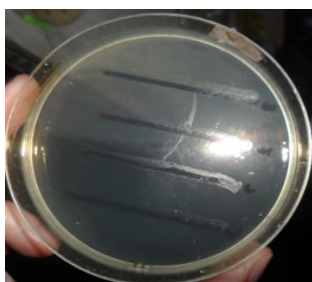
Et il est très probable que chacun des constituants de l'HE ait son propre mécanisme d'action (Rhayour, 2002).

### 2.3.Type d'activité :

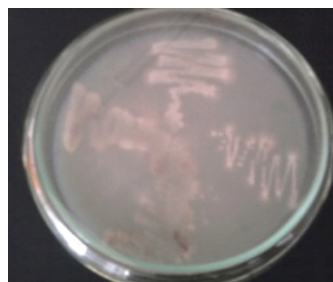
Le type d'inhibition de l'HE extraite de *R. officinalis* est fongistatique à 91,94%. Se traduisant par cette absence totale de croissance mycélienne ou par l'inhibition complète de la germination, rapporté par ailleurs par Robert et al., en 1990.

Par ailleurs, on remarque une réapparition de la culture dans le milieu exempt d'huile, témoignant ainsi qu'il s'agit bien évidemment d'une activité fongistatique. Donc, il n'y a pas de lyse cellulaire, le champignon peut régénérer et probablement il y aura présence de spore.

Ces colonies réapparues sont toute dépigmentée (de couleur blanche), ces changements sont observées quelques soit la concentration inhibitrice de croissance observée (Photo.15).



(1) Absence de croissance



(2) Repousse des colonies

**Photo. 15.** Activité fongistatique de l'HE testées (Labo. Microbiologie-UBMA).

Ce qui implique aussi que l'activité de notre huile n'est pas concentration dépendante, cela nous laisse répéter le traitement dans une périodicité bien définie (traitement prolongé et maintenu).

Le facteur inhibiteur trouvé, empêche la propagation des substances toxiques contenu à l'intérieur des cellules et donc la nocivité qui peut même être mortelles est stoppée.

Considérant chaque genre à part :

\* 83,34% des souches *Aspergillus* testées s'est montrée fongistatique dont : 88,23% *A. niger*.

\* 90,91% *A. Fumigatus* et la totalité d'*A. flavus*.

Aussi, le même type d'activité (fongistatique) est remarqué sur toute la microflore fongique du genre *Penicillium sp.* et *Fusarium sp.* testées.

Par contre l'aspect fongicide de l'extrait est infime, remarqué sur trois souches du même genre : deux *A. niger* et une *A. Fumigatus* (Tableau.12).

**Tableau 12.** Type d'activité de l'HE sur les souches fongiques étudiées.

Souches	<i>A. niger</i> (n=17)	<i>A. flavus</i> (n=3)	<i>A. fumigatus</i> (n=12)	<i>Penicillium sp.</i> (n=1)	<i>Fusarium sp.</i> (n=2)
<b>Type</b>					
<b>Fongistatique</b>	15	03	11	01	<b>02</b>
<b>Fongicide</b>	02	/	01	/	/

De ce résultat on note que l'activité est à la fois fongistatique et fongicide pour les *Aspergillus*. Ce qui est similaire au résultat trouvé par l'étude de Laib en 2012, en appliquant son huile de *Lavandula officinalis* sur le même genre étudié isolée de légumes sec. Cette différence de sensibilité à l'huile peut être due à certains facteurs à savoir le type de micro-organismes ciblés.

Cet aspect fongicide est aussi important et le traitement par l'extrait peut se faire une seule fois et à faible dose. Mais, après lyse cellulaires le problème de débris se pose. Ce type d'inhibition de l'extrait reste insignifiant par rapport au taux de l'activité de type fongistatique trouvé.

Pour l'instant nous ne pouvons qu'émettre des hypothèses ; d'abord les composés chimiques que possède notre HE extraite de *R. officinalis* de Youkous-Hammamet, et spécifiquement les sesquiterpènes seraient probablement responsables de ce type d'inhibition fongistatique.

D'autre part, étant donné que notre extrait contient des composés qui n'ont pas été identifiés (3,54%). Il serait probable que ces derniers sont soufrés ou présentent des halogènes dans leurs molécules, ces constituants sont reconnus par le fait d'augmenter cette propriété fongistatique (Vanbreuseghem et al., 1962).

Aussi les phénols qui sont des composants de l'HE utilisée pour cette étude présentent des propriétés fongistatiques très marquées (Chaumont & Leger, 2001). Et D'après Dorman et Deans, 2000 quelques composés aromatiques possèdent des activités

fongostatiques dont certains sont des composants de l'HE de *Rosmarinus officinalis* (le Limonène (0,61%),  $\beta$  pinène (4,55%) et le comphor).

Rajoutant que le carvacrol et linalol connus par leurs effets fongicides pouvant être des composants non identifiés dans notre étude et témoin du résultat trouvé sur les *Aspergillus*.

De nos jours et vu la résistance développée par de nombreux micro-organismes, la production de molécules spécifiquement anti-fongique est difficile (Prasad et Kappor), mais au regard de la grande efficacité et le type d'activité obtenue de notre HERo testée en très faibles quantités, qui est envisageable sur les *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium*.

Notre résultat reste une approche originale pour l'emploi de molécules bio-actives naturelles en substitution d'additifs alimentaire chimiques de synthèses, prolongeant ainsi la conservation des denrées, retarder leurs altération et donc préservé la santé humaine.

### **3. Résultat de l'application de l'huile essentielle en agro-alimentaire**

L'activité de plusieurs HE étudiées obtenus en milieu de culture favorable in vitro, et spécifiquement celui du romarin a donné une activité anti-microbienne avérée.

#### **3.1. Résultat de l'application sur la pomme**

La peau des végétaux forme une barrière qui s'oppose aux différents contaminants, et contribue efficacement à prolonger la conservation des denrées. Après la récolte, des altérations d'origine parasitaire de nature très diverse (moisissures, bactéries, insectes) apparaissent et difficile à éliminer. Ce qui contraint à l'usage de pesticides d'origine chimique ou encore de la cire pour mieux conserver les fruits et légumes.

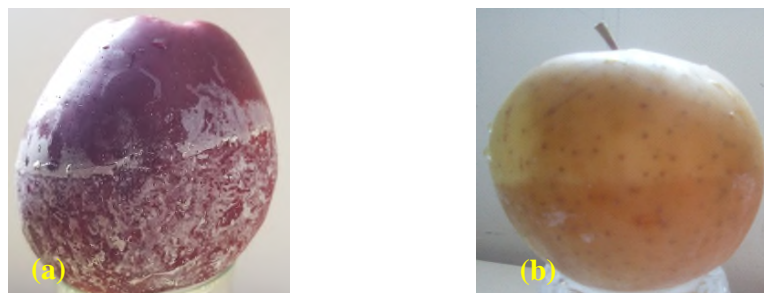
La pomme, un met délicat et onéreux. Transportée sur des longues distances et pendant une longue période, est systématiquement traitée contre tout germe d'altération par la cire.

##### **3.1.1. Résultat de la révélation de la cire de synthèse chez la pomme**

La pomme (a) avec un aspect brillant et attractif, a développé une couleur blanche sur sa peau, témoin de la présence de cire de synthèse. Cette dernière empêche

l'intégration de notre HE. Comparativement à la pomme (b) chez laquelle l'eau tiède à juste changée l'aspect du fruit (Photo.16).

Nous avons éliminé la variété de pomme (a) et le lot (b) est retenu comme test-objet. On note que : Au préalable, un simple lavage à l'eau a permis d'éliminer la cire enveloppant naturellement le fruit.



**Photo.16.** Résultat du test de révélation de la cire de synthèse sur deux variétés de pommes (a) et (b).

### 3.1.2. Effet conservateur de l'HE étudiée sur la pomme

Après cinq jours de conservation, 44,44% des rondelles de pommes pulvérisées par la concentration d'HE de 0,5% ont développé quelques taches de pourriture. En revanche, la totalité du nombre témoin est pourrit après trois jours.

Le tissu atteint de pourriture est la peau de la pomme. Avec traitement à l'HE ou exempt, la zone infectée du fruit étudié est uniforme sur la totalité de la partie pourrie, des lésions spongieuses sont parvenues à maturité, et leurs couleurs varient de brun pâle au brun foncé (Photo.17).



**Photo 17.** Variation de l'aspect des pommes en fonction du temps d'exposition à l'HE-Ro.

Cette pourriture peut être due à l'humidité élevée, qui est favorable à la propagation des souches fongiques *Aspergillus sp.* et *Penicillium sp.* connu d'être des contaminants de pommes spécifiquement et en agro-alimentaire en général.

En revanche, la concentration de l'HE-Ro optimale de 0,5% a donné ainsi une

meilleure conservation de la pomme tout en gardant sa peau riche en élément nutritif et son aspect visuel attractif.

Cette approche est utile à la maîtrise de qualité des aliments et l'amélioration du procédé de conservation. Bien sûr au préalable, la mesure de désinfection à titre préventive ou curative doit être prise d'abord au verger (période post-récolte), le matériel de récolte (caisses, paloxs), mais particulièrement les chambres de stockage des fruits.

Dans ce contexte, l'agent de lutte biologique naturelle présente une grande potentialité dans le contrôle des souches microbiennes et spécifiquement *Penicillium sp.* principal ennemi des pommes en conservation.

L'EH-Ro est une solution d'anti-fongique naturelle par excellence et plus recommandable du point de vue écologique. Cependant, son coût élevé limite son usage en agro-alimentaire à la place des pesticides d'origine chimique.

De ce fait, on propose l'application de notre HE extraite de *R. officinalis* sur des pommes conservées à la maison ou bien plantation de quelques arbustes entre les pommiers permettant d'éliminer probablement par ces aromates quelques parasites ou encore préparation de terrain agricole favorable à la poussée du romarin et d'en extraire ces HEs par des industries spécialisées.

### **3.2. Résultat de l'application sur les olives**

#### **3.2.1. Effet inhibiteur de l'HE extraite sur la formation du biofilm**

La question majeure de détérioration de la qualité (organoleptique et microbiologique) des olives conservées en foyer, est la formation d'une couche plus ou moins dense composée essentiellement de champignons.

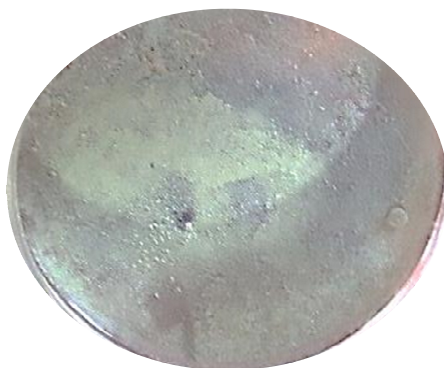
Cependant, plusieurs auteurs rapportent aussi l'existence d'autres micro-organismes : des bactéries, levures ...etc.

##### **3.2.1.1. Révélation du biofilm**

Dix jours après la préparation des olives, on constate le début d'apparition d'une fine couche qui arrive à maturité environ un mois après.

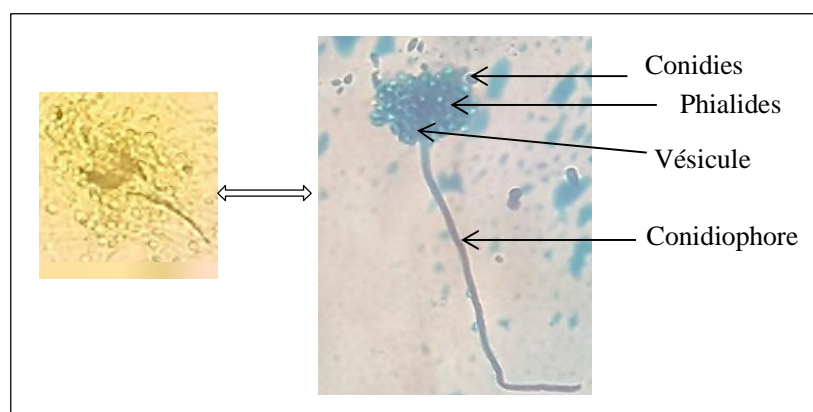
A l'examen macroscopique, il s'agit d'une couche épaisse, poudreuse, de couleur vert grisâtre adhérent aux parois du bocal rappelant l'aspect d'un champignon

filamenteux, c'est « le biofilm » (Photo.18).



**Photo.18.** Aspect macroscopique du biofilm sur les olives conservées.

A l'examen microscopique et à l'état frais (G :  $\times 40$ ), on note la présence de structures filamenteuses de même aspect que *A. flavus* composées de : conidies, phialides, vésicule, et conidiophore (Photo. 19).



**Photo.19.** Aspect microscopique de : *A. flavus* sous microscope optique (G :  $\times 40$ )  
(Lab. Microbiologie).

Cette espèce est connue comme l'un des colonisateurs majeur des olives encore sur l'olivier. Une fois cueillies et conditionnées en saumure, il devient un agent essentiel de détérioration et de dégradation des qualités organoleptiques.

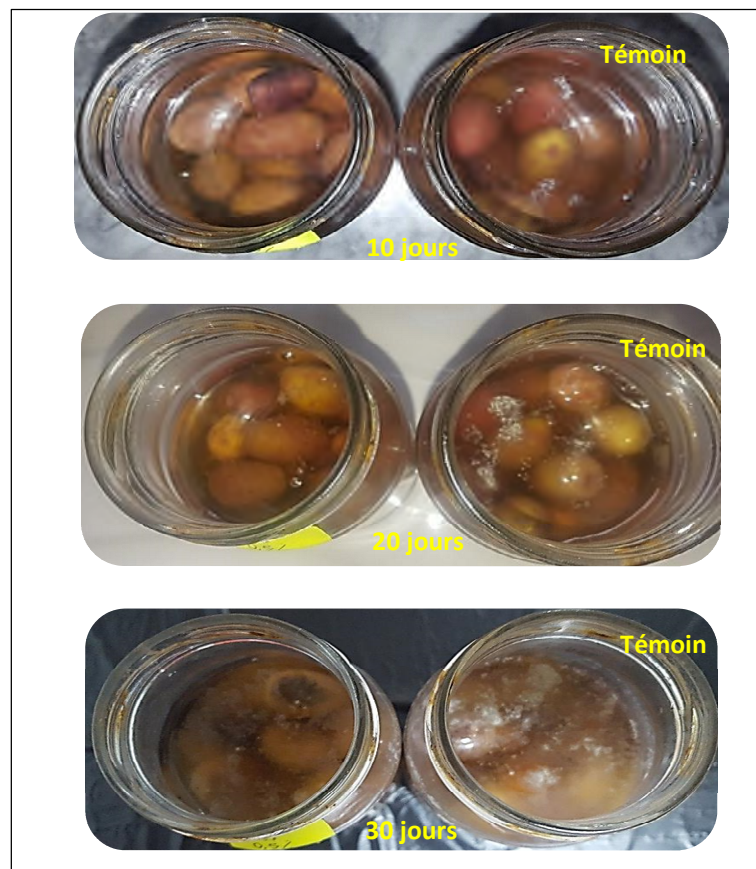
On lui connaît surtout la production de mycotoxines type aflatoxine B1 dont la concentration dans la saumure augmente avec le temps (Kachouri et al., 2014).

### 3.2.1.2.Effet conservateur de l'HE sur les olives

En présence de 0,5% de l'HE-*Ro* dans la préparation d'olives, au bout de dix jours, aucune formation du biofilm n'a pu être décelée. Et la préparation revête un aspect comparable à celui du début du test. En revanche, au niveau de la préparation témoin il apparaît de petites colonies de couleur blanche éparses.

Après vingt jours d'incubation la préparation témoin sans HE-RO présente un développement de colonies microbiennes occupant la quasi-totalité de la surface du bocal, toujours de couleur blanchâtre. Au contraire, constamment dans la préparation traitée aucun changement appréciable n'a été décelé.

Au bout d'un mois nous assistons à une présence d'une couche infiniment mince presque transparente sur la surface de la préparation traitée. En revanche, la préparation d'olives exempt d'huile dévoile un aspect d'eau trouble et un biofilm de couleur blanche vire vers le gris-vert. Cela est témoin du début de la maturation et pigmentation de la microflore fongique *A. flavus* sous forme d'une couche plus épaisse (Planche 7).



**Planche 7.** Aspect des olives traitées et témoins pendant un mois de conservation.

Au regard des résultats et comparativement aux olives témoins non traitées ; la mise en évidence de l'activité inhibitrice de notre HE extraite de *R. officinalis* de Hammamet-Youkous (Tébessa) sur la formation du biofilm au-dessous des olives vertes conservées au foyer, prolongeant ainsi sa durée de conservation est très intéressante. La recherche bibliographique approfondie, les traitements préliminaires et le mode de conservation



sont l'outil principal de ce résultat prometteur.

Toute circonstance positive ainsi que négative concernant la procédure de conservation et le choix des olives test-objet de notre préparation faite au foyer était pris en compte, en se basant sur ce qui est déjà décrit par quelques auteurs chercheurs :

D'abord, nos résultats contredit ce qui est rapporté par Maouni et al. (2002) ; que les olives vertes préparées dans les foyers sont plus contaminées que celle du commerce. Certes, la présence de sel, d'acide lactique et d'acide acétique dans la saumure du produit final sont considérés comme un facteur majeur pour accroître l'hygiène microbienne (Tantaoui-Elaraki et al., 1990 ; Asehraou et al., 1992) mais, ça reste des additifs de synthèse chimique.

Cependant, rajoutant que ces olives vertes sont par la suite exposées à un risque élevé de contamination qui vient de leur environnement, soit lors de leur commercialisation en vrac dans des récipients ouverts, ou vient d'autres matières utilisées dans la saumure (Moumene et al., 2013).

- Nos olives sont vertes et entières ce qui a minimisé leurs contamination par rapport aux dénoyautées. Et non ouvertes pour ne pas favoriser l'accès des bactéries et moisissures aux substances nutritives.

- On a évité de mettre du sel dans la préparation pour les raisons suivants :

D'abord, c'est connu que la teneur en sel de la saumure est un facteur très important dans la conservation des olives de table ; mais selon les résultats trouvés par Asehraou, 1992 ; Tantaoui-Elaraki et al., 1985 ; et Gracián, 1980 le salage appliqué aux olives vertes de table ne peut pas empêcher la croissance de moisissures qui peuvent être au contraire une source de mycotoxines.

Aussi, la concentration en sel est indéfini ; selon ce qui est décrit par Rokni et al., 2015 : une concentration inférieure à 6,2% en sel peut permettre la croissance de certains micro-organismes d'altération comme *Clostridium*. En revanche, une concentration plus élevée en sel laisse dominer le taux des levures à la fin de période de saumure par rapport aux autres populations microbiennes. Et ces dernières sont connues pour leur implication dans la formation des altérations dans les olives, ainsi que la réduction de l'acidité du produit final.

D'autre part, l'occurrence d'autres micro-organismes comme *S. aureus* dans les olives vertes salées a été signalée par Asehraou (1992) et aussi dans les olives vertes fermentés (Floriano, 1998). Cependant, mêmes si elles existent, nos études préliminaire sur l'activité de l'HE de romarin testée sur les *S. aureus* et autre souches bactériennes a montré un effet bactéricide avéré.

On note aussi que les olives atteignent des niveaux appropriés de pH et d'acidité après la procédure de fermentation et de ce fait devrait être salubre. Et l'application de l'HE-Ro étudié a accentué la qualité de stockage, en prolongeant la durée de conservation des olives par inhibition de la formation de biofilm pendant un mois, sans l'ajout de sel ni autre additif. Cet extrait est un bon anti-fongique naturel en substitution de molécules de synthèses.

En effet, pour arriver à un produit irréprochable, les caractéristiques de la saumure ou autre solution doivent être en conformité avec les bonnes pratiques de conservation, pour assurer la stabilité ultérieure des olives en respectant quelques règles de base.

## Conclusion

L'intensification des cultures, les monocultures et les grandes cultures n'ont pas résolu les problèmes des besoins alimentaires de la population mondiale. On a tendance à aller beaucoup plus vers la culture 'Bio', en se fiant à la nature.

Et donc un développement rapide du domaine agricole permettant de cerner les différentes techniques est impératif: innovation des méthodes automatisées, un agro-équipement adapté, formation de nouvelles générations d'agriculteurs maîtrisant l'outil numérique, et la lutte biologique par des molécules bio-actives naturelles.

Ces dernières, constituent un élément fondamental (anti-microbien) du métabolisme secondaire du monde végétal, source intéressante et inestimable issues des plantes médicinales entre autre 'le romarin'.

Ce végétal klil ou Iklil, pas très connu par ses différents modes d'applications traditionnelles ainsi que modernes. Les personnes âgées, principalement les femmes de la population annabi et Tébessi prêtent beaucoup à ces bienfaits héritées des anciennes générations. L'utilisent comme cataplasme, anti-microbien, anti- oxydants et en cas d'affections digestives ...etc. Son habitat naturel est l'une des caractéristiques de la zone d'étude (Youkous-Hammamet) et ses vertus thérapeutiques sont connu quel que soit la source.

L'usage des feuilles et la plante entière fraîche ainsi que sèche en mode infusion prédomine, et sa consommation en cas de nécessité est souvent prise après les repas. Ces effets indésirables et l'application de son HE sont presque méconnus par la population interrogée. En culinaire, est ajouté aux plats pour donner plus de saveur.

Malheureusement, malgré la richesse et la spontanéité de « iklil el djabel » à Youkous il reste sous-exploité. Zone caractérisée d'un massif montagneux, climat semi-aride ensoleillé, température et précipitation estimés supérieur à celle de la ville de Tébessa, un sol fertile (riche en oligo-éléments, bonne rétention d'humidité et d'un pH neutre) composé particulièrement de cailloux, calcaires et d'argile. Tous ces paramètres donnent ainsi une meilleure adaptation à la vie des plantes médicinales aromatiques et spécifiquement intéressantes à l'exploitation du romarin.

Dans cette région, cet arbuste est de la famille des lamiacées, espèce *Rosmarinus officinalis* à fleurs violets. Ces feuilles sont petites, étroites, persistantes, beaucoup plus

longues que larges, luisant sur leurs faces convexes supérieures et plus claire sur le dessous concave lui confère ainsi une structure adaptée à la sécheresse.

Sa teneur en eau (21,7%) est plus ou moins importante. Les coupes histologiques transversales de la feuille, ont présenté une nervure principale et un mésophile hétérogène, des épidermes supérieur et inférieur pourvus de poils épidermiques abondants: tecteurs et sécréteurs glanduleux à pied pluricellulaire et tête unicellulaire, accumulant dans leurs cytoplasmes des essences.

*R. officinalis* cueillie a donné un bon rendement en HE (1,94ml d'HE/100g de matière sèche), de couleur jaune très clair, forte odeur agreste et légèrement camphrée.

Cet extrait constitué de 14 composants chimiques identifiés par CPG-SM, renferment que des constituants terpéniques (monoterpènes et sesquiterpène) faisant parties majoritairement aux classes biochimiques des phénols mono-terpéniques (80%). Le composant majoritaire est le 1,8 cinéol (63,65%), attribuant à la plante son chémotype : *R. officinalis* à 1,8 cinéol. Élément à intérêt pharmaceutique, désinfectant du matériel...etc.

Cette HE est connu par son activité anti-microbienne avérée. Ainsi, notre étude s'est basée sur des souches fongiques collectés des fruits, légumes et quelques conserves. Principalement des champignons filamenteux connus pathogènes et responsables de détérioration des denrées alimentaires. La microflore retenue est : *Aspergillus* (*A. niger*, *A. fumigatus* et *A. flavus*), *Penicillium sp.* et *Fusarium sp.*

Le test de l'HE par fongigramme a révélé une dépigmentation totale et inhibition de colonies à de faible concentration (CMI : 0,25%). Alors que, son mécanisme d'action par effet inhibiteur de croissance fongique est différent d'une espèce à l'autre : *Aspergillus sp.* [0,50% - 0,75%], *Penicillium sp.* [0,5%] et *Fusarium sp.* [1%].

Le type d'inhibition de l'HE extraite pour la majorité des souches est fongistatique, les colonies réapparues sont toutes dépigmentées quelques soit la concentration inhibitrice de croissance observée. De ce fait, l'activité de notre huile n'est pas concentration dépendante et le traitement doit être prolongé et maintenu.

Par contre, l'aspect fongicide de l'extrait est remarqué sur trois souches du même genre (deux *A. niger* et un *A. Fumigatus*) reste insignifiant.

Ce résultat incite l'application de cet extrait en agro-alimentaire. Bien évidemment, la concentration d'HE-Ro optimale de 0,5% a prolongé plus ou moins la

conservation de la pomme, tout en gardant sa peau riches en élément nutritif. Et aussi a inhibé la croissance d'*A. flavus* responsable de la formation du biofilm sur les olives en conservation.

Ses résultats ouvrent les perspectives de l'utiliser comme solution alternative plus au moins saine, face aux agents conservateurs et additifs alimentaire chimiques connu par leur nocivité. Une formule galénique adaptée de cette huile naturelle de valeur, et d'odeur agréable est nécessaire.

*Références bibliographiques*

**A**

- AFNOR, 1985, Recueil des Normes Francaises « huiles essentielles », AFNOR. Paris. P57.
- Agnieszka Nowak, Danuta Kalemba, Lucjan Krala, Malgorzata Piotrowska, Agata Czyzowsk. 2012. The effects of thyme (*Thymus vulgaris*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* essential oils on *Brochothrix thermosphacta* and on the shelf life of beef packaged in high-oxygen modified atmosphere Food Microbiology. Elsevier. P 215.
- Akroum Souâd. 2008. Inhibition de quelques bactéries pathogènes par les extraits éthanoliques de *Rosmarinus officinalis*.
- Aktar Mohd Sayeed, Birhanu Degaga and Tanweer Azam. 2014. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review Issues Biol. Sci. Pharm. Res P.5
- Al amrani et al Analysis and biological activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. from Egypt.1994.Flavour and Fragrance Journal.
- Al-Hader A. A., Hasan Z. A. and M. B. Aqel. 1994. Hyperglycemic and insulin release inhibitory effects of *Rosmarinus officinalis*. J. Ethnopharmacol. 43(3):217-221.
- Al-Sereiti M R & Said S A. 1992. First Medical Conference of Libya. P 2.
- Al-Sereitia M R et al. 1999. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials, Indian Journal of Experimental Biology, Vol. 37, pp: 124-131.
- Amiri A, Bompeix. G. 2005. La pourriture bleue (*Penicillium* spp.) des pommes en pré et post-récolte. Phytoma la Défense des végétaux 579: 27-31.
- Amrouni S, Touati M, Hadeif Y, Djahoudi A. Effet de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* et de *Thymus ciliatus* sur *Pseudomonas aeruginosa* VIM-2 carbapénémase Phytothérapie. France: Springer-Verlag; 2014. P2.
- ANSES : AGENCE Nationale De Sécurité Sanitaire. 2011. *Penicillium expansum* et autres moisissures productrices de patuline Sous-règne : Ascomycètes. P.1-2.
- Aprotosoiaie A.C., Spac A.D., Hancianu M., Miron A., Tanasescu V.F., Dorneanu V. and Stanescu U. 2010. The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). *FARMACIA*, Vol. 58 (1); pp. 46-54.
- Aqel M B, J.1991. Ethnopharmacol. pp 33-57.

- Arikan S, Lozano-Chiu M, Paetznick V and Rex JH. 2001. In vitro susceptibility testing methods for caspofungin against *Aspergillus* and *fusarium* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*; 45: 327-30.
- Arnal-Schnebelen B, Hadji-Minaglou F, Peroteau JF, Ribeyre F, de Billerbeck VG (2004). Essential oils in infectious gynaecological disease: a statistical study of 658 cases. *Int. J. Aromather.* 14(4): 192-197.
- Arnold N, Valentini G, Bellomaria B, Laouer H., (1997). Comparative study of the essential oils from *Rosmarinus eriocalyx* Jordan & Fourr. from Algeria and *R. officinalis* L. from other countries. *J. Essent. Oil Res.*, vol 9: 167-175.
- AE/40 conta.doc 1999. Contamination des denrées alimentaires. pp: 2-4.
- Asehraou A., Faid M., Jana M. 1992. Physico-chemical properties and the microflora of Moroccan black table olives. *Grasas y Aceites*, P. 43
- Atik Bekkara F. 2007. Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. *Biologie & Santé*. Laboratoire des produits naturels, Département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaid, Imma Tlemcen, vol.7,n°1.
- Attrassi. 2017. Activité Antifongique In Vitro Du Perydroxan Sur *Penicillium*.
- Auguste Scheler. 1836. Dictionnaire d'étymologie française d'après les résultats de la science moderne.
- B**
- Baba Aissa F. les plantes médicinales d'Algérie ; 1991. P67.
- Baculard A., Tournier G. 1995, Aspergillose broncho-pulmonaires et mucoviscidose. *Rev. Pneumol. Clin*, 51, 159-162.
- Badillet G. et al. 1987. Champignons contaminants des cultures, champignon opportunistes, Atlas clinique et biologique, Vol II, Ed VARIA, Paris.
- Bajaj. Y.P.S. 1997. Medicinal and Aromatic Plants X; Edition Springer, P.352.
- Beever RE, Bollard EG. Nature of stimulation of fungal growth by potato extract. *J Gen Microbiol.* 2000; 60:273-279.
- Beloued Abdelkader, 2014 Plante médicinales d'Algérie. Edition OPU. P296.
- Benarfa N. 2005. Inventaire de la faune apicoïenne dans la région de Tébessa. Univ Mantouri-Constantine. P130.
- Bencheqroun Hassania K., Ghanmi Mohamed, Satrani Badr, Aafi Abderrahman et Chaouch Abdelaziz. 2012. Activité antimicrobienne des huiles essentielles



- d'*Artemisia mesatlantica*, plante endémique du Maroc. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, Vol. 81 ; p.16.
- Benhabiles N.E.H, 2001. Comparative study of Algeria's *Rosmarinus eriocalyx* and *Rosmarinus officinalis* L. Rivista.
- Benini C. 2007. Contribution à l'étude de la diversification de la production d'huiles essentielles aux Comores. Université Gembloux. P.109.
- Benoît Bock. 2008. Tela botanica Base de Données Nomenclaturale de la Flore de France. P1.
- Bergkvist L. en 2007. THE PREDICTIVE validity of multiple-item versus single-item.
- Bernardes W. et al. 2010. Antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* against Oral Pathogens: Relevance of carnosic acid and carnosol. Chem. Biodivers. 7(7):1835-1840.
- Boelens MH. 1985. The essential oil from *Rosmarinus officinalis* L. *Perfum. Flavor.*, 1985; 10: 21–37.
- Botineau M. 2010 « Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs »; Edition Lavoisier. P.1025.
- Botton et al.1999. Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle.2eme Ed.Masson. P.426.
- Bourgeois et al.1996. Microbiologie alimentaire Tom2.Aliments fermentés et fermentation alimentaires. Lavoisier.
- Boutabia L., Talailia S., Bouguetof I., Guendil F. et Chefrou A. 2016. Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, Vol.85. pp :174-189.
- Bouteddjiret C. et al. 2003. Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation. Flavour and fragrance journal. P482.
- Brunet et al. 2014. Geoscience Data Journal published by Royal Meteorological Society and John Wiley& Sons Ltd 1. P124.
- Bruneton J. 1999 . Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales. Tec. Et Doc. Lavoisier. 3emeédition. 484-488-1120.
- Bruneton J., 1993. Pharmacognosie et phytochimie plantes médicinales. Ed.Tec et Doc.
- Bruneton J., 2008. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2ème édition, Paris, Tec & Doc- Editions médicales internationales. P1188.
- Buckel J. 2003. Clinical aromathérapie : essential oils in Pactrice.

Burgess LW. et Bryden WL. 2012 . Fusarium: ubiquitous fungi of global significance .  
Under the microscope. Microbiology Australia. P22.

Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in  
foods: a review. Int.J.Food Microbiol.94:223-253.

## C

Cahagnier B, Richard-Molard D. 1998 Analyse mycologique in Moisissures des aliments  
peu hydratés. Paris: Tec & Doc;. p. 140-58.

Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P. W., Castillejos L., and A. Ferret. 2007. *Invited  
Review: Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation* J. Dairy  
Sci. p. 2581.

Carson C. F., Hammer K. A., and T. V. Riley. 2006. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree)  
Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties Clinical  
Microbiology Reviews. vol 19(1).pp.50–62.

Castegnaro M., Pfohl-leszkowicz A. 2002. Les mycotoxines: contaminants omniprésents  
dans l'alimentation animale et humaine, dans la sécurité alimentaire du  
consommateur, Lavoisier. Tec et Doc.

Cavalli. J.F. Caractérisation par COG/IK et RMN du carbone- CARBONE-13 d'huiles  
essentielles de Madagascar. Thèse de Doctorat. Université de Corse. 2002.

Chamouleau A. 1979. Les usages externes de la phytothérapie. Ed. Maloine S. A paris.  
P270.

Charlwood B.V. & Banthorpe D.V. 1991. Terpenoids. *In: Dey P.M. & Harborne J.B.,  
eds. Methods in plantbiochemistry*. Vol. 7. London: Academic Press, 43-98.

Charnay P. et Tourmeau J. 2007. Le petit.

Chaumont J.P & Leger C. 2001. Composition chimique and activité antimicrobienne  
des huiles essentielles d'*Aeollanthus pubescens* Benth. acclimatée au Togo.  
Comptes Rendus Chimie. 7 1107-1111.

Chermette René et Bussiéras Jean. 1993., Abrégé de parasitologie vétérinaire:  
Mycologie vétérinaire, Service de parasitologie, Ecole nationale vétérinaire  
d'Alfort.

Cheung, S., Tai, J. 2007. Anti-proliferative and antioxidant properties of rosemary  
*Rosmarinus officinalis*. Oncology reports; 17, 1525-31.

Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI] 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. Approved Standard, M38-A2. 2<sup>nd</sup> ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute;

CLSI. 2011. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement, Clinical and Laboratory Standards Institute, M100-S21 31.

Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-CFM). 2014. Volume 2, France.components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. J Appl Microb 95: 853-60.

Coste Hoppolite. 1998. Flore descriptive illustrée de la France, de la corse et des contrées limitrophes, Librairie scientifique et technique Albert Blanchard. Sd.

Cox S.D. et al. 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* 88; 2000. pp. 170-175.

CPIAs. 2017 Clinical Performance Improvement Activities (Normandie Procédures) ; désinfection avec l'eau de javel, Septembre. P.6.

## D

Dacosta Y.2003. Les phytonutriments bioactifs. Ed.:5. De boeck. Espagne. P353.  
d'Algérie. Vie et Nature 7, pp. 24–26.

Damerdji A. 2012. Les Orthoptéroïdes sur différentes plantes dans la région de Tlemcen (Algérie) Afrique SCIENCE.P. 83-84.

De Billerbeck V.G. 2007. Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*. 5 (5) : 249-253.

De Hoffmann E. Charrette J., Stroobant V. Spectrometrie de Masse Ed.2 : Librairie Dunod, Paris, France.1999.

Demarne F.E. Le géranium rosat. Parfum, cosmétique et aromes. 1985 ; 62.

Denis Corpet 2015. Faut-il manger la peau des pommes ? *Aliments & Santé* Nov.p1.

Derwich E., Benziane Z. and A. Boukir. 2010. Chemical composition and In vitro antibacterial activity of the essential oil of *Cedrus atlantica*. *Int. J. Agric. Biol.*, 12: 381–385

Desfemmes Clémentine, 2018. Maladies de l'olivier. Gerbeaud. P.1

- Dias P. C., M. A. Foglio, A. Possenti, J. E. de Carvalho. 2000. Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extracts of *Rosmarinus officinalis* L. J. Ethnopharmacol. 69(1):57-62.
- Dicarlo G. et al. 1999. Flavonoids : old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life.Sci.65 (4): 337-53.
- Djabali S, Et Barkat M. 2012. Effet des extraits polyphénoliques sur la résistance à l'infestation fongique dans le grain d'haricot v. Microbiol Ind Sanit Environ.;6(2):180.
- Dorman H. J. D. & S. G. 2000 Deans. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Essential Oil Research, 88 : 308-316.
- Dorman H. J. et Deans S.G., 2000-antimicrobial agents from plants : antibacterial activity of plant volatile oils, Journal of Applied Microbiology, 88 (2): 308.
- drogues : Manuel pratique pour la pharmacopées Européens. Entreprise moderne d'édition 4 Paris. Sd P.13.

## E

- Egon S., Dumeont E., Jork H. et al. Analyse chromatographique et microscopique des El-Boshy Mohamed S. et al. 2015. Studies on the Constituents of *Rosmarinus officinalis* and Their Synergistic Effect in Experimental Diabetic Rats Journal of Investigational Biochemistry Vol4 Issu1.P37.
- Escuder O. 2007. Plantes médicinales mode d'emploi. Paris : Ulm er P.255.

## F

- Fahim F. A. , A. Y. Esmat, H. M. Fadel and K. F. Hassan. 1999. Allied studies on the effect of *Rosmarinus officinalis* L. on experimental hepatotoxicity and mutagenesis. Int. J. Food Sci. Nutr. 50(6):413-427.
- Faugeras G., Lavenir R. 1965. Guide des travaux pratiques d'essai des drogues végétales, édition Vigot frères, Paris, 7<sup>ème</sup> édition. P176.
- Fay L.B., 1998. Application du couplage chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse en tandem (CPG/SM/SM) à l'analyse de produits alimentaires. Analisis Magazine. P29.
- Feillet P. 2000. Le grain de blé : Composition et utilisation. Edition Quae. INRA. Paris. P.308.
- Floriano B., Ruiz-Barba, J.L., Jiménez-Díaz, R. 1998 Purification and genetic characterization of enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel

antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4883–4890.

Furtado, M. A. et al. 2008. Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. *Mutation Res.* 657:150-154.

## G

Gabriele Schiro et al. 2018. *Alternaria* and *Fusarium* Fungi: Differences in Distribution and Spore Deposition in a Topographically Heterogeneous Wheat Field. *Journal of Fungi* P.2

Gari-Toussaint et al , *Fusarium solani* keratitis in a diabetic patient, *Journal de Mycologie Medicale* , VL - 7, 1997.

Gazengel J.M. et Orecchioni M. 2012. *Le préparateur en Pharmacie*. 2ieme Edition. Lavoisier.

Gbogbo Koffi Apeti et al 2013. Evaluation de l'activité antifongique de *ficus platyphylla del.* (moraceae) *European Scientific Journal*. P256.

Ghedira K. 2005. Les flavonoides : structure, propriétés biologiques, role prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. pp162-169

Ghestem A., Seguin E., Paris M. Orecchioni A.M.,2001. *Le préparateur en pharmacie dossier 2eme Ed Tech et Doc*. Paris. P175.

Gouget C. 2011. *Additifs alimentaires dangereux*.

Gracián, J.Y. Arevalo, G. 1980. Presencia de aflatoxinas en los productos del olivar. *Grasas y Aceites* 31: 167-171.

Guarro, J.; Gené, J.; Vroey, C. de; Guého, E. 1992. *Hormographiella*, a new genus of hyphomycetes from clinical sources. *Mycotaxon*. 45:179-190.

Guetat A, Al-Ghamdi FA, Osman AK. 2014. 1,8-Cineole,  $\alpha$ -pinene and verbenone chemo type of essential oil of species *Rosmarinus officinalis* L. From Saudi Arabia. *Int J Herb Med*. Vol 2(2):137-41.

Guillen Maria D. Cabo NJ. 1995. Characterisation of essential oils of some aromatic plants of industrial interest. *J.sci. Food. Agri.* 70, 359-363.

Guinoiseau E. Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: Séparation, identification et mode d'action. *Sciences du Vivant*; 2010. p. 67.

Guzman CC. 1999. *Rosmarinus officinalis* L. In : *Ressources végétales De l'Asie du Sud-Est*. n°13. Epices.ed. par Guzman CC. De Siemonsma J. Leiden Pays Bas : Editeur Backhuys. pp:194-197.

## H

- Hammer KA, Carson CF, Riley TV (2003) Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J Appl Microb* 95: 853–60.
- Heim E.K. et al.2002.Flavonoid antioxydants : chemistry metabolism and structure-activity relationships. *The journal of Nutritional Biochemistry*. Vol.13. P.572.
- Helmut Genaust.1996. Etymologisches Wörterbuch der botanischen Pflanzennamen.
- Hennequin C., Lavarde V., (1998). Infections à *Penicillium*, *Encycl. Med. Chir*.Elsevier, Paris, *Maladies Infectieuses*, 850-A-11.
- Heperkan D., Erol-Meriç B., Sismanoglu G., Dalkiliç G., Güler FK ,2006. Mycobiota, champignons mycotoxigènes et production de citrinine dans les olives noires . *Adv. Exp. Med. Biol.* P571.
- Hudson A. 2018. conservateurs alimentaires. P1. *Journals of Sciences and High Technologies* P.152.
- Hugette Max. 2008. La route des épices naturelles. Mélanges d'épices, aromates et condiments naturels.Ed. Sang de la terre.

## I

- I.A.R.C.1993. Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. In monographs on the evaluation ofcarcinogenic risks to human, World Health Organization, Lyon, France.
- ICMSF.1996. International Commission on Microbiological Specifications for Foods.
- Joyeux M., Rolland A., Fleurentin J., Mortier F & Dorfman P. 1990. *Planta Med.* P56.

## K

- Kachouri F. et al 2014. Elimination de l'aflatoxine B1 et inhibition de la croissance d'*Aspergillus flavus* par l'utilisation de *Lactobacillus plantarum* sur des olives. *J. Food Prot.*
- Kaloustian J, Chevalier J, Mikail C, Martino M, Abou L, Vergnes MF. Etude de six huiles essentielles: Composition chimique et activité anti-bactérienne. *Phytothérapie Pharmacognosie*. Berlin: Springer; 2008. p. 161

- Karoussou R., Koureas DN.& Kokkini S. 2005. Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in natura 2000 sites of Crete. *Photochemistry*. 66: 2668-2673.
- Kateryna D. et al. 2018. Etude comparative de la pathogénicité de *Fusarium circinatum* et d'autres espèces de *Fusarium* dans Provenances polonaises de *P. Sylvestris* L. J. Forests P.2.
- Kehal Farida. 2013. Utilisation de l'huile essentielle de *Citrus limon* comme agent conservateur et aromatique dans la crème fraîche mémoire. P61.
- Kempf M., Eveillard M., Kowalczyk F., Rossines E., Panhelleux G., Joly-Guillou ML., 2011. Antibacterial activity against 224 clinical bacterial strains of JCA 250 and JCA 251 compounds containing essential oils provided from Aroma Technologies research. *Pathologie Biologie*. 59: 39-43.
- Khan Zu et al.1999.Fatal pulmonaryaspergillosis due to *Aspergillus terreus*.J. Mycol. Med.9, 166-169.
- Knockaert C. 2002. Le fumage du poisson (7e édition).
- Koffi A.M.,Tonzibo Z.F.,Delort L.,Ruiz N.,Caldefie-Chézet L., Chalchat J.C. 2003. Corrélation entre la composition chimique et l'activité antifongique des huiles essentielles à prédominance thymol sur *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus*. *Phytothérapie*. P138.
- Kovar K A, Gropper B, Friess D & Ammon H P T, *Planta Med*, 53 (1987) 315.
- L**
- Laghchimi A. et al. 2014. Composition chimique et effet des phases liquide et vapeur de l'huile essentielle de *Lavandula multifida* sur la croissance mycélienne des moisissures responsables de la pourriture de la pomme. *J. Mater. Environ. Sci.* 5 (6), P.1778.
- Lagrada T. et al.2013. Characteristics of essential oils of *Rosmarinus officinalis* from Eastern Algeria. *Global J Res. Med. Plantes et Indigen. Med.* 2 (12):794-807.
- Laib I. 2012.Etude des activités anti-oxydante etantifongique de l'huile essentielle des fleurs séchées de *Lavandula officinalis* : application aux moisissures des légumes secs.Nature et technologie.P.50.
- Lanza Barbara, 2013. Fermentations anormales dans le traitement des olives de table: origine microbienne et évaluation sensorielle. *Frontier in Microbiology*. P2.

Lapare M., Collin G. 2000. Parfums du Maroc, et *le vase florentin*. Infoessences. Bulletin sur les huiles essentielles. Numéro 14. Lavoisier, France. P279.

Le Roi Guillaume S. M. 1859. Annales de botanique et d'horticulture. Flore des Jardins. Volume 2).

Lucarini Rodrigo et al. 2014. Hepatoprotective effect of *Rosmarinus officinalis* and rosmarinic acid on acetaminophen-induced liver damage Emir. J. Food Agric, P.878.

Ludwiczuk A. et al. 2017. Fondement, application et stratégie. Pharmacognosie, p .223.

## M

Makhloufi Ahmed. 2008. Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. [Thèse]. P.119.

Mallie M., S. Bertout. 2007. Caspofungine et mycoses à champignons rares : activité in vitro et in vivo chez l'animal et chez l'homme Journal de Mycologie Médicale. P. 27.

Maouni A., Khaddor M., Lamarti A., Badoc A. 2002. Recherche des penicilliums toxigènes contaminant les olives de table. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux 141 : 53-60.

Marcio Nucci, Elias J. Anaissie. 2009 ; Hyalohyphomycosis in Clinical Mycology (Second Edition).

Maribel Plascencia-Jatomea, John Martin Velez-Haro, 2014. *Aspergillus spp.* (Moisissure noire) dans la pourriture post-récolte. Elsevier P. 267.

Marie-Laure André. 2013. Les additifs alimentaires : Un danger méconnu Broché, Edition Jouvence.

Marlet Christelle, Lognay Georges. 2011. Les monoterpènes : sources et implications dans la qualité de l'air intérieur *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*

Martini MC., Seiller M. 1999. Actifs et additifs en cosmétologie. Ed Technique et documentation Lavoisier, Paris 2ème édition, Paris. P431.

Matsunaga K, Lu X-C, Yasuda H et al. 1997. Nat Med5. P.63.



- McLafferty F.W., Turecek F. *Interprétation of Mass Spectra*. Ed.4 : University Science Books, Sausalito, California, USA.1993.
- Medarag Narou Boubir H. 2012. FarhiA.Retrospective et analyse demographique de la dynamiqueur baine du système wilalay tebessi (1966–2008). *Journ. Geogr.*, 56, (2), București Roumanie; p.144.
- Mekki S. M. *Artemisia herba alba aAsso Carctérisation chimique et effets thérapeutiques (antiparasitaire et atifongique) de ses huiles essentielles*, 2008. P.47-90.
- Mercader Élisabeth - PasseportSanté.net*.2002.
- Mohammad S., Abu-Darwish and Abu-Dieyeh Z.H.M. 2009. Essential oil content and heavy metals composition of *Thymus vulgaris* cultivated in various climatic regions of Jordan. *Int. J. Agric. Biol.*, Vol. 11, N° 1, pp.59-63.
- Mokkadem A.1999. Cause de Dégradation des plantes médicinales et aromatiques
- Monnatte Stéphanie Lassus, aromatalogue, Joëlle Le Guehenec.2017. présidente de l'école française d'aromathérapie (EFAI), Histoire de l'huile essentielle d'Inule.,
- Moreira M.R., A.G. Ponce, C. E. De Valle et Roura S.I. 2005. Inhibitory parametrs of essential oils to reduce a food borne pathogen. *Lenensmittel-Wissenschaft und Technologie-LWT*, 38: 565-570.
- Morin O.1994. *Aspergillus et Aspergilloses: Maladies infectieuses.biologie*. Ed. Techniques Encyl. Med. Chir. Elsevier, Paris.
- Moumene Hamid et al. 2013. Qualité Hygiénique des olives de table vendus en vrac dans la région Marrakech-Tensift El Hawz. *Les Technologies De Laboratoire*, volume 8 N°32. P 85.

## N

- Neffar F. Benabdrrahmane Z. 2013. Quantification des huiles essentielles dans deux espèces de Romarin (*Rosmarinus officinalis* et *Rosmarinus tournefortii*) au niveau de djebel Metllili (Batna) *Revue Agriculture*. Vol 05. pp19-23.
- Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO. *Fusarium species: An illustrated manual for identification*. Pennsylvania, USA: Pennsylvania State University Press; 1983.

## O

- Olle M. and Bender I. 2010. The content of oils in Umbelliferous crops and its formation. *Agronomy Research*,8 (3), pp.687-696.

Ouibrahim A., Tlili Ait Kaki Y, Amrouni S., Djahoudi A.G. et Djebar M.R. 2013. Evaluation of antibacterial activity of *Laurus nobilis L.*, *Rosmarinus officinalis L.* and *Ocimum basilicum L.* from Northeast of Algéria. African Journal of Microbiology Research, 7 (42): 4968-4973.

Oussalah M., S. Caillet, L. Saucier and M. Lacroix. 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on four pathogen bacteria growth: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Food Control. 18 (5), 414-420.

Ozcan, M. 2003. Antioxidant activity of rosemary, sage, and sumac extracts and their combinations on stability of natural peanut oil. J. Med. Food. 6(3):267–270.P. 612.

## P

Panda H. 2009. Aromatic Plants Cultivation, Processing And Use, National Institute of Industrial research.

Paris M. et al. 1981. Abrégé de matière médicale, pharmacognosie. Tome I, Masson, Paris. P 339.

Pharmacopée Européenne 2005, 5<sup>ième</sup> édition Tome 2.ed. Qm., P.2569.

Pirrung M. C., Morehead A. T. 1997. The Total Synthesis of Natural Products. Ed. Davide goldsmith. Copyright, Canada. Sánchez.

Pitt J.I. 2006. *Penicillium* and related genera Series in Food Science, Technology and Nutrition. pp:437–450.

Prasad R. and Kapoor K. 2004. Multidrug resistance in yeast *Candida*. Int. Rev. Cytol, 242; p.215-248.

Projet PAM. 2014, Plantes Aromatiques et Médicinales. Manuel des bonnes pratiques de collecte du romarin (*Rosmarinus officinalis*).P.5.

## Q

Quezel P. et Santa S. 1963. Nouvelle Flore d'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales. 2 Tomes, Editions CNRS, Paris, 1170.

Quzel P. et Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. du centre national de la recherche scientifique. Paris 7. 1963. Pp :793.

## R

Rancé F. et Bermond S. 1996.. Aditifs, colorants et conservateurs. Toutes les allergies.

- Raper K. et Fennell D.J.1965. The genus *Aspergillus* , William and Wilkins editors, Baltimore., 8-600-A-10.
- Rasooli, I. et al. 2008. Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. Int. J. Food Microbiol. 122(1-2):135-139.
- Rhayour. Khadija. 2002. Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum* [Thèse].15. Fés.
- Robert JF et al. 1990. Dérivés de l'imidazo [2,1-b]thiazole X.PropriUs fongistatiques de 2-aminothiazoles et de 6-aryl imidazo[2,Lb]thiazoles substitués respectivement en 4 et en 3 par un reste aryl&hyle, arolymkthyle, fi-hydroxy B-aryl&hyle et &hoxycarbonylmethyle Eur J Med Chem. P.736.
- Roux Agnès et Ghigo Jean-Marc 2006. Les biofilms bactériens Bull. Acad. Vét. France P. 261.
- Rulffs W. 1984, Munch Med Wochensch. 126, 207.
- S**
- Sanchez Gomez et al.2006. Elaboration of table olives. DOAJ-Source.
- Schauenberg P. et Paris F. Guide des plantes médicinales ed. Delachaux et Niestlé. (Switzerland) ; 1973.Pp : 337-338.
- Seghir K. 2014. La vulnérabilité à la pollution deseaux souterraines de la région Tebessa-Hammamet (Est Algérien) Larhyss Journal n° 18 ;,p.54.
- Seyoum A., Asres K. El fiky F.K. 2006.Structure radical scavenging activity relationships of flavonoids.Phytochemistry.67 :2058-2070.
- Sheikh-Ali SI, et al. 2014. Les dangers potentiels d'*Aspergillus sp.* dans les aliments et les aliments pour animaux, et le rôle du traitement biologique J. Microbiol.
- Skerget M. et al.2005.Phenols,proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plants materials and their antioxdant activities. Food chem.vol (89): 191-198.
- Stashenko E. Martinez J.R. Gas chromatography-Mass Spectrometry. In : Advences in Gas chromatography. Ed. In tech. 2014.P.1-38.
- Steinmetz M D, Moulin-Traffort. 1998. Study of the action of  $\alpha$  hederin on the ultrastructure of *Candida albicans*. Mycoses, J & Regli P, 30.

## T

- Tabuc C. 2007. Flore Fongique De Différents Substrats Et Conditions Optimales De Production Des Mycotoxines. Thèse De Doctorat D'université : Pathologie, Mycologie, Genetique Et Nutrition. Toulouse : L'institut National Poly Technique Et De L'université De Bucarest. France. pp :16-190.
- Tantaoui-Elaraki, A., et Letutour, B. 1985. Contamination éventuelle des olives et dérivés par les mycotoxines: le point.- Oleagineux 40: 451-454.
- Tantaoui-Elaraki, A., Samane, S. and Roquebert, M.F.1990. Mycroflora of Moroccan greek style black olives. Microbiol. Alim. Nut. 8: 257-264.
- Teetes G.L. Young W.R.,Jotwani M.G.,Miller F.R. Gilstrap F.E., 1980. Introduction à la lutteintégrée contre les ennemis du sorgho.Ed. FAO, Amiricane. P164.
- Tessier A. 2003. Les plantes médicinales de Provence suivi de L'origine des noms végétaux. Paris : Ed. Médicis, P365.
- Trenholm HL et al.1988. Réduction des mycotoxines dans les aliments destinés aux animaux.Gouv. Nat.France.

## V

- Vanbreuseghem R. et al 1962 ; activité fongistatique, pharmacodynamique et thérapeutique du 3 :5-dichloro-4'-fluorothiocarbanilide. Pharmacologie biochimique.P.814.
- Victor Preedy Ronald Watson, 2010, Olives et huile d'olive dans la santé et la prévention des maladies 1<sup>ère</sup> édition. P.1520.
- VIDAL. 2010. Phytothérapie la santé par les plantes. - *Sélection du Reader's Digest* - P432.
- Villena GK & Gutierrez-Correa M (2007b) Morphological patterns of *Aspergillus niger* biofilms and pellets related to lignocellulolytic enzyme productivities. Lett Appl Microbiol 45: 231–237.
- Vincent MC. 1991. L'aromatogramme. Encyclopédie de médecine naturelle, phytothérapie, aromathérapie, Paris.

## W

- Waggas & Balaw,i. 2010. Rosemary Leave Extract against Acrylamide-Induced Neurotoxicity in Brain of Albino Rats. Egypt. J. Exp. Biol, P.23.

WHO. The World Health Organization.2002. Environmental Health Criteria Series. Morpholine.

## X

Xu, Z., A. van den Berg, M., Scheuring, C., et al. 2005. Genome physical mapping from large-insert clones by fingerprint analysis with capillary electrophoresis: a robust physical map of *Penicillium chrysogenum*”,Nucleic Acids Research.Vol 33. No 5.

## Y

Yenny Suanthie, Maribeth A.Cousin Charles. Woloshuk P. (2009). Multiplex real-time PCR for detection and quantification of ycotoxigenic *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. Journal of Stored Products Research 45 (2),139-145.

Yesil C.O., Bedir E. Vardar-Sukan, F. 2007. In vitro antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts treated with supercritical carbon dioxide. Food.

Yoon HS, Moon SC, Kim ND, Park BS, Jeong MH, Yoo YH. 2000. Genistein induces apoptosis of RPE-J cells by opening mitochondrial PTP. Biochem. Biophys. Res. Commun. 276(1): 151-156.

Yves M. 2005. Huiles essentielles. Chemistry Larousse médical. Paris .101, 1457–1464..P61.

## Z

Zanndouche Ouahid. 2015. La flore d’algérie. P.4.

[ *Annexes* ]

**Fiche d'enquête**

**Sexe:** M  F  **Age:**..... **Profession:**..... **Ville:**.....

**Connaissez-vous le romarin** (Iklil ou klil, hassalban, aziir, touzala, ouzbir)

Oui  Non

**Comment vous le connaissez?**

Utilisé par une personne de votre entourage  Utilisé par vous-même  Entendu parlez

**Usage:**

Thérapeutique  Culinaire  Autre.....  
en cuisine  
Par voie interne  Par voie externe

**D'où est-ce que vous vous procurez la plante?**

Herboriste  Culture  Nature  Autre

**Quelles sont les parties que vous utilisez?**

Racines  Tiges  Feuilles  Sommités fleuries  Parties aérienne  Plante entière

**La plante est utilisée:** Sèche  Fraiche

**Quelle est la période de récolte de la plante?**

Hiver  Automne  Printemps  Été

**Mode de préparation:**

Infusion  Décoction  Poudre  Inhalation  Teinture

**Posologie:**.....

**Fréquence d'utilisation:**

Fréquemment  Rarement  De temps en temps

**Administration:**

Avant repas  Au milieu  Après repas

**Maladies traitées:**.....

**Est-ce que vous utilisez les huiles essentielles de cette plante?** Oui  Non

**Si oui, comment?**

**Connaissez vous une (des) recette(s) à base de cette plante?**.....

**Est-ce que la plante est efficace?** Oui  Non

**A-t-elle des Effets indésirables**.....

## RESEARCH ARTICLE

### *In vitro* antifungal effect of *Rosmarinus officinalis* essential oil on *Aspergillus niger*

Faïza Baghloul<sup>1</sup>, Roukaya Mansori<sup>2</sup>, Abdelghani Djahoudi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, University Badji Mokhtar, Annaba, Algeria, <sup>2</sup>Department of Pharmacy, Laboratory of Parasitology-Mycology, CHU-Annaba, Algeria, <sup>3</sup>Department of Pharmacy, Faculty of Medicine, Laboratory of Microbiology, University Badji Mokhtar, Annaba, Algeria

Correspondence to: Abdelghani Djahoudi, E-mail: adjahoudi@yahoo.fr

Received: July 31, 2016; Accepted: October 13, 2016

#### ABSTRACT


**Background:** The development of *Aspergillus niger* fungi at the surface and in the food products is indeed very often seen, especially in the tins. It is essential to find a solution for a better conservation using natural bioactive molecules such as essential oil (EO) of rosemary. **Aims and Objectives:** The aim of our study is to detect *in vitro* the antifungal effect of *Rosmarinus officinalis* (Rosemary) EO, against the fungal strain *A. niger* contaminating various food products and responsible for invasive fungal infection. **Materials and Methods:** The EO of *R. officinalis* is picked in the city of Tebessa-Algeria, and extracted by steam distillation using a Linkens Nickerson-type device. The chemical analysis is performed by ion-exchange gas chromatography coupled to mass spectrometry. The determination of the activity and the minimal inhibitory concentrations of the EO are performed by the method of incorporation in sabouraud agar medium. **Results:** We found that the EO contain 14 components, the major one is 1.8 cineol (63.65%), the study of its antifungal activity on selection of a major foods contaminated by *A. niger* shows an activity on all strains tested with a minimum inhibitory concentration of 0.5%. We also remark a fungistatic effect. **Conclusion:** Therefore, conclusions of this study can solve the problem of poor preservation of food products and the health risks associated with exposure to mold in particular *A. niger* food source.

**KEY WORDS:** *Rosmarinus Officinalis*; Essential Oil; *Aspergillus Niger*; Antifungal Activity

#### INTRODUCTION

Microorganisms can sometimes be part of food products composition; they are also in many cases essential to their maturation, but when their proportion becomes important, it can lead to considerable deterioration of food products with harmful consequences for both human health and

economy. These microorganisms include bacteria, viruses, and fungi; they colonize several ecological niches;<sup>[1]</sup> and are transmitted to the food product through the water, air or during their preparation. The most often implicated specie is *Aspergillus niger*, this filamentous fungus is present in the air and dust, it is widely used in biotechnology thanks to these production capabilities of a wide range of organic acids, and it is a valuable source of extracellular enzymes. However, it is also known by the production of mycotoxins such as ochratoxin A (with known nephrotoxic effect) and fumonisin present especially in ordinary drinks,<sup>[2]</sup> both are classified as carcinogenic. In addition, a filamentous fungus is known to be the major causative agent of invasive aspergillosis. The inhibition of fungal growth by synthetic chemicals commonly used led to adverse effects on consumer

Access this article online	
Website: <a href="http://www.njppp.com">www.njppp.com</a>	Quick Response code
DOI: 10.5455/njppp.2017.7.7021513102016	

National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology Online 2016. © 2016 Abdelghani Djahoudi et al. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), allowing third parties to copy and redistribute the material in any medium or for any purpose, provided the original work is properly cited and states its license.



health, due to different environmental problems and residual toxicity: Carcinogenicity, teratogenicity, hormonal imbalance, spermatotoxicity, etc.<sup>[1]</sup> Moreover, invasive fungal infections are difficult to treat with currently available antifungal.<sup>[3]</sup>

Some plants or their extracts traditionally used in food preservation showed high inhibitory capacity of toxigenic molds,<sup>[4]</sup> among these plants, *Rosmarinus officinalis* (rosemary) is an aromatic plant belonging to Lamiaceae family, it has been used during thousands of years for both culinary and medicinal purposes, due to its aromatic properties and health benefits.<sup>[5]</sup> This plant is endemic in the area of Tebessa-Algeria it has widely shown good results as antibacterial, otherwise, there are no works on the antifungal activity of its essential oil (EO).

In this work, we propose an evaluation of the antifungal effect of EO of the considered plant against the fungus "*A. niger*" issued from contaminated foods. The results will tell us about the relevance of its use for healthy and longtime food conservation with a better organoleptic quality.

## MATERIALS AND METHODS

### Vegetal Material

#### *Location and characteristics of the harvest place*

Our samples were collected in the region of Tebessa, located in north-eastern of Algeria and it belongs to the field of the Saharan Atlas at Algerian-Tunisian eastern border<sup>[6]</sup> with the following geographical coordinates: Latitude 35.42° North, longitude 8.12° West, and 863 m above sea level.<sup>[7]</sup> The total area of the city of Tebessa is 13.878 km<sup>2</sup><sup>[8]</sup> and its bioclimatic is semi-arid; in the period between 1972 and 2009, the annual rainfall averages were ranged from 307 to 625 mm and the temperature was around 15°C.<sup>[9]</sup>

#### *Drug and extraction of EO*

The leaves and flowering tops of *R. officinalis* were harvested early by dry weather; drying was carried out away from light and moisture for 10 days. The extraction of EO was performed by steam distillation using a Likens Nickerson-type device.<sup>[10]</sup> The distillations of vegetal material were made in batches of 100 g during 2 h, and the EO was collected by decantation, and then, it was stored in a refrigerator at 4°C in dark glass vials sealed.

#### *Chemical analysis of the EO*

The analysis is performed in gas phase by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) using a device type Varian GC 3400 Saturn MS ion trap, with commercial library National Institute of Standards and Technology). The device is equipped with a DB5-MS column (25 mm long,

0.32 mm internal diameter, and 1.0 µm film thickness). The initial temperature of 60°C was maintained for 1 min and then was increased at a rate of 3°C/min to 200°C and maintained at this value for 15 min. The temperatures of the injector and detector were, respectively, 250°C and 285°C. The pressure of the helium carrier gas at the column head was set at 138 KPa. The injected amount of EO was 1 µl in splitless mode. The assay was performed by internal standardization.<sup>[11]</sup>

### Antifungal Activity

The antifungal activity was determined by method of incorporation of the oil tested in the agar sabouraud.

#### *Culture of test-objects stem*

Sixteen strains of fungi of the genus *A. niger*, isolated and collected on various foods (canned tomato, cheese, and harissa), are retained in our study.

The identification of the strains is based on macroscopic and microscopic characteristics.<sup>[12]</sup>

- Macroscopic (growth rate, aspect, topography, size, and color of colonies).
- Microscopic (hyphae conidiophore, phialides, and conidia) is performed by carrying out a spreading of the sample between slide and slip cover, then the preparation is stained by blue cotton. The objective 40 is used to highlight and identify the most important elements.

#### *Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC)*

The MIC of EO are determined by incorporation method in agar;<sup>[13]</sup> the seeding is done as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute document.<sup>[14,15]</sup> The EO is diluted in dimethyl sulfoxide and incorporated into the sabouraud medium previously melted and cooled at 45°C so as to obtain a series of dilution of 0.25%, 0.5%, 0.75%, and 1%. The strains were then inoculated at the medium surface by wide strips (no more than four strains per petri dish) (Figure 1).

- Incubation.

The inoculated Petri dishes were incubated at room temperature, and the observation was made every day for 5 days. The same strains tested in each Petri dish were seeded in the same order in a straight line on a witness sabouraud agar without EO and were incubated in the same conditions (control Petri dish).

#### *Determining activity type*

A transplant was performed from inhibition zones if existing on a Sabouraud medium free of EO, after incubation at room temperature:

- When there is no regrowth, the concentration is said fungicidal.
- If there the strain grows, the concentration activity is said fungistatic.<sup>[16]</sup>

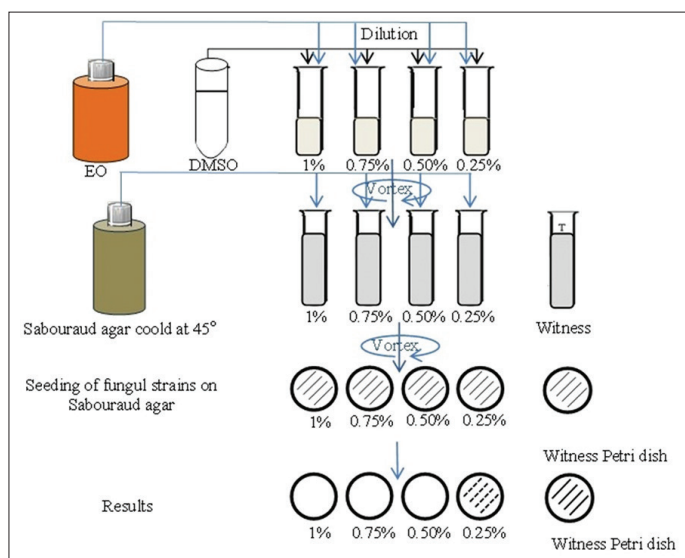
**RESULTS**

EOs isolated from aromatic plants have wide applications in perfumery, flavor, cosmetic, and pharmaceutical industries. They have been used since ancient times and despite many of them being substituted by synthetic ones.<sup>[17]</sup> In what follows, we will study the chemical composition of our EO to determine its main components, while comparing their amounts with other EO from other countries. Then, we will study its effects against *A. niger* fungus that contaminate food products.

**Chemical Composition of the EO of *R. officinalis***

The chromatography result of the extracted EO has identified 14 significant chemical compounds and three unidentified ones representing 3.54% (Table 1).

The studied EO contains only terpene components, where the majority was represented by monoterpenes (95.6%) and



**Figure 1:** Experimental protocol

**Table 1:** Chemical composition of the essential oil of rosemary extracted in comparison with others chromatographic profiles

Components sample region	$\alpha$ pinène	$\beta$ pinène	p-cymène	Limonene	1,8 cinéol	Camphor	Borneol	4-terpineol	$\alpha$ -terpineol	Bornyl acetate	Bisabolol
(Tébessa-Algeria)	4.93	4.55	0.46	0.61	63.65	14.23	1.80	0.64	4.24	0.49	0.86
Saudi Arabia	19.48	1.20	1.28	/	23.16	4.10	4.51	/	2.43	/	/
Spain	18-26	/	/	2.5-5	16-25	13-21	2-4.5	/	/	0.5-2.5	/
Morocco-Tunisia	9-14	/	/	1.5-4	38-55	5-15	1.5-5	/	/	0.1-1.5	/
Switzerland	20.61	/	/	3.73	17.95	12.99	13.27	/	/	4.77	/

only one sesquiterpène bisabolol (0.86%). On the other hand, this EO is characterized by wealth of 1.8 cineole (63.65%) and camphor (14.23%); these rates are high compared to other profiles from other countries described in Table 1. The chemotype of the plant is then: *R. officinalis* 1.8 cineole.

**Identification of the Fungal Strains**

The strain grown rapidly, it has a woolly and granular form with a pleated and soft terrain, its size is between 1.5 and 2 cm and has a white color first and then turns black.

The microscopic observation strain have identify septate and hyaline hyphe, hyaline conidiophores, and smooth wall, with a length between 400 and along 3000  $\mu$ m; they are becoming darker at the top and ending in a globular vesicle with the size diameter 30-75  $\mu$ m. The phialides cover the entire surface of the bladder with globular conidia, brown-black color, very rough. The diameter of the strain is 4-5  $\mu$ m.

**Antifungal Activity of EO**

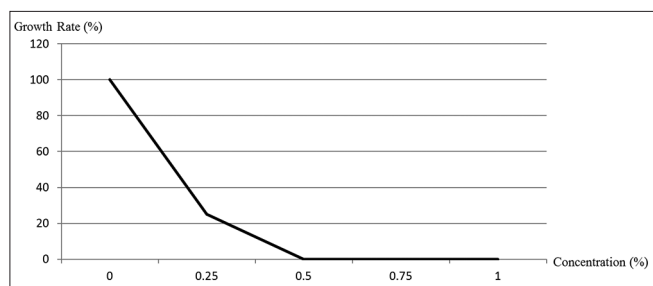
Compared to cultures in control dishes, the colonies of the 16 tested strains of *A. niger* showed a very weak growth at 0.25% concentration of EO. From a concentration of 0.50%, we noted a complete absence of growth for the 16 treated strains.

Therefore, the MIC value of the EO on the studied strains of *A. niger* was 0.50% (Figure 2).

We also noticed that *A. niger* have grown after being stopped by the presence of EO and its action against the strains tested is then fungistatic (Table 2).

**DISCUSSION**

The comparative study of chemical analysis of our EO of *R. officinalis* with those of Saudi Arabia,<sup>[18]</sup> Spain, Morocco, Tunisia, and Switzerland<sup>[19]</sup> showed that bisabolol and 4-terpineol appears only in rosemary of Tebessa-Algeria; we also note a lower content of  $\alpha$ -pinene (4.93%). Furthermore,  $\alpha$  terpineol,  $\beta$ -pinene, and p-cymene are only present in our sample and that of Saudi Arabia. The Camphor has a rate



**Figure 2:** Minimum inhibitory concentration curve

**Table 2:** MIC variation range and type of EO activity of *Rosmarinus officinalis* on *Aspergillus niger*

Species	MIC (%)	Activity type
<i>Aspergillus niger</i> (n=16)	0.50	Fungistatic (n=16)

n: Number of strain, MIC: Minimum inhibitory concentration, EO: Essential oil

of 14.23%, comparable to that established by the European Pharmacopoeia samples type of Spain, Morocco, and Tunisia.

According to the literature, the results of the macroscopic and microscopic identification obtained, indicate that the examined strain corresponds to the species *A. niger*.<sup>[20-22]</sup>

In addition, we note an antifungal activity of the EO of *R. officinalis* which is probably related to the monoterpene oxide: 1.8 cineole,<sup>[23]</sup> major compound with 65.63% of the overall composition of the oil. This component will cause an increase in the permeability of the cell membrane, thereby facilitating the entry of other active compounds especially: 4-terpineol.<sup>[24]</sup> Several authors have shown that in addition to the major compounds, minor ones such as 4-terpineol (0.64%) significantly contribute to the activities of EO by synergistic action.<sup>[25,26]</sup> Antifungal activity can also be associated with camphor (14.23%); this compound is known as a fungicidal and also antibacterial.<sup>[27]</sup> One cannot also overlook the role of limonene (0.61%) which is known for its action on the permeability of the cytoplasmic membrane of fungal cells, causing a loss of inclusions.<sup>[26]</sup>

Several research studies reveal that the activity of EO components usually results in the morphological changes of the hyphae and direct disturbance of the fungal cell membrane,<sup>[28,29]</sup> for example, hydrophobic components constituting the EO increase the permeability of the cell membrane, causing leakage of the bacterial contents and fungal cells.<sup>[30]</sup>

Furthermore, the lipophilic nature of the hydrocarbon backbone of the EO components and the hydrophilic nature of their functional groups play a very important role in the antimicrobial activity,<sup>[31]</sup> which is also influenced by the cyclic structure of hydrocarbons.<sup>[23]</sup>

Despite the difficulty of developing an antifungal molecule,<sup>[32]</sup> the activity of the components of our EO of *R. officinalis* on the filamentous fungus *A. niger* and its MIC, reinforces the idea of using this type of molecules to preserve food products by slowing their deterioration, prevent, and inhibit the secretion of toxic substances and thus preserve human health. Finally, we highly encourage the researchers to propose other studies on the antifungal activity of *R. officinalis* collected from other regions against *A. niger*; to compare the results and find more advantages of using its EO to preserve food products.

## CONCLUSION

Rosemary is a very abundant and endemic plant in Tebessa region situated in north-eastern of Algeria. The extraction of its EO and its analysis by GC-MS has identified 14 components with a predominance of monoterpenes. The chemotype is *R. officinalis* 1.8 cineol and this major component is often used by the pharmaceutical industry; it is also considered useful for the treatment of bronchitis, sinusitis, and rheumatism. The action of a low concentration of EO on 16 strains of *A. niger* collected from various food products has given an antifungal activity on all strains tested with a fungistatic effect. These results open the prospects for the use of this EO as a food preservative in substitution of chemical molecules known by their harmful effects.

## REFERENCES

- Sumathy V, Zakaria Z, Jothy SL, Gothai S, Vijayarathna S, Yoga Latha L, et al. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of *Cassia surattensis* flower against *Aspergillus niger*. *Microb Pathog.* 2014;77:7-12.
- Castella G, Alborch L, Bragulat MR, Cabañes FJ. Real time quantitative expression study of a polyketide synthase gene related to ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus niger*. *Food Control.* 2015;53:147-50.
- Gheith S, Saghrouni F, Bannour W, Youssef YB, Khammari I, Abdeljelil JB, et al. Contamination fongique de l'alimentation des patients d'onco-hématologie. *Nutr Clin Métab.* 2012;26(3):114-8.
- Mohammed Z. Etude Phytochimique et Activités Biologiques de Quelques Plantes Médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie [Thesis]. 2013. p. 76.
- Ribeiro-Santos R, Carvalho-Costa D, Cavaleiro C, Costa HS, Albuquerque TG, Castilho MC, et al. A novel insight on an ancient aromatic plant: The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Trends Food Sci Technol.* 2015;45(2):355-68.
- Seghir K. La vulnérabilité à la pollution des eaux souterraines de la région Tebessa-Hammamaet (Est Algérien). *Larhyss J.* 2014;18:54.
- Brunet M, Gilabert A, Jones PD, Efthymiadis D. A historical surface climate dataset from station observations in Mediterranean North Africa and Middle East areas. *Geosci Data J.* 2014;24:437-55.
- Hana MN, Abdellah F. Retrospective et analyse démographique

- de la dynamique urbaine du système wilayal tebessi (1966-2008). *J Geogr.* 2012;56(2):144.
9. Sedrati N, Djabri L. Contribution of Hydrochemistry to the Characterization and Assessment of Groundwater Resources: The Case of Tebessa Alluvial Aquifer (Algeria) IAHS Publications 364. 2014. p. 459.
  10. Paris RR, Moysse H. Matière Médicale. 2<sup>nd</sup> éd. Paris, France: Masson; 1976. p. 420.
  11. Kaloustian J, Chevalier J, Mikail C, Martino M, Abou L, Vergnes MF. Etude de six huiles essentielles: Composition chimique et activité anti-bactérienne. *Phytothérapie Pharmacognosie.* Berlin: Springer; 2008. p. 161.
  12. Cahagnier B, Richard-Molard D. Analyse mycologique in Moisissures des aliments peu hydratés. Paris: Tec & Doc; 1998. p. 140-58.
  13. Guinoiseau E. Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: Séparation, identification et mode d'action. *Sciences du Vivant;* 2010. p. 67.
  14. Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI]. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. Approved Standard, M38-A2. 2<sup>nd</sup> ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
  15. Amrouni S, Touati M, Hadeff Y, Djahoudi A. Effet de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* et de *Thymus ciliatus* sur *Pseudomonas aeruginosa* VIM-2 carbapénémase *Phytothérapie.* France: Springer-Verlag; 2014. p. 2.
  16. Djabali S, Et Barkat M. Effet des extraits polyphénoliques sur la résistance à l'infestation fongique dans le grain d'haricot v. *Microbiol Ind Sanit Environ.* 2012;6(2):180.
  17. Elsharkawy E. Anti-inflammatory activity and chemical compositions of essential oil of *Achillea fragrantissima*. *Natl J Physiol Pharm Pharmacol.* 2016;6(3):258-62.
  18. Guetat A, Al-Ghamdi FA, Osman AK. 1,8-Cineole,  $\alpha$ -pinene and verbenone chemo type of essential oil of species *Rosmarinus officinalis* L. From Saudi Arabia. *Int J Herb Med.* 2014;2(2):137-41.
  19. Carron CA, Vouillamoz J, Et Baroffio C. Evaluation de la résistance au gel de cinq génotypes de romarin. *Rev Vitic Arboric Hortic.* 2013;45(3):181.
  20. Raper K, Fennell D. The Genus *Aspergillus*. Baltimore, MD: Williams and Wilkins; 1965.
  21. Botton B, Breton A, Fèvre M, Gauthier S, Guy P, Larpent JP, et al. Moisissures Utiles et Nuisibles, Importance Industrielle. Paris: Masson; 1990.
  22. Tabuc C. Flore Fongique de Différents Substrats et Conditions Optimales de Production des Mycotoxines. [Thesis]; 2007. p. 31.
  23. Malecky M. The metabolism of terpenoids in caprins (HAL). *Life Sciences.* Montpellier: Agro Paris Tech; 2008. p. 30-3.
  24. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: Review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(1):50-62.
  25. Laghchimi A, Znini M, Majidi L, Renucci F, El Harrak A, Costa J. Composition chimique et effet des phases liquide et vapeur de l'huile essentielle de *Lavandula multifida* sur la croissance mycélienne des moisissures responsables de la pourriture de la pomme. *J Mater Environ Sci.* 2014;5(6):1778.
  26. Kehal F. Utilisation de l'huile essentielle de *Citrus limon* comme agent conservateur et aromatique dans la crème fraîche [mémoire de magister] Université de Constantine I.N.A.T.A.A; 2013. p. 61.
  27. Bencheqroun HK, Ghanmi M, Satrani B, Aafi A, Et Chaouch A. Activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Artemisia mesatlantica*, plante endémique du Maroc. *Bull Soc R Sci Liège.* 2012;81:4-21.
  28. Rhayour K. Etude du Mécanisme de l'Action Bactéricide des Huiles Essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum* [Thesis]. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah-Fés; 2002. p. 15.
  29. Makhloufi A. Etude des Activités Antimicrobienne et Antioxydante de Deux Plantes Médicinales Poussant à l'état Spontané Dans la Région de Bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) Et *Rosmarinus officinalis* L) et Leur Impact sur la Conservation des Dattes et du Beurre Cru. [Thesis]. Tlemcen: Université Aboubaker Belkaid; 2010. p. 119.
  30. Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol.* 2000;88:170-5.
  31. Nowak A, Kalembe D, Krala L, Piotrowska M, Czynowski A. The effects of thyme (*Thymus vulgaris*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* essential oils on *Brochothrix thermosphacta* and on the shelf life of beef packaged in high-oxygen modified atmosphere. *Food Microbiol.* 2012;32(1):212-6.
  32. Prasad R, Kapoor K. Multidrug resistance in yeast *Candida*. *Int Rev Cytol.* 2005;242:215-48.

**How to cite this article:** Baghloul F, Mansori R, Djahoudi A. *In vitro* antifungal effect of *Rosmarinus officinalis* essential oil on *Aspergillus niger*. *Natl J Physiol Pharm Pharmacol* 2016;7 (Online First). DOI: 10.5455/njppp.2017.7.7021513102016

**Source of Support:** Nil, **Conflict of Interest:** None declared.

## Résumé

Les nombreuses propriétés naturelles des huiles essentielles en font d'elles à la fois des ingrédients nutraceutiques et des agents de conservation très prometteurs pour l'industrie agro-alimentaire. Le recours à ces molécules s'avère être un choix adéquat pour face aux risques de contaminations précis ou afin de réduire (remplacer) les agents de conservation chimiques synthétiques connues par leurs nocivités sur la santé humaine.

Notre étude porte sur l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*, espèce très abondante dans la région de Hammamet-Youkous (Tebessa-Algérie). Elle fait partie du patrimoine médicinal et culinaire de cette localité, autre fois utilisée en médecine populaire, en cosmétique et en phytopharmacie. L'étude analytique de l'huile essentielle du romarin effectuée par CPG-SM, a montré que ces composants appartiennent à la classe biochimique des phénols et hydrocarbures mono-terpéniques, elle a aussi a révélé une prédominance du constituant 1,8 cinéole, le chémotype de la plante est donc : *Rosmarinus officinalis* à 1,8 cinéol.

L'activité de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* sur les souches fongiques pathogènes et les puissants contaminants alimentaires (*Aspergillus sp.*, *Fusarium* et *Penicillium*) par la technique de fongigramme a montrée qu'à de faibles concentrations, cette huile donne un bon résultat anti-fongique.

Le pouvoir antimicrobien de cette huile est très important, il se caractérise par une action fongistatique et fongicide vis-à-vis des germes suscités.

L'addition de l'huile essentielle du romarin « *Rosmarinus officinalis* » à "la pomme" et aux "olives" a donné un effet très significative, en augmentant leurs durées de conservation. Ceci nous conforte dans l'idée de proposer cette huile essentielle aromatique, comme source de molécules bio-actives conservatrices naturelles.

### Mots clés :

*Rosmarinus officinalis*- huile essentielle- contaminants alimentaires-conservation.