



Année Universitaire : 2015-2016

Master Sciences et Techniques : Biotechnologie microbienne

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

**Etude de l'effet combiné de l'huile essentielle de
Mentha pulegium et l'activité de l'eau sur la croissance
fongique et la production de l'ochratoxine A par des
souches d'*Aspergillus tubingensis***

Présenté par : YAHYAOUI Abdelhak

Encadré par : Pr. BOUSETA Amina

Soutenu le : 18/06/2016

Devant le jury composé de :

Pr. Khadija Bekhti FST Fès

Pr. Omar El Farricha FST Fès

Pr. Abdelali Tazi FST Fès

Remerciement

Je tiens à remercier vivement tous ceux qui m'ont permis de réaliser ce travail :

Ma profonde gratitude s'adresse tout particulièrement au Professeur : Mme. BOUSETA Amina professeur à la faculté des sciences Dhar El Mahraz Fès (FSDM) pour son encadrement, sa modestie, ses renseignements fructueux, son soutien constant et surtout une fois de plus pour sa totale disponibilité à chaque fois que j'exprime le besoin d'aide. Je ne trouverai jamais le mot exact pour lui exprimer mes sentiments de satisfaction, qu'elle trouve néanmoins ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je tiens à remercier vivement mes collègues LAAZIZ Adil Doctorant à la faculté des sciences Dhar El Mahraz Fès (FSDM), QJIDAA Souad, Docteur en biochimie et sciences alimentaires à la faculté des sciences Dhar El Mahraz Fès (FSDM), LAHJOUJI Tarik Doctorant à la faculté des sciences Dhar El Mahraz Fès, SARHIR Salwa Doctorante à la faculté des sciences Dhar El Mahraz Fès, BENMOUSSA Ikram, EL BAKKALI Amine, et ARAHMAT Younes pour leurs encouragements, leurs critiques et leur aide. Qu'ils acceptent l'expression de ma gratitude et de toute ma considération.

Ma reconnaissance s'adresse aux enseignants du Master Biotechnologie microbienne de la faculté des Sciences et techniques de Fès, pour leurs directives et le bagage scientifique dont ils m'ont fait part pour mener à bien cette étude. Je tiens à remercier chaleureusement Mme. BEKHTI Khadija, Mr. EL FARRICHA Omar et Mr. TAZI Abbelali d'avoir jugé notre travail.

Mes remerciements s'adressent aussi à mes amis de la promotion pour leur soutien, leurs remarques et leurs critiques.

Finalement, je tiens à manifester toute ma reconnaissance à mes parents et ma famille pour leurs encouragements, leur compréhension et leurs sacrifices et surtout leur soutien.

Résumé

L'ochratoxine A est un métabolite secondaire produit sur une large gamme de denrées alimentaires contaminées par plusieurs moisissures toxigènes. Leur persistance dans les aliments après les étapes de transformation et de stérilisation provoque plusieurs effets délétères à savoir des effets néphrotoxiques, cancérigènes et tératogènes. L'objectif de ce travail vise à étudier l'effet combiné de l'HE de la menthe pouliot à différentes concentrations (0.25-2.5 µL/mL) et l'activité en eau (0.99, 0.95 et 0.90 a_w) sur la croissance et la production de l'OTA par six isolats d'*A.tubingensis* dont quatre sont ochratoxinogènes (AV₃₅, AV₁₉, S₂ et S₃) et deux non ochratoxinogènes (Tf4 et I-4). L'analyse de l'HE par CPG-FID-O a montré que le constituant majeur est la pulégone (86%). Nos résultats ont montré qu'en absence de l'huile essentielle de *M. pulegium*, la croissance radiale varie en fonction de l'activité en eau et des isolats. Les taux de croissance des isolats non-ochratoxinogènes varient de 6.74 à 7.73 mm/jour à 0.99 a_w. La diminution de l'activité de l'eau à 0.90a_w provoque une réduction de la croissance radiale, le taux de croissance des isolats est compris entre 3.97 et 4.30 mm/jour. L'interaction de l'HE et de l'activité de l'eau sur la croissance radiale des souches d'*A. tubingensis* montre que l'augmentation de la concentration en HE de 0.25 à 2.5µL/mL, affecte aussi la phase de latence des isolats. Les taux d'inhibition augmentent pour les deux groupes d'isolats en fonction de l'activité de l'eau. Le taux d'inhibition le plus élevé a été observé pour la concentration 2.5µL/mL, il atteint 61% à 0.90 a_w. Nos résultats ont également montré que la réduction de la croissance fongique en présence de l'HE dépend de manière très significative (p=0.000) de la souche, de la dose appliquée et de l'activité en eau. L'analyse des extraits de milieu de culture de deux souches, une ochratoxinogène et l'autre non-ochratoxinogène à 0,99a_w par HPLC-FLD a montré que les concentrations de l'OTA dans le milieu de culture pour les essais témoins et ceux en présence d'HE étaient similaires dans la majorité des cas. Ce qui montre que la production de l'OTA n'a pas été stimulée par l'HE.

Mots clés : Métabolites secondaires ; Moisissures ; Ochratoxine A ; activité de l'eau ; *Mentha pulegium*.

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AFLP : Polymorphisme de longueur de fragments amplifiés.

a_w : Activité de l'eau.

CYA : Czapek Yeast Extract.

EFSA: *European Food Safety Authority*.

FAO: Food and Agriculture Organization.

GC-FID-O : Chromatographie en phase Gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme et un détecteur olfactif.

GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

HE : Huile essentielle.

HPLC: High Performance Liquid Chromatography.

IARC: International Agency for Research on Cancer.

IK : Indice de Kovats.

LASSA : Laboratoire d'Agro-alimentaire et Sécurité Sanitaire des Aliments.

OTA : Ochratoxine A.

OTB : Ochratoxine B.

OTC : Ochratoxine C.

Ota : Ochratoxine α .

OT β : Ochratoxine β .

PKS : Polycétone synthase.

RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA.

TR : Temps de Rétention.

UV : Ultra-violet.

Liste des tableaux

Tableau 1. Les conditions maximales et minimales (température et activité en eau) de croissance des <i>Aspergillus</i> de la section <i>Nigri</i> sur les différents milieux de culture.	8
Tableau 2. Concentration de l'ochratoxine A dans les grains de céréales et certains produits de végétaux pour différents pays.....	10
Tableau 3. Les différentes formes d'ochratoxines.	12
Tableau 4. Les conditions maximales et minimales (Activité d'eau et température) pour la production de l'OTA sur différents milieux de cultures.	15
Tableau 5. Composition chimique d'huile essentielle de <i>M. pulegium</i>	28
Tableau 6. Effet de différentes concentrations en huile essentielle de la menthe pouliot et différentes activités en eau sur la phase de latence	29
Tableau 7. Analyse de la variance de l'effet des concentrations de l'HE <i>M. pulegium</i> , des différents isolats, de l'activité de l'eau et de leurs interactions sur les taux de croissance d' <i>Aspergillus niger</i> agrégats (6 isolats <i>tubingensis</i>) sur milieu CYA.	35
Tableau 8. Comparaison entre des composés majoritaires de l'HE des feuilles et de la partie aérienne de la menthe pouliot.....	35
Tableau 9. Effet de différentes doses de l'HE et activité en eau 0.99aw sur la production de l'OTA par une souche ochratoxinogène et autre non-ochratoxinogènes d' <i>A. tubingensis</i> isolées à partir de raisin marocain.	39

Liste des figures

Figure 1. Aspect morphologiques des <i>Aspergillus</i> unisérié et bisérié.....	5
Figure 2. Structure chimique de l'OTA.....	11
Figure 3. Schéma de synthèse de l'OTA (Harris et Mantle, 2001).	13
Figure 4. Chromatogramme de l'HE de la menthe pouliot (<i>Mentha pulegium</i>)	27
Figure 5. Croissance radiale (mm/jour) des isolats d' <i>A. tubingensis</i> sur milieu CYA en présence de l'huile essentielle (HE) de menthe pouliot à différentes concentrations (0: témoin; 0.25; 0.5; 1 ; 1.5 ; 1.75 ; 2 et 2.5 $\mu\text{L/mL}$), à 0.99 a_w et 25°C.	31
Figure 6. Croissance radiale (mm/jour) des isolats <i>A. tubingensis</i> sur milieu CYA en présence de l'huile essentielle (HE) de <i>M. pulegium</i> à différentes concentrations (0: témoin; 0.25; 0.5; 1 ; 1.5 ; 1.75 ; 2 et 2.5 $\mu\text{L/mL}$), à 0.95 a_w et 25°C.	32
Figure 7. Croissance radiale (mm/jour) des isolats <i>A. tubingensis</i> sur milieu CYA en présence de l'huile essentielle (HE) de <i>M. pulegium</i> à différentes concentrations (0: témoin; 0.25; 0.5; 1 ; 1.5 ; 1.75 ; 2 et 2.5 $\mu\text{L/mL}$), à 0.90 a_w et 25°C.	33
Figure 8. Moyens des taux d'inhibition calculées pour tous les isolats <i>A. tubingensis</i> sur milieu CYA en présence de l'HE de menthe pouliot à différentes concentrations, et à différentes activités en eau pendant 25°C.	34

Liste des photos

Photo 1. Chromatographe en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme et un détecteur olfactif (GC-FID-O)..... 22

Photo 2. Chromatographe en phase liquide à haute performance Agilent Technologies série HP 1100.
..... 24

Table des matières

Introduction.....	1
CHAPITRE I : Aperçue bibliographique	3
I.1. Généralité sur les moisissures	3
I.2. Le genre <i>Aspergillus</i>	4
I.2.1. Description et classification.....	4
I.2.2. Identification des <i>Aspergillus</i>	5
a. Identification macroscopique et microscopique	5
b. identification moléculaire	6
c. Facteurs affectant la croissance des <i>Aspergillus</i>	7
I.2.3. les mycotoxines	8
I.2.3.1. Généralités	8
I.2.3.2. Les ochratoxines	9
a. Nature et contamination des aliments.....	9
b. Structure et propriétés physico-chimiques	11
c. Biosynthèse de l'OTA	13
d. Toxicité	13
e. Facteurs affectant la production de l'ochratoxine A.....	14
f. Stratégies de lutttes contre la contamination à l'OTA	15
I.2.4. Contrôle de la croissance fongique par les huiles essentielles	16
CHAPITRE II. Matériel et méthodes.....	19
II.1. Matériel biologique	19
II.1.1. Préparation de la solution sporale	19
II.1.2. Milieux de culture et ajustement de l'activité de l'eau.....	19
II.2. Matériel végétal	20
II.2.1. Extraction des huiles essentielles.....	20
II.2.2. Analyse de la composition chimique de l'HE de la <i>menthe pouliot</i> par GC-FID-Oet GC-MS21	
II.2.3. Ajout de l'HE de la <i>menthe pouliot</i> et inoculation du milieu CYA	23
II.2.4. Inoculation et incubation	23
II.2.5. Extraction de l'OTA à partir des cultures.....	23
II.2.6. Analyse des extraits par HPLC	23
II.2.6. Analyse statistique des résultats.....	24
CHAPITRE III. Résultats et discussion	25
III.1. Composition chimique de l'HE de la <i>menthe pouliot</i>	25

III.1.1. Rendement et composition chimique de l'huile essentielle de <i>menthe pouliot</i>	25
III.1.2. Analyse et identification des composés volatils de l'HE	25
III.2. Effet de l'HE et de l'activité en eau sur la croissance fongique.....	28
III.2.1. Effet de l'huile essentielle de <i>menthe pouliot</i> et l'activité en eau sur la phase de latence des isolats d' <i>A. tubingensis</i>	28
III.2.2. Effet de l'huile essentiel de la <i>menthe pouliot</i> et l'activité en eau sur le taux de croissance fongique.....	29
III.3. Effet de l'HE de la <i>menthe pouliot</i> et l'activité en eau sur la production de l'OTA.....	38
Conclusion et perspective	40
Références bibliographiques	42

Introduction

Les moisissures filamenteuses des genres *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicilium*, *Cladosporium*, et *Alternaria* sont connues pour être des contaminants de plusieurs produits agricoles dans le champ ou au cours de stockage. Cependant, le développement de champignons peut altérer la qualité sanitaire de la production végétale et provoquer des pertes économiques importantes. En effet, la contamination par les mycotoxines constitue une des principales causes d'altération sanitaire des productions agricoles. Selon la FAO, plus de 25% des récoltes mondiales sont contaminées par les mycotoxines dont, l'ochratoxine A reconnue pour ces effets tératogènes, mutagènes, et cancérigènes.

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires toxiques produits par des moisissures dotées génétiquement d'un pouvoir toxinogène (Andersen et Thrane, 1996). Elles peuvent avoir des effets délétères sur la santé humaine et animale. En effet le genre *Aspergillus*, est l'un des genres ayant une capacité importante à produire ces métabolites toxiques et contaminant une large gamme de produits alimentaires. Mais certaines espèces de ce genre sont également caractérisées par un grand intérêt économique en industrie agro-alimentaire vue leur capacité à produire divers métabolites à haute valeur ajoutée. Abarca et al. (2004) ont montré que *A. niger* a une grande valeur économique et biotechnologique et est utilisé pour produire plusieurs acides organiques et enzymes extracellulaires comme les amylases, les cellulases, et les pectinases.

La principale mycotoxine produite par les *Aspergillus* noirs est l'ochratoxine A. Cette toxine est produite par *P. verocunum* et *A. ochraceus*. D'autres espèces du groupe *Aspergillus niger* de la section *Nigri* sont aussi capables de produire l'ochratoxine A dont certaines espèces n'ont été décrites que récemment, en particulier *A. tubenginsis*. Cette toxine est présente dans une large gamme de denrées alimentaires et plus précisément les céréales, les grains de café, le cacao, les épices, les noix, les fruits secs, le raisin et jus de raisin. Elle a aussi été détectée dans le sang humain et les produits d'origine animale (Zimmerli et Dick., 1996 ; Al-Hazmi., 2010 ; Selouane et al., 2009a). Selon Vega et al. (2009), 50% des denrées alimentaires, contaminés par l'OTA et destinées à l'alimentation humaine proviennent des produits céréaliers. La seconde source d'OTA (10 à 15% de la prise totale en OTA) est attribuée aux produits de la vigne.

La prédiction de la croissance et de la production des mycotoxines est très difficile vu qu'elle est fortement influencée par l'interaction de plusieurs facteurs complexes principalement, l'activité de l'eau, la température, le temps d'incubation, l'espèce fongique endogène et le substrat (Pose *et al.*, 2010; Garcia *et al.*, **2011**). Dans les circonstances actuelles, l'utilisation des fongicides chimiques synthétiques pourrait conduire au développement de la résistance des souches, l'apparition des effets nocifs grâce à l'accumulation résiduelle de ces antifongiques. Ces fongicides synthétiques inhibent la croissance fongique mais stimulent dans certaines conditions la production des mycotoxines. C'est pour cela que la recherche de nouvelles sources alternatives naturelles de traitement serait nécessaire. En conséquence, plusieurs plantes aromatiques et médicinales sont actuellement utilisées par de nombreux chercheurs pour contrôler la croissance et la production des mycotoxines. En effet, plusieurs activités biologiques ont été attribuées à ces plantes à savoir les activités antibactériennes, antiseptiques, antiparasitaires, antifongiques...etc. Dans ce contexte et afin de contribuer au contrôle de la croissance fongique et la production de l'ochratoxine A par des isolats toxigènes et non toxigènes en particulier *A. tubenginsis*, notre travail vise à étudier l'effet combiné de l'huile essentielle de la menthe pouliot et l'activité de l'eau sur la croissance fongique et la production de l'OTA par des isolats d'*A. tubingensis* producteurs d'OTA (4 souches) et non producteurs (2 souches).

Le rapport de ce travail sera structuré en trois parties. D'abord un aperçu bibliographique relatant quelques généralités sur les moisissures particulièrement le genre *Aspergillus* et les métabolites secondaire non volatiles à savoir l'OTA. Une deuxième partie qui sera consacrée aux différentes méthodes expérimentales et analytiques ainsi qu'au matériel utilisés. Les résultats et discussion seront présentés dans la troisième partie, suivie par une conclusion.

CHAPITRE I : Aperçu bibliographique

I.1. Généralités sur les 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'oeil 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 nommé les conidiophores. Certaines mycètes peuvent se reproduire par un mode sexué, et en fonction de 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) constituant la forme de symbiose la plus répandue à l'échelle planétaire. 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 la 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 sanitaire et 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%. Le genre *Aspergillus* présente le genre le plus diversifié qui contamine une grande gamme de denrées alimentaires. Au niveau agricole, il cause des pertes économiques importantes grâce à sa capacité de produire des métabolites secondaires toxiques et la réduction de la quantité et de la qualité organoleptique des aliments. Mais, il a aussi un impact positif en biotechnologie représenté par la production de divers métabolites tels que les antibiotiques, les acides organiques, les médicaments ou les enzymes.

I.2. Le genre *Aspergillus*

I.2.1. Description et classification

Les *Aspergillus* sont des champignons microscopiques qui contaminent les récoltes dans les champs ou pendant la conservation dans les silos. Ils font partie des Deuteromycètes (champignons imparfaits, reproduction asexuée), ordre des Hyphomycètes, famille des *Moniliaceae*. Ils sont caractérisés par un appareil végétatif (thalle) formé de filaments mycéliens hyalins, de diamètre fin et régulier, septés et ramifiés. Sur les filaments végétatifs prennent naissance des filaments dressés, non cloisonnés (conidiophores) qui se terminent par une vésicule de forme variable (sphérique et rugueuse, parfois étirées ou gonflées) sur laquelle sont disposées les cellules conidiogènes ou phialides.

Les phialides peuvent être insérées directement sur la vésicule (têtes unisériées) ou portées par des petites structures insérées sur la vésicule (têtes bisériées) nommées métules ou stérigmates (Raper et Fennell, 1965). La figure 1 illustre l'aspect morphologique des *Aspergillus* unisérié et bisérié.

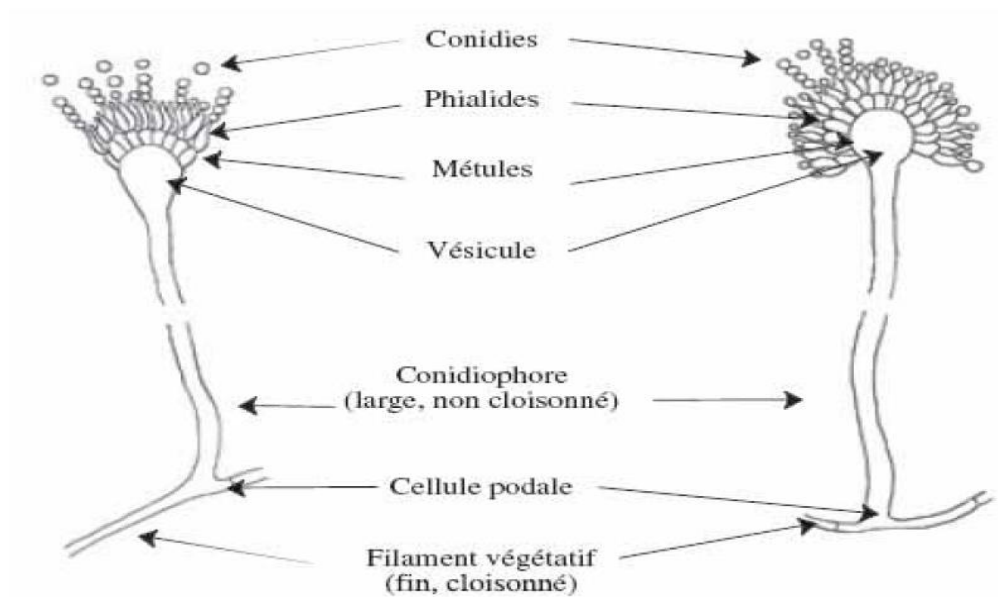


Figure 1. Aspect morphologiques des *Aspergillus* unisériel et bisériel.

Le genre *Aspergillus* inclut plusieurs groupes, dont les *Aspergillus* de la section *Nigri* renfermant plusieurs espèces ochratoxinogènes telles que *A. carbonarius* et *A. niger* agrégats. (Abarca *et al.*, 2004). Ils présentent généralement des colonies foncées, souvent noires, et des conidiophores unisériés (*A.japonicus*) ou bisériés (*A.carobonarius*, *A. niger*, *A. tubengensis*, *A. foetidus*,...).

Ce groupe d'*Aspergillus* noirs inclut plusieurs espèces qui présentent un intérêt très important dans la mycologie alimentaire, mycologie médicale et de la biotechnologie. Cependant, de nombreuses espèces entraînent la détérioration des aliments tels que les raisins et dérivés (Zimmerli et Dick, 1996). Par ailleurs, ils sont également utilisés dans l'industrie de la fermentation pour produire des hydrolases telles que les amylases ou les lipases, et des acides organiques tels que l'acide citrique et l'acide gluconique.

I.2.2. Identification des *Aspergillus*

a. Identification macroscopique et microscopique

La classification des champignons appartenant à la section *Nigri* est complexe en raison des différences délicates entre les espèces. L'identification de ces espèces a été étudiée par des critères morphologiques (Pitt, 1997 ; Samson *et al.*, 2004) en se basant principalement sur la structure marginale, la texture, la vitesse de croissance, le diamètre et la couleur des colonies.

En plus des caractéristiques macroscopiques, l'observation microscopique est un outil précieux qui permet la visualisation de différentes structures des têtes aspergillaires quelle que soit la couleur et le diamètre de conidiophore, l'aspect de vésicule, la morphologie et le diamètre des conidies. Elle permet aussi la différenciation entre espèces de têtes unisérié et bisérié du même groupe d'*Aspergillus* de la section *Nigri*. En effet, *A. carbonarius* pourrait être facilement distingué des autres espèces du groupe bisérié en fonction de la taille et de l'ornementation des conidies, dont le diamètre varie de 7 à 9 μm ($> 6\mu\text{m}$) alors que pour les *Aspergillus* du groupe *A. niger* agrégats ont un diamètre $< 6\mu\text{m}$. Les différentes espèces de ce groupe comme (*A. niger*, *A.tubingensi*, et *A. foetidus*) présentent une grande similitude de point de vue morphologique ce qui rend leur distinction difficile. Samson *et al.*, en 2007 ont montré que l'espèce *A. tubingensis* pourrait être macroscopiquement distinguée des autres espèces par la production de sclérotés, mais c'est un caractère de différenciation qui n'est pas toujours observé.

b. identification moléculaire

La taxonomie d'*Aspergillus* de la section *Nigri* reste assez mal définie. Il comprend un groupe étroitement apparenté 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.

Plusieurs approches ont été employées dans cette section, y compris des caractéristiques morphologiques, physiologiques et les méthodes moléculaires telles que la PCR-RFLP, la RAPD-PCR (Samson et Pitt, 2000), ainsi que le séquençage de nucléotides, facilitent la détermination correcte des espèces d'*Aspergillus* noir.

Une étude récente a montré qu'environ 26 espèces ont été identifiées, par voie moléculaire (*Aspergillus carbonarius*, *A.niger*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus tubingensis*,...) dont certains décrites récemment (Varga et Samson, 2011). Pour identifier ces espèces, l'amplification d'une partie des gènes marqueurs de la calmoduline et de la β -tubuline en utilisant des amorces CMD5 et CMD6, Bt2a et Bt2b respectivement suivie par un séquençage d'ADN. Les séquences qui en résultent sont analysées et comparées aux séquences de référence de la banque de donnée GenBank du logiciel BLAST n. Selon le pourcentage d'homologie ($> 99\%$), l'espèce peut être identifiée. C'est la méthode utilisée pour discriminer les espèces d'*Aspergillus niger* agrégats difficilement distinguables morphologiquement.

c. Facteurs affectant la croissance des *Aspergillus*

Au cours des dernières années, des études scientifiques ont porté principalement sur l'influence des facteurs environnementaux sur la croissance et la production d'OTA par *P. verrucosum* et *A. ochraceus* car elles étaient considérées comme étant les principales espèces productrices. Actuellement, de nombreux chercheurs ont montré que d'autres espèces appartenant à la section *Nigri* telles que *A. niger* *agrégats* et *A. carbonarius* sont ochratoxinogènes. L'influence de l'activité de l'eau, de la température, du pH, et de la teneur en gaz (O_2 et CO_2) sur la croissance et la biosynthèse de l'OTA a également fait l'objet de nombreuses études. Les aspergilli noirs préfèrent un climat tropical et subtropical. Ils peuvent croître dans un intervalle de température allant de 10 à 40°C avec une activité en eau comprise entre 0.72 et 0.99 a_w (Pitt et al., 2000). Ainsi, La réduction de la pression partielle en oxygène et surtout l'accroissement de la teneur en CO_2 a un effet dépresseur bien plus important sur la toxinogénèse que sur la croissance. La composition chimique des denrées alimentaires et le pH sont deux autres facteurs environnementaux influençant à la fois la croissance que la toxinogène de plusieurs moisissures. En effet, la croissance maximale des *Aspergillus* de la section *Nigri* ainsi que leur toxinogène ont été observées dans des aliments riches en glucides, lipides, et protéines ayant un pH qui varie entre 5 et 7.

Outre les facteurs environnementaux, les facteurs biologiques ont une influence notable sur la croissance et la production d'OTA. Certains de ces facteurs biologiques sont intrinsèques ; par conséquent, ne dépendent que de la base génétique de la souche fongique.

La température et l'activité de l'eau sont les principaux facteurs qui influent sur la germination, la croissance et la sporulation des champignons responsables de la détérioration des aliments (Lacey, 1984). Le tableau suivant indique les températures et les activités en eau maximales et minimales de croissance des *Aspergillus* de la section *Nigri* sur différents milieux de culture.

Tableau 1. Les conditions maximales et minimales (température et activité en eau) de croissance des *Aspergillus* de la section *Nigri* sur les différents milieux de culture.

	Milieu	Intervalle de T testée (°C)	Température optimal °C	a _w optimale	a _w minimale	Référence
A. niger Agrégats	Grains de maïs	15-30	30	0.95	0.91	Astoreca <i>et al.</i> (2007b)
	Grains d'arachide	15-30	30	0.99	0.91	Astoreca <i>et al.</i> (2009b)
	Grains de café	15-30	25	0.99	0.93	Astoreca <i>et al.</i> (2010a)
	Nutriment synthétique (SNM)	10-37	25	0.95	0.93	Selouane <i>et al.</i> (2009)
A. Carbonarius	Jus de raisin synthétique	10-40	35	0.98	0.88	Mitchell <i>et al.</i> (2004)
	Raisins secs	15-30	25-30	0.99	0.91	Astoreca <i>et al.</i> (2007b)
	CYA	15-35	30	0.95	0.85	Romero <i>et al.</i> (année)
	Nutriment synthétique (SNM)	10-37	25	0.95	0.90	Selouane <i>et al.</i> (2009)

I.2.3. Les mycotoxines

I.2.3.1. Généralités

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires, de faible poids moléculaire, d'origine chimique très diversifiée (polyacétates, terpènes et acides aminés). Elles sont élaborées principalement par des moisissures toxigènes appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* naturellement présentes dans l'air ambiant, le sol et sur les cultures,

par opposition aux molécules apportées intentionnellement ou accidentellement par l'homme telles que les additifs alimentaires et les résidus de certains médicaments (résidus d'antibiotiques).

Ces toxines sont produites sur une large variété de denrées alimentaires avant, pendant et après récolte. Elles affectent de nombreux produits agricoles, dont les céréales, les fruits secs, les noix, les grains de café, raisin et les graines oléagineuses (D'Mello et McDonald, 1997 ; Scudamore et Livesey, 1998). Les mycotoxines sont considérées comme faisant partie des contaminants alimentaires les plus significatifs en termes d'impact sur la santé publique et la sécurité alimentaire (Steyn, 1995 ; Pitt *et al.*, 2000).

Le type et la quantité de mycotoxine dépendent des différents caractères morphologiques, génétiques et niches écologiques des espèces fongiques qui les produisent. En effet, plus de 300 métabolites secondaires ont pu être identifiées sous contrôle des différents paramètres qui influencent la croissance fongique et la production des mycotoxines. Environ une trentaine de ces molécules ont une véritable importance en termes de santé animale et humaine (Pfohl-Leszkowicz, 2002).

Bien que, plusieurs sortes de mycotoxines sont retrouvées dans les aliments, seule une vingtaine contamine l'alimentation humaine et présente un effet délétère sur la santé du consommateur. Les plus importantes sont : les aflatoxines, les ochratoxines, les trichothécènes, la stérigmatocystine, la zéaralénone, la citrinine, la patuline, les fumonisines.

I.2.3.2. Les ochratoxines

a. Nature et contamination des aliments

Les ochratoxines sont des mycotoxines produites par des espèces appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*, elles constituent le deuxième groupe majeur de mycotoxines après les aflatoxines. Parmi les différentes formes d'ochratoxines produites par ces genres, seules l'ochratoxine A (OTA) et très rarement l'ochratoxine B (OTB) sont rencontrés comme contaminants naturels des aliments. L'OTA est le composé le plus toxique de ce groupe, elle a été isolée pour la première fois en 1965 par un groupe de chercheurs sud-africains à partir d'un isolat d'*A. ochraceus* (Van der Merwe *et al.*, 1965). Une évaluation de l'OTA a montré que, pour les consommateurs européens, les céréales sont la source alimentaire la plus importante de cette mycotoxine (EFSA, 2006). En raison de l'incidence potentielle et de la haute toxicité de l'OTA dans les céréales, le règlement de la Commission européenne a fixé les teneurs maximales pour l'OTA à 5 µg/kg dans les graines de céréales

brutes et 3 pg/kg) pour tous les produits dérivés des céréales (Commission des Communautés européennes, 2006).

La présence de l'OTA a été signalée dans une grande variété d'aliments et de boissons notamment les céréales (blé, maïs, seigle, orge, avoine, ...), mais aussi dans le riz, le soja, le café, le cacao, les haricots, les pois, les cacahuètes et les fruits secs (figues, raisins). Les raisins et leurs dérivés comme le vin et le jus de raisin ainsi que la bière sont fréquemment contaminés par cette toxine (Zimmerli et Dick, 1996 ; El Khoury *et al.*, et 2008). Elle est présente aussi dans les produits dérivés des céréales comme la farine, le pain, les pâtes (Majerus *et al.*, 1993). Le tableau représente les différentes concentrations de l'OTA distribuées dans plusieurs denrées alimentaires :

Tableau 2. Concentration de l'ochratoxine A dans les grains de céréales et certains produits de végétaux pour différents pays.

Pays	Produits	Niveau de contamination µg/kg	Références
Maroc	Figues sèches	0,01-1,42	Zinedine et al. (2007b)
	Raisins secs	0,05-4,95	Zinedine et al. (2007)
	Arachides	0,1-2,36	
	Riz	0,02-32,4	Selouane et al. (2009b)
	Raisin	0.08 – 4	
Corée	Riz	3,9	Park et al. (2005)
Côte d'Ivoire	Millet	3-1738	Sangare-Tigori et al. (2006)
	Maïs	9-92	
	Riz	0,6-64	
Etats Unis	Blé	60	Ngundi et al. (2006)
	Orge	85	
Grand Bretagne	Maïs	2	Scudamore et al. (1998a)
	Riz	3-12	Scudamore et al. (1998b)
	Maïs	1,5	Scudamore et al. (2000)
	Blé orge avoine	5,2-231	MacDonald et al.c2004)
Inde	Maïs	0-20	Janardhana et al. (1999)
Portugal	Riz	0,09-3,52	Pena et al. (2005)
Turquie	Blé	0,36-2,23	Baydar, 2005
	Maïs	0,47	
	Riz	0,27	
	Soja	0,57	
	Avoine	4,07	
	Seigle	3,69	
	Orge	3,45	
Brésil	Café	0,84-7,3	Fujii et al. (2006)
Grèce	Raisins	16-25	Tjamos et al. (2006)
Mexique	Café vert	30,1	Robledo et al. (2001)
Tunisie	Raisins	0,59-2,57	Lasram et al. (2007)

b. Structure et propriétés physico-chimiques

La formule brute de l'OTA est $C_{20}H_{18}ClNO_6$. Elle est constituée d'une molécule de 3-méthyle-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydroisocoumarine liée par une liaison peptidique, au niveau de son groupement carboxyle en C7, au groupement amine de la L-β-phénylalanine.

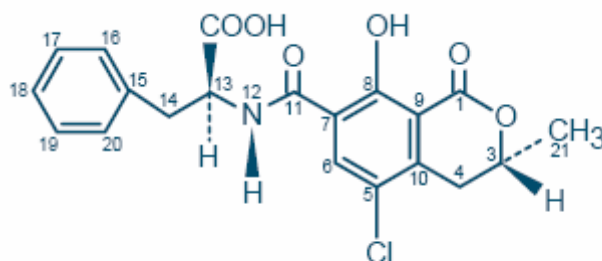


Figure 2. Structure chimique de l'OTA

Elle appartient à la famille des polycétones, synthétisées plus précisément par la voie de polycétoacide. Ce groupe présente une structure générale qui peut, en fonction des groupements R, donner les différents analogues de structure de l'OTA : l'ochratoxine B (OTB) l'analogue déchloré de l'OTA, l'ochratoxine C (OTC) l'ester éthylique de l'OTA et l'ochratoxine α ($Ot\alpha$), dérivé isocoumarique de l'OTA ainsi que son analogue déchloré, l'ochratoxine β ($Ot\beta$) (Moss, 1996). Le tableau récapitule pour chacune des ochratoxines la composition des groupements caractéristiques.

Tableau 3. Les différentes formes d'ochratoxines.

Les ochratoxines	R1	R2	R3	R4	R5	Structure de base
OTA	Phe*	Cl	H	H	H	
OTB	Phe	H	H	H	H	
OTC	Phe, ethyle ester	Cl	H	H	H	
OTα	OH	Cl	H	H	H	
OTβ	OH	H	H	H	H	

*Avec Phe : phénylalanine

Ces différences au niveau structural des ochratoxines ont des effets marqués sur leur potentiel toxique respectif. L'OTA est la plus répandue et la plus toxique des autres ochratoxines.

L'OTA est un acide organique faible ayant un pKa de 7,1 (Miller et Trenholm, 1994) et une masse molaire de 403,8 g/mol. Son point de fusion est de 90°C lorsqu'elle est cristallisée dans le benzène et de 169°C lorsqu'elle est cristallisée dans le xylène (IARC, 1983). Elle est soluble dans les solvants organiques polaires à pH neutre et très peu soluble dans l'eau. A pH alcalin, elle est soluble et stable dans une solution aqueuse de bicarbonate de sodium (0,1 M, pH 7,4) ainsi que dans les solutions alcalines aqueuses. L'OTA est relativement stable à la température, elle est en revanche complètement dégradée par l'hypochlorite de sodium (Castegnaro et al., 1991). L'OTA possède un maximum d'absorption à 333 nm avec un coefficient d'extinction molaire de 5500/mol/cm dans le méthanol. Elle présente un maximum d'émission de fluorescence à 467 nm dans l'éthanol à 96% et à 428 nm dans l'éthanol absolu à $\lambda_{exc} = 333\text{nm}$. En milieu acide, l'OTA présente des propriétés de fluorescence (longueur d'onde d'émission = 365 nm), cette fluorescence est verte à 365 nm alors qu'en milieu alcalin, elle est bleue. L'irradiation gamma d'OTA en solution dans l'éthanol ne provoque aucune dégradation. Cependant, une dégradation a été observée dans le cas d'un faible taux d'humidité et lors d'un traitement avec un excès d'hypochlorite de sodium (NaCl) (Castegnaro et al., 1991). L'OTA présente deux groupements qui peuvent exister ou non sous forme ionisable selon les conditions physiologiques et qui sont : le groupement carboxyle de la phénylalanine ayant un pKa de 4,4 (Valenta, 1998) et le groupement hydroxyle sur le C₈ ayant un pKa entre 7,05 et 7,1 (Marquardt et Frohlich, 1992). L'OTA est instable à la lumière et à l'air en solution, elle disparaît ou se dégrade après une brève exposition à la lumière essentiellement en présence

d'humidité. Dans une solution d'éthanol, elle peut rester stable pendant une année dans des conditions réfrigérées et à l'obscurité. Quand elle est chauffée jusqu'à décomposition, la molécule émet des fumées toxiques de chlore et d'oxydes d'azote.

c. Biosynthèse de l'OTA

La biosynthèse de l'OTA par *Aspergillus ochraceus* a été étudiée la première fois par Searcy et al. (1969) via l'utilisation de plusieurs expériences de radioactivité par le ^{14}C et ^{13}C . Ils ont montré que la biosynthèse de l'OTA est sous la dépendance de deux voies principales : la voie de shikimates et la voie pentacétides. La voie des shikimates fournit la partie phénylalanine, tandis que la voie des pentacétides donne la partie dihydroisocoumarine.

L'origine de la partie dihydroisocoumarine est la condensation décarboxylative d'une unité acétate et de 4 unités malonate sous l'action d'une polycétone synthase (PKS).

Le squelette ainsi formé subit une série de réaction : cyclisation, aromatisation, méthylation, oxydation et chlorination (Steyn et Holzapfel, 1970). La chaîne de polycétide obtenue est modifiée par la formation d'un noyau lactone (synthèse de la melleïne) et par l'addition d'un groupe carboxylique (synthèse d'ochratoxine). L'atome de chlore est incorporé ensuite par l'action d'une chloroperoxydase (synthèse d'Ota). La formation de l'OTA à partir d'Ota et de la phénylalanine est catalysée par l'ochratoxine A synthase.

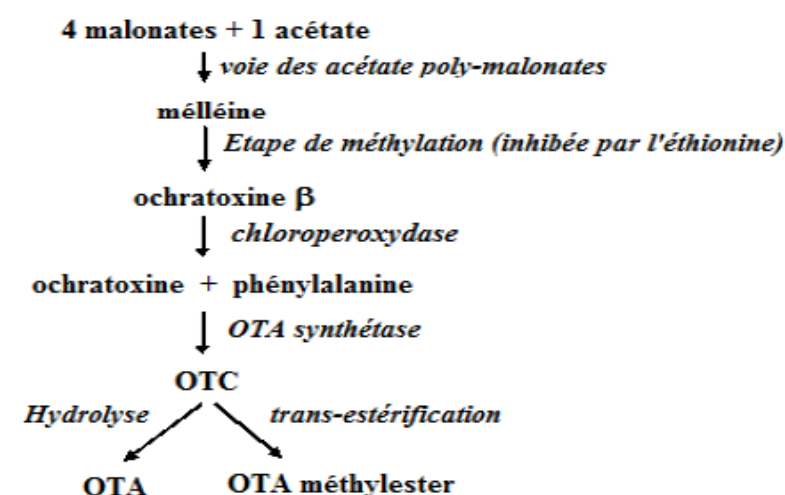


Figure 3. Schéma de synthèse de l'OTA (Harris et Mantle, 2001).

d. Toxicité

L'ochratoxine (OTA) produite principalement par *Aspergillus* et *Penicillium* est l'une des mycotoxines alimentaires, contaminant le plus répandu dans le monde.

L'OTA a été classé comme cancérogène humain présumé par l'agence internationale pour la recherche et le cancer, et exerce également plusieurs autres effets toxiques, y compris l'hépatotoxicité, l'immunotoxicité, la tératogénicité et la génotoxicité (Pfohl- Leszkowicz et Mandeville, 2007).

Le mécanisme associé à la toxicité de l'OTA affecte les processus de la synthèse des protéines, la formation ROS, peroxydation lipidique, la perturbation de l'homéostasie calcique et la dépréciation des réactions d'oxydation mitochondriales (Eder et al., 2000; Schaaf et al., 2002). En outre, Zhang et al. (2009) ont rapporté une neurotoxicité OTA-induite, médiée par l'apoptose dans les cellules neuronales.

e. Facteurs affectant la production de l'ochratoxine A

Plusieurs champignons filamenteux sont capables de provoquer une détérioration des aliments avec des pertes économiques considérables dans la chaîne alimentaire. Au cours des dernières années, l'accent sur ces champignons a été focalisée sur leur aptitude à produire des métabolites secondaires, telles que les mycotoxines, qui peuvent avoir des effets nuisibles sur les animaux et les humains. L'ochratoxine A (OTA) est une mycotoxine d'une préoccupation majeure qui peut être produite par plusieurs espèces d'*Aspergillus* de la section Nigri dans les régions chaudes et tropicales, *Circumdati* et genre *Penicillium* dans les climats tempérés (Pitt et Hocking, 2009). En effet, *Aspergillus carbonarius* est le membre le plus distinct et il a été rapporté comme la principale source de contamination par l'OTA dans les raisins et ses produits dérivés en Europe. La température et l'activité de l'eau (a_w) sont les principaux facteurs environnementaux qui influencent à la fois le taux de détérioration fongique et la production de mycotoxines (Magan et Aldred, 2007).

Tableau 4. Les conditions maximales et minimales (Activité d'eau et température) pour la production de l'OTA sur différents milieux de cultures.

	Milieu	Intervalle de T testée (°C)	Température optimale °C	a _w optimale	a _w minimale	Référence
A. niger Agrégats	Grains de maïs	15-30	25	0.97	0.91-0.93	Astoreca <i>et al.</i> (2009a)
	Grains d'arachide	15-30	25	0.97	0.91	Astoreca <i>et al.</i> (2009b)
	Grains de café	15-30	25	0.99	0.95	Astoreca <i>et al.</i> (2010a)
	Milieu nutritionnel synthétique	10-37	30-37	0.90-0.95	-	Selouane <i>etal.</i> , (2009)
A. Carbonarius	Milieu nutritionnel synthétique	10-40	15-20	0.95-0.98	0.94	Mitchell <i>et al.</i> (2004)
	Raisins secs	15-30	30	0.99	0.91	Astoreca <i>et al.</i> (2007b)
	CYA	15-35	15	0.95	0.87	Romero <i>et al.</i> (2007)
	Milieu nutritionnel synthétique	10-37	25-30	0.95-0.99	0.90	Selouane <i>et al.</i> , (2009)

f. Stratégies de lutte contre la contamination à l'OTA

Pour lutter contre les moisissures et les mycotoxines, il faut savoir à quel moment ces moisissures se développent. Ainsi, il est possible de définir 5 moments privilégiés au cours de l'élaboration du produit : lors de la culture, de la récolte, du stockage, de la transformation et enfin lors de la consommation (Leszkowicz, 1999). Cependant, plusieurs approches peuvent être adoptées afin de limiter la contamination en mycotoxines. Il s'agit de la prévention ou de la curation selon le stade considéré.

La prévention est sans aucun doute le meilleur moyen permettant de contrôler la contamination par les mycotoxines. Cependant, la contamination est parfois présente et des procédures de détoxification doivent être mises en œuvre afin de pouvoir rendre utilisable le produit contaminé en alimentation humaine ou animale. Ces procédures de décontamination sont basées sur l'élimination : physique, chimique ou biologique (Park, 1993).

Les mesures préventives sont basées sur la maîtrise d'un guide des bonnes pratiques culturales, des moyens de récolte, de stockage et de transformation.

Concernant les mesures curatives (poste récolte), elles se basent principalement sur la décontamination par les agents de biotransformation et les agents adsorbants. Les agents de biotransformation sont des microorganismes, des plantes ou des enzymes ayant la capacité de dégrader ou convertir une mycotoxine en un produit moins toxique ou inactif. Les agents adsorbants sont des substances qui sont capables de séquestrer les mycotoxines et réduire leurs effets sur la santé de l'animal. Les agents adsorbants forment une famille hétérogène de composés d'origine minérale, microbienne ou végétale, classés selon leur composition chimique en deux groupes : les adsorbants inorganiques (les charbons actifs, les argiles, les aluminosilicates et les résines synthétiques) et les adsorbants organiques (les fibres végétales non digestible, les acides humique, les parois des bactéries fermentaires et les parois des levures).

I.2.4. Contrôle de la croissance fongique par les huiles essentielles

Actuellement, l'utilisation des produits chimiques pour contrôler et réduire l'incidence des contaminations du champ et post-récoltes demeure la principale mesure à prendre. Cependant, l'application des fongicides à des concentrations élevées contre les moisissures d'altération post-récolte peut inhiber leur croissance. Mais ils présentent le risque de stimuler la production de mycotoxines et de laisser des résidus toxiques dans les produits alimentaires (Moosavy et al., 2008). En raison de la sensibilité croissante des consommateurs à cette pollution résiduelle et les effets toxiques de nombreux fongicides de synthèse, l'importance de l'utilisation de produits alternatifs naturels devient nécessaire (Bankole et Mabekoje, 2004). Ces produits naturels seraient plus sûrs pour la population et l'environnement et éviteraient le développement de la résistance par les microorganismes pathogènes (Tatsadjieu et al., 2010).

Les huiles essentielles représentent l'ensemble de substances naturelles complexes de métabolites secondaires volatils isolés à partir des matrices d'origine végétale par

hydrodistillation, distillation par entraînement à la vapeur. Ces composés sont de faible poids moléculaire, lipophiles, odorants et souvent liquide. (Kalemba, 2003).

Ce sont des petites gouttelettes qui se forment dans les cellules sécrétrices à partir des sucres issus de la photosynthèse, concentrées ensuite dans des poches, des poils, et des canaux sécréteurs (Couic-Marinier, 2013). Elles sont présentes dans différents organes végétaux producteurs (les fleurs, les racines ou rhizomes, les écorces, le bois, les fruits, et les graines), et leurs compositions varient en fonction de la zone productrice du végétal (Lamendin, 2004 ; Rafi, 1995).

La compositions chimiques 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; Pavela et al., 2005). 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 provoquent 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.

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 Mehraz à Fès.

II.1. Matériel biologique

Six souches d'*Aspergillus tubenginsis* (AV35, AV19, S3, S2, I-4, et TF4) ont été étudiées. Toutes les souches avaient été isolées à partir du raisin frais marocain. Les souches ont servi pour étudier l'effet combiné de l'huile essentielle de la *menthe pouliot* et l'activité en eau sur la croissance et la production de l'OTA.

II.1.1. Préparation de la solution sporale

Les souches d'*Aspergillus* ont été cultivées sur milieu CYA à 25°C pendant 7 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 CYA ont été inoculées centralement avec 10 µl de la suspension de spores fongique (environ 10⁵ spores).

II.1.2. Milieux de culture et ajustement de l'activité de l'eau

L'activité de l'eau (a_w) est un paramètre thermodynamique représentant la disponibilité des molécules d'eau d'une solution ou d'un aliment. Cette eau disponible (eau non liée aux macromolécules) est à la base des altérations chimiques, biochimiques et microbiologiques des aliments. Elle se définit par rapport au potentiel chimique de l'eau :

$$\mu_w(P,T) - \mu'_w(P,T) = RT \ln a_w$$

μ_w : potentiel chimique de l'eau dans le produit

μ'_w : potentiel chimique de l'eau pure

Elle est définie aussi comme le rapport de la pression de vapeur d'eau du produit (P) dans le système en équilibre par rapport à celle de l'eau pure (P0) à la même température et à pression atmosphérique. L'activité de l'eau est comprise entre 0 et 1 et elle peut être déterminée par la mesure de l'humidité relative d'équilibre (HRE) par un thermoconstanter ou un a_w -mètre :

$$a_w = P/P_0 = \text{HRE (\%)} / 100$$

Dans notre cas, nous nous sommes basées sur l'étalonnage réalisé par Belli et al. (2004) pour ajuster l'activité de l'eau des milieux de culture par ajout de glycérol.

L'étude de l'effet combiné des huiles essentielles et de l'activité de l'eau sur la croissance fongique et la production de l'OTA a été réalisée sur le milieu de culture Czapeck Yeast Autolysate agar (CYA) dont la composition est la suivante : Saccharose, 30g ; Extrait de levure, 5g ; 50ml de la solution A (NaNO₃, 20g ; KCl, 5g ; MgSO₄, 7H₂O, 5g ; FeSO₄, 7H₂O, 0.1g ; Eau distillée, 500ml) ; 50ml de la solution C (K₂HPO₄, 10g ; Eau distillée, 500ml) ; 1ml de la solution métallique (ZnSO₄ 7H₂O, 1g ; CuSO₄ 5H₂O ; Eau distillée, 100ml) ; agar, 15g ; eau distillée, 900ml ; le pH finale est de 6.7. Trois activités de l'eau (0.90, 0.95 et 0.99 a_w) ont été étudiées à une température de 25°C pendant 7 jours. Durant la réalisation des différentes expériences ; l'activité de l'eau du milieu CYA a été ajustée à 0.90 et 0.95 par ajout de glycérol 58mL/L et 29mL/L, respectivement (Belli et al., 2004).

II.2. Matériel végétal

La menthe pouliot du nom latin *Mentha pulegium* fait partie des plantes aromatiques et médicinales. C'est une plante herbacée, vivace, indigène et très odorante. C'est une espèce spontanée dans l'ensemble de l'Europe, l'ouest de l'Asie et le nord de l'Afrique. Au Maroc, la menthe pouliot se rencontre dans presque toutes les régions soit à l'état spontané ou cultivé.

Classification :

- **Règne** : Plantae
- **Embranchement** : Spermathophyta (Angiospermae)
- **Classe** : Equisetopsida
- **Ordre** : Lamiales
- **Famille** : Lamiaceae
- **Nom vernaculaire** : Menthe pouliot

II.2.1. 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 les feuilles de la plante dont on veut

extraire l'huile essentielle ont été placés 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. 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.

II.2.2. Analyse de la composition chimique de l'HE de la *menthe pouliot* par GC-FID-O et GC-MS

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 d'autre part à un détecteur olfactif (GC-FID-O).

Analyse GC-FID-O

Le chromatographe (Thermo Finigan, Trace GC 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) et d'un système d'acquisition de données chromatographiques (logiciel Chrom Quest version 4.2) (Photo 1). 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 chaque extrait et par trois opérateurs.

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.



Photo 1. Chromatographe en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme et un détecteur olfactif (GC-FID-O).

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'alcane. 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.

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

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 .

II.2.3. Ajout de l'HE de la *menthe pouliot* et inoculation du milieu CYA

Les tests antifongiques ont été réalisés sur quatre souches ochratoxinogènes (AV35, AV19, S3, et S2) et deux non ochratoxinogènes (I-4 et TF4) selon la méthode rapportée par Remmal *et al.* (1993b). L'huile essentielle a été émulsionnée par une solution d'agar à 0.2 % afin de disperser les composés. Des volumes de cette dilution ont été ajoutés au milieu CYA stérilisé et refroidi à 45-50°C. Les concentrations finales en huile essentielle sont 0.25, 0.5, 1, 1.5, 1.75, 2 et 2.5 µL/mL. Des témoins contenant le milieu de culture seule ont également été préparés. 10 µl de la solution sporale ajustée à 10⁵ spore/ml ont été déposés au milieu de chaque boîte de pétri.

II.2.4. Inoculation et incubation

Les souches d'*Aspergillus* ont été cultivées sur milieu de culture CYA ajusté à différents activités en eau (0.99, 0.95, 0.90) et à différentes concentrations des huiles essentielles. Les boîtes de Pétri ont été mises dans des sacs en plastiques et incubées à 25°C pendant 7 jours. Toutes les expériences ont été réalisées en triple pour l'étude de la croissance fongique. Les boîtes de pétri ont été examinées chaque jour et le diamètre des colonies a été mesuré dans les 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.

II.2.5. Extraction de l'OTA à partir des cultures

L'extraction de l'OTA a été réalisée suivant la méthode de **Bragulat et al. (2001)**. À l'aide d'un emporte-pièce, trois carottes ont été prélevées de chaque colonie, pesées puis introduites dans des tubes eppendorf auquel est ajouté 1 ml de méthanol. Les tubes eppendorf sont incubés pendant 60 min à 25°C. Le mélange est centrifugé 3 fois à 13000 tr/min pendant 15 min. Les extraits ont été filtrés à travers un filtre millipore 0.2 µm (PVDF hydrophilic) puis analysés par chromatographie liquide haute performance (HPLC-FLD).

II.2.6. Analyse des extraits par HPLC

L'analyse de l'OTA a été réalisée par chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) à l'aide d'un chromatographe en phase liquide (HP Agilent

Technologies série 1100) équipé d'une boucle d'injection de 20 μ l et couplé à un détecteur fluorimétrique de type HP G132A (Photo 2).



Photo 2. Chromatographe en phase liquide à haute performance Agilent Technologies série HP 1100.

Les métabolites des extraits fongiques ont été séparés sur une colonne en phase inverse (Nucleosil-C18, 4.6 x 250 mm, l'épaisseur du film est de 5 μ m). La détection par fluorescence a été réalisée à une longueur d'onde d'excitation de 333 nm et une longueur d'onde d'émission de 460 nm. La phase mobile est pompée à un débit de 0.7 ml/min et l'OTA a été analysée en mode isocratique (Acétonitrile/eau/acide acétique : 99/99/2 ; V/V/V) Le volume d'injection est de 20 μ l.

II.2.6. Analyse statistique des résultats

Dans tous les cas, les régressions linéaires de l'augmentation des rayons des colonies en fonction du temps (jours) en phase exponentielle a été utilisée pour obtenir les taux de croissance (mm/jour). Ces régressions ont été obtenues par le programme Microsoft Excel version 2010. L'analyse de la variance pour l'effet de l'interaction des différents traitements sur la croissance et les concentrations d'OTA produites a été réalisée à l'aide du logiciel SPSS 20.0 (Statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL, USA).

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 c'est d'étudier l'effet combiné de l'huile essentielle de la menthe pouliot et l'activité en eau sur la croissance fongique et la production de l'OTA. Pour cette étude nous avons sélectionné six souches d'*Aspergillus tubingensis*.

III.1. Composition chimique de l'HE de la *menthe pouliot*

III.1.1. Rendement et composition chimique de l'huile essentielle de *menthe pouliot*

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.

III.1.2. Analyse et identification des composés volatils de l'HE

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 figure4 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 tableau5. 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, présentes à de faibles proportions, ont été également identifiées par GC-FID-O. On peut citer

principalement le bornéol (1.31%), l' α -pinène (0.41%), le β -pinène (1.11%), le p-Mentha-1,8-diène (1.10%), et le 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.

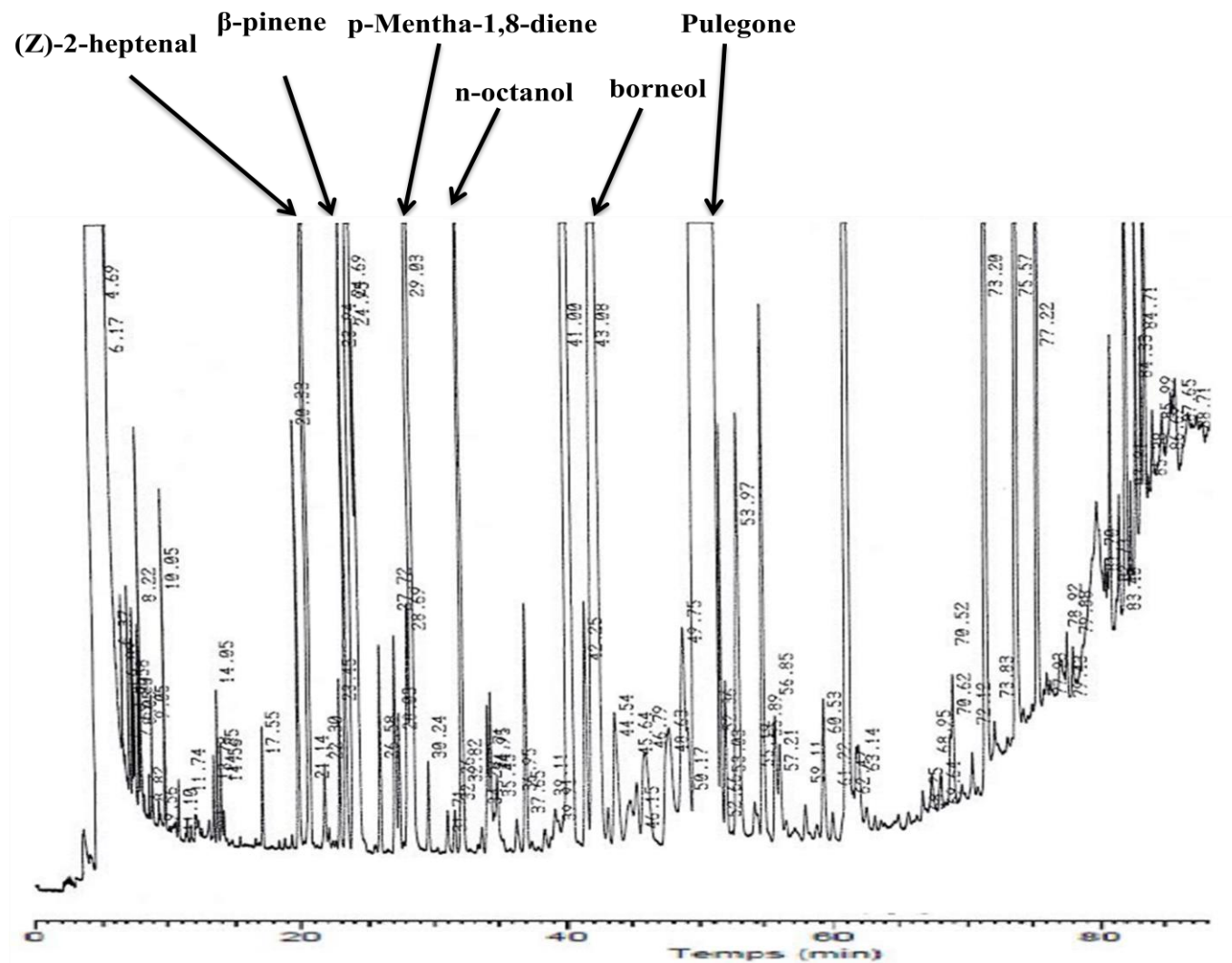


Figure 4. Chromatogramme de l'HE de la menthe pouliot (*Mentha pulegium*)

Tableau 5. Composition chimique d'huile essentielle de *M. pulegium*.

IK	Composé	Identification	%	Odeur
924	(Z)-2-hepténal	GC	0,06	-
934	α -pinène	GC-O	0,41	Agréable +
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	Tridecène	GC	0,02	-
1184	p-Cymen-8-ol	GC	0,05	-
1230	Pulégone	GC-O	86,14	Mentholée ++++++

Nos résultats sont en accord avec ceux de Qjidaa (2015) 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 pulégone 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.

III.2. Effet de l'HE et de l'activité en eau sur la croissance fongique

III.2.1. Effet de l'huile essentielle de *menthe pouliot* et l'activité en eau sur la phase de latence des isolats d'*A. tubingensis*

La phase de latence est considérée comme le temps écoulé (en jour) entre l'inoculation et le moment où le diamètre de la colonie atteint 5 mm. Le tableau 6 résume l'effet des différentes concentrations de l'HE et des différentes activités en eau sur la phase latence. Comme le montre ce tableau, l'ajout de l'huile essentielle de *menthe pouliot* à différentes activités en eau affecte la phase de latence. Pour les témoins à une activité en eau de 0.99_{aw}, le diamètre des colonies dépasse les 5mm en un jour. Cependant, à une activité en eau de 0.95 et 0.90_{aw} le diamètre des colonies atteint les 5mm respectivement dès le deuxième et le troisième jour.

Tableau 6. Effet de différentes concentrations en huile essentielle de la *menthe pouliot* et différentes activités en eau sur la phase de latence (jours)

Concentration d'HE ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Phase de latence 0.99 a_w	Phase de latence 0.95 a_w	Phase de latence 0.90 a_w
T	1	2	3
0.25	1-2	2	3
0.5	2	2	3
1	2	2	3
1.5	2	2	3
1.75	2	2	3-4
2	2	2	3-4
2.5	3	3	4

Nos résultats montrent que l'addition de l'HE dans le milieu de culture augmente la phase de latence. Elle variait de 1 à 2 jours pour les concentrations 0.25 à 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ à une activité de 0.99 a_w et 0.95 a_w , et atteint 3 à 4 jours pour la concentration de 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ à une activité de 0.99 a_w et 0.95 a_w . A une activité de l'eau de 0.90 a_w , la phase de latence est de 3 à 4 jours, quelle que soit la concentration de l'HE.

III.2.2. Effet de l'huile essentiel de la *menthe pouliot* et l'activité en eau sur le taux de croissance fongique

L'effet de l'huile essentielle de la menthe pouliot (*menthe pouliot*) sur la croissance des souches d'*Aspergillus tubingensis* a été testé *in vitro* sur milieu CYA à 25°C. Les résultats de l'activité antifongique à différentes activités en eau ont montré que ces souches sont moyennement sensibles à l'huile essentielle de la menthe pouliot. Comme on peut le remarquer, l'augmentation de la concentration finale de l'huile essentielle dans le milieu de culture diminue de façon faible le diamètre de la colonie. Une réduction importante a été observée pour les concentrations 2 et 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Quant aux témoins, la colonie avait déjà atteint les bords de la boîte de Pétri en 7 jours d'incubation à activité en eau 0.99 a_w .

Les figures 6 à 8 présentent les résultats de l'effet combiné de l'activité de l'eau (0.90, 0.95 et 0.99) et de différentes concentrations de l'huile essentielle sur la croissance radiale de 4 isolats d'*A. tubingensis* ochratoxinogènes (AV35, S2, S3 et AV19) et non-ochratoxinogènes (I-4 et Tf4). L'action *in vitro* de l'huile essentielle de la menthe pouliot sur la croissance radiale des isolats d'*Aspergillus tubingensis* a montré que cette huile essentielle est active contre ces isolats.

En absence de l'HE (Témoins), les taux de croissance des isolats ochratoxinogènes varient de 6.48 à 7.53 mm/jour avec une moyenne de 6.81 mm/jour à 0.99 a_w (figure 6). La

diminution de l'activité de l'eau à 0.95 réduit les taux de croissance, ils sont compris entre 5.69 et 7.39 mm/jour avec une moyenne de 6.15 mm/jour (figure 7). A faible activité de l'eau (0.90), les taux de croissance sont situés entre 3.83 et 4.55 mm/jour avec une moyenne de 4.05 mm/jour (figure 8). Quant aux isolats non-ochratoxinogènes, la croissance est en général légèrement plus rapide que celle des isolats ochratoxinogènes. A une activité de l'eau de 0.99_{aw}, les taux de croissance varient de 6.74 à 7.63 mm/jour avec une moyenne de 7.19 mm/jour (figure 6). Cependant à une activité en eau de 0.95_{aw}, il n'y a pas une différence remarquable par rapport 0.99_{aw}. Les taux de croissance des deux isolats sont compris entre 5.70 et 6.98 mm/jour avec une moyenne de 6.34 mm/jour. Une diminution de l'activité de l'eau à 0.90 provoque une réduction relativement forte du taux de croissance (3.97- 4.30 mm/jour, moyenne : 4.15 mm/jour)

Donc on peut constater que pour tous les isolats testés, l'activité de l'eau optimale pour la croissance à 25°C est de 0.99.

L'application de l'HE de la menthe pouliot à des doses de 0.25 à 2.5 µL/mL et à une activité de l'eau de 0.99_{aw} diminue légèrement le taux de croissance aussi bien pour les isolats ochratoxinogènes que pour les isolats non ochratoxinogènes (figure 6). Ainsi, à la faible concentration en HE (0.25 µL/mL), le taux de croissance moyen des isolats ochratoxinogènes est de 6.59 mm/jour avec un taux d'inhibition moyen de 3.60% (figure 9). Quant aux isolats non ochratoxinogènes, le taux de croissance varie entre 6.41 et 7.45 mm/jour avec une moyenne de 6.93 mm/jour. Leurs taux d'inhibition varient entre 2.35 et 4.85%. A forte dose en HE (2.5 µL/mL) le taux de croissance diminue rapidement pour les deux groupes d'isolats ochratoxinogènes et non ochratoxinogènes. Il est compris entre 3.96 et 5.79 mm/jour (taux moyen de 5.02 mm/jour) pour le premier groupe et entre 4.55 et 4.95 mm/jour (taux moyen de 4.75) pour le deuxième groupe. A 0.99 _{aw}, les taux d'inhibition moyens maximum sont de 26.73 et 30.17% pour les isolats ochratoxinogènes et non ochratoxinogènes, respectivement.

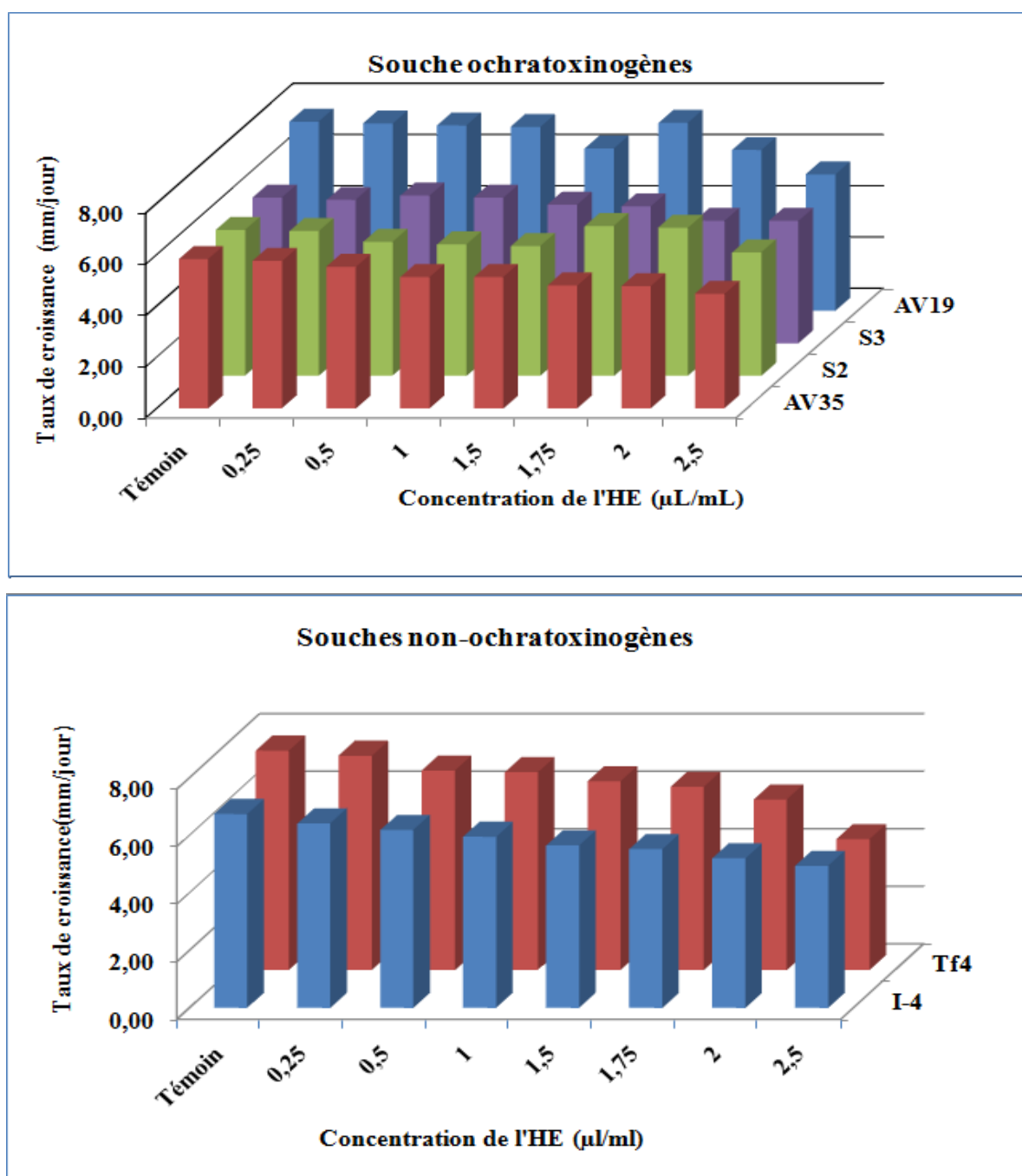


Figure 5. Croissance radiale (mm/jour) des isolats d'*A. tubingensis* sur milieu CYA en présence de l'huile essentielle (HE) de *mentha pouliot* à différentes concentrations (0: témoin; 0.25; 0.5; 1 ; 1.5 ; 1.75 ; 2 et 2.5 μL/mL), à 0.99_{a_w} et 25°C.

A une activité de l'eau de 0.95_{a_w}, l'ajout des différentes concentrations de l'HE dans le milieu de culture diminue le taux de croissance à la fois pour les souches ochratoxinogènes que les souches non ochratoxinogènes (figure 7). La croissance maximale a été observée à la concentration en HE de 0.25 μL/mL avec un taux moyen de 6.08 mm/jour (5.60-7.32 mm/jour) pour les isolats ochratoxinogènes. Leurs taux d'inhibition varient entre 15.45 et

27.80% (figure 9). Le taux de croissance minimum a été remarqué à la plus grande concentration en HE (2.5 $\mu\text{L/mL}$) avec une moyenne de 4.85 mm/jour. Pour les isolats non ochratoxinogènes, le taux d'inhibition le plus élevé a été observé à la dose de 2.5 $\mu\text{L/mL}$ (20.91%). Les taux de croissance varient de 4.82 à 5.14 mm/jour avec une moyenne de 4.98 mm/jour.

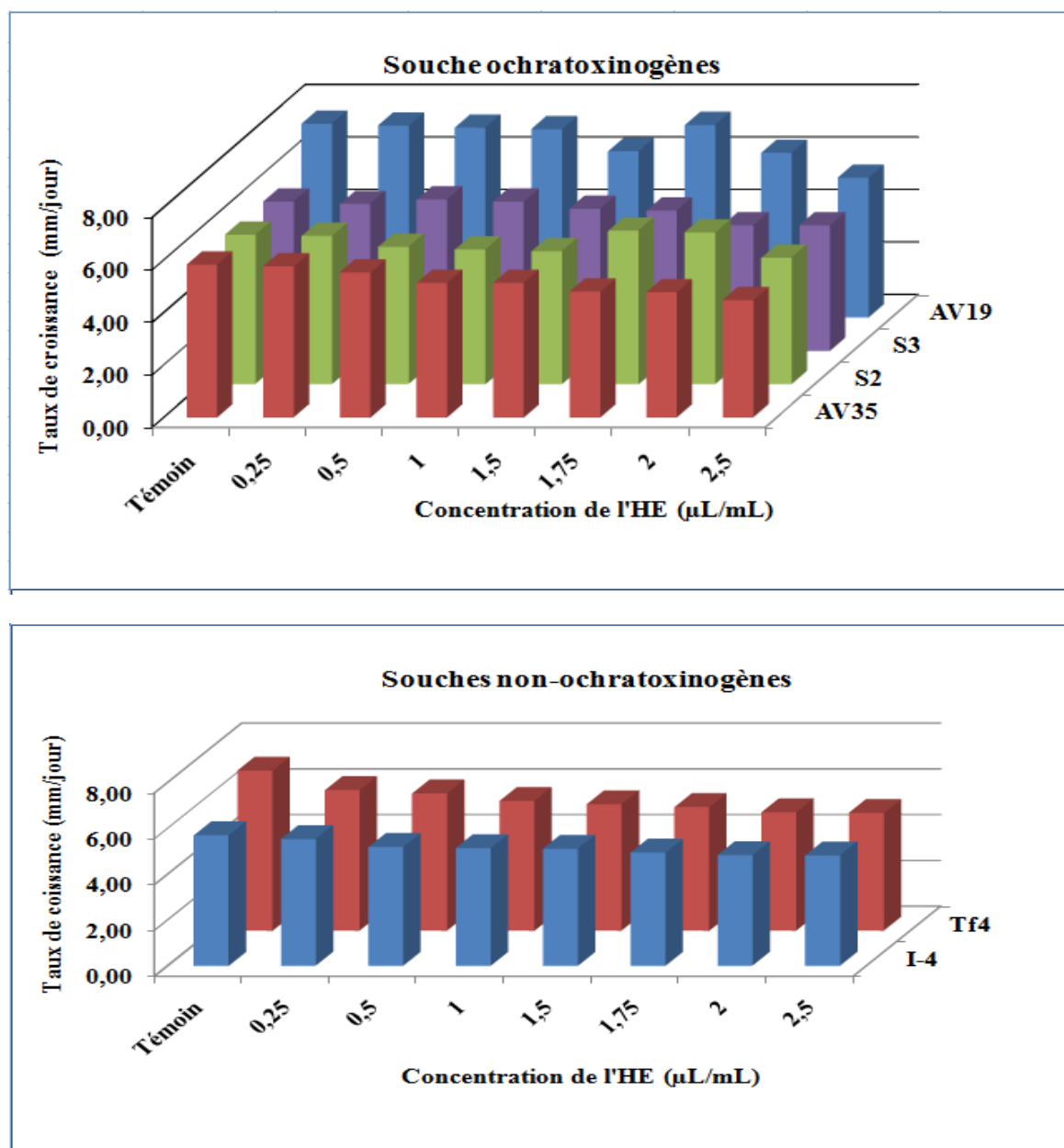


Figure 6. Croissance radiale (mm/jour) des isolats *A. tubingensis* sur milieu CYA en présence de l'huile essentielle (HE) de *M. pulegium* à différentes concentrations (0: témoin; 0.25; 0.5; 1 ; 1.5 ; 1.75 ; 2 et 2.5 $\mu\text{L/mL}$), à 0.95 a_w et 25°C.

A faible activité en eau (0.90 a_w), le taux de croissance diminue rapidement pour les deux groupes d'isolats (figure 8). Le taux de croissance des isolats ochratoxinogènes à cette

activité en eau se situe entre 2.08 et 3.38 mm/jour à 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Le taux d'inhibition moyen est de 36.63% (figure 9). Dans les mêmes conditions, les taux de croissance des isolats non ochratoxinogènes sont compris entre 1.67 et 2.35 mm/jour avec un taux d'inhibition moyen de 51%.

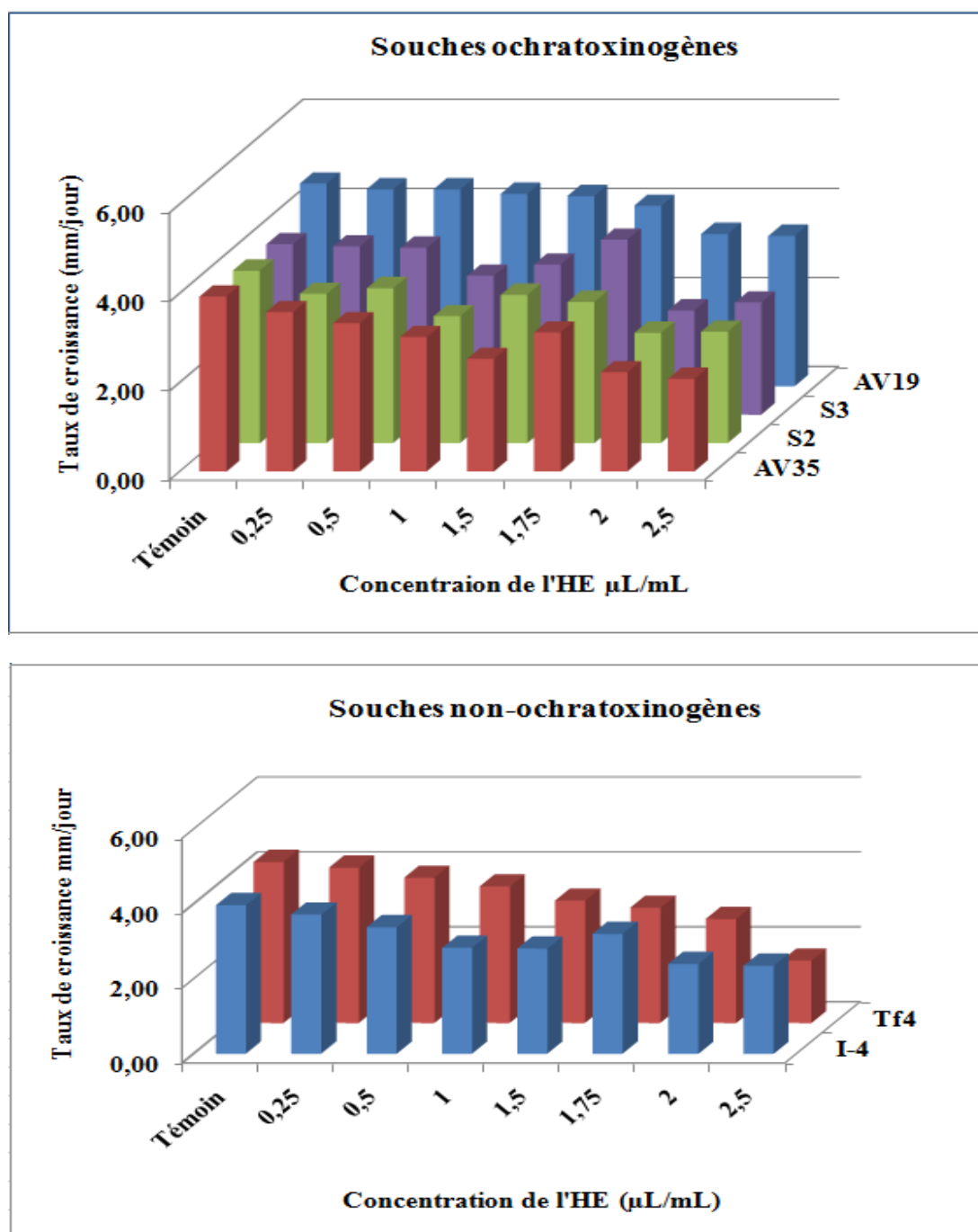


Figure 7. Croissance radiale (mm/jour) des isolats *A. tubingensis* sur milieu CYA en présence de l'huile essentielle (HE) de *M. pulegium* à différentes concentrations (0: témoin; 0.25; 0.5; 1; 1.5; 1.75; 2 et 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$), à 0.90 a_w et 25°C.

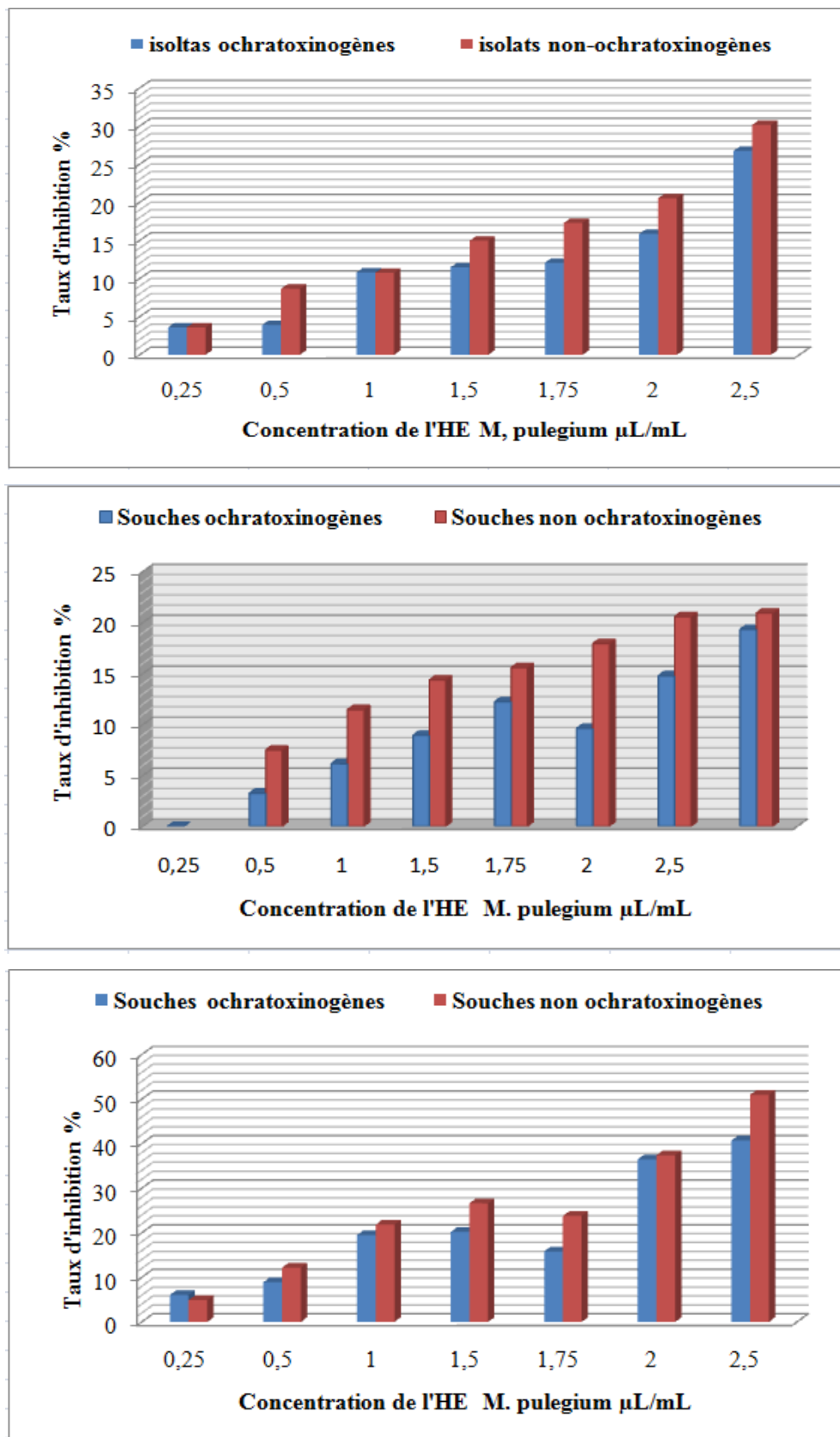


Figure 8. Moyennes des taux d'inhibition calculées pour tous les isolats *A. tubingensis* sur milieu CYA en présence de l'HE de *menthe pouliot* à différentes concentrations, et à différentes activités en eau pendant 25°C.

Donc on peut déduire que l'HE de la menthe pouliot présente plus d'effet pour les isolats non-ochratoxinogènes que les isolats ochratoxinogènes (taux d'inhibition plus élevé pour les non ochratoxinogènes). Par ailleurs, la réduction de la croissance radiale d'*A. tubingensis* à 0.99a_w et 0.95a_w est aussi moins importante que celle observée à 0.90a_w à la fois pour les isolats ochratoxinogènes que pour les isolats non- ochratoxinogènes.

Comme le montre le tableau 7, l'effet des concentrations de l'huile essentielle de *M. pulegium*, des isolats, des activités de l'eau et de leurs interactions (I*aw, I*C, aw*C, I*aw*C) sur le taux de croissance radiale est très significatif (p=0.000).

Tableau 7. Analyse de la variance de l'effet des concentrations de l'HE *M. pulegium*, des différents isolats, de l'activité de l'eau et de leurs interactions sur les taux de croissance d'*Aspergillus niger* agrégats (6 isolats *tubingensis*) sur milieu CYA.

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Modèle corrigé	880,904 ^a	143	6,160	76,053	,000
Ordonnée à l'origine	10821,167	1	10821,167	133597,946	,000
Souches	86,753	5	17,351	214,211	,000
Activité	638,289	2	319,144	3940,150	,000
Concentration	104,817	7	14,974	184,867	,000
Souches * Activité	6,847	10	,685	8,453	,000
Souches * Concentration	12,373	35	,354	4,364	,000
Activité * Concentration	4,640	14	,331	4,092	,000
Souches * Activité * Concentration	13,943	70	,199	2,459	,000
Erreur	23,327	288	,081		
Total	11829,392	432			
Total corrigé	904,231	431			

Le test de Scheffé ($\alpha=0.05$) subdivise l'ensemble des facteurs en des sous-ensembles homogènes. Ainsi, les isolats ont été subdivisés en quatre sous-groupes chevauchants, le premier est formé par deux isolats ochratoxinogènes (S₂ et AV₃₅) et un isolat non-ochratoxinogène (I-4) avec des moyennes du taux de croissance de 4.64, 4.68 et 4.77 mm/jour, respectivement. Le deuxième est formé par deux isolats ochratoxinogènes S₂ (moyenne des taux de croissance de 4.77 mm/jour) et S₃ (moyenne des taux de croissance de

4.92 mm/jour). Le troisième et le quatrième sous-groupe sont formés chacun par un seul isolat (Tf₄ et AV₁₉ dont le taux moyen est 5.21, 5.93mm/jour respectivement). Ces résultats montrent que l'effet de l'HE de menthe pouliot sur la croissance radiale ne distingue pas les souches ochratoxinogènes des non-ochratoxinogènes.

Les concentrations ont subdivisé l'ensemble des observations en cinq sous-groupes homogènes et chevauchants. Le premier et le deuxième sous-groupe formés par les concentrations 2.5 et 2 µL/mL, dont les taux moyens sont respectivement de 4.07 et 4.52 mm/jour. Le troisième sous-groupe renferme trois concentrations chevauchantes entre elles (1 ; 1.5 ; 1.75 µL/mL) avec des taux moyens respectifs de 4.92, 5 et 5.05 mm/jour. Les concentrations de 0.5 et 0.25 µL/mL forment le quatrième sous-groupe avec un taux moyen situé entre 5.38 et 5.51 mm/jour. Le dernier sous-groupe renferme seulement le témoin dont le taux moyen est de 5.74 mm/jour.

Quant à l'activité de l'eau, elle a subdivisé l'ensemble des observations en trois sous-ensembles homogènes où chaque activité de l'eau forme un groupe indépendant. Les groupes 1, 2 et 3 sont formés par les observations aux activités de l'eau respectives de 0.90 (3.32mm/jour), 0.95 (5.57 mm/jour) et 0.99 (6.20 mm/jour).

L'effet antifongique de la menthe pouliot dépend donc des isolats, des doses de l'HE appliquées et de l'activité en eau.

En général, la stratégie la plus efficace pour lutter contre la croissance ainsi que la production des mycotoxines au cours de la culture est la prévention pré-récolte.

Les facteurs environnementales à savoir activité en eau, température, temps de stockage...etc jouent un rôle très important et conditionne la réduction de la population fongique et la production de mycotoxines.

Nos résultats ont montré que les taux de croissance fongique obtenus à partir des tests réalisés sont strictement liés aux trois paramètres : dose en huile essentielle, activité en eau et les isolats.

Ce comportement corrobore des études similaires rapportées par Passon *et al.* (2012). Ils ont testé cinq huiles essentielles de boldo (*Peumus boldus* Mol.), de poleo (*Lippia turbinata* var. *integrifolia* (Griseb.)), de clou de girofle (*Syzygium aromaticum* L.), de l'anis (*Pimpinella anisum*) et du thym (*Thymus vulgaris*) sur la croissance fongique d'*Aspergillus niger* agrégats et *A. carbonarius* à différentes activité en eau (0.98a_w, 0.95a_w, 0.93a_w). Ils ont montré que l'inhibition de la croissance a commencé à partir de la concentration la plus faible d'huile essentielle de 15,62 µg/mL (~ 7.5%) et a atteint un maximum de ~ 92.5% à la

concentration finale de 1000 µg/mL. les pourcentages d'inhibitions ont été estimés à 14.7, 41.7 et 78.5% aux activités de l'eau respectives de 0.98, 0.95 et 0.93. Ils suggèrent que les HE de boldo, poleo et clou de girofle affectent la biosynthèse de l'OTA pour les deux espèces. Qjidaa (2015) ont aussi montré que l'activité antifongique de l'huile essentielle de la menthe pouliot contre les souches d'*A. tubinginsis* et d'*A. foetidus* ochratoxinogènes et non-ochratoxinogènes dépend également des isolats et des doses en huile essentielle utilisées. Le pouvoir antifongique des huiles essentielles d'*E. camaldulensis* et de *M. pulegium* a été évalué par la méthode de micro-atmosphère (Suhr, 2003 ; Bourjilat, 2004) vis-à-vis de deux champignons causant la pourriture des pommes. L'huile essentielle de *M. pulegium* était plus active que celle d'*E. camaldulensis*, elle a provoqué une inhibition de la croissance d'*A. alternata* et de *P. expansum* à partir de 10 µL/mL alors qu'en présence de l'huile essentielle d'eucalyptus, les deux champignons ont résisté jusqu'à 30 µL/mL (Mohamed et al., 2011). En outre Hmiri et al. (2013) ont trouvé que l'huile essentielle de *M. pulegium* exerce une activité inhibitrice remarquable sur trois agents pathogènes (*A. alternata*, *B. cinerea* et *P. expansum*). L'espèce *A. alternata* était la plus sensible, elle a été inhibée à partir d'une concentration de 156 µL/L. La concentration de 300 µL/L a été suffisante pour provoquer une inhibition totale de la croissance de *P. expansum* et de *B. cinerea*. En présence d'eugénol, les champignons testés ont manifesté une sensibilité relative ; *B. cinerea* a été inhibé à partir d'une concentration de 156 µL/L, alors que *A. alternata* et *P. expansum* ont résisté jusqu'à 300 µL/L.

Nos résultats ont montré que les pourcentages d'inhibition se situaient entre 3.60 et 27.87 ; entre 3.25 et 19.30 et entre 6.06 et 40.73 aux activités de l'eau respectives de 0.99_{a_w} ; 0.95_{a_w} et 0.90_{a_w}. Passon *et al*, (2012) ont rapporté des pourcentages d'inhibition plus élevés (14.0 – 54.1%, 24.3 - 100% et de 32.2 - de 100% aux activités de l'eau respectives de 0.98, 0.95, 0.93 _{a_w}) pour les espèces d'*A. niger* agrégats en utilisant d'autres huiles essentielles.

Plusieurs auteurs ont attribué l'effet antifongique des huiles essentielles à leurs composés majeurs. Dans notre cas, la pulégone est le composé principal de l'huile essentielle de la menthe pouliot étudiée avec un pourcentage de 86.4 %. Ce résultat est en accord avec les travaux réalisés par Qjidaa (2015) qui a utilisé à la fois la même plante et les mêmes isolats. Cependant, le taux d'inhibition à une concentration de 2 µL/mL en HE de *M. pulegium* obtenu par Qjidaa (2015) varie entre 87.8 et 100% à 0.99_{a_w}. Rappelons que dans notre étude le taux d'inhibition maximal était de 30.2% à la même activité de l'eau.

Bien que la composition de l'HE de *M. pulegium* soit similaire à celle rapportée par Qjidaa (2015), les taux d'inhibition dans nos conditions pour les différentes concentrations sont plus faibles. Le tableau 8 présente une comparaison des composés majoritaires de notre HE avec celle obtenu par Qjidaa (2015) ainsi que la variation des taux d'inhibition à une dose d'HE de 2 μ L/L.

Tableau 8. Comparaison entre des composés majoritaires de l'HE des feuilles et de la partie aérienne de la *menthe pouliot*.

	HE des feuilles de <i>M. pulegium</i> (présente étude)	HE de la partie aérienne de <i>M. pulegium</i> (Qjidaa, 2015)
	Taux d'inhibition à 2 μ L/mL 11.47 - 22.98%	Taux d'inhibition à 2 μ L/mL 87.8-100%
Composés identifiés	% des composés majoritaires	% composés majoritaire de la
Pulégone	86.14%	85.41%
Bornéol	1.31%	1.90%
β -pinène	1.11%	0.37%
p-Mentha-1,8-diene	1.10%	0.92%
α -pinène	0.41%	0.21%
n-octanol	0.17%	-

D'après ce tableau on remarque que le pourcentage des différents composés majoritaires est à peu près le même pour les deux HE de la *menthe pouliot*. Cependant le taux d'inhibition de notre HE est très faible par rapport à celle de Qjidaa (2015). Il est admis que cette grande différence due à la composition complexe des extraits de plantes qui rend difficile d'établir une relation entre un composé et une cellule cible. Il est prouvé que même les composants mineurs jouent un rôle essentiel dans l'activité antimicrobienne et il semblerait que les effets inhibiteurs sont le résultat de leur action synergique (Abdenour, 2012 ; Cabral et al., 2013).

III.3. Effet de l'HE de la *menthe pouliot* et l'activité en eau sur la production de l'OTA

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'analyse de l'OTA produite dans les milieux de culture en présence ou non de l'HE a été réalisée par chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur fluorimétrique (HPLC-FLD). Vu le temps consacré

à la réalisation de notre mémoire et la disponibilité de l'appareil, nous nous sommes limités à l'analyse des extraits d'OTA de deux souches (une ochratoxinogène et l'autre non-ochratoxinogène) aux différentes concentrations de l'HE à l'activité de l'eau de 0,99_{aw}. Les résultats de l'effet de l'HE de la menthe pouliot sur la production de l'OTA sont résumés dans le Tableau 9.

Tableau 9. Effet de différentes doses de l'HE et activité en eau 0.99_{aw} sur la production de l'OTA par une souche ochratoxinogène et autre non-ochratoxinogènes d'*A. tubingensis* isolées à partir de raisin marocain.

Doses enHE (μ L/mL)	Isolats	<i>A.tubingensis</i> (AV35) OTA ⁺	<i>A.tubingensis</i> (I-4) OTA ⁻
		OTA (ng/g de gélose)	
	Témoin	0,31 $\pm$ 0.28	ND
	0.25 μ L/ml	0.30 $\pm$ 0.16	ND
	0.5 μ L/ml	0.12 $\pm$ 0.09	ND
	1 μ L/ml	0.40 $\pm$ 0.18	ND
	2 μ L/ml	0.39 $\pm$ 0.27	ND
	2.5 μ L/ml	0.04 $\pm$ 0.00	ND

ND : Non détecté

OTA⁺ : souche ochratoxinogène

OTA⁻ : souche non ochratoxinogène

Comme on pouvait s'y attendre, l'OTA n'a pas été détectée dans les milieux de culture des isolats non-ochratoxinogènes, quelle que soit la concentration de l'HE testée. Pour les isolats ochratoxinogènes, l'ajout de l'HE de la menthe pouliot à différentes concentrations ne semble pas modifier la production de l'OTA dans la majorité des cas. En effet, les concentrations de l'OTA dans les témoins sont similaires à celles obtenues pour les doses de 0.25 ; 1 ; et 2 μ L/mL. Cependant, une diminution a été constatée pour 0.5 et 2.5 μ L/mL. Ces résultats sont en accord avec ceux de Qjidaa (2015) où elle a montré que l'ajout d'HE de menthe pouliot diminuait l'accumulation de l'OTA dans le milieu à l'inverse des fongicides qui stimulaient la production de cette toxine.

Conclusion et perspective

La contamination des aliments par les moisissures représente un grand problème dans le secteur agroalimentaire. En effet, plusieurs types de mycotoxines ayant un effet néfaste sur la santé humaine et animale peuvent contaminer les denrées agroalimentaires, en plus des pertes économiques très importantes liées à la détérioration de denrées par les moisissures. L'ochratoxine A est l'une des mycotoxines les plus répandues à cause de sa production par plusieurs espèces de moisissures douées d'un pouvoir toxigènes y compris les espèces des genres *Penicillium* et *Aspergillus*. Les céréales et les raisins sont considérés comme les principaux vecteurs de l'OTA. Cette dernière a des propriétés néphrotoxiques, carcinogènes, tératogènes et immunotoxiques.

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 l'OTA, même si la croissance fongique est inhibée, s'avère nécessaire.

Les résultats de l'effet combiné de l'HE de la menthe pouliot et les différentes activités en eau sur la croissance fongique et la production de l'OTA par des isolats d'*Aspergillus tubingensis* a montré que cette huile essentielle à une activité antifongique. En effet, les taux d'inhibition varient de 0.12 à 61%, selon l'isolat, la concentration de l'HE dans le milieu et l'activité en eau. La diminution de l'activité en eau du milieu de 0.99 a_w à 0.90 a_w augmente la phase de latence et diminue les taux de croissance. En plus l'interaction de l'HE et l'activité en eau à 0.90 a_w s'est avérée plus efficace avec un taux d'inhibition de 3.40 à 61%. Le taux d'inhibition la plus élevé a été remarqué à la concentration 2.5 μ l/ml à l'activité de l'eau de 0.90 a_w , il dépasse 60%.

L'étude statistique a montré que les différentes concentrations de l'huile essentielle de la menthe pouliot, les souches, l'activité en eau pris séparément ainsi que leurs interactions ont un effet hautement significatif ($p=0,000$) sur la croissance radiale.

L'analyse de l'OTA dans les différents extraits de cultures des deux souches d'*A. tubingensis* producteur d'OTA (AV35) et non producteur d'OTA (Tf4), en présence de différentes concentrations d'HE et à une activité de l'eau de 0.99, a montré que l'ajout de l'HE de la menthe pouliot à différentes concentrations ne semble pas modifier la production

de l'OTA. Dans la majorité des cas, L'HE de la menthe pouliot n'a pas stimulé la production de l'OTA contrairement à ce qui a été démontré au laboratoire pour les fongicides.

Pour compléter ce travail, 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 (a_w « élargir la gamme d'activité de l'eau », température, temps d'incubation) sur la croissance fongique et la production de l'OTA devrait être approfondie.

Références bibliographiques

- Abarca, M.L., Accensi, F., Cano, J. et Cabanes, F.J. 2004. Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86, 33-49.
- Al-Hazmi, N.A. 2010. Determination of patulin and ochratoxin A using HPLC in apple juice samples in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 17, 353-359.
- Andersen, B., Thrane, U. (1996). Secondary metabolites produced by *Alternaria infectoria* and their use as chemotaxonomic markers. *Mycotoxin Research.*, 12, 54–60.
- Astoreca, A., Barberis, C., Magnoli, C., Combina, M., Dalcero, A. 2009a. Ecophysiological factors effect on growth rate, lag phase and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate strains in irradiated peanut seeds. *Int. J. Food Microbiol.*, 129, 131–135.
- Astoreca, A., Magnoli, C., Barberis, C., Chiacchiera, S.M., Combina, M., Dalcero, A. 2007b. Ochratoxin A production in relation to ecophysiological factors by *Aspergillus* section *Nigri* strains isolated from different substrates in Argentina. *Sci. Total Environ.* 388, 16–23.
- Astoreca, A., Magnoli, C., Barberis, C., Combina, M., Chiacchiera, S.M., Dalcero, A. 2009b. Influence of ecophysiological factors on growth, lag phase and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate strains in corn grains. *Int. J. Food Microbiol.* 129, 174–179.
- Astoreca, A., Magnoli, C., Barberis, C., Combina, M., Dalcero, A. 2010a. Growth and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* group strains in coffee beans in relation to environmental factors. *World Mycotoxin J.* 3, 59–65.
- Astoreca, A., Magnoli, C., Barberis, C., Combina, M., Dalcero, A. 2010b. *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production in irradiated dried grapes under different water activity and temperature conditions. *World Mycotoxin J.* 3, 175–182.
- Astoreca, A., Magnoli, C., Ramirez, M.L., Combina, M., Dalcero, A. 2007a. Water activity and temperature effects on growth of *Aspergillus niger*, *A. awamori* and *A. carbonarius* isolated from different substrates in Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 314–318.
- Bankole, S., Mabekoje, O.O., 2004. Mycoflora and occurrence of aflatoxin B1 in dried yam chips from markets in Ogun and Oyo States, Nigeria. *Mycopathologia*, 157: 111-115.

Baydar, T., Engin, A.B., Girgin, G., Aydin, S. et Sahim, G. 2005. Aflatoxin and ochratoxin in various types of commonly consumed retail ground samples in Ankara, Turkey, *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 12, 193-197.

Blumenthal, C.Z. 2004. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 39, 214-228.

Bourjilat, F., Mounchid, K., Dersi, N., Aboussaouira, T., Rachidai, A., Tantaoui- Elaraki, A., and Alaoui-ismaili, M., (2004). The susceptibility study of resistant *Escherichia coli* to *Rosmarinus officinalis* and *Eucalyptus globulus* essential oils, *Congrès international de Biochimie*, Marrakech, Maroc, 3-6 Mai, 267-269.

Bragulat, M.R., Abarca, M.L., et Cabanes, F.J. 2001. An easy screening method for fungi producing Ochratoxin in Pure Culture. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 139-144.

Castegnaro, M., Barek, J., Frémy, J.-M., Lafontaine, M., Miraglia, M., Sansone, E.B. et Telling, G.M. (1991).- Laboratory Decontamination and Destruction of Carcinogens in Laboratory Wastes : Some mycotoxins. IARC Scientific Publications No.113, Lyon, International Agency for Research on Cancer, p.63.

Chami, F. (2005). Oregano and clove essential oils induce surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytother. Res.* 19, 405-8.

Couic-Marinier, F., Lobstein, A. 2013. Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. *Actualités pharmaceutiques* 52 (525) : 18-21.

D'Mello, J. P. F., MacDonald, A. M. C. 1997. Mycotoxins. *Animal Feed Science D'Enfert*, C. 1997. Fungal spore germination: insights from the molecular genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* 21: 163-172.

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.

Eder, S., Benesic, A., Engert, R.F.J., Schwerdt, G., Michael, K.D., Gekle, 2000. Nephritogenic ochratoxin A interferes with mitochondrial function and pH homeostasis in immortalized human kidney epithelial cells. *Eur. J. Physiol.* 440, 521–529.

El Khoury, A., T. Rizk, R., Lteif, H., Azouri, M.L., Delia and A. Lebrihi, 2008. Fungal contamination and Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Lebanese wine-grapes and musts. *Food and Chemical Toxicology* 46 (6), 2244–2250.

European Commission (EC) (2006) Commission regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off J Eur Union* L365: 6–24.

European Food Safety Authority (EFSA), 2006a. Opinion of the Scientific Panel on 1375 Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to 1376 ochratoxin A in food. *EFSA J.* 365, 1–56.

Fujii, S., Ribeiro, R.M., Scholz, M.B., Ono, E.Y., Prete, C.E., Itano, E.N., Ueno, Y., Kawamura, O. et Hirooka, E.Y. 2006. Reliable indirect competitive ELISA used for a survey of ochratoxin A in green coffee from the North of Parana State, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 23, 902-909.

Garcia, D., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marin, S., 2011. Is intraspecific variability of growth and mycotoxin production dependent on environmental conditions? A study with *Aspergillus carbonarius* isolates. *Int. J. Food Microbiol.* 144, 432–439.

Guenther, E., 1972. The essential oils. Vol. 1 (2e ad.), Krieger R.E. Publ., Malabar, Florida (USA), 87-226.

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. *Springer Science. World. J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 2227-2238

Hmiri, S., Rahouti, M., Habib, Z., Satrani, B., Ghanmi, M. et El Ajjouri, M. 2011. Évaluation 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*, 80, 824 – 836.

- Janardhana, G.R., Raveesha, K.A. et Shetty, H.S. 1999. Mycotoxin contamination of maize grains grown in Karnataka (India). *Food and Chemical Toxicology*, 37 (8), 863–868.
- Kalemba, D., Kunicka, A., 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10: 813-829.
- Lacey, J., 1986. Factors affecting mycotoxin production. In: *Mycotoxins and phycotoxins*. Steyn, P.S. et Vleggaar, R. (eds). 6th International IUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxins, Pretoria, South Africa.
- Lasram, S., Belli, N., Chebil, S., Zghonda, N. Mliki, A., Sanchis, V. et Ghorbel, A. 2007. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in grapes from Tunisian vineyard. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 376-379.
- Mahboubi, M. and Haghi, G. 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 325–327.
- Marquardt, R.R. et Frohlich, A.A. 1992. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *Journal of Animal Science*, 70, 2968-3988.
- Miller, J.D., Trenholm, H.L. 1994. Mycotoxins In Grain/ Compounds Other Than Aflatoxin. 5, 261-263.
- Mitchell, D., Parra, R., Aldred, D., Magan, N. 2004. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *J. Appl. Microbiol.* 97, 439–445.
- Moosavy, M.H., Basti, A.A., Ali, M., 2008. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in a food model system and on the bacterial. *International Journal of Food Microbiology*, 43, 69–76.
- Moss, M.O. 1998. Recent studies of mycotoxins. *Journal of Applied Microbiology symposium supplement*, 84, 62S-76S.
- Park, J.W., Chung, S-H. et Kim, Y-B. 2005. Ochratoxin A in Korean food commodities : occurrence and safety evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4637-4642.
- Passone, M.A., Girardi, N.S., Etcheverry, M. 2012. Evaluation of the control ability of five essential oils against *Aspergillus* section *Nigri* growth and ochratoxin A accumulation in

peanut meal extract agar conditioned at different water activities levels. *Int J Food Microbiol* 159: 198–206.

Pena, A., Cerejo, F., Lino, C. et Silveira, I. 2005. Determination of ochratoxin in Portuguese rice sample by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382, 1288-1293.

Pfohl-Leszkowicz, A., Manderville, R.A. 2007. Ochratoxin A: an overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 61–99.

Pitt, J.I. and Hocking, A.D. 1997. *Fungi and Food spoilage*, Vol. II. Pitt, J.I. and Hocking, A.D (eds) Blackie Academic and Professional, London, UK.

Pitt, JI., Basilico, JC., Abarca, ML., et Lopez C. 2000. Mycotoxins and toxigenic fungi. *Med Mycol*, 38, 41-46.

Pose, G., Patriarca, A., Kyanko, V., Pardo, A., Pinto, V.F., 2010. Water activity and temperature effects on mycotoxin production by *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. *Int. J. Food Microbiol.* 142, 348–353.

Qjidaa, S. (2015). Thèse: Effet des fongicides, du resvératrol et de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* sur la croissance fongique et la production de l'OTA par des souches d'*Aspergillus tubingensis* et *A. foetidus* isolées à partir du raisin marocain.

Raper, K. B. et Fennel, D.I. 1965. The genus *Aspergillus*. Baltimore, Williams and Wilkins Co. New York, USA.

Rasooli, I., Rezaei, M.B., Allameh, A. 2006. Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*-*International Journal of Infectious Diseases* 10, 236-241.

Remmal, A., T-Eiaraki, A., Bouchikhi, T., Aha your, K., Ettayebi, M., 1993. Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in Agar medium. *J. Essent. Oil Res.* 5, 179-184.

Robledo, M.L., Marin, W.S. et Ramos, A.J. 2001. Contamination natural con micotoxinas en maiz forrajero y granos de café verde en el Estado Nayarit (Mexico). *Revista Iberoamericana de Micología*, 18, 141-144.

- Romero, S.M., Comerio, R.M., Larumbe, G., Ritieni, A., Vaamonde, G., Fernández Pinto, V. 2005. Toxigenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* 104, 43–49.
- Romero, S.M., Fernández Pinto, V., Patriarca, A., Vaamonde, G. 2010. Ochratoxin A production by a mixed inoculum of *Aspergillus carbonarius* at different conditions of water activity and temperature. *Int. J. Food Microbiol.* 140, 277–281. 79.
- Romero, S.M., Patriarca, A., Fernández Pinto, V., Vaamonde, G. 2007. Effect of water activity and temperature on growth of ochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from Argentinean dried vine fruits. *Int. J. Food Microbiol.* 115, 140–143.
- Samson, R. A., Houbraken, J. Q. M. P., Kuijpers, A. F. A., Frank, J. M., Frisvad, J. C. 2004b. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*, 50, 45-61.
- Samson, R.A., Noomin, P., Meijer, M., Houbraken, J., Frisvad, J.C. and Varga, J. 2007. Diagnostic tools to identify black *Aspergilli*. *Studies in Mycology*, 59, 129–145.
- Samson, R.A., Varga, J., Meijer M., et al. (2011). New taxa in *Aspergillus* section *Usti*. *Studies in Mycology* 69: 81–97.
- Sangare-Tigori, B., Dem, A.A., Kouadio, J.H., Betbeder, A., Baudrimont, I., Dano, D.S., Moukha, S. et Creppy, E.E. 2006. Preliminary survey of ochratoxin A in millet, maize, rice and peanuts in Cote d’Ivoire from 1998 to 2002. *Human & Experimental Toxicology*, 25, 211-216.
- Schaaf, G.J., Nijmeijer, S.M., Maas, R.F., Roestenberg, P., de Groene, E.M., Fink- Gremmels, J. 2002. The role of oxidative stress in the ochratoxin A-mediated toxicity in proximal tubular cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1588, 149–158.
- Scudamore, K.A. et Livesey, C.T. 1998. Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 1-17.
- Scudamore, K.A. et Patel, S. 2000. Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into the United Kingdom. *Food Additives and Contaminants*, 17, 407-416.

Scudamore, K.A., et Livesey, C.T. 1998. Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 1-17.

Selouane, A., Bouya, D., Lebrihi, A., Decock, C. and Bouseta, A. 2009b. Impact of some environmental factors on growth and production of ochratoxin A of/by *Aspergillus tubingensis*, *A. niger*, and *A. carbonarius* isolated from Moroccan grapes. *Journal of Microbiology*, 47, 411- 419.

Selouane, A., Zouhair, S., Bouya, D., Lebrihi, A. et Bouseta A. 2009a. Natural occurrence of ochratoxigenic *Aspergillus* species and ochratoxin A in Moroccan grapes. *World Applied Sciences Journal*, 7 (3), 297-305.

Steyn, P.S., Holzapfel, C.W., 1970. Biosynthesis of ochratoxins, metabolites of *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry*, 9, 1977–1983.

Steyn, P.S., Holzapfel, C.W., Ferreira, N.P., 1970. The biosynthesis of ochratoxins, metabolites of *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry* 9, 1977–1983.

Suhr K.I., and Nielsen P.V. (2003). Antifungal activity of essential oils evaluated by Tatsadjieu, N., Jazet M., Ngassoum, MB., Etoa, X., Mbofung, MF., 2010. Investigations on the essential oil of *Lippia rugosa* from Cameroon for its potential use as antifungal agent against *Aspergillus flavus* Link ex. Fries. *Food Control*, 5:161–166. two different application techniques against rye bread spoilage fungi, *J. Appl. Microbiol.*, 93, 665-674.

Technology, 69, 155-166.

Tjamos, S.E., Antoniou, P.P. et Tjamos, E.C. 2006. *Aspergillus spp.*, distribution, population composition and ochratoxin A production in wine producing vineyards in Greece, *International Journal of Food Microbiology*, 111(1), 61-66.

Valenta, H. et Richter, W. 1998. Untersuchungen zur reversibilit  tes eines ochratoxin A Dekontaminationsverfahrens. In: 20. Mykotoxin-Workshop, 8-10 June 1998, Detmold: Bundesanstalt fuer Getreide, Kartoffel-und Fettforschung, 10.

Van der Merwe, K.J., Steyn, P.S., Fourie, L., De Scott, B., et Theron, J.J. 1965b. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. Nature (London) 205,1112.

Vega, M., Munoz, K., Sepulveda, C., Aranda, M., Campos, V., Villegas, R. 2009. Solid-phase extraction and HPLC determination of Ochratoxin A in cereals products on Chilean market. Food Control, 20(7), 631-634.

Zhang, X., Boesch-Saadatmandi, C., Lou, Y., Wolffram, S., Huebbe, P., Rimbach, G. 2009. Ochratoxin A induces apoptosis in neuronal cells. Genes Nutr. 4, 41–48.

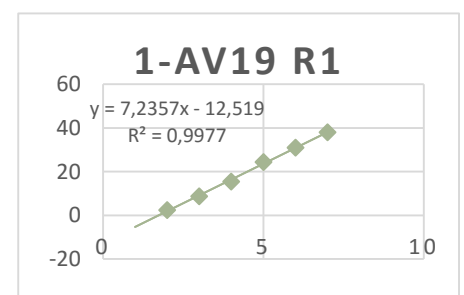
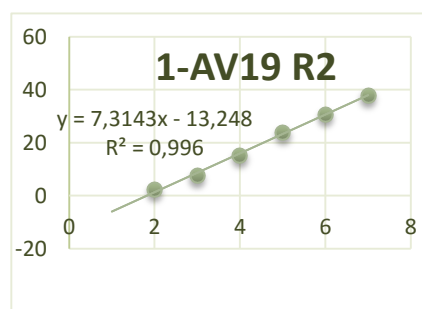
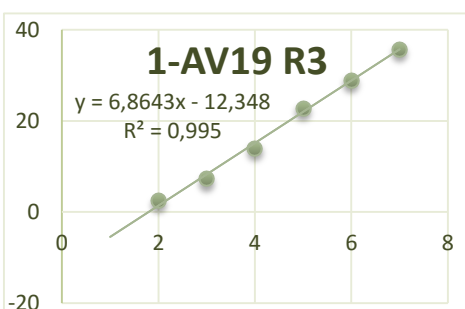
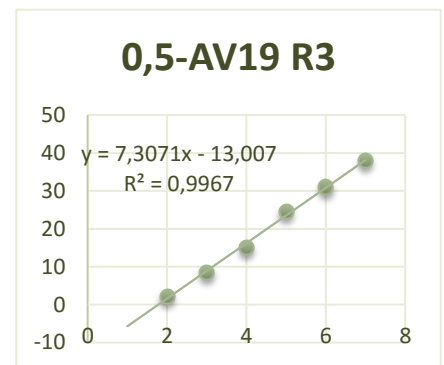
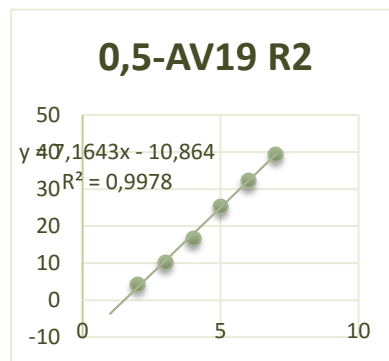
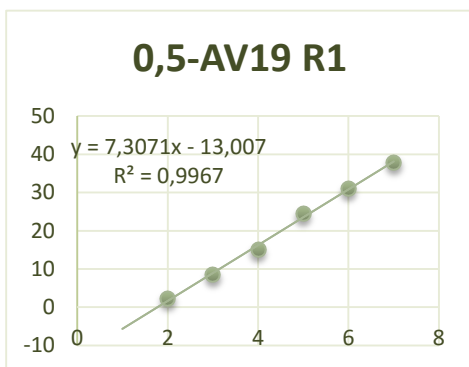
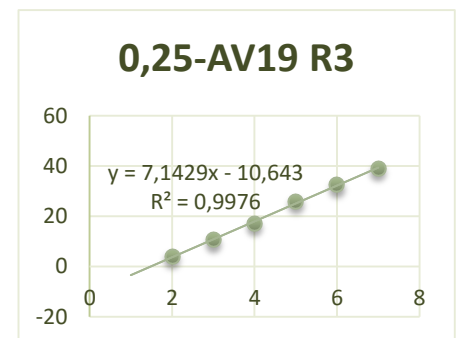
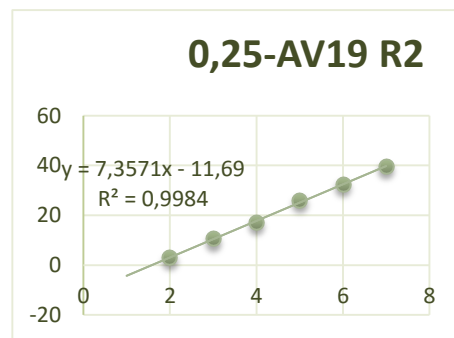
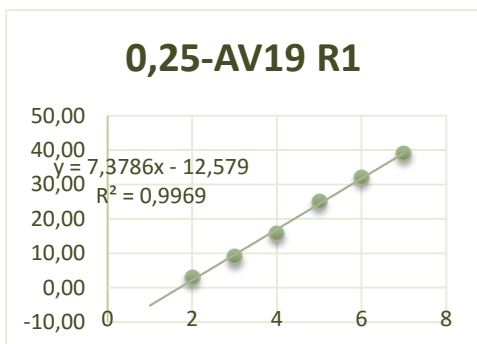
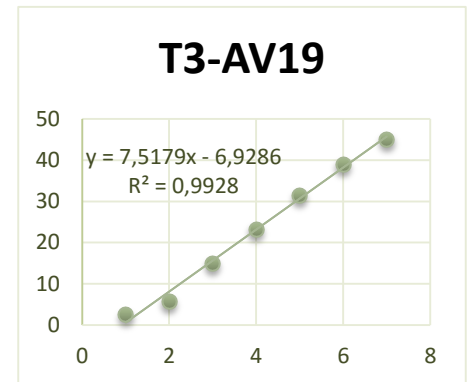
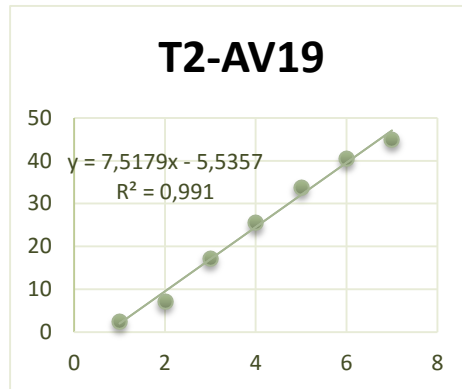
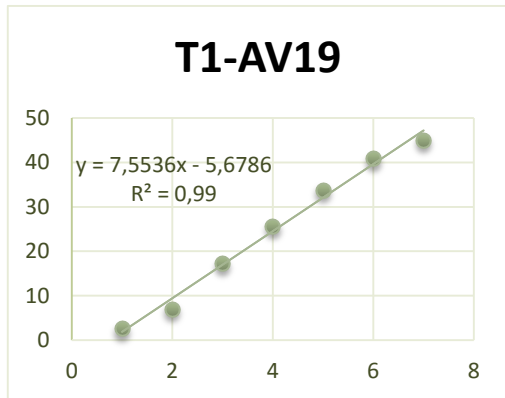
Zimmerli, B. et Dick, R. 1996. Ochratoxin A in table wines and grape-juice: occurrence and risk assessment. Food Additives and Contaminants, 13, 655-668.

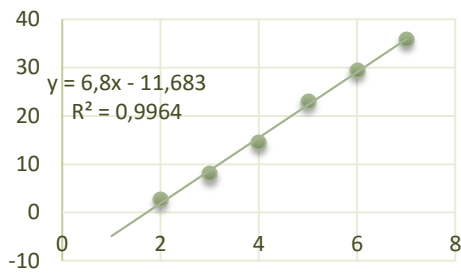
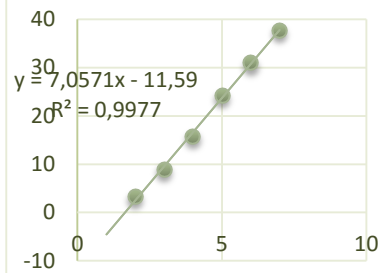
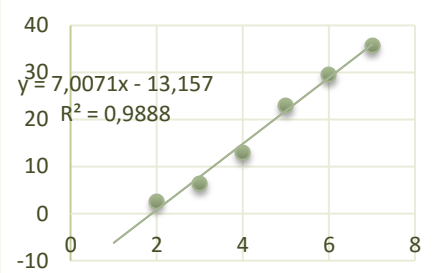
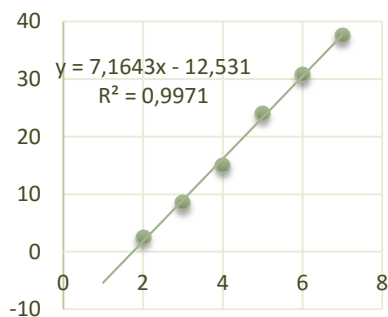
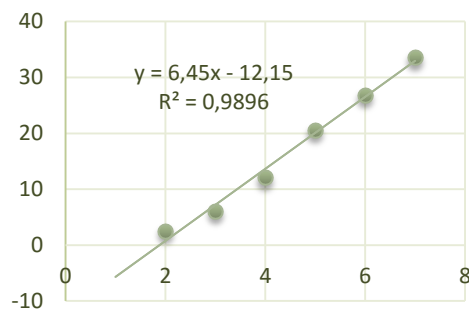
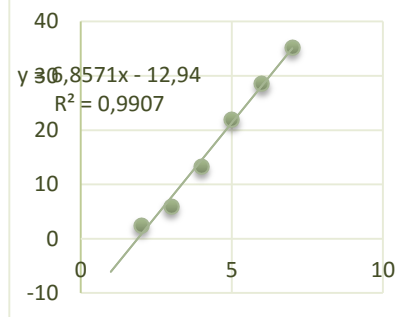
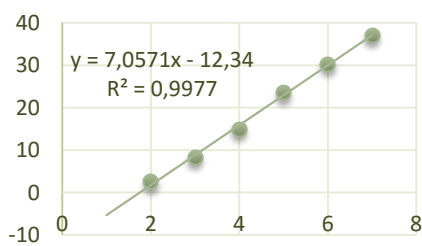
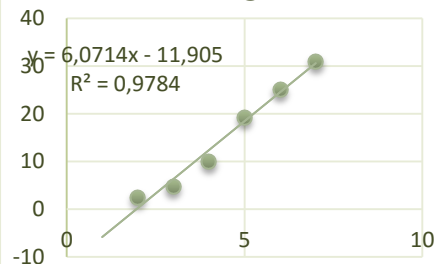
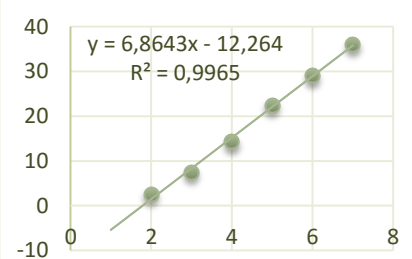
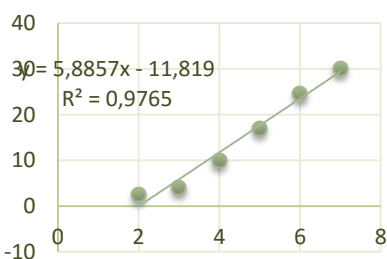
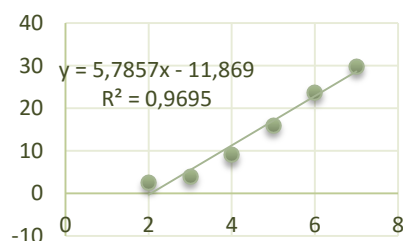
Zimmerli, B., et Dick, R. 1996. Ochratoxin A in table wines and grape-juice: occurrence and risk assessment. Food Additives and Contaminants, 13, 655-668.

Zinedine, A., Soriano, J.M., Juan, C., Mojemmi, B., Moltó, J.C., Bouklouze, A., Cherrah, Y., Idrissi, L., El Aouad, R., Mañes, J., 2007b. Incidence of ochratoxin A in rice and dried fruits from Rabat and Salé area, Morocco. Food Additives and Contaminants, 24(3), 285-299.

Annexe

Les courbes de tendance



1,5-AV19 R3**1,5-AV19 R1****1,5-AV19 R2****1,75-AV19 R1****1,75-AV19 R2****1,75-AV19 R3****2-AV19 R1****2-AV19 R2****2-AV19 R3****2,5-AV19 R1****2,5-AV19 R2****2,5-AV19 R3**