



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES FES



MEMOIRE DU PROJET DE FIN D'ETUDE

MASTER SCIENCES ET TECHNIQUES

GESTION ET CONSERVATION DE LA BIODIVERSITE

***Activité antifongique in vitro de
Mentha pulegium sur des souches de Fusarium
colmorum et Fusarium araminearum***

Présenté par :
EL BAKKALI Amine

Le 18 juin 2016 devant le jury composé de :

Pr. BOUSETA Amina	LASSA, FSDM Fès	Encadrante
Pr. FADEL FATIMA	FST, Fès	Encadrante
Pr. SQAULLI Hakima	FST, Fès	Examineur
Pr. BEKHTI Khadija	FST, Fès	Examineur
Pr. AL FIGUGUI Jamila	FST, Fès	Examineur

Année Universitaire : 2015/2016

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Mes très chers parents : Fatima et Abderahmane

Ma chère sœur Aicha et mes chers frères Abdelali et mohammed

Toute ma famille ;

Tous mes amis ;

A tous ceux qui ont une bonne impression dans mon cœur ;

Toute la promotion du Master Gestion et Conservation de

Biodiversité 2016

El Bakkali Amine

Remerciements

Je remercie d'abord ALLAH le tout puissant qui m'a guidé et qui m'a donné la force et la volonté de réaliser ce travail.

Je remercie Madame BOUSETA Amina, Professeur au département de Sciences de la vie à la Faculté des Sciences Dhar Al Mahraz - Fès, d'avoir acceptée de diriger ce travail avec beaucoup de disponibilité et d'efficacité, pour m'avoir fait partager son expérience, pour les conseils et encouragements qu'il a su me prodiguer pendant toute la durée de ce projet.

J'exprime mes sincères remerciements à Madame FADIL Fatima, Professeur de l'environnement au département de Sciences de la vie à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, pour son aide, ses conseils et sa disponibilité.

Je remercie vivement les professeurs ; Madame SQUALLI Hakima, Madame BEKHTI Khadija et Madame AL FIGUIGUI Jamila qui ont accepté de juger ce travail. Je leur suis très reconnaissant d'y avoir consacré une partie de leur temps.

Mes remerciements sont adressés à l'ensemble des doctorants du Laboratoire d'agroalimentaire et sécurité sanitaire des aliments à la FSDM - Fès qui ont contribué à mon encadrement et surtout LAAZIZ Adil, LAHJOUJI Tarek et SARHIR Salwa.

Je tiens à remercier mes amis et collègues, pour leur aide, leur intérêt pour la recherche et pour leurs précieux conseils ainsi pour tous les bons moments partagés, passés et futurs.

Je tiens également à remercier mes collègues de promotion, pour les pauses relaxation et discussions que nous avons partagées durant ces deux dernières années à la FST de Fès.

Enfin, mes pensées vont, bien entendu, vers mes parents, mes sœurs, ainsi que vers toute ma famille, leur soutien et leur compréhension ont été un atout majeur pour la réalisation de ce travail.

Résumé

Dans le but de rechercher des moyens de lutte biologique contre les champignons du genre *Fusarium* responsables des pertes dans des cultures céréalières. Les activités antifongiques de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* ont été testées sur huit souches appartenant aux espèces de *Fusarium culmorum* et *Fusarium graminearum*.

L'huile essentielle de la menthe pouliot, obtenue par hydrodistillation, a été analysée par chromatographie en phase gazeuse (GC-FID-O). L'essence est dominée par le pulégone (86,14 %). L'effet antifongique de cette huile essentielle vis-à-vis des souches de *F. culmorum* et *F. graminearum* par la technique de contact direct sur gélose a montré une activité antifongique sur la majorité des souches testées. Les taux d'inhibition varient de 0.99 à 9.57 mm/jour, selon les souches et les doses appliquées (0.25 à 4 µL/L). Les valeurs maximales des taux d'inhibition obtenues pour la concentration de 4 µL/L sont comprises entre 33.7 et 90.6%, le taux d'inhibition moyen calculé pour toutes les souches dépasse 50%.

Ces résultats permettent conclure que les HEs des plantes aromatiques et médicinales peuvent constituer une solution alternative valable aux agents antifongiques dans la lutte contre les moisissures des denrées alimentaires.

Mots clés : Moisissures ; *Fusarium* ; *Mentha pulegium*; huiles essentielles

Table des matières

<i>Dédicaces</i>	2
<i>Remerciements</i>	3
Résumé	4
Liste des abréviations.....	7
INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE I : Aperçu bibliographique	3
1. Moisissures	3
1.1 Genre <i>Fusarium</i>	4
2. Aperçu sur les mycotoxines	8
2.1 Déoxynivalénol (DON)	8
3. Effet antifongique des huiles essentielles (menthe pouliot).....	12
3.1 Menthe pouliot.....	12
3.2 Généralités sur les huiles essentielles.....	13
3.3 Méthodes d'extraction et d'identification des composés des huiles essentielles.....	14
4. Contrôle de la croissance fongique par les huiles essentielles	16
CHAPITRE II : Matériel et méthodes.....	19
1. Matériel biologique.....	19
2. Préparation de la solution sporale	19
3. Matériel végétal	19
4. Effet de l'huile essentielle de la menthe pouliot sur la croissance fongique.....	20
3.1 Extraction des huiles essentielles.....	20
3.2 Milieux de culture.....	22
3.3 Ajout de l'HE de la menthe pouliot, inoculation et incubation du milieu MEA.....	22
3.4 Mesure du taux de croissance.....	23
CHAPITRE III : Résultats et Discussion	24
1. Rendement et Composition chimique de l'huile essentielle	24
2. Activité antifongique de la menthe pouliot.....	27
Conclusion et perspective	32
Références bibliographiques.....	33
Annexes	40

Liste des figures

Figure 1 : Caractéristiques de <i>Fusarium culmorum</i> (Botton et al., 1985), (x750).	6
Figure 2 : Caractéristiques de <i>Fusarium graminearum</i> (Botton et al., 1985).....	6
Figure 3 : Structure chimique générale du déoxynivalénol.....	9
Figure 4 : voie proposée de la biosynthèse du déoxynivalénol (DON).....	11
Figure 5 : photo de <i>Mentha Pulegium</i> (Pelot, 2010).....	13
Figure 6: Hydrodistillation dispositif.....	20
Figure 7: Chromatographe en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme et un détecteur olfactif (GC-FID-O).....	22
Figure 8: Chromatogramme d'analyse de la menthe pouliot par GC-FID-O	25
Figure 9: Taux d'inhibition de la croissance fongique des souches de <i>Fusarium colmorum</i> (7 souches)	28
Figure 10: Taux d'inhibition de la croissance de la souche de <i>Fusarium graminearum</i> MUCL 803.....	29
Figure 11: Taux d'inhibition moyen calculé pour l'ensemble des souches de <i>Fusarium culmorum</i>	30

Liste des abréviations

AF : Aflatoxine

CIRC : Centre international de recherche sur le cancer

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

CPG/SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

DON : Déoxynivalénol

FAO : Food and Agricultural organization of the United Nations

GC-FID-O : Gas Chromatography with Flame Ionization Detector-Olfactif

IK : Indice de Kovats

LASSA : Laboratoire d'agroalimentaire et sécurité sanitaire des aliments

MEA : Malt Extract Agar

MUCL : Mycothèque d'Université catholique de Louvain

MVA : Acide mévalonique

NIV : Nivalénol

OTA : Ocratoxine A

PAM : Plantes Aromatiques Médicinales

PCR : Polymerase Chain Reaction

RAPD : Randomly Amplified Polymorphie DNA

RFLP : Restriction fragment length polymorphism

UCL : Université catholique de Louvain

ZEA : Zéaralénone

INTRODUCTION GENERALE

Les mycotoxines sont des substances chimiques issues du métabolisme secondaire d'un certain nombre de moisissures appartenant principalement aux genres *Penicillium*, *Aspergillus* et *Fusarium*. Ces moisissures se développent sur les céréales avant, pendant et après la récolte et constituent un contaminant naturel. En effet, l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (Food and Agricultural organization of the United Nations FAO) a estimé que les pertes totales des denrées alimentaires dues aux mycotoxines sont de l'ordre de 1 000 millions de tonnes par an. La présence de ces toxines entraîne une diminution de la qualité et la disponibilité en volume des grains récoltés (FAO, 2009 ; Yannikouris, 2002).

Plusieurs espèces du genre *Fusarium* causent des dégâts très importants du point de vue agroalimentaire, ils sont considérés comme des champignons du champ infectant principalement le blé et le maïs. Ce qui se traduit non seulement par une réduction du rendement des cultures par la fusariose, mais aussi par la production d'une large gamme de mycotoxines. Le déoxynivalénol est une toxine appartenant à la famille des trichothécènes, il est produit principalement par les espèces *Fusarium graminearum* et *Fusarium colmorum* (Gutleb et al., 2002). L'exposition à cette toxine présente des risques pour la santé humaine et des animaux de la ferme. Le DON est un contaminant naturel important en raison de sa présence fréquente à des concentrations toxicologiques dans le monde entier (Bottalico et Perrone, 2002; Logrieco et al., 2002; Placinta et al., 1999). D'où la nécessité de la lutte contre ces champignons.

La lutte chimique en utilisant des fongicides présente plusieurs inconvénients tels que les problèmes de pollution environnementale qui est aussi considérée comme un problème sérieux pour la santé humaine. De plus, l'utilisation de ces produits de synthèse peuvent stimuler la biosynthèse des mycotoxines et entraîner le développement des souches résistantes (Kanda, 2003 ; Caron et Laverdiere, 2003 ; Schmidt et al., 2013).

La recherche d'autres méthodes en prenant en considération d'autres critères que l'efficacité est devenue indispensable. La lutte biologique par l'utilisation de substances naturelles antioxydantes et antifongiques, peut constituer une alternative aux produits chimiques. Parmi ces substances naturelles, figurent les huiles essentielles extraites

des plantes aromatiques (Maihebiau, 1994). Plusieurs travaux ont mis en évidence les différentes activités biologiques des plantes aromatiques et médicinales, en particulier leur effet antifongique (Jaz et Dongmo, 2009). Ainsi par leurs propriétés, les huiles essentielles pourraient donc servir d'agent de conservation des denrées alimentaires.

Dans ce contexte, de nombreuses études ont montrés que les extraits de certaines plantes aromatiques ont une action inhibitrice sur la croissance et la toxinogénèse de plusieurs champignons responsables d'infections alimentaires (Amarti, 2010). Dans ce sens, cette étude vise l'évaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle de la menthe pouliot (*Menthapulegium*) vis-à-vis de huit souches appartenant aux espèces *Fusarium colmorum* et *Fusarium graminearum*.

Le présent travail est reparti en 3 chapitres, le chapitre I est un aperçu bibliographique qui présente brièvement des généralités sur les moisissures, particulièrement le genre *Fusarium* ainsi que les métabolites secondaires fongiques à savoir le déoxynivalénol (DON). L'ensemble des techniques et méthodologies utilisées pour la réalisation de ce travail sont regroupées dans le chapitre II. Le chapitre III expose les résultats obtenus. La conclusion du travail mené ainsi que les perspectives qui en découlent clôtureront ce manuscrit.

CHAPITRE I : Revue bibliographique

1. Moisissures

Les moisissures sont des champignons microscopiques ubiquitaires (Pitt *et al.*, 2000). Elles sont caractérisées par un appareil végétatif sous forme d'un thalle composé de longs filaments ramifiés souvent cloisonnés (hyphes), dont l'ensemble constitue le mycélium visible à l'œil nu. Les moisissures peuvent se reproduire grâce à un mode végétatif ou asexué en formant des exo-spores ou des conidies qui prennent leurs naissances à partir des hyphes spécialisés nommés les conidiophores. Certaines mycètes peuvent se reproduire par un mode sexué, et en fonction de la localisation des spores de cette reproduction on peut les classer parmi les groupes de Zygomycètes, Ascomycètes, Basidiomycètes, et Hyphomycètes. Les spores, produites en très grande quantité et issues de la reproduction asexuée assurent la dissémination spatiale de l'espèce.

Les moisissures sont des organismes hétérotrophes, dépourvus de pigment photosynthétique, ils sont incapables de fabriquer les substances organiques nécessaires à la croissance de leurs cellules. Ils sont donc obligés de consommer des molécules élaborées par d'autres organismes.

Ils sont impliqués dans la dégradation et le recyclage de la matière organique et constituent une part importante des décomposeurs sur terre par leur capacité d'exploration via l'extension des hyphes, couplée à la capacité de largage des enzymes hydrolytiques. De plus, certains champignons peuvent être phytopathogènes ou provoquer des mycoses chez les animaux. Un troisième mode de vie, symbiotique, est également très répandu, on distingue les associations symbiotiques entre champignons et végétaux supérieurs (mycorhize) qui constituent la forme de symbiose la plus répandue à l'échelle planétaire, et une autre forme de symbiose est représentée par les lichens, qui sont constitués d'une association entre champignon et une cyanobactérie.

Les moisissures sont considérées comme l'une des principales préoccupations de conservation des aliments. Ainsi, leur croissance sur les aliments crus et transformés peut entraîner plusieurs types de détérioration en particulier l'altération de la qualité organoleptique : changement de la texture, développement de saveurs et l'émission d'odeurs.

Cependant la plupart des genres rencontrés dans les graines de plusieurs denrées alimentaires sont rassemblés en deux groupes dont, le premier groupe appelé champignons de champ, et comprend les genres *Alternaria*, *Cladosporium* et *Fusarium*. Le deuxième groupe, appelé champignons de stockage, représentés par les genres *Aspergillus* et *Penicillium* qui peuvent croître à une humidité très élevée comprise entre 70% et 90%.

1.1 Genre *Fusarium*

1.1.1 Généralités

Les champignons du genre *Fusarium* sont largement répandus sur les végétaux et dans les sols. Ils se trouvent dans la mycoflore normale des produits de base, comme le riz, le haricot, le soja et d'autres cultures (Pitt et al., 1994). Alors que la plupart des espèces sont plus fréquentes dans les zones tropicales et subtropicales, certains colonisent les sols dans les climats froids. *Fusarium* est un genre des Hyphomycètes.

Les *Fusarium* sont caractérisés morphologiquement par un thalle à croissance généralement rapide, blanc à crème, jaune brunâtre, rose, rouge, violet ou lilas. Les conidiophores parfois très ramifiés forment sur le thalle des coussinets (sporodochies) et portent des masses de spores d'aspects graisseux.

Les phialides sont plus ou moins allongées et peuvent produire deux types de conidies :

- des macroconidies fusiformes, souvent courbées, pluriseptées, avec une cellule basale pédicellée, portant une sorte de talon,
- des microconidies petites, généralement septées, piriformes, fusiformes ou ovoïdes.

Certaines espèces produisent les deux types de spores, d'autres ne forment que des macroconidies. Les chlamydospores sont présentes ou absentes, terminales ou intercalaires, différenciées par le mycélium ou par les conidies (Botton et al., 1985).

Le genre *Fusarium* comporte une cinquantaine d'espèces dont certaines sont connues pour engendrer des pathologies (Lynch et al., 2003). Dans cette étude nous nous intéressons aux deux espèces *Fusariumgraminearum* et *Fusariumcolmorum*.

1.1.2 Identification des *Fusarium*

La classification des champignons était historiquement basée sur de nombreux caractères morphologiques et biologiques observables. L'identification des champignons filamenteux se base sur la comparaison d'un grand nombre de critères (Guarro et al. 1999).

L'identification en se basant sur les caractéristiques morphologiques n'est pas suffisante d'où l'appellation à la biologie moléculaire. Le genre *Fusarium* comprend des espèces étroitement apparentés des organismes qui sont difficiles à distinguer en fonction des caractéristiques morphologiques telles que la morphologie des colonies, la taille des conidies, et l'ornementation. Les techniques de la biologie moléculaire offrent un certain nombre d'outils pour la détection et le dénombrement des champignons pathogènes et des informations sur l'identification des espèces inconnues d'après leurs séquences d'ADN (Paminondas et Paplomatas, 2004). Au cours des dernières années, il y a eu un grand progrès dans le développement d'outils et de technologies de la biologie moléculaire (Beckmann, 1988). Chaque technique peut être utilisée comme un outil pour étudier la variation parmi les isolats fongiques, et de l'information sur les relations génétiques, la taxonomie, la structure de la population et l'épidémiologie associés aux champignons (Cooley, 1991). Plusieurs méthodes sont envisageables pour identifier les *Fusarium* par la biologie moléculaire (Mentré et Montgermont, 2003).

1.1.2.1 Caractéristiques macroscopiques et microscopiques

Fusarium colmorum

Le thalle est à croissance rapide, d'abord blanc à jaunâtre ou rose puis ocracé à rouge brunâtre avec un revers rouge à pourpre.

Les microconidies sont absentes. Les phialides sont courtes et larges formées sur le mycélium aérien ou groupées en sporodochies. Les macroconidies sont fusiformes, courbes, septées, à cellule apicale courte et pointue. Les chlamydospores sont intercalaires ou terminales, formées par le mycélium ou par les conidies, subglobuleuses, brunâtres, lisses ou verruqueuses (Botton et al., 1985), (figure 1).

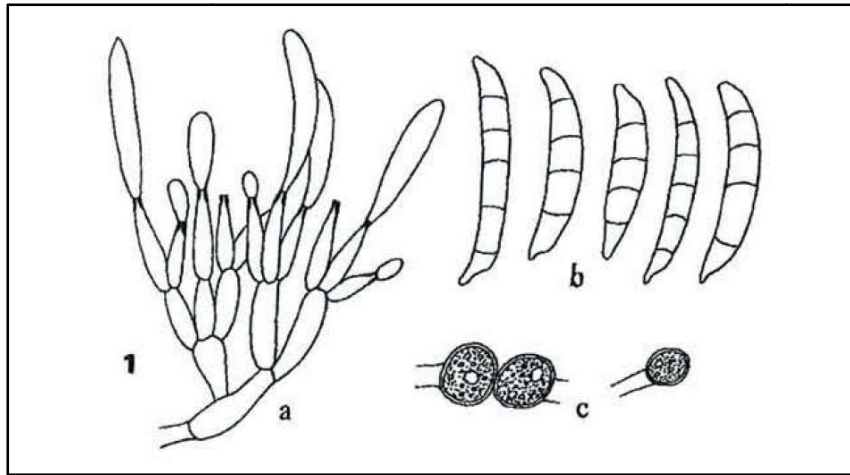


Figure 1 : Caractéristiques de *Fusarium culmorum* (Botton et al., 1985), (x750).

1- *Fusarium culmorum* : a- macrophialides et macroconidies ; b- macroconidies ; c-chlamydospores

Fusarium graminearum

Le thalle est rose grisâtre ou rouge à pourpre devenant brun vineux, floconneux. Il n'y a pas de microconidies. Les phialides peuvent s'agréger en sporodochies. Les macroconidies sont fusiformes, courbes, septées, à cellule terminale longue et pointue. Les chlamydospores sont intercalaires, globuleuses, hyalines à brun pâle, formées par le mycélium, ou plus rarement dans les macroconidies. Les périthèces sont formées dans la nature sur un grand nombre de graminées. Les asques sont clavés et octosporés. Les ascospores sont hyalines ou brunes très claires, fusiformes, triseptées. (Botton *et al.*, 1985), (figure 2).

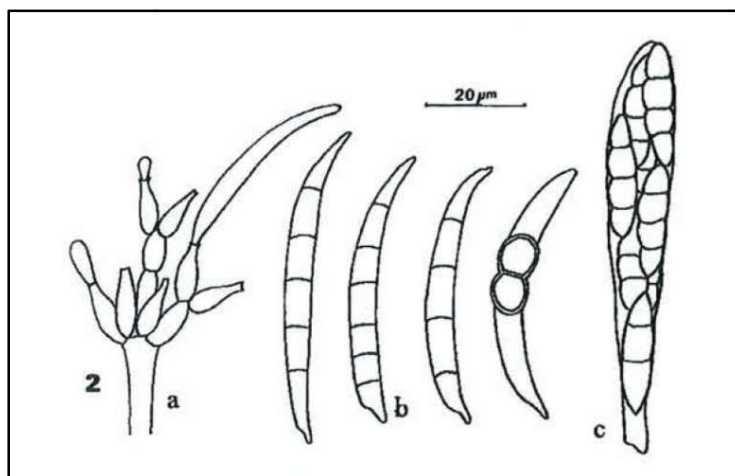


Figure 2 : Caractéristiques de *Fusarium graminearum* (Botton et al., 1985)

2- *Fusarium graminearum* : a- macrophialides et macroconidies ; b- macroconidies ; c- asqueoctosporé

1.1.2.2 Identification moléculaire

La technique de PCR-RFLP se base sur l'amplification de la même portion d'ADN pour toutes les espèces, puis la digestion des amplifiats par des enzymes de restriction. Du fait d'un polymorphisme de séquences, les sites de coupures enzymatiques sont variables d'une espèce à l'autre. Le polymorphisme de longueur est révélé sur gel pour chaque espèce (Edel et al., 1996). Une technique dérivée consiste à amplifier, également la même portion d'ADN pour toutes les espèces, puis à séquencer les amplifiats. La séquence est variable d'une espèce à l'autre (Hennequin et al., 1999).

Une autre technique consiste à amplifier l'ADN avec des amorces établies au hasard : la PCR couplée à des marqueurs RAPD (Randomly Amplified Polymorphie DNA Polymerase Chain Reaction), que Nicholson et al. (1998) et Parry et al. (1995) ont réussi à développer des amorces spécifiques capables de distinguer les espèces *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. avenaceum* et *F. poae* dans des extraits végétaux. Ainsi, l'emploi d'une paire d'amorces spécifiques simplifie l'identification du *F. graminearum* et *F. culmorum* deux espèces faisant l'objet de notre travail.

1.1.3 Facteurs influençant la croissance des espèces du genre *Fusarium*

La croissance fongique est fortement influencée par l'interaction complexe de plusieurs facteurs environnementaux tels que la température, l'activité de l'eau, le pH, l'acidité du milieu, le taux de CO₂ et la présence simultanée d'autres micro-organismes, il faut noter aussi qu'il y'a une corrélation positive entre ces facteurs et ceux qu'influencent la production de mycotoxines (Martins & Martins, 2002 ; Ramirez et al., 2004).

Selon Hope et al. (2005), *Fusariumculmoruma* une croissance optimale à une activité d'eau de 0,98 a_w et une croissance minimale à 0,90 a_w dans les degrés de température de 15°C et 25 °C. La croissance du *F. graminearum* est optimale à 0,99 a_w à 25°C et 0,98 a_w à 15°C. Dans l'ensemble, la température, l'activité de l'eau et leurs interactions affecte significativement la croissance des deux espèces (Hope et al., 2005). L'Influence du pH sur la croissance des deux espèces du genre *Fusarium* a révélé que *F. aethiopicum* et *F. culmorum* ont manifesté une bonne croissance à un pH de 6,5 alors qu'une absence de croissance a été notée à un pH entre 2,5 et 3,5 pour les deux espèces de *Fusarium* étudiées.

Une augmentation de l'acidité ou l'alcalinité entraîne une diminution progressive de la biomasse fongique. Cependant, une corrélation positive entre la croissance des deux espèces et la production des mycotoxines (DON et NIV) a été enregistrée pour *F. aethiopicum* et *F. culmorum* (SHILPA, 2014).

2. Aperçu sur les mycotoxines

Les mycotoxines sont des molécules toxiques produites par des champignons via leur métabolisme secondaire. Malgré les efforts pour contrôler la contamination fongique, la flore fongique naturelle associée aux aliments est dominée par les espèces *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium* (Murphy et al., 2006). Parmi les mycotoxines identifiées, les mieux étudiées et qui causent des dégâts très importantes du point de vue agroalimentaire sont des aflatoxines (AFs), des fumisinisines, la zéaralénone (ZEA), l'ochratoxine A (OTA) et des trichothécènes notamment le déoxynivalénol (DON). Leur toxicité aiguë par absorption digestive a été documentée à la suite d'épidémies humaines et animales, et par expérimentation animale (Le Bars, 1996). Dans ce travail nous nous intéressons aux mycotoxines produites par les champignons du genre *Fusarium* à savoir les trichothécènes. Ces derniers forment une famille qui comporte approximativement 170 molécules (Grove 1988; 1993) divisées en quatre types (A, B, C et D). Le type A est représenté par les toxines T-2 et HT-2 et le type B par le déoxynivalénol (DON), le nivalénol (NIV) et leurs dérivés acétylés.

Les trichothécènes types A et B sont produites par plusieurs espèces de *Fusarium* (Thrane, 2001). Cependant, les principaux producteurs de DON sont *F. graminearum*, *F. culmorum* et *F. cerealis*. Ces derniers sont des champignons du sol et ce sont des agents pathogènes importants des plantes. Ils poussent sur les récoltes et dans le champ (Eriksen et Alexander, 1998).

2.1 Déoxynivalénol (DON)

2.1.1 Généralités

Le déoxynivalénol (DON; vomitoxin ; dehydronivalenol) nommé selon l'UIPAC en 2005 : 12,13-époxy-3, 4, 15-trihydroxytrichotec-9-èn-8-one, $C_{15}H_{20}O_6$, PM: 296,32. Chimiquement, il appartient à la famille des **trichothécènes**. La structure chimique du DON est présentée dans la figure 3. Il appartient au groupe des sesquiterpénoides qui possèdent un

squelette tricyclique (trichothécane) formé par un cyclopentane, un cyclohexane, un cycle à six chaînons oxygénés et 4 groupements méthyles (Sobrova et al., 2010).

Le déoxynivalénol est un composé en général très stable, pendant le stockage/broyage et au cours de la cuisson des aliments. Il n'est pas dégradé par des températures élevées (EFSA, 2011c).

Le DON est une mycotoxine produite par des champignons du genre *Fusarium*, à savoir *Fusarium culmorum* et *Fusarium graminearum*, microorganismes abondants dans diverses cultures de céréales (blé, maïs, orge, avoine et seigle) et les céréales transformées (malt, la bière et du pain).

Dans les céréales contaminées, les dérivés 3-acétyl et 15-acétyl DON sont présents à des proportions importantes (10-20%) en plus de DON (Eriksen et Alexander, 1998).

Il n'y a aucune preuve expérimentale ou épidémiologique pour des propriétés mutagènes et cancérogènes de DON et il a été classé par le CIRC dans la catégorie 3 (non classable quant à sa cancérogénicité aux humains) (IARC, 1993).

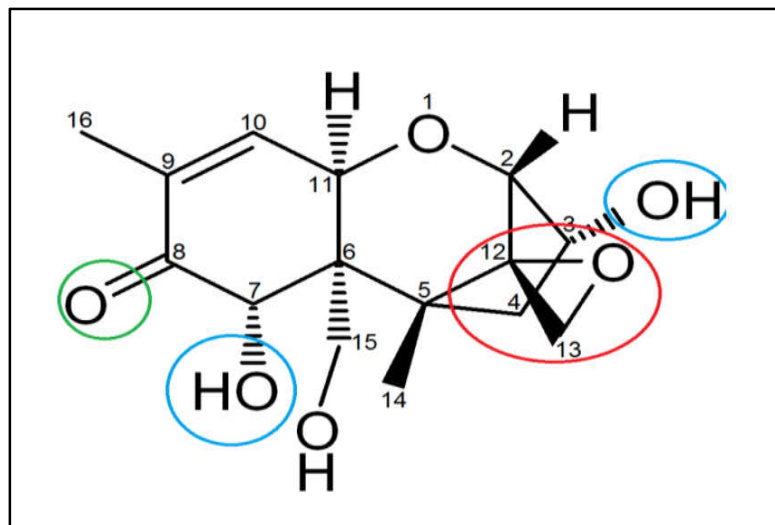


Figure 3 : Structure chimique générale du déoxynivalénol

○ Groupement spécifique aux trichothécènes de type B ; ○ groupement spécifique au DON ;
○ Groupement principal responsable de la toxicité.

Bien que le DON soit moins toxique que les autres trichothécènes tels que T-2 ou HT-2. Les effets aigus d'intoxication alimentaire chez les humains sont des douleurs abdominales, des vertiges, des maux de tête, irritation de la gorge, des nausées, des vomissements, la diarrhée et des selles sanglantes (Rotter et al., 1996).

L'administration chronique du DON chez les animaux, provoque une perte de poids, l'anorexie, et une diminution de l'efficacité nutritionnelle. Chez les porcs, les espèces les plus étudiées, une concentration de 1 à 2 ppm provoque le rejet partiel de l'alimentation, tandis que 12 ppm conduit à un refus total. L'administration de DON se traduit également par une augmentation de la taille du foie, une diminution des protéines sériques, ainsi qu'une diminution de l'hématocrite et une réduction du calcium sérique et de phosphore. D'autres symptômes sont la réduction de la taille de la thyroïde, des taux élevés de thyroxine et de troubles immunitaires tels que l'immunodépression ou d'immunostimulation (en fonction de la dose et la fréquence d'exposition) et une sensibilité accrue aux agents pathogènes facultatifs. Chez le porc, le DON a également un effet neurotoxique qui produit un syndrome anorexique, en modifiant la concentration des neurotransmetteurs dans l'hypothalamus, le cervelet et le cortex frontal. Il augmente également la sérotonine, mais n'a aucun effet sur les niveaux de la noradrénaline et de la dopamine (Lori et Rizzo, 2007).

2.1.2 Biosynthèse du déoxynivalénol (DON)

Les trichothécènes tels que le déoxynivalénol (DON), le nivalenol et la toxine T-2 sont des sesquiterpènes dérivés de la voie de l'acide mévalonique (MVA) (Kimura et al., 2007). Le pyruvate produit à partir de la glycolyse est transformé en acétyl-CoA. Dans la voie MVA commence par la condensation de 3 molécules d'acétyl-CoA sous l'action de la thiolase et de la 3-Hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA synthase. Le produit formé est le 3-Hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMG-CoA) qui sera réduit en acide mévalonique sous l'action de l'enzyme HMG-CoA réductase. Après des réactions de phosphorylation et décarboxylation, le mévalonate est transformé pour produire diphosphate isopentenyl diphosphate (IPP). Sous l'action de l'enzyme farnésyl pyrophosphate synthase l'IPP est ensuite converti en farnésyl diphosphate (Lange et al., 2000), le premier substrat de la biosynthèse du DON (Foroud et Eudes, 2009). Dans la première étape, le diphosphate de farnésyle est cyclisé en trichodiène par trichodiène synthase (tri5) (figure 4) (Foroud et Eudes, 2009). La voie de biosynthèse des trichothécène de type B est illustrée par la figure 4. Dans la première étape, le farnésyl diphosphate est cyclisé en trichodiène par la trichodiène synthase (Foroud et Eudes, 2009). Les trois étapes suivantes comprennent une hydroxylation, époxydation et une autre hydroxylation catalysée par une monooxygénase P450 pour produire l'isotrichodiol. Une hydroxylation supplémentaire produit l'isotrichotriol (Kimura et al., 2007).

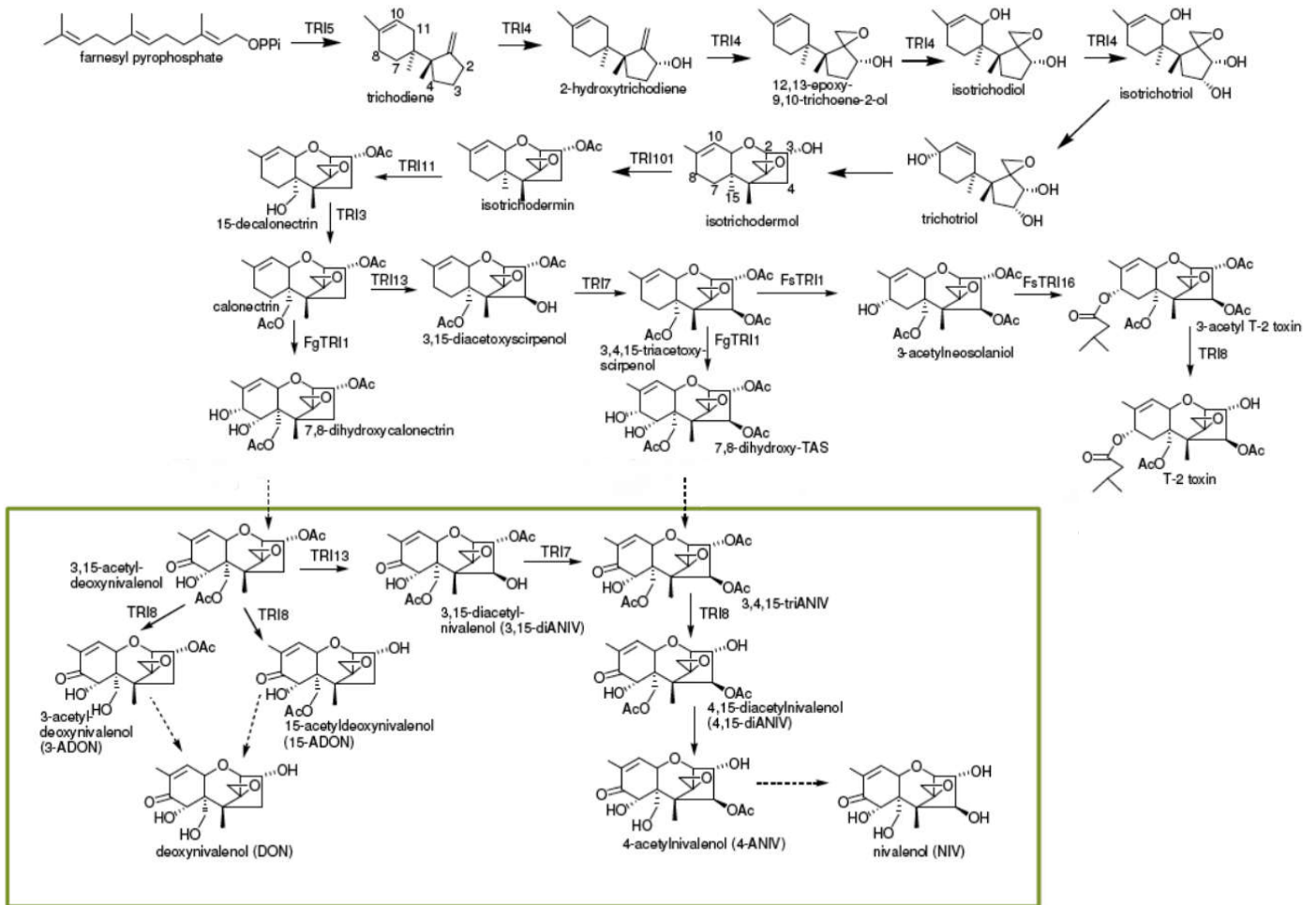


Figure 4 : voie proposée de la biosynthèse du déoxynivaléol (DON).

La boîte représente les trichothécènes de type B. Figure extraite de McCormick, Stanley, Stover, et Alexander (2011).

Deux étapes d'isomérisation non enzymatiques produisent le premier trichothécène dans la voie dite isotrichodermol (Foroud et Eudes, 2009). L'enzyme trichothécène 3-O acétylatransférase transfère un groupement acétyle à l'isotrichodermol en C-3 pour produire isotrichodermine, qui est ensuite hydroxylée en C-15 par une monooxygénase pour former la 15-décalonectrine (Foroud et Eudes, 2009). Par la suite, la 15-O-acétyltransférase produit la calonectrine, suivie par 7,8-dihydroxycalonectrine catalysée par TRI1 (C-7 17monooxygénase) (McCormick et al., 2011). Le produit suivant est 3,15-diacétylcalonectrine, qui est converti en 3-acétyldéoxynivaléol (3ADON) par la déacétylase (McCormick et al., 2011). Dans la dernière étape, 3ADON serait converti en DON par le TRI101 (Figure 4) (McCormick et al., 2011).

3. Effet antifongique des huiles essentielles (menthe pouliot)

3.1 Menthe pouliot

Description de *Mentha pulegium*

Le genre *Mentha L.* (Lamiaceae) se compose de plus de 25 espèces, est responsable d'environ 2000 tonnes d'huile essentielle dans le monde entier, ce qui en y fait le deuxième genre producteurs des huiles essentielles les plus importantes, après le genre *Citrus* (Mucciarelli et al., 2001).

L'espèce *Mentha pulegium L.*, appartenant à ce genre et communément connu sous le nom pouliot, est une plante herbacée vivace aromatique atteignant jusqu'à 40 cm de hauteur (Stengele et Stahl-Biskup, 1993). Cette espèce sauvage pousse dans les zones humides et immergées d'eau du centre, sud de l'Europe occidentale, l'Afrique du Nord et en Asie (Chalchat et al., 2000; Tutin et al., 1972). Les parties aériennes sont pubescentes portant trichomes glandulaires qui sont responsables de la sécrétion d'huile essentielle.

La morphologie, la distribution et la fréquence de ces trichomes glandulaires sont des caractéristiques distinctives entre les espèces de Lamiacées (Werker, 2000). Dans la médecine traditionnelle, elle est utilisée sous forme d'infusion pour la prévention de divers troubles et inflammations des voies respiratoires et gastriques (Mkaddem et al, 2007 ; Póvoa et al, 2006).

Cette plante a également été utilisée comme épice et agent aromatisant dans plusieurs aliments (Mkaddem et al., 2007 ; Monteiro et al., 2007a), les huiles essentielles de *M. pulegium* sont généralement considérés comme riches en pulégone, un composé toxique avec des effets hépatotoxiques potentiellement mortels (Anderson et al., 1996). Plusieurs publications, rapports et directives de l'union européenne mettent l'accent sur la nécessité d'une meilleure caractérisation des plantes et préparations botaniques et de l'évaluation scientifique des risques liés à l'exposition des consommateurs à ces produits.

Il est connu que la composition chimique des plantes est influencée par plusieurs facteurs externes, y compris les conditions et le climat de croissance (Figueiredo et al., 2008).

Classification:

- **Règne :** Plantae
- **Embranchement :** Spermathophyta (Angiospermae)
- **Classe :** Equisetopsida
- **Ordre :** Lamiales

- **Famille :** Lamiaceae
- **Genre :** *Mentha*
- **Espèce :** *Mentha Pulegium*
- **Nom vernaculaire :** Menthe pouliot



Figure 5 : photo de *Mentha Pulegium* (Pelot, 2010)

3.2 Généralités sur les huiles essentielles

Les HEs existant dans les plantes aromatiques sont responsables des différentes senteurs qu'elles dégagent. Les HEs se retrouvent dans des glandes minuscules situées dans différentes parties de la plante aromatique : dans les feuilles (basilic), dans les fleurs (rose), dans le fruit (citron), dans les graines (coriandre), dans l'écorce (cannelle) et, pour certaines plantes, c'est dans les racines (ail) (Jacques, 1997). Les HE sont des complexes naturels de molécules volatiles et odorantes, synthétisées par les cellules sécrétrices des plantes aromatiques. Celles-ci les conservent dans des poches au niveau de certains organes (Duquenois, 1968).

La synthèse et l'accumulation d'une huile essentielle sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, le plus souvent situées sur ou à proximité de la surface du végétal (Bruneton, 1987). Il existe en fait quatre structures sécrétrices :

- Les cellules sécrétrices : Chez les Lauracées et les Zingibéracées.

- Les poils glandulaires épidermiques : Chez les Lamiacées, Géraniacées... etc.
- Les poches sphériques schizogènes : Les glandes de type poche se rencontrent chez les familles des : Astéracées, Rosacées, Rutacées, Myrtacées, etc.
- Les canaux glandulaires lysigènes : On les retrouve chez les Conifères, Umbellifères, etc.

3.3 Méthodes d'extraction et d'identification des composés des huiles essentielles

3.3.1 Méthodes d'extraction

Le procédé d'obtention des HE intervient d'une façon déterminante sur sa composition chimique (Garnero, 1977).

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales, cette diversité est due à la variété des matières premières et à la sensibilité considérable de certains de leurs constituants.

La méthode utilisée dans ce travail est l'extraction par hydrodistillation, elle a été proposée par Garnier en 1891, c'est la méthode la plus utilisée pour extraire les HE et pouvoir les séparer à l'état pur, mais aussi de fournir de meilleurs rendements. Le principe consiste à immerger directement la matière végétale à traiter dans un ballon rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition, les vapeurs hétérogènes vont se condenser sur une surface froide et l'HE sera alors séparée par différence de densité (Bruneton, 1993). Il existe autres méthodes d'extraction à savoir l'extraction par solvants organiques, l'expression à froid, l'enfleurage, l'hydro-distillation par micro-ondes sous vide et l'extraction par fluide à l'état supercritique...etc.

Des travaux réalisés sur l'influence du procédé d'extraction sur la composition chimique des huiles essentielles montrent que l'extraction par les micro-ondes à une grande efficacité du point de vue rendement, temps d'extraction, et pourcentage du produit actif (chénotype) (Bendahou et al., 2008 ; Bocevska et al., 2007).

3.3.2 Méthodes d'identification des composés des huiles essentielles

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

La CPG est une des méthodes privilégiées pour la séparation et l'identification de des composants d'une HE, elle réalise à la fois une analyse qualitative et quantitative (Paris et Godon, 1979). Cette méthode consiste à l'injection et la vaporisation de l'échantillon en tête de colonne. L'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile. La CPG est basée sur la distribution du produit analysé entre une phase gazeuse mobile est une phase (liquide ou solide) immobilisée sur la surface d'un support inerte (Skoog *et al.*, 2003).

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

En ce qui concerne particulièrement les huiles essentielles, le couplage CPG/SM est, aujourd'hui, la technique de référence (Longevialle, 1981 ; Constantin, 1996).

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

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

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

4. Contrôle de la croissance fongique par les huiles essentielles

Les moyens de lutte contre les moisissures se basent principalement sur l'utilisation de substances chimiques antifongiques. La multiplication des applications de ces molécules pose de sérieux problèmes de rémanence (Kanda, 2003). La plupart des fongicides de synthèse actuels affectent directement des fonctions essentielles, comme, par exemple, la respiration, la biosynthèse des stérols ou la division cellulaire. Ce mode d'action peut entraîner, d'une part, des risques pour l'Homme et les organismes non ciblés et, d'autre part le développement de souches fongiques résistantes (Caron & Laverdiere, 2003). De ce fait, la recherche d'autres molécules alternatives à ces fongicides s'impose.

La composition chimique des huiles essentielles est un mélange complexe qui peut varier non seulement, par les facteurs intrinsèques (le génotype) de l'organe mais aussi en fonction de divers paramètres extrinsèques telles que la température, la quantité de lumière, la pluviométrie, la période de récolte, les conditions édaphiques, et le mode d'extraction (Mohamed *et al.*, 2009; Olle et Bender, 2010). En effet, le pool génétique représente le principal facteur influençant la biosynthèse des huiles essentielles dans la même espèce.

C'est la raison pour laquelle, une même espèce présente plusieurs chémotypes, en élaborant des huiles essentielles avec des entités chimiques variables.

La quantité et la qualité des composés chimiques des huiles essentielles leur confèrent plusieurs activités plus précisément : l'activité antibactérienne, l'activité antifongique, l'activité antiparasitaire et l'activité antioxydante (Marzouk *et al.*, 2008).

Ces propriétés sont étroitement liées à la nature de leurs constituants et des groupements ou fonctions chimiques qu'ils possèdent ; c'est le cas de l'activité antifongique qui décroît selon le type de fonctions chimiques : Phénols > Alcools > Aldéhydes > Cétones > Ethers > Hydrocarbures.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne *in vitro* d'une substance peut être mise en évidence par plusieurs techniques classiques, aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide. Les méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne des HE les plus couramment utilisées

sont la méthode de diffusion dans l'agar, la méthode de micro-atmosphère et la méthode de dilution.

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celles des moisissures et des levures. Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés majeurs.

Rasooli *et al.* (2006) ont montré que les huiles essentielles affectent l'ultra-structure des champignons, *Aspergillus niger* provoquant des dommages irréversibles sur la membrane cellulaire (perte de potentiel membranaire), et une inhibition de la germination des spores et de l'élongation du mycélium. En outre, chez *saccharomyces cervisiae*, l'origan et le clou de girofle, provoque la lyse cellulaire (Chami, 2005).

Parmi les huiles essentielles qui présentent une activité antifongique, on trouve les huiles dérivées des plantes aromatiques et médicinales particulièrement : le clou de girofle, l'origan, le thym, les agrumes, la menthe et le romarin.

Des études récentes effectuées sur des champignons toxigènes appartenant aux espèces *Penicillium nordicum*, *Penicillium verrucosum*, *Verticilliumdahliae* et *Cladosporium* sp., ont montré que l'utilisation des produits synthétiques (Aliette, Rovral, Cantus, Ortiva, Expérience Luna, Fenomenal et Mancozèbe) inhibe la croissance fongique mais au même temps stimule la synthèse de toxines à savoir l'ochratoxine A/B et la citrinine (Schmidt et al., 2013).

Les huiles essentielles de nombreuses plantes aromatiques ou leurs composés actifs pourraient être employés dans le domaine phytosanitaire et agroalimentaire comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires (Lis-Balchin, 2002 ; Ismaïel et al., 1990).

Les huiles essentielles des deux espèces *Thymus bleicherianus* et *Thymus capitatus*, ont montré in vitro, une forte activité antifongique contre tous les champignons de pourriture du bois d'œuvre testés. Ce grand pouvoir bioactif observé chez les deux huiles essentielles est attribué principalement à leurs teneurs élevées en phénols terpéniques (carvacrol et thymol) (El Ajjouri, 2008).

Trois huiles essentielles des plantes aromatiques et médicinales marocaines (*Thymus vulgaris*, *Mentha spicata* et *Citrus limonum*) ont été testées vis-à-vis de trois souches de

dermatophytes responsables de la surinfection de l'eczéma de contact (*Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, et *Epidermophyton floccosum*). Ces huiles essentielles, appliquées à des concentrations élevées ont inhibé significativement la croissance mycélienne des trois champignons testés. Ainsi, l'huile essentielle du *Thymus vulgaris* a montré l'activité la plus élevée contre les dermatophytes par rapport à celle des deux autres huiles. L'espèce *Trichophyton mentagrophytes* a montré une sensibilité aux huiles essentielles plus importante que les autres dermatophytes.

Les huiles essentielles les plus étudiées pour leurs propriétés antifongiques appartiennent à la famille des Lamiacées : thym, origan, lavande, menthe, romarin, sauge, etc... Etant donnée la grande complexité de la composition chémotypique des huiles essentielles, malgré de possibles synergies certains auteurs préfèrent étudier l'effet d'un composé isolé pour pouvoir ensuite le comparer à l'activité globale de l'huile. Ainsi l'activité fongistatique des composés aromatiques semble être liée à la présence de certaines fonctions chimiques (Voukou et al., 1988).

Plusieurs chercheurs attribuent l'activité antifongique des huiles essentielles aux composés majoritaires de celles-ci, Ainsi Hmiri et al. (2011) ont attribué l'activité antifongique de la menthe pouliot vis-à-vis des champignons responsables de la détérioration des pommes à la présence de la pulégone comme composé majoritaire.

Les travaux d'Ouraini et al. (2007) et Chebli et al. (2003) ont signalé que l'activité de n'importe qu'il huile essentielle serait le résultat aussi bien de ses composés majoritaires que de l'effet synergique des composés minoritaires.

CHAPITRE II: Matériel et méthodes

Le présent travail a été réalisé au sein du laboratoire d'agroalimentaire et sécurité sanitaire des aliments (LASSA) à la Faculté des Sciences Dhar el Mahraz à Fès.

1. Matériel biologique

Sept souches de *Fusarium colmorum* (MUCL 791, MUCL 792, MUCL 794, MUCL 795, MUCL 796, MUCL 797 et MUCL 799) et une souche de *F. graminearum* (MUCL 803) sont utilisées dans cette étude. Elles proviennent de la Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain. L'identification morphologique et moléculaire a été confirmée par le personnel de la mycothèque. Les souches ont servi pour étudier l'effet de l'huile essentielle de la menthe pouliot sur la croissance fongique.

2. Préparation de la solution sporale

Les souches de *Fusarium* ont été cultivées sur milieu MEA à 25°C pendant 11 jours. Les conidies ont été récoltées par grattage dans une solution de l'eau physiologique stérile à 0.9%. La concentration finale de la suspension de spores a été déterminée à l'aide d'une cellule hématimétrique (chambre de Thoma). Des boîtes de Pétri contenant 20 ml du milieu de culture MEA ont été inoculées centralement avec 10 µl de la suspension de spores fongique (environ 10⁵ spores).

3. Matériel végétal

Ce travail a porté sur la menthe pouliot du nom latin *Mentha pulegium* fait partie des plantes aromatiques et médicinales, originaire d'Europe et d'Asie Mineure, se rencontre partout au Maroc dans les endroits humides. Elle est très utilisée pour soigner les rhumes, les maux de gorge, la toux, les bronchites, les infections pulmonaires et les refroidissements, elle est aussi un excellent digestif. La production nationale d'huile essentielle de cette plante peut être estimée à 20 tonnes par an (Bellakhdar, 1997 ; Hmamouch, 2001).

4. Effet de l'huile essentielle de la menthe pouliot sur la croissance fongique

3.1 Extraction des huiles essentielles

Parmi les techniques d'extraction des huiles essentielles, l'hydrodistillation est l'une des techniques les plus utilisées et les plus anciennes. L'huile essentielle a été extraite par un dispositif de type Clevenger. Un mélange d'eau et des parties de la plante dont on veut extraire l'huile essentielle ont été placées dans un ballon qui est porté à ébullition. Sous l'effet de la chaleur et en présence de la vapeur d'eau (hydrodistillation), les cellules végétales éclatent et libèrent les molécules odorantes (Guenther, 1972). Ces molécules sont entraînées par la vapeur d'eau puis condensées via un réfrigérant.

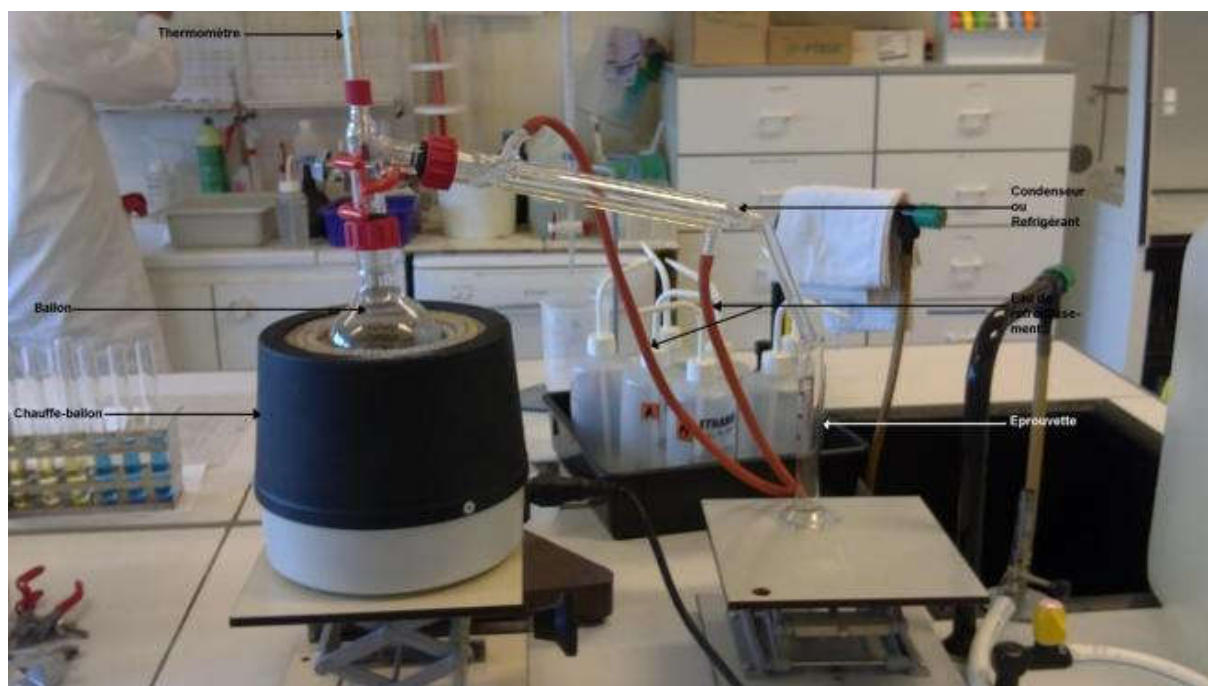


Figure 6: Hydrodistillation dispositif

La phase organique du condensat (huile essentielle) est ensuite récupérée. Les rendements en HE ont été déterminés par rapport à la matière sèche, estimée à partir d'échantillons séchés pendant trois jours à température ambiante. Les HE obtenues sont ensuite analysées par chromatographe en phase gazeuse.

3.2 Analyse de la composition chimique de l'HE de la menthe pouliot par GC-FID-O

La composition chimique de l'huile essentielle de la menthe pouliot a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée d'une part à un détecteur à ionisation de flamme et à un détecteur olfactif (GC-FID-O).

3.1.1 Analyse GC-FID-O

Le chromatographe (Thermo Finigan, Trace 2000) est équipé d'un injecteur split-splitless, d'un détecteur à ionisation de flamme, d'un détecteur olfactif, d'un intégrateur (Chromjet DP-700). Les composés volatils ont été séparés sur une colonne capillaire (50 m x 0.32 mm Wall Coated Open Tubular (WCOT); CP-SIL5 CB (CHROMPACK), épaisseur du film de 1.2 μm). La température du four est maintenue à 36°C pendant 2 min et ensuite programmée de 36°C à 85°C avec une pente de 20°C/min puis jusqu'à 145°C à 1°C /min et enfin jusqu'à 250°C à 3°C /min. La température du four est maintenue à 250°C pendant 30 minutes. Le débit du gaz vecteur (azote) est de 1 ml/min. Les températures de l'injecteur et du détecteur sont respectivement de 225 et 275°C. L'huile essentielle de la menthe pouliot diluée dans le dichlorométhane a été analysée en double et l'injection se fait en mode splitless avec ouverture du split à 0.80 min. La surface minimale des pics intégrés est fixée à 1000 $\mu\text{V.S}$. En sortie de colonne un diviseur permet d'envoyer la moitié de l'effluent vers le détecteur (FID) et l'autre moitié vers une sortie chauffée. Ce dispositif permet de flairer chaque composé volatil séparé préalablement. En général la colonne se termine par un entonnoir dans lequel l'opérateur place son nez et tente alors de définir chaque odeur perçue, son intensité relative ainsi que le temps où il perçoit l'odeur. L'évaluation de l'odeur a été effectuée deux fois pour l'HE. Les composés ont été identifiés sur base de leurs indices de rétention (IK) et de leurs odeurs en comparaison avec ceux des standards purs injectés.

Les indices de Kovats nous permettent d'identifier les composés volatils présents dans l'HE. Ils se basent sur la relation linéaire existant entre le temps de rétention (ou son logarithme, s'il n'y a pas de programmation de température) et le nombre d'atomes de carbone d'une série d'alcanes. Ainsi, le temps de rétention de chaque composé analysé par chromatographie peut être comparé à deux alcanes, l'encadrant sur le chromatogramme et converti en indice de Kovats. Par définition l'indice de Kovats d'un alcane est fixé à 100 fois son nombre d'atomes de carbone (n). Le grand avantage des IK est leur constance pour une phase stationnaire donnée et cela, quelle que soient les conditions expérimentales. L'indice de Kovats des composés organiques volatils est calculé d'après la formule suivante.



Figure 7: Chromatographe en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme et un détecteur olfactif (GC-FID-O).

$$IK_x = [(T_{Rx} - T_{Rn}) / (T_{Rn+1} - T_{Rn})] \times 100 + IK_n$$

IK_x : indice de Kovats du composé x.

IK_n : indice de Kovats de l'alcane à n atomes de carbones = $100 \times n$.

T_{Rn} et T_{Rn+1} sont les temps de rétention (en minutes) des deux alcanes qui encadrent, dans le chromatogramme, le composé x.

T_{Rx} = temps de rétention du composé x.

3.2 Milieux de culture

L'étude de l'effet de l'huile essentielle sur la croissance fongique a été réalisée sur le milieu de culture Malt Extract Agar (MEA) dont la composition est la suivante : Malt Extract, 30g ; Agar, 17g. L'activité de l'eau a été ajustée par l'ajout de glycérol selon les proportions décrites par Ramos et al. (1998).

3.3 Ajout de l'HE de la menthe pouliot, inoculation et incubation du milieu MEA

Les tests antifongiques ont été réalisés selon la méthode rapportée par Remmal et al. (1993b). L'huile essentielle est émulsionnée par une solution d'agar à 0.2 % afin de disperser

les composés. Des volumes de cette dilution ont été ajoutés au milieu MEA (Malt Extract Agar) stérilisés et refroidis à 45-50°C.

Les Concentrations finales en huile essentielle sont 0.25, 0.5, 1, 2, 3 et 4 µL/mL. Des témoins contenant le milieu de culture seul ont également été préparés. Tous les essais ont été réalisés en triple. 10 µl de la solution sporale ajustée à 10^5 spore/ml ont été déposés au milieu de chaque boîte. Le tout est incubé à 25°C à l'obscurité pendant 11 jours. Généralement la majorité des huiles essentielles sont instables à la lumière et, elles disparaissent ou se dégradent après une brève exposition à la lumière essentiellement en présence d'humidité.

3.4 Mesure du taux de croissance

Les boîtes ont été contrôlées quotidiennement pendant 11 jours (le diamètre de colonie serait identique au diamètre de boîte de pétri) et les diamètres des colonies ont été mesurés en deux directions perpendiculaires. La régression linéaire du rayon de la colonie en fonction du temps (jours) a été utilisée pour la détermination du taux de croissance radiale exprimé en mm/jour.

CHAPITRE III : Résultats et Discussion

Le développement de champignons et la production de mycotoxines dépend de plusieurs facteurs environnementaux comme la température et l'activité en eau ainsi que la composition chimique de la denrée sur laquelle les moisissures se développent. L'objectif de cette partie est d'étudier l'effet de l'huile essentielle de la menthe pouliot sur la croissance fongique. Pour ce faire nous avons sélectionné sept souches de *Fusarium colmorum* et une souche de *F. graminearum*.

1. Rendement et Composition chimique de l'huile essentielle

Après hydrodistillation de l'huile essentielle de la menthe pouliot, le rendement moyen d'extraction de la partie aérienne, en particulier les feuilles, a été estimé à 5ml pour 100g de la matière sèche. L'huile essentielle de cette plante est incolore et caractérisée par une odeur mentholée, forte et agréable.

L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle de la menthe pouliot a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme et à un détecteur olfactif (GC-FID-O). La figure 7 illustre le chromatogramme typique de l'huile essentielle de *menthe pouliot*. Les composés séparés sur une colonne capillaire apolaire ont été identifiés sur base de la comparaison de leurs indices de rétention et de leurs odeurs par rapport à ceux des composés standards analysés dans les mêmes conditions.

Une centaine de composés ont été détectés dont 16 ont été identifiés. Les composés importants sont représentés dans le tableau 1. La composition chimique de l'extrait de *menthe pouliot* est représentée essentiellement par des terpènes dont le composé majeur est la pulégone avec un pourcentage de 86.14%.

La proportion des composés identifiés dépasse 90% par rapport à l'ensemble des composés volatils de l'HE de *menthe pouliot* détectés. En plus de la pulégone caractérisée par une odeur mentholée forte rappelant celle de la menthe pouliot, d'autres molécules ont été également identifiées par GC-FID-O mais avec des proportions plus faibles. On peut citer principalement le borneol (1.31%), l' α -pinène (0.41%), le β -pinène (1.11%), le p-Mentha-1,8-diene (1.10%), et n-octanol (0.12%).

La confirmation de cette identification nécessite l'utilisation de la GC-MS ou la CPG-FID-O avec une colonne polaire.

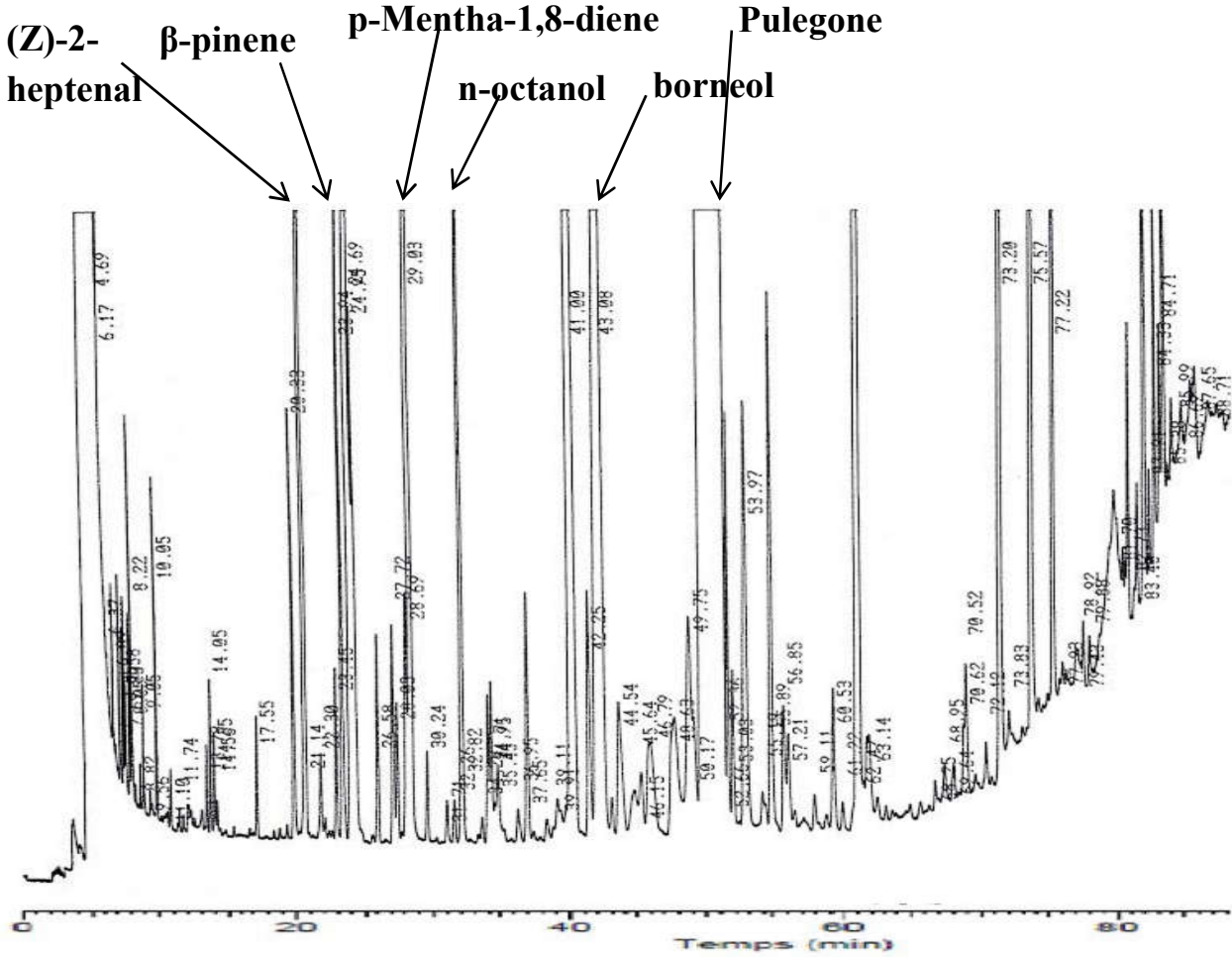


Figure 8: Chromatogramme d'analyse de la menthe pouliot par GC-FID-O

Tableau 1 : Composition chimique de l'huile essentielle de la menthe pouliot

IK	Composé	Identification	%	Odeur
924	(Z)-2-hepténal	GC	0,06	-
934	α -pinène	GC-O	0,41	dd
962	3-Octanol	GC-O	0,02	Rose +
977	β -pinène	GC-O	1,11	-
1024	p-Mentha-1,8-diène	GC-O	1,10	Mentholée ++
1061	n-octanol	GC	0,17	Terre mouillée ++
1079	Linalool	GC-O	0,02	Agréable +++
1107	γ -terpinéol	GC-O	0,05	Florale ++
1153	Borneol	GC-O	1,31	-
1165	p-Menth-8-en-3-one-trans	GC	0,05	-
1175	Tridécène	GC	0,02	-
1184	p-Cymen-8-ol	GC	0,05	-
1230	Pulégone	GC-O	86,14	Mentholée ++++++

Le constituant majeur de l'huile essentielle de la menthe pouliot est la pulégone avec une proportion de 86.14%. Les proportions des autres composés identifiés sont comprises entre 0.02 (3-octanol et tridécène) et 1.31% (bornéol).

Nos résultats sont en accord avec ceux de Qjidaa (2014) et Hmiri et al., (2011), ces auteurs ont aussi identifié les composés volatils de l'huile essentielle de la menthe pouliot et ils ont montré que la pulegone est le composé majeur avec des proportions supérieures à 80%. Cependant, les travaux de Mahboubi et al., (2008) et ceux de Derwich et al., (2010) au Maroc, ont mis en évidence un autre chémotype dont les composés majeurs sont la pipéritone et la pipériténone, avec de faibles teneurs en pulégone.

2. Activité antifongique de la menthe pouliot

Toutes les souches ont été testées pour leur capacité à produire le déoxynivalénol et les résultats ont montré qu'elles produisent toutes cette mycotoxine. Les taux de croissance des différentes souches en présence de différentes concentrations de l'HE de la menthe pouliot sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Effet des différentes concentrations en huile essentielle de *Mentha pulegium* sur le taux moyen de croissance des souches du *F. colmorum* et *F. graminearum* après 11 jours de culture sur milieu MEA

Souches Concentration ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	MUCL 791	MUCL 792	MUCL 794	MUCL 795	MUCL 796	MUCL 797	MUCL 798	MUCL 803
T	12.96 \pm 2.00	7.37 \pm 0.12	10.51 \pm 0.30	8.96 \pm 0.28	6.83 \pm 0.03	10.70 \pm 2.58	12.54 \pm 1.58	10.86 \pm 0.08
0.25	9.44 \pm 0.12	4.63 \pm 0.02	9.09 \pm 0.15	9.28 \pm 0.06	contaminé	9.20 \pm 0.18	9.57 \pm 0.01	6.70 \pm 0.01
0.5	9.19 \pm 0.03	4.75 \pm 0.16	9.14 \pm 0.07	9.22 \pm 0.12	7.13 \pm 0.01	9.13 \pm 0.03	8.71 \pm 0.63	5.89 \pm 0.00
1	7.03 \pm 0.11	2.27 \pm 0.11	3.56 \pm 0.53	4.43 \pm 0.82	4.62 \pm 0.29	3.62 \pm 0.41	4.16 \pm 0.15	2.71 \pm 0.12
2	6.44 \pm 0.70	2.96 \pm 0.06	3.68 \pm 0.48	4.27 \pm 0.35	3.88 \pm 0.00	3.76 \pm 0.08	3.22 \pm 0.14	2.44 \pm 0.18
3	5.99 \pm 1.36	3.39 \pm 0.08	4.50 \pm 1.30	3.64 \pm 0.67	4.11 \pm 0.35	4.77 \pm 1.00	3.48 \pm 0.47	Contaminé
4	5.78 \pm 0.27	3.44 \pm 0.21	0.99 \pm 0.04	3.54 \pm 0.95	4.53 \pm 0.12	4.18 \pm 0.68	3.30 \pm 0.17	contaminé

L'application de l'huile essentielle de la menthe pouliot à différentes concentrations (0,25, 0,5, 1, 2, 3 et 4 $\mu\text{L/L}$) vis-à-vis de ces souches a révélé une inhibition de la croissance qui dépend probablement de la dose en HE et de la souche testée (Figure 8).

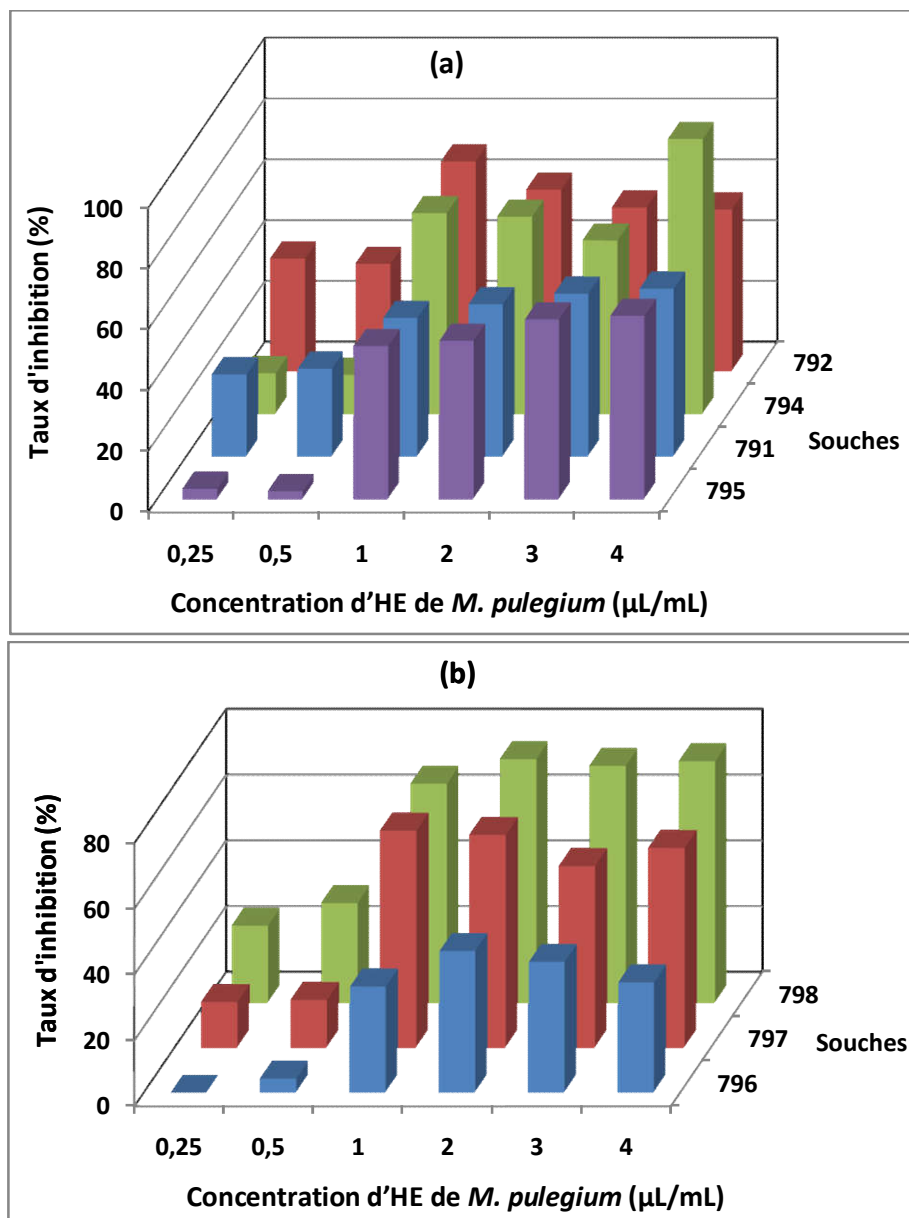


Figure 9: Taux d'inhibition de la croissance fongique des souches de *Fusarium colmorum* (7 souches)
 (a) : les souches MUCL 791, MUCL 792, MUCL 794, MUCL 795 ; (b) : MUCL 796, MUCL 797, MUCL 798

Les résultats obtenus ont montré pour la souche MUCL 791, le taux d'inhibition varie de 27% à la concentration de 0.25 μ L/mL à 55% à la concentration en HE de 4 μ L/mL. Les taux de croissance sont compris entre 72.15 et 55.39 mm/jour avec une moyenne de 42.5 mm/jour.

Le taux de croissance de la souche MUCL 792 à 25°C est de 7.37 mm/jour. L'ajout de l'HE réduit nettement cette croissance radiale avec des taux variant de 4.63 mm/jour à 0.25 μ L/L à 3.44 mm/jour pour une dose de 4 μ L/mL. Les taux d'inhibition varient de 37 à 53%.

Le taux d'inhibition maximal est observé chez la souche MUCL 794, avec une valeur de 90.58% à la concentration de 4 μ L/mL. Le taux de croissance moyen pour le témoin est de l'ordre de 10.51 mm/jour. L'ajout de l'HE réduit cette croissance radiale selon les doses appliquées, le taux de croissance varie de 9.09 mm/jour pour 0.25 μ L/L à 0.99 mm/jour pour la dose maximale en HE (4 μ L/L).

La souche MUCL 795 a montré un taux d'inhibition moyen de l'ordre de 55%. Pour la souche MUCL 796, le taux d'inhibition a atteint 43% à la concentration 2 μ L/mL et un taux d'inhibition de 60.5% à la concentration de 4 μ L/mL. Tandis que la souche MUCL 797 montre un taux d'inhibition qui varie de 14% jusqu'à 64%. En ce qui concerne les souches MUCL 798 et MUCL 803 le taux d'inhibition atteint 75% (Figure8).

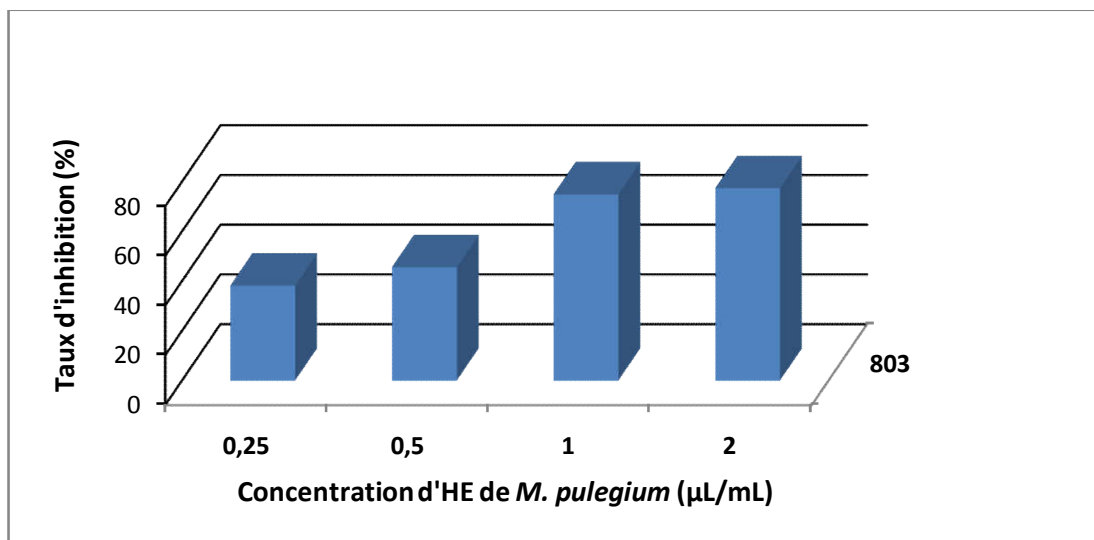


Figure 10: Taux d'inhibition de la croissance de la souche de *Fusarium graminearum* MUCL 803.

Le taux d'inhibition pour la souche MUCL 803 appartenant à l'espèce *Fusarium graminearum* a montré un taux d'inhibition allant de 38% pour la dose d'HE la plus faible (0.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$) jusqu'à 77% à la concentration de 4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Figure 9).

Nos résultats ont montré que l'huile essentielle de la menthe pouliot a une activité antifongique importante pour les 8 souches de *Fusarium culmorum* et *Fusarium graminearum* testées. La croissance des souches était rapide à 25°C pour les témoins avec des taux de croissance variant selon l'isolat de 7.37 à 10.95 mm/jour. En présence de l'huile essentielle de la menthe pouliot, la croissance radiale est plus faible avec un taux d'inhibition variant de 33.7 à 90.6% pour la dose maximale de 4 $\mu\text{L}/\text{L}$.

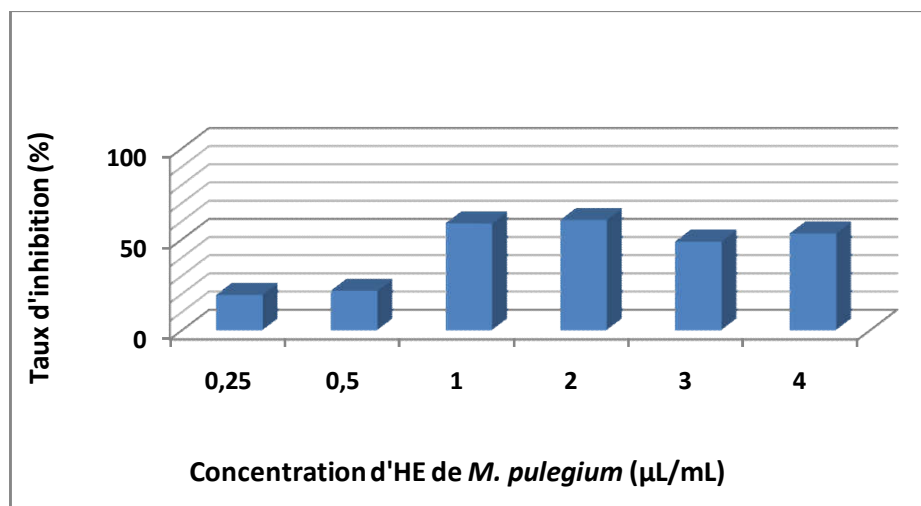


Figure 11: Taux d'inhibition moyen calculé pour l'ensemble des souches de *Fusarium culmorum* (7 souches) et *graminearum* (1 souche)

La figure 10 présente le taux d'inhibition moyen calculé pour l'ensemble des souches testées. Ce taux varie de 19.7% en présence d'HE à la dose la plus faible et il est supérieur à 50% pour la dose maximale appliquée (4 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

Plusieurs études ont été effectuées sur l'activité antifongique de plusieurs plantes contre des champignons du genre *Fusarium* (EL-HOUITI et al., 2011 ; HAMDANI, 2015). Cependant, rares sont celles qui ont abordé l'activité antifongique de l'HE de *Mentha* pour *Fusarium culmorum* et *Fusarium graminearum*. Les résultats obtenus dans cette étude ont montré une inhibition de la croissance fongique qui dépend de la souche et de la concentration de l'huile essentielle. L'HE de la menthe pouliot a montré une activité élevée aux concentrations entre 2 et 4 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Hmiri et al. (2011) qui ont testés la menthe pouliot sur des champignons responsables de la détérioration des pommes (*Alternaria alternata* et *Penicillium expansum*), avec une absence d'inhibition totale même à une concentration de 5µL /mL. Les travaux réalisés par Chebli et al. (2003) et Hajlaoui et al. (2009) ont également montré l'effet antifongique de la menthe pouliot vis-à-vis plusieurs espèces fongiques (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum* et *Trichoderma* sp.).

Conclusion et perspective

Les moisissures et leurs mycotoxines causent des dégâts importants en contaminant les denrées alimentaires. Les champignons du genre *Fusarium* sont l'un des plus importants agents pathogènes des céréales dans le champ et peuvent aussi altérer la production végétale pendant le stockage. De plus, ces microorganismes provoquent des effets néfastes pour les animaux et l'Homme par leurs métabolites secondaires toxiques, principalement le déoxynévaléol (DON). Ainsi, les problèmes dus à l'utilisation du traitement chimique à base de fongicides synthétiques, pousse à la recherche d'alternatives plus efficaces et plus sûres.

La prévention et la maîtrise de la contamination des aliments demeurent indispensables, surtout pendant la culture. L'utilisation des substances naturelles comme des alternatives au lieu d'utiliser des fongicides synthétiques qui stimulent dans certaines conditions la production de DON même si la croissance fongique est inhibée s'avère nécessaire. Ce travail est consacré à l'étude de la composition chimique et de l'activité antifongique de l'huile essentielle de la menthe pouliot sur la croissance de huit souches appartenant aux espèces *Fusarium colmorum* et *Fusarium graminearum*.

L'analyse qualitative et quantitative par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme et à un détecteur olfactif (GC-FID-O) de l'huile essentielle de la menthe pouliot a permis d'identifier 11 composés. La pulégone est le composé majeur avec une proportion de l'ordre de 86%. D'autres composés comme le bornéol, l' α - et le β -pinène ainsi que l'octanol ont également été identifiés dans l'HE de la menthe pouliot.

L'huile essentielle de la *menthe pouliot* testée présente une activité antifongique sur la majorité des souches testées. Les taux d'inhibition varient de 0.99 à 9.57 mm/jour, selon les souches et les doses appliquées (0.25 à 4 μ L/L). A la dose de 4 μ L/mL, les valeurs maximales des taux d'inhibition sont comprises entre 33.7 et 90.6% et le taux d'inhibition moyen calculé pour toutes les souches dépasse 50%.

Il serait intéressant de déterminer le ou les composés de l'HE responsables de cette activité antifongique. Ainsi, les composés majeurs pris séparément ou en mélange devraient être testés. De plus, l'effet combiné de l'HE à différents paramètres environnementaux sur la croissance fongique et la production de DON devrait être approfondie.

Références bibliographiques

- ALEXANDER N.J. (2008) The TRI101 story: engineering wheat and barley to resist Fusarium head blight. *World Mycotoxin Journal* 1:31-37.
- AMARTI F., SATRANI B., GHANMI M., FARAH A., AAFI A., AARAB L., EL AJJOURI M. et CHAOUCH A., (2010), Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss and Reut et *Thymus ciliatus* (Desf) Benth. du Maroc, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 14 (1), 141-148.
- ANDERSON I.B., MULLEN, W.H., MEEKER J.E., KHOJASTEH-BAKHT, S.C., OISI, S., NELSON, S.D., BLANC, P.D., 1996. Pennyroyal toxicity: measurements of toxic metabolite levels in two cases and review of the literature. *Ann. Intern. Med.* 124, 726–734.
- BARCELOUX, D.G., 2008. Pennyroyal and Pulegone (*Mentha pulegium* L.). In: *Medical Toxicology of Natural Substances: Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Plants and Venomous Animals*. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, pp. 563–567.
- BECKMANN, J. S (1988). Oligonucleotide polymorphisms: A new tool for genomic genetics. *Biotechnology* 6, 161 – 164.
- BELLAKHDAR J. - Médecine traditionnelle et toxicologie ouest-sahariennes, contribution à l'étude de la pharmacopée marocaine. 1978. Edition technique nord- africaine. Rabat.
- BENDAHOU, M.; MUSELLI, A.; GRIGNON-DUBOIS, M.; BENYOUCEF, M.; DESJOBERT, J.M.; BERNARDINI, J.F.; COSTA, J. 2007. Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chem.* 106, 132-139.
- BOTTALICO, A., LOGRIECO, A., 1998. Toxigenic *Alternaria* species of economic importance. In: Sinha, K.K., Bhatnager, D. (Eds.), *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*. Marcel Dekker, New York, pp. 65–108.
- BOTTON R, BRETON A, FEVRE M., GUY PH., LARPENT J.P. ET VEAU P., (1985). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. *Biotechnologies*. Masson, p139 à 145.
- BRUNETON J., 1993. Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. Tec. & Doc. Lavoisier, 2ème édition, Paris. 915p.
- BRUNETON J., 1999. Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. Tec. & Doc. Lavoisier 3ème édition, Paris.
- CARON J. & L. LAVERDIERE, 2003.- Tests d'efficacité de Roatshield contre *Pythium* de la tomate de serre du Québec. Rapport final de recherche, Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec, Québec, 44 p.

CHALCHAT, J.C., GORUNOVLC, M.S., MAKSIMOVLC, Z.A., PETROVLC, S.D., 2000. Essential oil of wild growing *Mentha pulegium* L from Yugoslavia. *J. Essent. Oil Res.* 12, 598–600.

CHAMI F., 2005. Evaluation in vitro de l'action antifongique des huiles essentielles d'origan et de girofle et de leurs composés majoritaires in vivo application dans la prophylaxie et le traitement de la Candidose Vaginale sur des modèles de rat et de souris immunodéprimés. Thèse de doctorat, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc, 266p.

CHEBLI B., ACHOURI M., IDRISSE HASSANI L.M., and HMAMOUCHE M., (2003), Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr, *J. Ethnopharmacol.*, **89**, 165-169.

CONSTANTIN E., 1996. Spectrométrie de masse, Lavoisier Tec & Doc, Paris. p : 1-14.

COOLEY, R. N (1991). The use of RFLP analysis, electrophoretic karyotyping and PCR in studies of plant pathogenic fungi. *Molecular Genetics*, in press.

DERWICH, E., BENZIANE, Z., & BOUKIR, A. (2010). Chemical composition of leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* and evaluation of its antibacterial activity. *International Journal of Agriculture and Biology*, 12, 199–204.

DUQUENOIS P. – L'utilisation des huiles essentielles en pharmacie, leur normalisation et l'Europe du médicament. *Parf. Cosm. Sov.* 1968, 11: 414-418.

EL AJJOURI M., 2008. Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* Pomel et *Thymus capitatus* (L.) Hoffm. & Link contre les champignons de pourriture du bois d'œuvre. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2008 12(4), 345-351.

ERIKSEN GS, ALEXANDER J (eds.), 1998. *Fusarium toxins in cereals – a risk assessment.* Nordic Council of Ministers; TemaNord 1998: 502, pp. 7-27 and 45-58; Copenhagen.

European Food Safety Authority (EFSA), 2011c. Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed. *EFSA J.* 9, 2481.

FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G.; SCHEFFER J.J.C. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavor Frag. J.* 2008, 23, 213-226.

Foroud N.A., Eudes F. (2009) Trichothecenes in cereal grains. *Int J Mol Sci* 10:147-73.

GROVE, J.F., 1988. Non macrocycle trichothecenes. *Nat. Prod. Rep.* 5, 187–209.

GROVE, J.F., 1993. Macrocycle trichothecenes. *Nat. Prod. Rep.* 10, 429–448.

GUARRO, J., GENÉ, J. AND STCHIGEL, A.M. 1999. Developments in fungal taxonomy. Clin. Microbiol. Rev., 12:454–500.

GUTLEB, A.C., MORRISON, E., MURK, A.J., 2002. Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by Fusarium strains: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol. 11, 309– 320.

HAJLAOUI H., TRABELSI N., NOUMI E., SNOUSSI M., FALLAH H., KSOURI R., and BAKHROUF A., (2009), Biological activities of the essential oils and methanol extract of two cultivated mint species (*Mentha longifolia* and *Mentha pulegium*) used in the Tunisian folkloric medicine, World J. Microbiol. Biotechnol., **25**, 2227-2238.

HENNEQUIN C., ABACHIN E., SYMOENS F., LAVARDE V., REBOUX G., NOLARD N. ET BERCHE P.,(1999). Identification of Fusarium species involved in human infections by 28S rRNA genesequencing. I. Clin. Microbiol., 37, 3586-3589.

HMIRI S., Mohamed RAHOUTI, Zakaria HABIB, Badr SATRANI, Mohamed GHANMI et Mustapha EL AJJOURI -Evaluation du Potentiel Antifongique des Huiles Essentielles de *Mentha Pulegium* et d'eucalyptus *Camaldulensis* dans la Lutte Biologique Contre les Champignons Responsables de la Détérioration des Pommes en Conservation. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, Vol. 80, 2011, p.824 – 836.

HOPE R, D. ALDRED AND N. MAGAN., (2005). Letters in Applied Microbiology ,vol 40, pp 295–300.

IARC, 1993. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; Vol. 56: Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, pp397-333; Lyon.

ISMAIEL A. & PIERSON M.D., 1990. Inhibition of growth and germination of *C. botulinum* 33A, 40B, and 1623E by essential oil of spices. J. Food Sci., 55, 1676-1678.

JACQUES G. PALTZ S.A.- Le fascinant pouvoir des huiles essentielles. Fascicule du laboratoire "Jacque Paltz". 1997.

KANDA M., 2003.- Diversité des cultures et utilisation des pesticides dans les périmètres maraichers de Lomé (Togo). Mémoire DESS, Université d'Abomey-Calavi, Bénin, 93 p.

KIMURA, M., T. TOKAI, N. TAKAHASHI-ANDO, S. OHSATO AND M. FUJIMURA (2007). "Molecular and genetic studies of fusarium trichothecene biosynthesis: pathways, genes, and evolution." Biosci Biotechnol Biochem 71(9): 2105-23.

LE BARS J, LE BARS P. Recent acute and sub-acute mycotoxicoses recognized in France. Vet Res 1996;27:383–93.

- LIS-BALCHIN M., 2002. Lavender: the genus *Lavandula*. Taylor and Francis, London. p: 37, 40, 50, 155-200.
- LOGRIECO, A., G. MULE, A. MORETTI AND A. BOTTALICO, 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. *Eur. J. Plant. Pathol.*, 108: 597-609.
- LONGEVIALLE P., 1981. Spectrométrie de masse des substances organiques, Masson, Paris. p :32- 35.
- LORI, G.A., RIZZO, I., 2007. Deoxinivalenol. In: Soriano, J.M. (Ed.), *Micotoxinas en Alimentos*. Díaz de Santos, Madrid, pp. 269–292.
- LYNCH DR, KAWCHUK LM, CHEN Q, KOKKO M (2003). Resistance to *Fusarium sambucinum* in wild and cultivated *Solanum* species. *Am. J. Potato Res.*, 80: 353-358.
- MAHBOUBI, M. and HAGHI, G. 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 325–327.
- MAIHEBIAU. P, *La nouvelle aromathérapie: biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs*. Lausanne. (1994) 635p.
- MARTINS M. L.& MARTINS H. M.(2002) Influence of water activity, temperature and incubation time on the simultaneous production of deoxynivalenol and zearalenone in corn (*zea mays*) by *Fusarium graminearum*. *Food Chemistry*, 79, 315-318.
- MARZOUK, B., FREDJ, M.B.H., CHRAIEF, I., MASTOURI, M., BOUKEF, K., MARZOUK, Z., 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Tunisian *Mentha pulegium* L. *J. Food Agric. Environ.* 6, 78–82.
- McCORMICK S.P., STANLEY A.M., STOVER N.A., ALEXANDER N.J. (2011) Trichothecene: From simple to complex mycotoxins. *Toxins* 3:802-814.
- MENTRE E., MONTGERMONT A., (2003). Détection et Identification des *Fusarium* species. Ecole supérieure de microbiologie et Sécurité Alimentaire de Brest (ESMISAB). Rapport de méthodologie. Université de Bretagne Occidentale pl.
- MKADDEM, M., BOUSAID, M., BEN FADHEL, N., 2007. Variability of volatiles in Tunisian *Mentha pulegium* L. (Lamiaceae). *J. Essent. Oil Res.* 19, 211–215.
- 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.
- MONTEIRO, A., PÓVOA, O., MARINHO, S., RODRIGUES, L., MONTEIRO, P., 2007a. *Mentha pulegium* e *Mentha cervina* Os Poejos na boa Cozinha Portuguesa. ISA Press, Lisboa.

MURPHY, P. A., HENDRICH, S., LANDGREN, C., & BRYANT, C. M. (2006). Food mycotoxins: An update. *Journal of Food Science*, 71, R51–R65.

NELSON P.E., TOUSSOUN T.A. ET MARASAS W.F.O., (1983). *Fusarium species. An illustrated manual for identification*. The Pennsylvania State University Press, University Park, Pa, 193pp.

NICHOLSON P., LEES A.K., MAURIN N., PARRYD.W. ET REZANOOR RN., (1996). Development of a PCR assay to identify and quantify *Microdochium nivale* var. *nivale* and *Microdochium nivale* var. *malus* in wheat, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 48,257-271.

OLLE M. AND BENDER I., 2010. The content of oils in Umbelliferous crops and its formation. *Agronomy Research* 8 (3), pp.687-696.

PAMINONDAS, E AND PAPLOMATAS, K (2004). Molecular diagnostics for soilborne fungal pathogens. *Phytopathology Meditterreanean*. 43 (2), 213 – 220.

PARRY D., JENKINSON P., MCLEOD L. « *Fusarium Ear Blight (scab) in Small-Grain Cereals - a Review* ». *Plant Pathology*. avril 1995. Vol. 44, n°2, p. 207-238.

PARRY D.W. ET NICHOLSON P., (1996). Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat, *Plant Pathology*, 45,383-391.

PIBIRI M.C, 2006. Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. thèse de Doctorat, Lausanne, Canada, p :177.

PITT J.I., BASILICO J.C., ABARCA M.L ET LOPEZ C. (2000).- *Mycotoxins and toxigenic fungi*. *Medical Mycology*, 38, 41–46. Purchase

PITT, J. I., HOCKING, A. D., BHUDHASAMAI, K., MISCAMBLE, B. F., WHEELER, K. A AND TANBOON- EK, P (1994). The normal mycoflora of commodities from Thailand. 2. Beans, rice, small grains and other commodities. *International Journal of Food Microbiology*. 23:35-43.

PITT, R., S. CLARK, AND K. PARMER. Protection of Groundwater from Intentional and Nonintentional Stormwater Infiltration. U.S. Environmental Protection Agency, EPA/600/SR-94/051. PB94- 165354AS, Storm and Combined Sewer Program, Cincinnati, Ohio. 187 pgs. May 1994.

PLACINTA, C.M., J.P.F. D'MELLO AND A.M.C. MACDONALD, 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feeds with *Fusarium* mycotoxins. *Anim. Feed. Sci. Technol.*, 78, 21-37.

POVOA, O., FARINHA, N., MARINHO, S., NUNES, P., GODINHO, D., MATA, F., RODRIGUES, L., MON-TEIRO, A., 2006. Pennyroyal (*Mentha pulegium*) and Hart's Pennyroyal (*Mentha cervina*) biodiversity in Alentejo, Portugal. *Acta Hort.* 723, 91–97.

PRADEAU D. & COHEN Y., 1992. L'analyse pratique du médicament, Ed.médicales internationales. P :418-428.

QJIDAA, S., SELOUANE, A., ZOUHAIR, S., BOUYA, D., DECOCK, C. AND AMINA BOUSETA. 2014. In vitro effect of pyriméthanol on the fungal growth of ochratoxigenic and non-ochratoxigenic species of *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus foetidus* isolated from Moroccan grape. *South Asian J exp Biol*; 4(2): 76-84.

RAMIREZ M. L., CHULZE S. & MAGAN N. (2004) Impact of environmental factors and fungicides on growth and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentinian wheat. *Crop Protection*, 23, 117-125.

RAMOS, A.J., LABERNIA, N., MARÝN, S., SANCHIS, V., MAGAN, N. (1998) Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains. *International Journal of Food Microbiology* 44, 133– 140.

RASOOLI, I., REZAEI, M. B., & ALLAMEH, A. (2006). Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. *Food Control*, 17, 359–364.

RIBEIRO, A., MACHADO, A. P., KOZAKIEWICZ, Z., RYAN, M., LUKE, B., BUDDIE, A.G., VENÂNCIO, A., LIMA, N. ET KELLEY, J. (2006) Fungi in bottled water : a case study of a production plant. *Revista Iberoamericana de Micología*, 23(3), pp. 139-144.

ROTTER BA, PRELUSKY DB, PESTKA JJ, 1996. Toxicology of deoxynivalenol (Vomitoxin). *J Toxicol Environ Health* 48: 1-34.

SHILPA. P, V. KOTESWARA RAO*, S. GIRISHAM, S. M. REDDY. (2014). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol 6, Issue 11, 312-317.

SKOOG D.A., HOLLER F.J. & NIEMAN T.A., 2003. *Principes d'analyse instrumentale*. 1ère édition, Ed. De Boeck Université,p: 945.

SOBROVA P., ADAM V., VASATKOVA A., BEKLOVA M., ZEMAN L., KIZEK R. « Deoxynivalenol and its toxicity ». *Interdisciplinary Toxicology*.1 septembre 2010. Vol. 3, n°3, p. 94-99.

SOBROVA, P., ET AL. 2010, Deoxynivalenol and its toxicity. *Interdisciplinary toxicology*. 3(3): p. 94-99.

STENGELE, M., STAHL-BISKUP, E., 1993. Seasonal variation in the essential oil of European pennyroyal (*Mentha pulegium* L.). *Acta Hort.* 344, 41–51.

THRANE, U., 2001. Developments in the taxonomy of *Fusarium* species based on secondary metabolites. In: Summerbell, B.A., Leslie, J.F., Backhouse, D., Bryden, W.L., Burgess, L.W. (Eds.), *Fusarium*. Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Press, St. Paul, Minnesota, pp. 29–49.

TRANCHANT J., 1995 . Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. Ed. Masson. Paris.

TUTIN, T.J., HEYWOOD, V.H., BURGESS, N.A., MOORE, D.M., VALENTINE, D.H., WALTERS, S.M., WEBB, D.A., 1972. *Flora Europaeae*, vol. III, CLI. Labiatae. University Press, Cambridge.

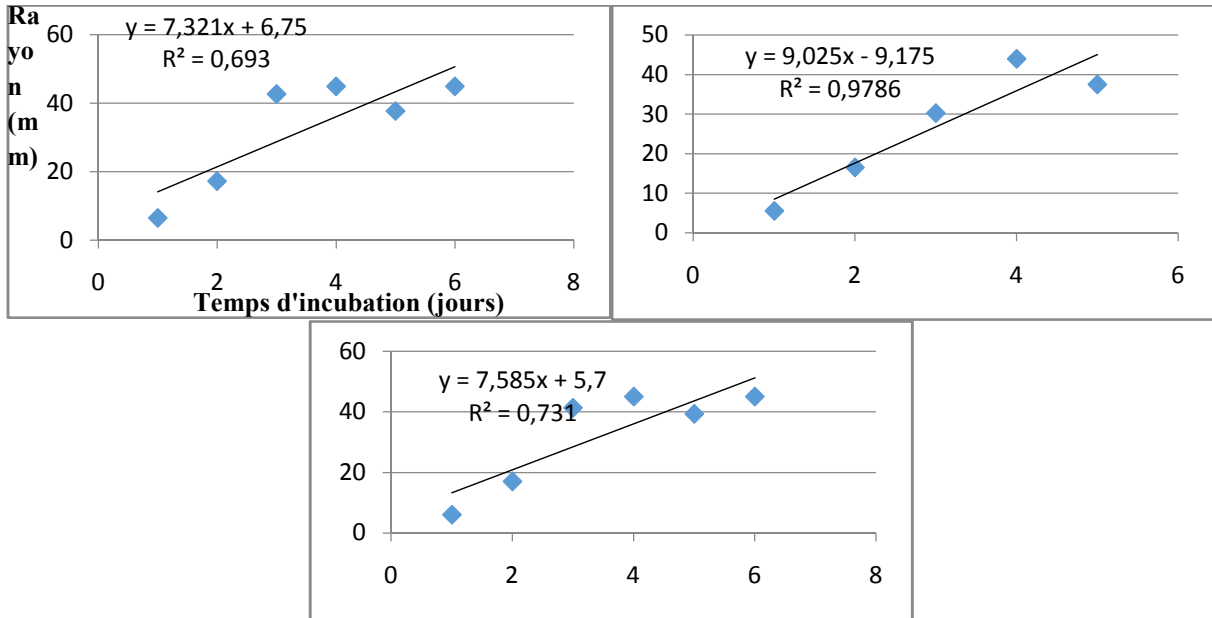
WERKER, E., 2000. Trichome diversity and development. *Adv. Bot. Res.* 31, 1–35.

WOLLENWEBER H.W. ET REIKING O.A., (1935). *Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung*. Paul Parey. Berlin 335p.

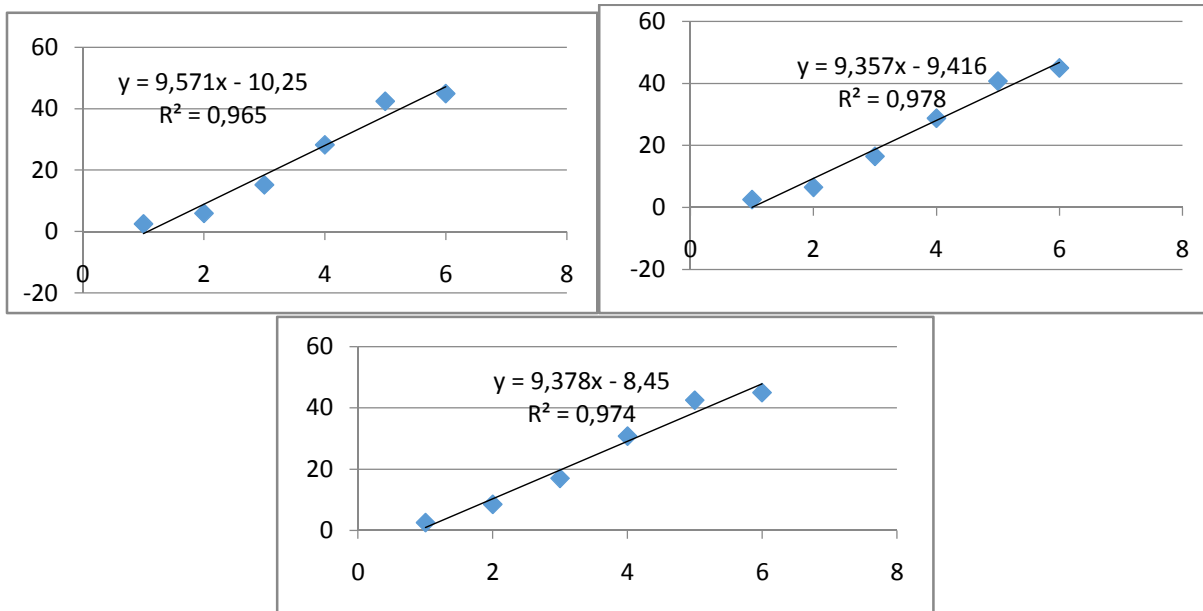
YANNIKOURIS (A.) et JOUANY (J.P.) - Les mycotoxines dans les aliments des ruminants ; leur devenir et leurs effets chez l'animal, *INRA, Prod.Anim*, 15 (1), 2002 ; 3-16.

Annexes

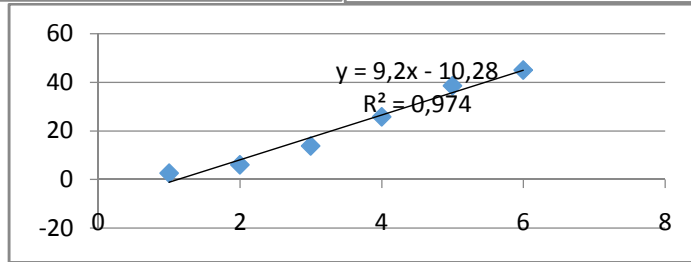
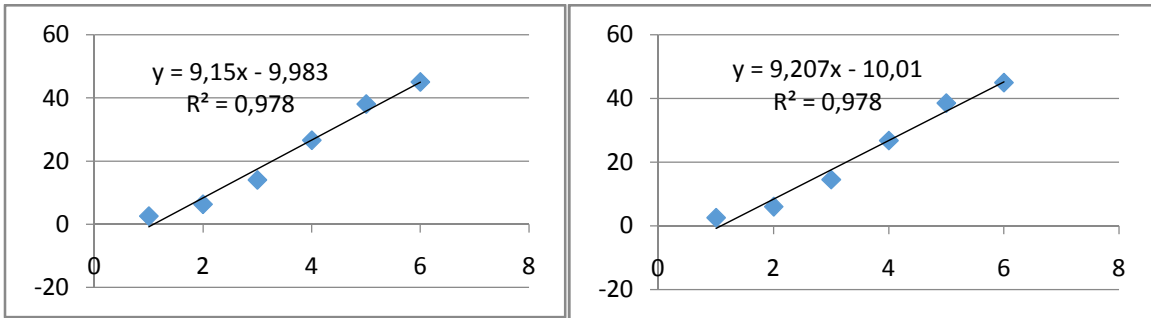
Croissance de la souche MUCL791 en fonction du temps à 25 °C ; Témoin (3 répétions)



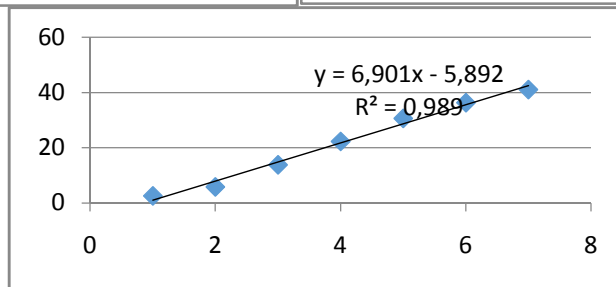
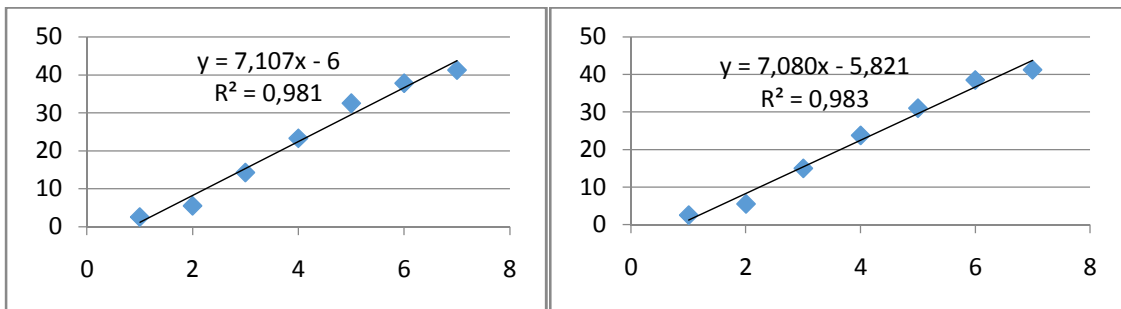
Croissance de la souche MUCL791 en fonction du temps à 25 °C ; [C]= 0.25µL/L



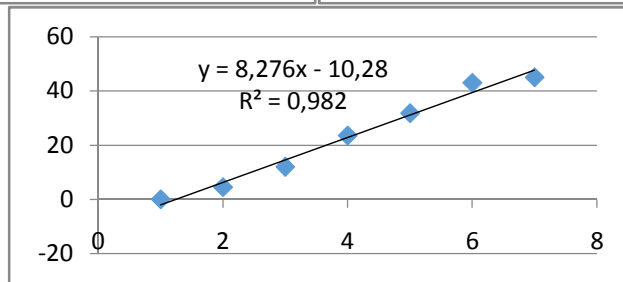
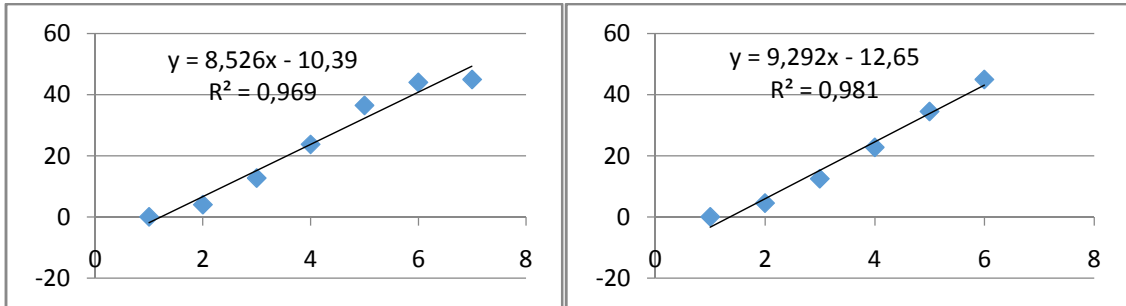
Croissance de la souche MUCL791 en fonction du temps à 25 °C ;[C]= 0.5 µL/L



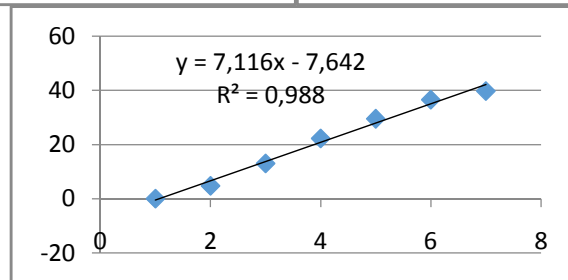
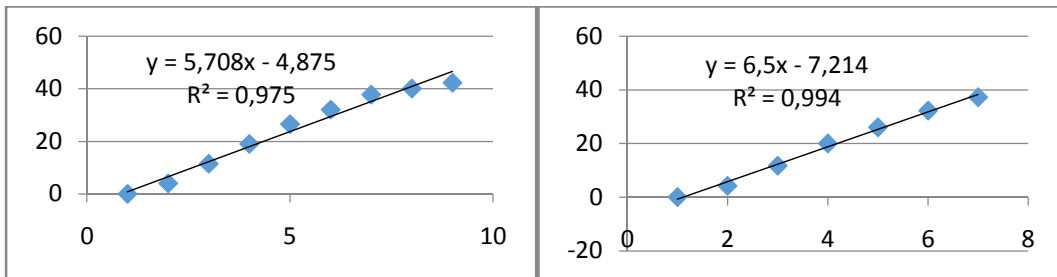
Croissance de la souche MUCL791 en fonction du temps à 25 °C ;[C]= 1 µL/L



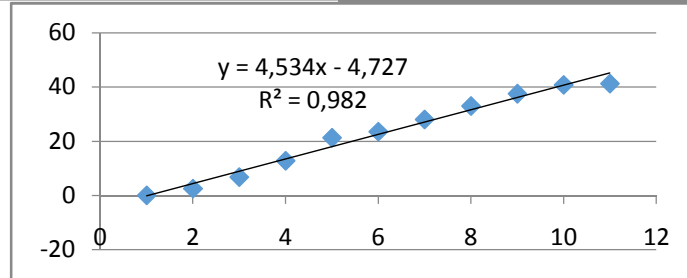
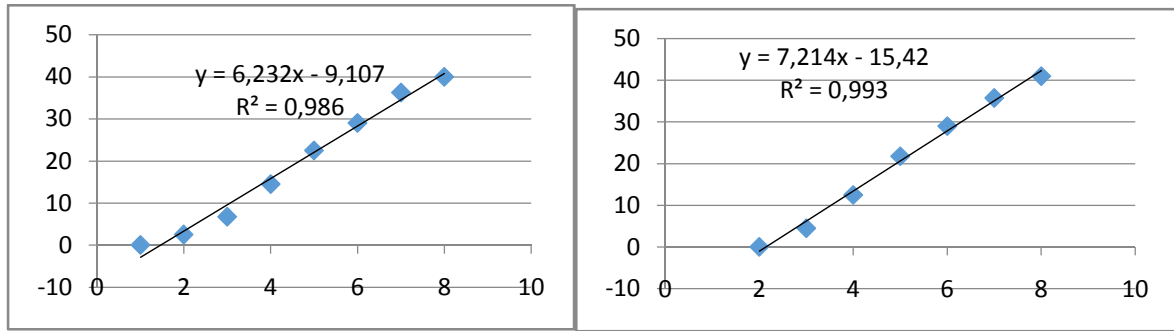
Croissance de la souche MUCL791 en fonction du temps à 25 °C ;[C]= 1.5 µL/L



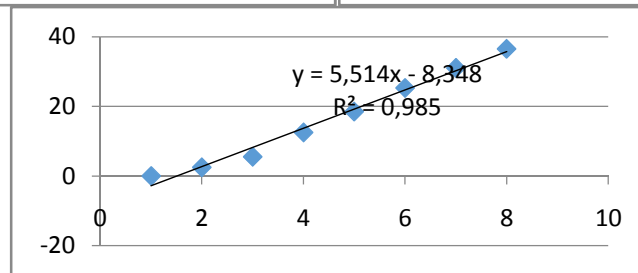
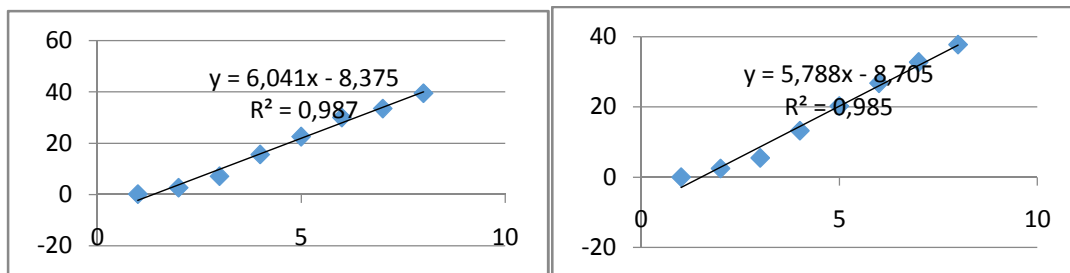
Croissance de la souche MUCL791 en fonction du temps à 25 °C ;[C]= 2 µL/L



Croissance de la souche MUCL791 en fonction du temps à 25 °C ; [C]= 3 µL/L



Croissance de la souche MUCL791 en fonction du temps à 25 °C ; [C]= 4 µL/L



Le taux de croissance, taux moyen, l'écart type et le pourcentage d'inhibition de la souche MUCL791 aux concentrations de 0.25 à 4 µL/L

Souche 791	Concentration (µL/L)	Taux	Taux moyen	Ecart type	% d'inhibition
MUCL 791	T	9,025	9,06	0,05	
		9,12			
		9,03			
	0,25	9,57	9,44	0,12	-4,18
		9,36			
		9,38			
	0,5	9,15	9,19	0,03	-1,42
		9,21			
		9,2			
	1	7,11	7,03	0,11	22,39
		7,08			
		6,9			
	1,5	8,52	8,70	0,53	3,99
		9,29			
		8,28			
	2	5,71	6,44	0,70	28,91
		6,5			
		7,11			
	3	6,23	5,99	1,36	33,87
		7,21			
		4,53			
	4	6,04	5,78	0,27	36,19
		5,79			
		5,51			

