

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud MAMMERRI de Tizi-Ouzou



Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département des Sciences Biologiques

THESE

Pour l'obtention du grade de Docteur 3^{ème} cycle
Spécialité: Biochimie, Microbiologie et Sciences Alimentaires

Présentée par
Ben Miri Yamina

**Etude du potentiel antifongique, antiaflatoxinogène
et antioxydant de certaines huiles essentielles et leur
efficacité dans le système alimentaire.**

Soutenue le 01/07/ 2019 devant le jury composé de:

Mr Houali Karim	Professeur (UMMTO)	Président
Mr Djenane Djamel	Professeur (UMMTO)	Directeur de thèse
Mr Kecha Mouloud	Professeur (U. Bejaia)	Examineur
Mr Ferhat M. Amine	Professeur (ENS de Kouba, Alger)	Examineur
Mr Ouelhadj Akli	Maître de conférences A (UMMTO)	Examineur
M ^{me} Yahiaoui Karima	Maître de conférences A (UMBB)	Examinatrice
Mr Aït Saïd Samir	Maître de conférences A (UMMTO)	Invité

Année universitaire 2018-2019

Remerciements

En premier lieu et avant tout je tiens à remercier DIEU le tous puissant qui m'a donné le courage, la patience et la force de terminer ce travail.

Le travail a été réalisé sous la direction de Professeur Djenane Djamel de l'Université de Tizi-Ouzou. Je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude pour m'avoir encadré pendant la durée de cette thèse, pour sa confiance, sa gentillesse, son encouragement, son soutien qu'il m'a accordé, pour ses remarques pertinentes et son optimisme. Je lui suis reconnaissante pour le temps qu'il m'a consacré et toutes les opportunités qu'il m'a offertes au cours de cette thèse.

J'exprime toute ma gratitude au Professeur Houali Karim de l'Université de Tizi-Ouzou pour avoir accepté de présider ce jury et pour sa grande disponibilité.

Mes remerciements s'adressent aussi aux différents membres du jury:

- Professeur Kecha Mouloud de l'Université de Bejaia, Docteur Ouelhadj Akli, Maître de conférences A à l'université de Tizi-Ouzou; Docteur Yahiaoui Karima, Maître de conférences A à l'université M'Hamed BOUGARA de Boumerdès; Professeur Ferhat Mohamed Amine, de l'Ecole Nationale Supérieure de Kouba, Alger, de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être membres du jury.

Je remercie Docteur Aït Saïd Samir, Maître de conférences A à l'Université de Tizi-Ouzou, d'avoir accepté d'être un invité.

Je remercie Professeur Abderrahmane MATI de l'Université de Tizi-Ouzou, Président du comité de formation doctorale (CFD) pour son engagement et ses conseils.

Je remercie Professeur Nasserline Sabaou directeur de laboratoire de recherche sur les produits bioactifs et la valorisation de la biomasse à l'E.N.S de Kouba, Alger de m'avoir accueilli dans son laboratoire et mettre à ma disposition le matériel nécessaire pour la réalisation de mes expériences.

Le travail n'aurait jamais pu être complété sans l'utilisation du GC/MS de laboratoire de Biotechnologies Végétales appliquées aux Plantes Aromatiques et Médicinales, Faculté des Sciences et Techniques. Université Jean monnet, Saint-Etienne (France) avec la participation de Docteur Benabdelkader Tarek, Maître de conférences à l'université M'Hamed BOUGARA de Boumerdès.

Un grand merci à Madame Bouti Karima Maître de Conférences (E.N.S de Kouba), Madame Tounssi Hassina (Ingénieur de laboratoire d'écophysiologie végétale, E.N.S de Kouba), Docteur Lakache Zined, Maître de Conférences (E.N.S de Kouba), Madame Azzoune Nadia, Maître de Conférences (Université de Boumlerdès) et Madame Zebiri Saliha Maître de Conférences (E.N.S de Kouba) pour les conseils et les encouragements qu'elles m'ont prodigué depuis la première année de doctorat.

Je ne remercierai jamais assez le docteur Mahdid mouhamed Maître de Conférences (E.N.S de Kouba) et Madame Bouazza Fatma, Maître de Conférences (Université de Médéa) pour les nombreux services qu'ils m'ont rendus durant la réalisation de cette thèse, qu'ils trouvent ici le témoignage de mes remerciements les plus amicaux.

Une pensée particulière pour Monsieur Talbi (Université de Tizi-Ouzou), vous étiez toujours à mes côtés et vous m'avez toujours apporté le soutien. Je vous remercie chaleureusement.

Je suis très reconnaissante envers toute autre personne, qui ma aidé durant les travaux de thèse.

En guise de reconnaissance, je dédie ce travail

à mes chers parents, mes sœurs, frères

Pour leur présence à tous les instants,

Pour le soutien qu'ils m'ont apporté.

Liste des publications et communications

Listes des publications et communications scientifiques en rapport avec la thèse doctorale

1. Publications

- **Yamina Ben Miri**, Agustín Ariño and Djamel Djenane. Study of Antifungal, Anti-aflatoxicogenic, Antioxidant Activity and Phytotoxicity of Algerian *Citrus limon* var. Eureka and *Citrus sinensis* var. Valencia Essential oils. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. DOI: 10.1080/0972060X.2018.1456363.
- **Yamina Ben Miri**, and Djamel Djenane. Evaluation of Protective Impact of Algerian *Cuminum cyminum* L. and *Coriandrum sativum* L. Essential Oils on *Aspergillus flavus* Growth and Aflatoxin B₁ Production. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. DOI: 10.3923/pjbs. 2018.
- **Yamina Ben Miri**, and Djamel Djenane. Antifungal, Anti-aflatoxicogenic, Antioxidant Activity and *in vivo* Efficacy of Essential Oil of the Aerial Parts of *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns & Link. *Phytothérapie*. DOI 10.3166/phyto-2018-0032.
- **Yamina Ben Miri** and Djamel Djenane. Evaluation of *Laurus nobilis* (L.) essential oil as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant properties: Efficacy in food system. *Journal of Food Science and Technology*.0022-1155.

2-Chapitre livre

- **Yamina Ben Miri**, Djamel Djenane and Agustín Ariño. Prevention by essential oils of occurrence of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin B₁ production in food system: Review. *Aflatoxin B₁ Occurrence and Toxicological Effects*. 978-1-83880-256-1. (Accepté).

3- Communications

- **Ben Miri Yamina**, Djenane Djamel. Composition chimique et activité antioxydante de L'huile essentielle de *Laurus nobilis*. La 1^{ère} Journée Nationale de l'Agro-alimentaire, Engineering et environnement, Boumerdes la 16 Avril 2017.
- **Ben Miri Yamina**, Djenane Djamel. Antifungal activity *Laurus nobilis* essential oil against *Aspergillus flavus*. Les Journées Internationales de Biotechnologie, Tunisie les 18, 19, 20, 21 et 22, Décembre 2016.

Liste des publications et communications

- **Ben Miri Yamina**, Djenane Djamel, Bouti Karima, Mahdid Mohamed. The inhibitory effect of *Nigella sativa* essential oil on *Aspergillus flavus* and on aflatoxin production. Troisième Exposition Ethnobotanique et quatrième Atelier d'initiation à la phytothérapie, Alger le 15 Mai 2016.
- **Ben Miri Yamina**, Djenane Djamel, Bouti Karima, Azzoune Nadia, Mahdid Mohamed, Zebiri saliha, Zane kamelia. Antifungal Activity of two essential oils against fungi isolated from some imported spices. Troisième Exposition Ethnobotanique et quatrième Atelier d'initiation à la phytothérapie, Alger le 15 Mai 2016.
- **Ben Miri Yamina**, Riba Amar, Djenane Djamel. Inhibitory effect of the essential oil of Coriander on aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. Maghrebian-Finnish Biotechnology Symposium, Tunisie les 19, 20, 21 et 22, 2016 Mars 2016.

Résumé

Ce travail a pour objectif de déterminer en premier lieu le profil chimique des différentes huiles essentielles (HEs) du *Citrus limon* L. var. Eureka (*C. limon*), *Citrus sinensis* L. var. Valencia (*C. sinensis*), *Cuminum cyminum* L. (*C. cyminum*), *Coriandrum sativum* L. (*C. sativum*), *Laurus nobilis* L. (*L. nobilis*), et *Thymus capitatus* L. (*T. capitatus*), ensuite déterminer leur pouvoir d'inhibition de la croissance de *Aspergillus flavus* E73 (*A. flavus*) ainsi que sur la production de l'AFB₁. La fungitoxicité, l'activité antioxydante, la teneur en phénols, la phytotoxicité et l'effet *in vivo* ont également été évaluées.

De bons rendements en HEs ont été enregistrés pour les différentes matières végétales, le rendement le plus élevé est celui de *L. nobilis* (1,13%), suivi par *C. cyminum* (1,08%), *T. capitatus* (0,82%), *C. sativum* (0,7%), *C. limon* (0,62%) et en dernier lieu *C. sinensis* (0,55%). Les HEs obtenus ont été caractérisées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM). Les analyses ont révélé que le limonène est le composé majoritaire des HEs de *C. sinensis* (82,6 %) et *C. limon* (54,95 %). Les HEs de *C. cyminum* et *C. sativum* ont été dominées par le cuminaldéhyde (65,98%) et le linalol (78,86%), respectivement. Le 1,8-cinéole (35,54%) est le composé le plus dominant dans l'HE de *L. nobilis* tandis que l'HE de *T. capitatus* a été caractérisée par prédominance de deux composants, le thymol (25,82%) et le linalol (23,40%).

Une corrélation positive entre la diminution subséquente de la croissance de l'*A. flavus* E73, de la biomasse mycélienne et la production d'AFB₁ et la présence des HEs. L'inhibition complète a été enregistrée à 1,75 mg/ml pour *C. limon*, 2,00 mg/ml pour *C. sinensis*, 1,25 mg/ml pour *C. cyminum*, 1,50 mg/ml pour *C. sativum*, 1,75 mg/ml pour *L. nobilis* et finalement 1,00 mg/ml pour *T. capitatus*.

La fungitoxicité des HEs a été estimée sur neuf (09) moisissures à savoir *Aspergillus carbonarius* (*A. carbonarius*), *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*), *Aspergillus niger* (*A. niger*), *Aspergillus ochraceus* (*A. ochraceus*), *Aspergillus tamari* (*A. tamari*), *Aspergillus terreus* (*A. terreus*), *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. et *Rhizopus* sp. Les HEs sont efficaces envers ces moisissures toxigènes.

Les activités de piégeage du radical DPPH, l'oxydation des lipides du couple β -carotène /acide linoléique ont montré des activités modérées. En outre, ces dernières ont été utilisées comme marqueurs pour l'élucidation de l'inhibition à base d'antioxydants de la biosynthèse d'AFB₁.

Au cours du test phytotoxique, les HEs (sauf pour *L. nobilis*) n'ont pas manifesté un effet néfaste sur la germination des graines de blé de HD1220 (Hiddab) et d'AS 81189 A (Ain Abid) montrant leur caractère non phytotoxique. Ces HEs ont également montré une efficacité prononcée *in vivo* fournissant jusqu'à > 75% de protection des graines de blé des deux variétés de la contamination par *A. flavus* E73.

Tous ces résultats ont révélé que les HEs de *C. limon*, *C. sinensis*, *C. cyminum*, *C. sativum*, *L. nobilis* et *T. capitatus* constitueraient une solution appropriée pour la formulation d'additifs alimentaires à base de plantes/conservateurs contre la biodétérioration des aliments provenant des moisissures du stockage ainsi que leur contamination par l'AFB₁.

Mots clés: Huiles essentielles, *Aspergillus flavus* E73, Activité antifongique, AFB₁, Activité antioxydante, Phytotoxique, Blé.

Abstract

The aim of this work is to study the chemical profile of the essential oils (EOs) of *Citrus limon* L. (*C. limon*), *Citrus sinensis* L. (*C. sinensis*), *Cuminum cyminum* L. (*C. cyminum*), *Coriandrum sativum* L. (*C. sativum*), *Laurus nobilis* L. (*L. nobilis*) and *Thymus capitatus* L. (*T. capitatus*) the inhibition of *A. flavus* E73 growth and the production of AFB₁. Fungitoxicity, antioxidant activity, phytotoxicity and *in vivo* effect were also evaluated.

The tested local plants showed better yields of EOs, the highest being that of *L. nobilis* (1.13%) followed by *C. cyminum* (1.08%), *T. capitatus* (0.82%), *C. sativum* (0.7%), *C. limon* (0.62%) and finally *C. sinensis* (0.55%). The obtained EOs were characterized by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS). The analyzes revealed that limonene was the major component of the EOs of *C. sinensis* (82.6%) and *C. limon* (54.95%). The EOs of *C. cyminum* and *C. sativum* were dominated by cuminaldehyde (65.98%) and linalol (78.86%), respectively. 1,8-cineole (35.54%) was the most dominant compound in *L. nobilis*, EO while *T. capitatus*, EO was predominantly composed of two components, thymol (25.82%) and linalol (23.40%).

A positive correlation between the subsequent decreases in *A. flavus* E73 growth, mycelial biomass and AFB₁ production by the toxigenic strain with increasing EOs concentrations was found in all treatment sets. Complete inhibition was found to be 1.75 mg/ml (*C. limon*), 2.00 mg/ml (*C. sinensis*), 1.25 mg/ml (*C. cyminum*), 1.50 mg/ml (*C. sativum*), 1.75 mg/ml (*L. nobilis*) and 1.00 mg/ml (*T. capitatus*). The fungitoxicity of EOs was estimated against nine food borne molds, namely *A. carbonarius*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. tamari*, *A. terreus*, *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. and *Rhizopus* sp. EOs were effective against these toxigenic molds.

In vitro antioxidant activities demonstrated that DPPH radical scavenging activities, β -carotene/linoleic acid lipid oxidation had moderate activity. In addition, these EOs have been used as markers for the elucidation of antioxidant-based inhibition of AFB₁ biosynthesis. During the phytotoxic test, EOs (except *L. nobilis*) did not show a detrimental effect on the germination of wheat seeds of HD1220 (Hiddab) and AS 81189 A (Ain Abid) showing their non-phytotoxic. The EOs also showed a pronounced *in vivo* efficacy in the food system providing up to > 75% wheat seed protection from both varieties of *A. flavus* E73 contamination. The results from this study indicate that the EOs of *C. limon*, *C. sinensis*, *C. cyminum*, *C. sativum*, *L. nobilis* and *T. capitatus* would be an appropriate solution for the formulation of plant-based/preservative food additives against the biodeterioration of food from storage molds and lipid peroxidation and their contamination by AFB₁.

Key words: Essential oils, *Aspergillus flavus* E73, Antifungal activity, AFB₁, Antioxidant activity, Phytotoxic, Wheat seed.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو دراسة التركيب الكيميائي للزيوت الأساسية لـ *Citrus sinensis* ، *Citrus limon* ، *Aspergillus flavus* E73 وإنتاج AFB₁ ، كما تم تقييم سمية الفطريات، نشاط مضادات الأكسدة ، السمية النباتية والتأثير في الوسط الحي. أظهرت النباتات التي تم اختبارها عوائد جيدة من الزيوت الأساسية، أعلاها في (1,13 %) *L. nobilis* ، يليها *C. cyminum* (1,08%) ، *T. capitatus* (0,82%) ، *C. sativum* (0,70%) ، *C. limon* (0,62%) وأخيرا *C. sinensis* (0,55%) . تميزت الزيوت الأساسية التي تم الحصول عليها بواسطة كروماتوجرافيا الغاز إلى جانب الطيف الكتلي (GC /SM) أن limonene كان المركب الرئيسي لـ *C. sinensis* (82,6%) و *C. limon* (54,95%) . المكونات الرئيسية لـ *C. sativum* و *C. cyminum* هم على التوالي cuminaldehyde (65,98%) ، linalol (78,86%) . كان linalol هو المركب الأكثر شيوعاً في *L. nobilis* ، بينما كان كل من thymol (25, 82%) و linalol (23, 40%) المركبان الرئيسيان لـ *T. capitatus* .

تم العثور على علاقة إيجابية بين الانخفاضات اللاحقة في نمو *A. flavus* E73 والكتلة الحيوية الفطرية وإنتاج AFB₁ بواسطة السلالة التوكسينية مع زيادة تركيزات الزيوت الأساسية في جميع مجموعات العلاج. تم العثور على تثبيط كامل ليكون 1,75 ملغ / مل (*C. limon*) ، 2,00 ملغ / مل (*C. sinensis*) ، 1,25 ملغ / مل (*C. cyminum*) ، 1,50 ملغ / مل (*C. sativum*) ، 1,75 ملغ / مل (*L. nobilis*) و 1,00 ملغ / مل (*T. capitatus*) . كما تم تقدير تسمم الفطريات ضد تسعة سلالات فطرية ، وهي *A. carbonarus* ، *A. fumigatus* ، *A. niger* ، *A. ochracus* ، *A. tamari* ، *A. terreus* ، *Fusarium* sp. ، *Penicillium* sp. و *Rhizopus* sp. وقد كانت الزيوت الأساسية فعالة ضد هذه الفطريات السامة.

النشاطية المضادة للأكسدة لهذه الزيوت الأساسية تم تقديره باستعمال: اختبار DPPH و ابيضاض β -carotene . من خلال النتائج المتحصل عليها يتضح بان هذه الزيوت الأساسية تملك قدرة مضادة للاكسدة. من خلال اختبار السمية النباتية، لم تظهر الزيوت الأساسية (باستثناء *L. nobilis*) تأثيراً ضاراً على إنبات بذور القمح لـ HD1220 (هضاب) و AS 81189 A (عين عابد) التي تبين أنها غير سامة للنباتات. أظهرت الزيوت الأساسية أيضاً فعالية ملحوظة في الوسط الحي حيث توفر ما يصل إلى 75% من حماية بذور القمح من كلا الصنفين من التلوث بـ *A. flavus* E73 .

تشير نتائج هذه الدراسة إلى أن الزيوت الأساسية لـ *C. limon* و *C. sinensis* و *C. cyminum* و *C. sativum* و *L. nobilis* و *T. capitatus* ستكون حلاً ملائماً لصياغة إضافات غذائية قائمة على النبات / المواد الحافظة ضد التحلل الحيوي للأغذية من السلالات الفطرية و بيروكسيد الدهون وتلوثها بواسطة AFB₁.

الكلمات المفتاحية: الزيوت الأساسية ، *A. flavus* E73 ، النشاط المضاد للفطريات ، AFB₁ ، نشاط مضادات الأكسدة ، السموم النباتية ، بذور القمح.

Liste des abréviations

A: Absorbance.

ADN: Acide désoxyribonucléique.

AF-ALB: aflatoxine-albumine.

AFAR: Aldéhyde reductase d'aflatoxine.

AFB₁: Aflatoxine B₁.

AFNOR: Association Française de Normalisation.

AFSSA: Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.

ATP: Adénosine Tri Phosphate.

a_w: Activité de l'eau (activity of water).

BHT: Butyl-hydroxytoluène.

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

CCM: Chromatographie sur couche mince.

CE: Commission Européenne.

CIRC: Centre International de Recherche sur le Cancer.

CMF: Concentration minimale fongicide.

CMI: Concentration minimale inhibitrice.

CYA: Milieu à base d'extrait de levure et Czapek gélosé (Czapek Yeast Agar).

CYP: Cytochromes P.

DMAST: Diméthyl allyl transférase.

DMSO: Diméthyl sulfoxyde.

DO: Densité optique.

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.

DRBC: Milieu à base de dichloran rose Bengale chloramphénicol gélosé (Dichloran Rose Bengale Chloramphenicol Agar).

EMX: Enzymes du métabolisme des xénobiotiques.

FAO: Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (Food and Agriculture Organization).

G25N: Milieu à base de nitrate de glycérol gélosé (Glycerol Nitrate Agar).

GC: Chromatographie en phase gazeuse.

GST: Glutathion S-transférase.

HE: Huile essentielle.

HR: Humidité relative.

HSCAC: Aluminosilicates de sodium calcium hydratés.

IA: Indice d'acide.

Liste des abréviations

IC₅₀: Concentration à 50% de DPPH perdu.

IE: Indice d'ester.

IR: Indice de rétention.

IRF: Infrarouge.

ISO: Organisation internationale de normalisation (International Standard Organisation).

MDGC: Chromatographie gazeuse multidimensionnelle.

Mdr: Multi drug resistance.

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

NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrogène.

NRPS: Non-ribosomal peptide synthétase.

OMS: Organisation Mondiale de la Santé.

PAL: Phosphatases alcalines.

PDA: Milieu à base de pomme de terre et dextrose gélosé (Potato Dextrose Agar).

PgP: Pglycoprotéine.

PKS: Polycétide synthase.

PM: Poids moléculaire.

RMN: Résonance magnétique.

ROS: Espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species).

rpm: Rotation par minute.

SM: Spectrométrie de masse.

SMKY: Milieu à base d'extrait de levure, sulfate de magnésium, nitrate de potassium et de saccharose (Sucrose Magnesium sulphate potassium nitrate Yeast extract).

SPME: Micro-extraction en phase solide.

TC: Terpènes cyclase.

TR: Temps de rétention.

UV: Ultra violet.

VIH: Virus de l'immunodéficience humaine.

γ-GT: γ- glutamyl transférases.

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Listes des publications et communications

Résumé

Abstract

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Page

I. Revue bibliographique

Introduction	1
I.1. Généralités sur les moisissures et les mycotoxines	3
I.2. Moisissures	3
I.3. Mycotoxines	3
I.3.1. Les mycotoxines en alimentation humaine et animale	5
I.3.2. Les facteurs influençant la production des mycotoxines	6
I.3.2.1. Facteurs intrinsèques	6
I.3.2.2. Facteurs extrinsèques	6
I.3.2.3. Facteurs divers	8
I.3.3. Effets des mycotoxines sur la santé	9
I.3.4. Impact économique des mycotoxines	10
I.3.5. Réglementations relatives aux mycotoxines	11
I.4. Genre <i>Aspergillus</i>	12
I.4.1. Définition	12
I.4.2. <i>Aspergillus flavus</i>	13
I.5. Aflatoxines	14
I.5.1. Origine et structure	14
I.5.2. Propriétés physico-chimiques	15
I.5.3. Contamination en aflatoxines des denrées alimentaires	16
I.5.4. Métabolisme de l'aflatoxine B ₁ dans l'organisme	16
I.5.5. Toxicité des aflatoxines	20
I.6. Méthodes de lutte contre les aflatoxines	22

I.6. 1. Procédés physiques	22
I.6. 2. Procédés chimiques	23
I.6. 3. Procédés biologiques	23
I.6.4. Les Huiles essentielle: une stratégie alternative de lutte contre la production des aflatoxines	24
I.6. 4.1. Huiles essentielles	23
a. Définition, localisation et composition chimique	23
b. Méthode d'extraction des huiles essentielles	26
c. Méthodes d'analyses des huiles essentielles	31
I.6.4.2. Utilisation des huiles essentielles comme agents antifongiques et anti-aflatoxinogènes	32
a. Inconvénients des fongicides de synthèse	32
b. Les huiles essentielles comme des antifongiques naturels	33
c. Mécanisme d'action des huiles essentielles	34
d. Les huiles essentielles comme anti-aflatoxines B ₁	35
I.7. Application des huiles essentielles dans la prévention des aliments de la contamination	37
I.7. 1. Limitations de l'utilisation des huiles essentielles	38
I.8. Présentation et description botanique de quelques plantes utilisées dans cette étude	39
I.8.1. <i>Citrus limon</i> (L.) var. Eurêka	39
I.8.1.1. Classification	39
I.8.2. <i>Citrus sinensis</i> (L.) var. Valencia	40
I.8.2.1. Classification	40
I.8.3. <i>Cuminum cyminum</i> L.	41
I.8.3.1. Classification	41
I.8.4. <i>Coriandrum sativum</i> L.	42
I.8.4.1. Classification	43
I.8.5. <i>Laurus nobilis</i> L.	43
I.8.5.1. Classification	44
I.8.6. <i>Thymus capitatus</i> L.	45
I.8.6.1. Classification	45
II. Partie expérimentale	
II. 1. Matériel végétal	47
II. 2. Extraction et caractérisation des huiles essentielles	47
II. 2.1. Hydrodistillation	47

II. 2.2. Calcul du rendement en huiles essentielles	48
II. 2.3. Étude analytique des huiles essentielles	49
II. 2.3.1. Propriétés organoleptiques	49
II. 2.3.2. Propriétés physico-chimiques	49
a. Mesure des indices physiques	49
b. Mesure des indices chimiques	50
II. 2.4. Analyse par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/SM)	51
II. 2.4.1. Analyse en GC/MS	51
II. 2.4.2. Identification des composés volatils	52
II. 3. Tests biologiques	52
II. 3.1. Matériel fongique	52
II. 3.2. Milieux de culture	53
II. 3.3. Identification de l'espèce d' <i>A. flavus</i> E73	53
a. Identification du genre	53
b. Identification de l'espèce	54
II. 3.4. Test de confirmation du pouvoir aflatoxinogène de la souche	54
II. 4. Préparation de l'inoculum	55
II. 5. Activité antifongique <i>in vitro</i> des huiles essentielles	55
II. 5.1. Étude de la nature de la fongitoxicité des huiles essentielles	57
II. 6. Test d'inhibition de la production des aflatoxines B ₁	58
II. 6.1. Test anti-aflatoxinogène	58
II. 7. Spectre fongitoxique des huiles essentielles contre moisissures d'intérêt alimentaire	59
II. 9. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles	60
II.9.1. Evaluation de l'activité de piégeage du radical libre par la méthode de DPPH	60
II.9.2. Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode β-carotène/acide linoléique	61
II. 10. Test de phytotoxicité et <i>in vivo</i> des huiles essentielles	61
II. 10.1. Blé	61
II. 10. 2. Détermination du taux d'humidité relative	62
II. 10.3. Test de phytotoxicité	62
II. 10.3.1. Tests préliminaires de germination	62
II. 10.3.2. Tests finaux de germination	63
II. 10.4. Étude <i>in vivo</i> de l'effet des vapeurs des huiles essentielles sur le substrat	64

II. 10.4.1 Analyse mycologique	64
II. 11. Analyse statistique	66
III. Résultats et Discussion	
III.1. Rendements en huiles essentielles	67
III.2. Caractéristiques organoleptiques et physico-chimique des huiles essentielles	68
III.2.1. Caractéristiques organoleptiques	69
III.2.2. Caractéristiques physico-chimiques	70
III. 3. Composition chimique des huiles essentielles	71
III.3.1. <i>C. sinensis</i> et <i>C. limon</i>	71
III.3.2. <i>C. cyminum</i> et <i>C. sativum</i>	75
III.3.3. <i>L. nobilis</i> et <i>T. capitatus</i>	79
III.4. Principaux caractères morphologiques d' <i>A. flavus</i> E73	83
III.4.1. Identification de genre	83
a. Aspect macroscopique	83
b. Aspect microscopique	83
III.4.2. Identification de l'espèce	84
III.5. Étude du pouvoir producteur d'aflatoxine B ₁ par <i>A. flavus</i> E73	85
III.6. Activité antifongique et anti -aflatoxine B ₁	86
III.6.1. Activité antifongique des huiles essentielles	86
III.6.1.1. Effet des huiles essentielles de <i>C. sinensis</i> et <i>C. limon</i> sur la croissance d' <i>A. flavus</i> E73	86
III.6.1.2. Effet des huiles essentielles de <i>C. cyminum</i> et <i>C. sativum</i> sur la croissance d' <i>A. flavus</i> E73	89
III.6.1.3. Effet des huiles essentielles de <i>L. nobilis</i> et <i>T. capitatus</i> sur la croissance d' <i>A. flavus</i> E73	91
III.6.1.4. Concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration fongicide minimale (CMF) des huiles essentielles	95
III.6.2. Activité antiaflatoxine B ₁ des huiles essentielles	97
III.6.2.1. Effet des huiles essentielles sur la biomasse mycélienne	99
III. 6.2.2. Effet des huiles essentielles sur la production d'aflatoxine B ₁	100
III. 6.3. Fungitoxicités des huiles essentielles	104
III. 7. Activité antioxydante des huiles essentielles	108
III. 7.1. Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode du DPPH	108

III.7.2. Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode du β -carotène/acide linoléique	111
III.8. Relation entre l'activité antioxydante et la production d'aflatoxine B ₁	112
III. 9. Phytotoxicité des huiles essentielles	113
III.9.1. Effet sur la germination	113
III. 9.2. Effet sur la longueur de la radicule et de la tige	114
III. 10. Essai <i>in vivo</i> : Fumigation des huiles essentielles sur des aliments (blé)	116
Conclusion et Perspectives	120
Références bibliographiques	
Annexes	

Figure 1: Voies de biosynthèse des mycotoxines: NRPS, non-ribosomal peptide synthétase; PKS, polycétide synthase; TC, terpènes cyclase; DMAST, diméthyl allyl transférase.....	4
Figure 2: Structure typique d'un <i>Aspergillus</i> bisérié (à gauche) et unisérié (à droite).....	13
Figure 3: <i>A. flavus</i>	14
Figure 4: Structures chimiques des AFB ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , M ₁ et M ₂	15
Figure 5: Métabolisme des xénobiotiques	17
Figure 6: Bioconversion de l'AFB ₁ exo-8,9-époxyde.....	20
Figure 7: Montage d'hydrodistillation.....	26
Figure 8: Montage d'entraînement à la vapeur d'eau.....	27
Figure 9: Montage d'hydrodiffusion.	27
Figure 10: Montage d'extraction assistée par micro-ondes.....	28
Figure 11: Montage d'extraction au CO ₂ supercritique.	29
Figure 12: Montage de distillation Turbo.....	30
Figure 13: Montage d'extraction assistée par ultrasons.....	30
Figure 14: Montage d'enfleurage.....	31
Figure 15: <i>Citrus limon</i> L.....	40
Figure 16: <i>Citrus sinensis</i> L.....	41
Figure 17: <i>Cuminum cyminum</i> L.....	42
Figure 18: <i>Coriandrum sativum</i> L.....	43
Figure 19: <i>Laurus nobilis</i> L.....	44
Figure 20: <i>Thymus capitatus</i> L.....	46
Figure 21: Montage d'hydrodistillation.....	48
Figure 22: Schéma du test de l'activité antifongique des HEs sur <i>A. flavus</i>	56
Figure 23: Réaction d'un donneur d'hydrogène (antioxydant) avec le radical DPPH.....	60
Figure 24: Mesure de la longueur de la racicule et de la tige d'une plantule traitée par HE.....	64
Figure 25: Etapes de dénombrement d'isolats d' <i>A. flavus</i> par étalement en surface.....	65
Figure 26: Aspect macroscopique et microscopique d' <i>A. flavus</i> E73.....	83
Figure 27: Aspect macroscopique d' <i>A. flavus</i> E 73 par la méthode de «pique centrale».....	84
Figure 28: Mise en évidence par fluorescence sous lumière U.V. (365 nm) de la production d'AFB ₁ par d' <i>A. flavus</i> E73 sur milieu à base d'extrait de noix coco.....	85
Figure 29: CCM sous UV 365 nm montrant les taches bleues d'AFB ₁ produite par <i>A. flavus</i>	

E73 sur milieu SMKY et CAM.	85
Figure 30: Effet de l'HE de <i>C. limon</i> et <i>C. sinensis</i> aux différentes concentrations sur la croissance de l' <i>A. flavus</i> E73 pendant 7 jours d'incubation.....	87
Figure 31: Les pourcentages d'inhibition de la croissance du mycélium de l' <i>A. flavus</i> après 7 jours d'incubation (<i>C. limon</i> et <i>C. sinensis</i>).....	87
Figure 32: Effet de l'HE de <i>C. cyminum</i> et <i>C. sativum</i> aux différentes concentrations sur la croissance de l' <i>A. flavus</i> E73 pendant 7 jours d'incubation.....	90
Figure 33: Les pourcentages d'inhibition de la croissance du mycélium de l' <i>A. flavus</i> après 7 jours d'incubation (<i>C. cyminum</i> et <i>C. sativum</i>).....	90
Figure 34: Effet de l'HE de <i>L. nobilis</i> et <i>T. capitatus</i> aux différentes concentrations sur la croissance de l' <i>A. flavus</i> E73 pendant 7 jours d'incubation.....	92
Figure 35: Les pourcentages d'inhibition de la croissance du mycélium de l' <i>A. flavus</i> après 7 jours d'incubation (<i>L. nobilis</i> et <i>T. capitatus</i>).....	92
Figure 36: Effet des HEs sur la biomasse mycélienne de l' <i>A. flavus</i> E73.....	100
Figure 37: Effet des HEs sur la production d'AFB ₁	102

Tableau I: Moisissures et mycotoxines retrouvées dans certains aliments.....	6
Tableau II: Effets identifiés ou suspectés des principales mycotoxines et mécanismes d'action cellulaires et moléculaires identifiés expérimentalement.....	10
Tableau III: Principales réglementations européennes concernant les teneurs limites en mycotoxines dans l'alimentation humaine et animale.....	12
Tableau IV: Différent types de structures rencontrées dans les HEs.....	25
Tableau V: Effets antifongiques des HEs.....	34
Tableau VI: Effet inhibiteur de quelques HEs sur la croissance d' <i>A. flavus</i> et la production d'AFB ₁	36
Tableau VII: Effet antifongique <i>in vivo</i> de certaines HEs	37
Tableau VIII : Présentation des espèces étudiées.....	47
Tableau IX: Conditions opératoires des analyses CG/SM.....	51
Tableau X: Sites de collecte et principales caractéristiques écologiques des deux variétés de blé.....	62
Tableau XI : Variation des rendements d'extractions par hydrodistillation des HEs....	68
Tableau XII : Caractéristiques organoleptiques des HEs étudiées.....	69
Tableau XIII. Caractéristiques physico-chimique des HEs étudiées.....	71
Tableau XIV: Composés chimiques des HEs de <i>C. sinensis</i> et <i>C. limon</i>	72
Tableau XV : Composés chimiques des HEs de <i>C. cyminum</i> et <i>C. sativum</i>	76
Tableau XVI : Composés chimiques des HEs de <i>L. nobilis</i> et <i>T. capitatus</i>	80
Tableau XVII : Identification d' <i>A. flavus</i> E73.....	84
Tableau XVIII : Concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration fongicide minimale (CMF) des HEs.....	95
Tableau XIX : Effet des HEs sur la biomasse et la production de l'AFB ₁	98
Tableau XX : Spectre fongitoxique des HEs de <i>C. sinensis</i> et <i>C. limon</i>	105
Tableau XXI : Spectre fongitoxique des HEs de <i>C. cyminum</i> et <i>C. sativum</i>	105
Tableau XXII : Spectre fongitoxique des HEs de <i>L. nobilis</i> et <i>T. capitatus</i>	106
Tableau XXIII : Résultats de l'activité antioxydante	109
Tableau XXIV : Effet des HEs sur la germination et la croissance des grains de blé...	116
Tableau XXV : Protection des grains (%) de blés traités avec les HEs après 6 mois de stockage.....	117

Le problème alimentaire est le plus urgent, le plus permanent et le plus contraignant que toutes les sociétés ont à résoudre. Le stockage et ses modalités, sont un élément déterminant des stratégies possibles, et l'un de ceux sur lesquels le milieu physique fait peser les contraintes les plus lourdes.

Les moisissures sont des micro-organismes ubiquitaires avec une grande capacité à coloniser différents types de substrats et de proliférer sous conditions environnementales extrêmes (Nguefack *et al.*, 2009). Ils altèrent divers types d'aliments à savoir les céréales, les légumineuses, les épices, les légumes, les fruits, etc. et produisent également des mycotoxines. Parmi toutes les mycotoxines, l'aflatoxine B₁ (AFB₁) produit par *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* est la forme la plus toxique (hépatotoxique, tératogène et mutagène) pour les mammifères (Frisvad *et al.*, 2005, Prakash *et al.*, 2010; Prakash *et al.*, 2011; Reddy *et al.*, 2011). Elle a été classée comme cancérigène humain de catégorie 1 par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer. Elle est thermostable, résistante aux procédés de cuisson et de stérilisation. Il est également stable au cours d'un stockage prolongé, et les produits contaminés conservent leurs contaminations intactes pendant plusieurs années (Rubert *et al.*, 2012). La lutte chimique demeure la principale mesure pour réduire l'incidence des contaminations post-récoltes des denrées alimentaires. En effet, les produits antimicrobiens appartenant aux groupes des benzimidazoles, les hydrocarbures aromatiques et des inhibiteurs de la biosynthèse des stérols sont souvent utilisés pour les traitements post-récoltes (Amiri *et al.*, 2008). Cependant, l'application à des concentrations élevées de ces produits chimiques synthétiques dans une perspective de contrôle post-récolte des denrées alimentaires augmenterait le risque de 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 une réalité (Prakash *et al.*, 2012). De même, la restriction imposée par l'industrie alimentaire et les organismes de réglementation sur l'utilisation de certains additifs alimentaires synthétiques ont conduit à un regain d'intérêt dans la recherche d'alternatives, comme des composés antimicrobiens naturels, en particulier ceux d'origine végétale (Hammer *et al.*, 1999). Les huiles essentielles (HEs) possèdent d'importantes activités dont celle antimicrobienne est la plus étudiée (Hammer *et al.*, 2003; Yehouenou *et al.*, 2010; Djenane, 2015; Djenane *et al.*, 2018, 2019). L'utilisation des HEs, en tant qu'agents antimicrobiens présente deux avantages principaux: le premier est leur origine naturelle qui signifie plus de sécurité pour le consommateur et

l'environnement et la seconde est qu'elles ont été considérées à faible risque de développement de la résistance par des microorganismes pathogènes (Tatsadjieu *et al.*, 2010). Plusieurs études ont révélé que les HEs pourraient constituer donc, une source intéressante d'antifongiques alternatifs (Souza *et al.*, 2005; Deabes *et al.*, 2011; Mishra *et al.*, 2012 ; da Cruz Cabral *et al.*, 2013; Kedia *et al.*, 2014; Stevic *et al.*, 2014).

C'est dans cette optique que se situent nos objectifs principaux et, qui se résument dans les volets suivants:

- Extraction et caractérisation des HEs de six plantes locales (*Citrus limon* L., *Citrus sinensis* L., *Cuminum cyminum* L., *Coriandrum sativum* L., *Laurus nobilis* L., et *Thymus capitatus* L.).
- Tester leur activité antifongique contre la souche aflatoxinogène *Aspergillus flavus* E73.
- Caractériser leur potentiel anti-aflatoxinogène.
- Tester leur fungitoxicité sur des moisissures.
- Evaluer leur activité antioxydante.
- Tester leur phytotoxicité.
- Et enfin, étudier *in vivo* leur effet biologique sous forme de vapeurs appliquées sur les semences de blé.

I.1. Généralités sur les moisissures et les mycotoxines

I.2. Moisissures

Le terme de «moisissure» n'a pas réellement de signification systématique; il est communément utilisé pour désigner des champignons microscopiques filamenteux qui ont de l'importance dans les différentes industries humaine et dans l'environnement, de façon bénéfique ou néfaste (Leyral et Vierling, 2001). Les moisissures sont constituées par des filaments ramifiés, les hyphes, dont l'ensemble est connu sous le nom de mycélium. Elles sont classées dans le règne des champignons. Au sein de ce règne et, selon certains auteurs, il existe entre 65 000 à 100 000 espèces différentes, les moisissures constituent un ensemble hétérogène d'environ 20 000 espèces (Pinton, 2012). Les moisissures ne correspondent pas à un groupe systématique homogène, mais se situent en diverses familles de champignons microscopiques. Leur classification, tout comme celle des autres champignons, est d'abord basée sur le mode de reproduction sexuée. Ce critère définit quatre des cinq classes des mycètes, soit les *Chytridiomycètes*, les *Zygomycètes*, les *Basidiomycètes*, les *Ascomycètes*, les *Deutéromycètes* et les *Chytridiomycètes*. Ces organismes sont alors classés d'après le mode de production des spores asexuées ou conidies. En outre, lorsque la reproduction sexuée n'est pas connue, la subdivision est appelée *Fungi imperfecti* (Leveau et Bouix, 1993; Heritage *et al.*, 1996).

Les moisissures produisent de grandes variétés de métabolites secondaires. Certains d'entre eux sont très utiles à l'Homme et présentent un intérêt considérable dans les différents domaines (agriculture, biotechnologie, environnement, santé, industrie agroalimentaire, etc.). A côté de ces intérêts bénéfiques, elles sont capables de provoquer également d'importantes détériorations, notamment dans le domaine agronomique (Nguyen, 2007). Cependant, l'impact le plus négatif de l'altération des denrées alimentaires est sans doute celui lié à la synthèse de substances toxiques: les mycotoxines.

I.3. Mycotoxines

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires qui ne sont pas essentiels au développement de la moisissure contrairement aux métabolites primaires tels que les acides nucléiques, les protéines ou les acides gras (A.F.S.S, 2009). Plus de 300 métabolites secondaires ont été identifiés seulement environ une trentaine possèdent de réelles propriétés toxiques avérées (Fremy et Thomann, 2009). Ces toxines se retrouvent à l'état de

contaminants naturels de nombreuses denrées d'origine végétale : notamment les céréales mais aussi les fruits, noix, amandes, grains, fourrages, ainsi que les aliments manufacturés ou composés destinés à l'alimentation humaine et animale (Galtier *et al.*, 2006).

Les mycotoxines sont secrétées par des moisissures appartenant notamment aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* et *Claviceps* (Marin *et al.*, 2013). Parmi les groupes de mycotoxines considérées comme importantes du point de vue sanitaire en agroalimentaire, les aflatoxines (AFs), l'ochratoxine A (OTA), la patuline (PAT), les fumonisines (FUM, surtout FB₁), la zéaralénone (ZEN), les trichothécènes (HT-2, Toxin-T2 et deoxynivalénol DON) (Galtier *et al.*, 2006; Paterson, 2006).

Contrairement aux toxines bactériennes, les mycotoxines ne sont pas des protéines et ne sont pas directement codées par des gènes. Elles sont les produits terminaux de voies de biosynthèses longues et complexes constituées de séries de réactions enzymatiques successives. L'origine chimique des mycotoxines est très variée. Certaines dérivent des acides aminés (alcaloïdes de l'ergot, acide aspergillique, gliotoxine, roquefortine). D'autres dérivent des polycétoacides (aflatoxines, ochratoxine, patuline, citrinine, zéaralénone). D'autres sont des dérivés terpéniques (diacétoxyscirpénol, fusarénone, déoxynivalénol, toxine T2, verrucarine) (Pinton, 2012). Les principales voies connues de biosynthèse des mycotoxines sont présentées dans la **Figure 1**.

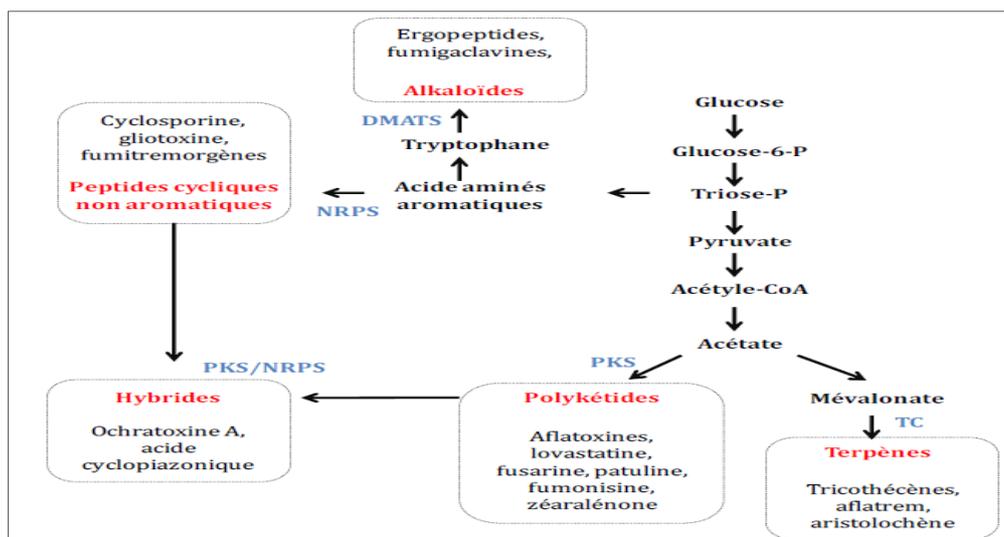


Figure 1. Voies de biosynthèse des mycotoxines: NRPS, non-ribosomal peptide synthétase ; PKS, polykétide synthase; TC, terpènes cyclase ; DMAST, diméthyl allyl transférase (El Khoury, 2016).

I.3.1. Les mycotoxine en alimentation humaine et animale

La production des mycotoxines pourrait avoir lieu dans les champs avant, au moment ou bien après récolte (post-récolte) et pendant le stockage. Les espèces du genre *Fusarium* (*F. moniliforme*, *F. roseus*, *F. tricinctum* et *F. nivale*) constituent les principales moisissures productrices de toxines avant la récolte (Jouany *et al.*, 2009). Tandis que les espèces des genres *Aspergillus* et *Penicillium* telles que *A. flavus* et *A. parasiticus* sont des contaminants des denrées stockées. Alors que les espèces d'*A. clavatus* et d'*A. fumigatus* sont deux espèces qui n'attaquent que les graines déjà endommagées à forte humidité.

Une fois produites, les mycotoxines peuvent être retrouvées dans toutes les parties de la colonie fongique: les hyphes, le mycélium, les spores mais aussi dans le substrat sur lequel le développement a eu lieu (Bhat *et al.*, 2010). L'exposition aux mycotoxines se fait essentiellement par voie orale suite à l'ingestion de denrées contaminées mais elle peut également avoir lieu par inhalation voire par contact (Jarvis et Miller, 2005; Klich, 2009; Zain, 2011).

Il convient également de souligner que, dans la majorité des cas, les humains et les animaux sont exposés à plusieurs mycotoxines. Ce constat est lié à trois raisons principales: une mycotoxine peut être produite par plusieurs espèces fongiques différentes, inversement, une même espèce est parfois capable de produire simultanément plusieurs mycotoxines. L'aliment du bétail est généralement constitué de plusieurs parties préparées à partir de plusieurs matières premières, chacune pouvant être une source d'une toxine différente (Alassane-Kpembé *et al.*, 2016).

Les mycotoxines peuvent contaminer de nombreux produits alimentaires comme les céréales (maïs, blé, riz, orge, etc.), les graines oléagineuses (arachides, coton), les fruits secs (pistaches, noix, figes séchées, etc.), les épices, etc (Marin *et al.*, 2013). Le **Tableau I** regroupe les mycotoxines moisissures, mycotoxines et les denrées les plus souvent contaminées.

Tableau I. Moisissures et mycotoxines retrouvées dans certains aliments (Tozlovanu, 2008).

Champignons	Mycotoxines	Denrées
<i>Aspergillus</i>	Aflatoxines Ochratoxines A	Maïs, cacahuète, graine de coton, riz, tissus d'animaux (jambon, lard, saucisse), lait et dérivés
<i>Fusarium</i>	Zéaralénone, Fumonisines, Trichothécènes	Blé, maïs, orge, riz, seigle, avoine
<i>Penicillium</i>	Patuline, Ochratoxine A, Citrinine	Fruits et jus de fruits, blé, riz, fromage, noix
<i>Alternaria</i>	Alternariol	Fruits, légumes et produits dérivés de pommes et tomates
<i>Claviceps</i>	Alcaloïdes de l'ergot	Blé et dérivés, seigle

I.3.2. Les facteurs influençant la production des mycotoxines

La production de mycotoxines est directement liée à la croissance fongique. Par conséquent, les facteurs capables d'influencer cette croissance vont aussi jouer un rôle sur la toxinogénèse. D'une manière générale, la sécrétion par les moisissures de métabolites toxiques dans les aliments dépend de plusieurs facteurs qui peuvent être intrinsèques (nature de la souche) ou bien extrinsèques (conditions environnementales).

I.3.2.1. Facteurs intrinsèques

Concernant la nature de la souche, certaines moisissures sont toxinogènes mais d'autres ne le sont pas (Le Bars, 1988). De plus au sein d'une même espèce toxinogène, certaines souches sont fortement productrices de toxines alors que d'autres le sont mais à des degrés moindres. La toxinogénèse d'une moisissure peut dépendre du stade de développement de la souche productrice.

I.3.2.2. Facteurs extrinsèques

Les facteurs de l'environnement qui favorisent le développement de la toxinogénèse sont nombreux à savoir la teneur en eau, l'humidité relative, le pH, la température, la composition du substrat en éléments nutritifs et sa richesse en graisses ou en azote et la compétition entre les différents micro-organismes.

a. Nature du substrat

Les moisissures sont des organismes hétérotrophes, se développant exclusivement sur des substrats organiques contenus dans les produits alimentaires de base (oléagineux, céréales, produits laitiers etc.). Les glucides sont les sources de carbone les plus utilisées par les moisissures. La présence de quelques substances dans les aliments stimule la croissance des moisissures et la production des mycotoxines comme le saccharose et les acides aminés. La contamination d'une denrée alimentaire par les moisissures dépend de la nature du substrat en particulier de la nature des glucides disponibles.

b. Activité de l'eau (a_w)

L'activité de l'eau reflète la quantité d'eau disponible dans une substance liquide ou solide. Elle permet de rendre compte de la quantité d'eau « libre », indispensable aux réactions biochimiques d'un micro-organisme. L' a_w permet de donner des informations importantes sur la stabilité physico-chimique d'un produit et sur son innocuité microbiologique. La valeur de l'activité de l'eau s'établit de 0 à 1. Plus l' a_w est élevée, plus la quantité d'eau disponible pour la croissance d'un micro-organisme est importante.

Selon Troller (1980), l' a_w joue un rôle primordial sur la croissance des moisissures en particulier sur la germination des spores et la croissance du mycélium. L'exigence et la tolérance des moisissures vis à vis de l'eau sont variables d'une souche à l'autre. Les moisissures sont classées en trois groupes :

- Les espèces hygrophiles dont les spores germent à plus de 90% et leur croissance optimale se situe à 100 % d'humidité relative (*Mucor* sp.).
- Les espèces mésophiles dont les spores germent entre 80 et 90% et leur croissance optimale se situe entre 95 et 100% d'humidité relative (*Alternaria* sp., *Penicillium* sp.).
- Les espèces xérophiles dont les spores germent à moins de 80% et leur croissance optimale se situe entre 95 et 100% d'humidité relative (*Aspergillus* sp. *Penicillium* sp.).

c. Température

La température joue un rôle prépondérant sur la croissance et la physiologie des moisissures et en outre sur la compétition entre les espèces. La plupart des champignons sont

mésophiles avec des optima de croissance variant de 25 °C à 35°C. Pour d'autres, elles sont psychrophiles ou psychrotolérantes (Botton *et al.*, 1990).

La température permettant une toxigénèse optimale est en général voisine de la température optimale de croissance (Pfohl-Leszkowicz, 1999). Par ailleurs, les mycotoxines peuvent être élaborées à des températures généralement inférieures à celle de la croissance (Samson *et al.*, 2004). En ce qui concerne les *Aspergillus* de la section *Nigri*, de façon générale, la production d'OTA se fait dans un très large intervalle de température (Esteben *et al.*, 2006).

d. pH du milieu

Le pH du milieu est un facteur important dans la croissance des moisissures et la production des mycotoxines. Les moisissures peuvent croître dans une gamme de pH allant de 3 à 8, leur pH optimal de croissance étant plutôt situé entre 5 et 6. Les aliments (en particulier les fruits et les légumes) ayant un pH inférieur à 6, se trouvent être des cibles privilégiées de l'infestation fongique.

e. Composition gazeuse

La plupart des moisissures sont aérobies. L'augmentation de la teneur en CO₂ (20%), surtout si elle est associée à une réduction en oxygène, provoque une chute importante de la production d'aflatoxines (Le Bars, 1988). Après conservation dans une atmosphère confinée, dans laquelle les moisissures peuvent plus ou moins se développer, la remise à l'air libre ou la ventilation provoque rapidement une intense toxinogénèse.

I.3.2.3. Facteurs divers

La contamination d'arachide, de coton, de maïs par *A. flavus* ou par les aflatoxines avant la récolte est souvent liée à l'attaque par les insectes. Durant le stockage, les échantillons de grains hébergeant des charançons révèlent en général une population fongique importante et parfois même en mycotoxines. Des micro-organismes dits « de concurrence » peuvent affecter la production de mycotoxines sur les produits agricoles. Ils peuvent augmenter ou gêner la formation des mycotoxines en changeant les conditions environnementales les rendant défavorables pour la production de mycotoxines ou en produisant des composés inhibiteurs (Lacey, 1986). Les interactions avec d'autres

microorganismes peuvent également être différentes dans les différentes conditions environnementales (Marin *et al.*, 1998; Cairns *et al.*, 2003).

Plusieurs facteurs additionnels peuvent influencer la production des mycotoxines dans le champ. Il peut s'agir des pratiques agricoles comme le labourage et la rotation de récolte (Lipps et Depp, 1991), les fongicides utilisés (Moss et Frank, 1985), la variété de la plante (Golinski *et al.*, 1996) et les différences géographiques (Langseth *et al.*, 1995).

I.3.3. Effets des mycotoxines sur la santé

L'ingestion d'aliments contaminés par les mycotoxines est la principale source de contamination de l'homme et des animaux bien que la voie respiratoire ou cutanée soit également rencontrée (Peraica *et al.*, 1999).

Au sein d'une même espèce animale, la susceptibilité aux mycotoxines peut fortement varier d'un individu à l'autre en fonction de la race, de l'état physiologique ou du stress auquel il est soumis (Sinha et Bhatnagar, 1998). De même, les différentes mycotoxines induisent des effets différents : certaines exerçant un pouvoir hépatotoxique voire cancérogène, d'autres se révélant oestrogéniques, immunotoxiques, néphrotoxiques ou neurotoxiques (Liu et Wu, 2010). Contrairement aux toxines bactériennes dont les effets sont immédiats (souvent entre 12 et 36 h après ingestion des aliments contaminés), les mycotoxines ont des effets insidieux, qui se manifestent à plus ou moins long terme (quelques mois à quelques années). Le **Tableau II** résume les effets et les mécanismes d'action des principales mycotoxines.

Tableau II. Effets identifiés ou suspectés des principales mycotoxines et mécanismes d'action cellulaires et moléculaires identifiés expérimentalement (A.F.S.S.A, 2009).

Toxine	Effets	Mécanismes d'action cellulaire et moléculaire
Aflatoxines B ₁ + M ₁	Hépatotoxicité. Génotoxicité. Cancérogénicité. Immunomodulation	Formation d'adduit à l'ADN. Péroxydation lipidique. Bioactivation par le cytochrome P450. Conjugaison aux GS-transférases.
Ochratoxine A	Néphrotoxicité. Génotoxicité. Immunomodulation.	Impact sur la synthèse des protéines. Inhibition de la production d'ATP. Détoxification par les peptidases.
Patuline	Neurotoxicité. Mutagenèse <i>in vitro</i> .	Inhibition indirecte d'enzymes.
Trichothécènes (toxine T-2, déoxynivalénol, etc.)	Hématotoxicité. Immunomodulation. Toxicité cutanée.	Induction de l'apoptose sur progéniteur. Tissu hématopoïétique et cellules immunitaires. Impact sur la synthèse des protéines. Altération des immunoglobulines.
Zéaralénone	Fertilité et reproduction.	Liaison aux récepteurs oestrogéniques. Bioactivation par des réductases. Conjugaison aux glucuronyltransférases.
Fumonisine B ₁	Lésion du système nerveux central. Hépatotoxicité. Génotoxicité. Immunomodulation.	Inhibition de la synthèse de céramide. Altération du rapport sphinganine/sphingosine. Altération du cycle cellulaire

I.3.4. Impact économique des mycotoxines

Malgré les nombreuses recherches qui ont été faites sur l'aspect toxicologique et pathologique des mycotoxines chez les populations humaines et animales, sur leur implication directe ou indirecte dans l'apparition de certaines maladies telles les cirrhoses, les cancers ou certaines maladies nutritionnelles comme le kwashiorkor (Hendrickse, 1984) ou la maladie du kashin-Beck au Tibet en Inde (Jiambo *et al.*, 1995), peu de travaux ont été entrepris dans le but d'étudier l'impact financier et économique des mycotoxines sur des populations spécifiques aussi bien dans les pays industrialisés que les pays développés.

Les conséquences économiques engendrées par les mycotoxines sont lourdes. Dans les pays d'Amérique du Nord, la productivité des animaux a connu des pertes énormes estimées à des milliards de dollars par année (Miller, 1998). L'impact financier des mycotoxines concerne non seulement les risques pour la santé de l'homme et les animaux domestiques, mais aussi la dégradation de la qualité des produits agricoles commercialisés tant pour le marché intérieur que pour l'exportation.

I.3.5. Réglementations relatives aux mycotoxines

L'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S) a récemment reconnu que la contamination des produits alimentaires par les mycotoxines constitue une source importante de maladies d'origine alimentaire (O.M.S, 2002). Conscients des effets graves que peuvent avoir ces toxines naturelles, de nombreux pays ont adopté ces dernières années des réglementations relatives aux mycotoxines dans les produits d'alimentation humaine et animale.

Les premières limites pour les mycotoxines ont été fixées à la fin des années 60 pour les aflatoxines et, à la fin de l'année 2003, une centaine de pays avaient élaborés des limites spécifiques pour les mycotoxines dans les aliments et leur nombre continue de progresser (F.A.O, 2004). Le **Tableau III** illustre les Principales réglementations européennes concernant les teneurs limites en mycotoxines dans l'alimentation humaine et animale.

L'établissement de réglementations en matière de mycotoxines est une opération très complexe, dans laquelle de nombreux facteurs entrent en jeu. En effet, plusieurs facteurs, d'ordre scientifique et socioéconomique, peuvent avoir une incidence sur l'établissement de valeurs limites et de réglementations concernant les mycotoxines. Il s'agit des facteurs suivants:

- disponibilité de données toxicologiques;
- disponibilité de données sur la présence de mycotoxines dans divers produits;
- connaissance de la répartition des concentrations de mycotoxines dans un lot;
- disponibilité de méthodes d'analyse;
- législation des pays avec lesquels des contacts commerciaux existent;
- nécessité d'un approvisionnement alimentaire suffisant.

Tableau III. Principales réglementations européennes concernant les teneurs limites en mycotoxines dans l'alimentation humaine et animale (Galtier *et al.*, 2006).

Toxine	Règlement européen	Aliment	Teneurs limites
Alimentation humaine aflatoxine B ₁	CE 466/2001 et CE 257/2002 472/2002	Céréales et dérivés arachides, fruits	4 µg/kg 2 à 15 µg/kg
aflatoxine M ₁	257/2002 472/2002	épices lait	5 à 10 µg/kg 0,05 µg/kg
ochratoxine A	1425/2003	céréales, fruits, vin	5 à 10 µg/kg
patuline	856/2005	pommes et dérivés	10 à 50 µg/kg
déoxynivalénol	856/2005	céréales et dérivés	200 à 1750 µg/kg
fumonisines	856/2005	céréales et dérivés	200 à 2000 µg/kg
zéaralénol	856/2005	céréales et dérivés	20 à 200 µg/kg
toxine T-2	nd	céréales et dérivés	en attente
Alimentation animale aflatoxines ergot de seigle	32/2002	céréales, autres céréales	5 à 50 µg/kg 1000 mg/kg

nd : n'est pas déterminé.

I.4.Genre *Aspergillus*

I.4.1. Définition

Le genre *Aspergillus* regroupe environ 250 espèces (Klich, 2007). Il est caractérisé par une structure particulière (**Figure 2**) ressemblant à l'aspergillum, un instrument utilisé pour asperger l'eau bénite, et qui a inspiré à Micheli, un prêtre catholique, ce nom en 1729 (Klich, 2009).

Les *Aspergillus* spp. sont très répandus dans la nature et tout particulièrement dans le sol où ils contribuent à la biodégradation et le recyclage des matières organiques (Scheidegger et Payne, 2003). Ils sont par ailleurs utilisés dans plusieurs domaines (agriculture, biotechnologie et santé) en exerçant des rôles bénéfiques comme la production de métabolites utiles (enzymes, protéines et acides).

Etant donné son importance économique extrême liée à ses effets utiles et nuisibles, plusieurs ouvrages ont été consacrés au genre *Aspergillus* en général et à sa taxonomie et sa phylogénie en particulier (Samson et Pitt, 2000; Varga *et al.*, 2003; Frisvad et Samson, 2004; Samson *et al.*, 2006).

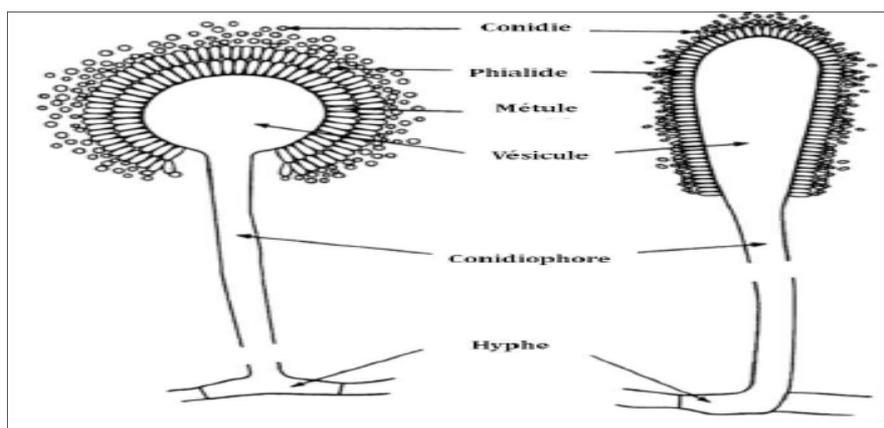


Figure 2. Structure typique d'un *Aspergillus* bisérié (à gauche) et unisérié (à droite) (El Khoury, 2016).

I.4.2. *Aspergillus flavus*

A. flavus, moisissure de couleur vert jaune à vert olive, caractérisée par des têtes conidiennes, unisériées ou bisériées, d'abord radiées, puis réparties en plusieurs colonnes de spores mal individualisées, jaunâtres au début, puis vert-jaune foncé. Les conidiophores hyalins, verruqueux, atteignent 1 à 2,5 mm de long. La vésicule est globuleuse ou subglobuleuse (10 à 65 μm de diamètre). Les têtes sont radiées et majoritairement bisériées (2 rangées de stérigmates). Les conidies sont lisses ou légèrement rugueuses (Hedayati, 2007; Samson, 2010) (**Figure 3**). C'est une espèce à prédominance tropicale et subtropicale, peut coloniser de nombreux substrats, fréquemment rencontrée dans le sol, les produits végétaux en décomposition, les fourrages, les grains et semences en stockage, les aliments pour animaux, les dérivés de céréales,...etc (Horn et Dorner, 1998). *A. flavus* présente également un important pouvoir pathogène. Il attaque principalement les voies respiratoires de l'homme et des animaux. C'est l'un des principaux responsable des aspergilloses bronchiques allergiques. Il élabore divers métabolites toxiques, mais surtout des aflatoxines, notamment l'aflatoxine B₁ (AFB₁) qui est l'un des plus puissants hépato-carcinogènes connus à l'heure actuelle. L'aflatoxinogénèse peut avoir lieu de 12 °C à 42 °C, avec un optimum situé entre 25 °C et 30 °C.

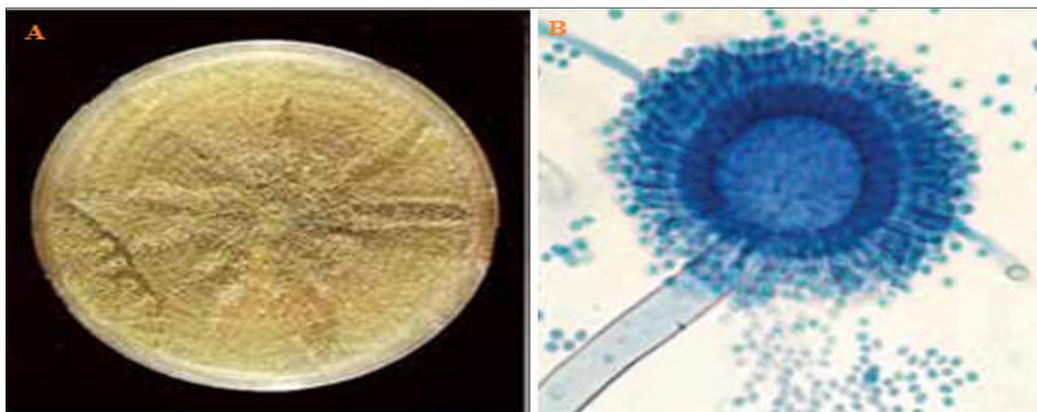


Figure 3. *A. flavus* (A: Culture de 7 jours sur gélose au malt à 25°C ; B: Aspect microscopique) (Tabuc, 2007).

I.5. Aflatoxines

I.5.1. Origine et structure

Parmi les métabolites secondaires des champignons, une place particulière est occupée par les aflatoxines, responsables de toxicités aiguës ou chroniques chez de très nombreux animaux.

C'est en 1960 que survient, en Grande Bretagne, une catastrophe sans précédent dans les annales de l'agriculture : en une saison, plus de 100 000 dindons à l'engraissement meurent de lésions hépatiques graves. D'autres accidents présentant des manifestations pathologiques identiques sont signalés à la même époque en Angleterre parmi les animaux de laboratoire, les dindonneaux, les canetons, les faisandeaux, les porcs et le gros bétail. D'étiologie inconnue, cette intoxication est dénommée « Turkey X disease ». Un lien existe cependant entre tous les cas signalés, une farine à base de tourteaux d'arachides et importée du Brésil, intervient dans l'alimentation de tous ces animaux. Les farines à haute toxicité se révélèrent être contaminées par des moisissures, *A. flavus* responsables de la production de la toxine dénommée « aflatoxine » (Abdellah, 2004; Nguyen, 2007).

Les aflatoxines sont des métabolites secondaires d'origine fongique produits par deux souches d'*Aspergillus*. *A. flavus* synthétise les aflatoxines B₁ (AFB₁) et B₂ (AFB₂) tandis que *A. parasiticus* excrète, en plus, les aflatoxines G₁ (AFG₁) et G₂ (AFG₂) (Ruppel *et al.*, 2004 ; (Maraqa *et al.*, 2007). Une troisième souche appelée *A. nomius*, rare mais proche de *A. flavus* est capable de produire des aflatoxines (Bhatnagar et Garcia, 2001 ; Varga *et al.*, 2015). Les

dérivés des AFB₁ et B₂ sont communément appelés aflatoxine M₁ (AFM₁) et M₂ (AFM₂). *A. flavus* est le principal agent de contamination du maïs et des graines de coton, tandis qu'*A. parasiticus* est présent surtout dans les graines d'arachide (Rojas *et al.*, 2005; Saleemullah *et al.*, 2006).

Les aflatoxines regroupent 18 composés structurellement proches, caractérisées au niveau chimique par des structures de coumarines bifuraniques auxquelles sont accolées des pentanones (AFB) ou des lactones hexatomiques (AFG). Toutes les aflatoxines se rattachent à l'un de ces deux types de structures (AFB, AFG) et ne diffèrent entre elles que par la position de divers radicaux sur le noyau (Firmin, 2011). Les structures chimiques de ces différents composés sont représentées dans la **Figure 4**.

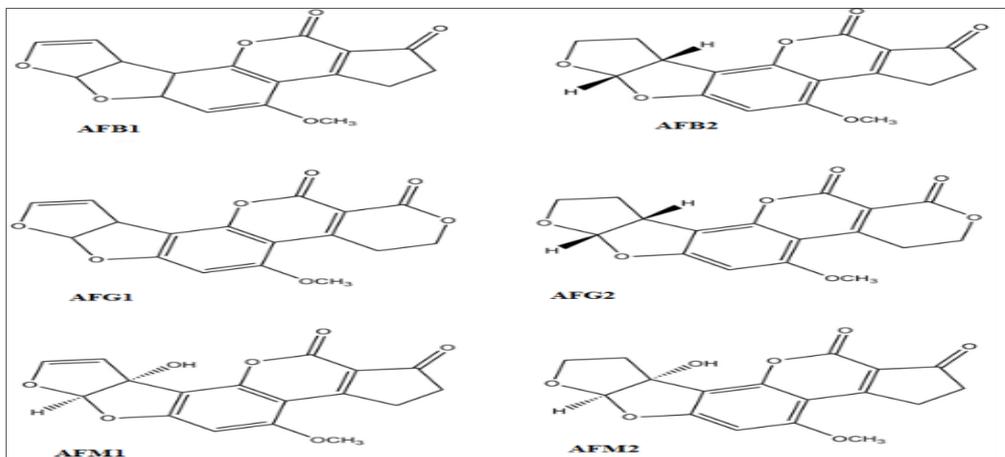


Figure 4. Structures chimiques des AFB₁, B₂, G₁, G₂, M₁ et M₂ (Santini et Ritieni, 2013).

I.5.2. Propriétés physico-chimiques

Les aflatoxines sont des composés organiques de nature non protéique, de faible poids moléculaire (312 à 330 g/mol), se présentent sous forme de cristaux à point de fusion élevé (240 °C-289 °C), elles sont très peu solubles dans l'eau (10-20 mg/litre), insolubles dans les solvants non polaires et très solubles dans les solvants organiques moyennement polaires (chloroforme et l'alcool méthylique), tout particulièrement le diméthyl-sulfoxyde. En milieu alcalin (pH > 10), elles sont solubilisées avec ouverture de l'un des noyaux lactoniques. L'hydrolyse prolongée dans l'eau bouillante, peut également provoquer l'ouverture de noyau lactonique avec, dans certaines conditions, formation de dérivés non toxiques. Toutes les aflatoxines sont lévogyres. La fluorescence intense des aflatoxines, une fois exposées à des

longueurs d'ondes ($\lambda = 365 \text{ nm}$) de la lumière ultra-violette (U.V.), a pour avantage de détecter ces composés à des niveaux extrêmement bas (de l'ordre du nanogramme). L'aflatoxine de type B (AFB = AF « blue ») donne une fluorescence bleue et celle de type G (AFG = AF « Green »), donne une fluorescence verte. L'aflatoxine M₁ donne une fluorescence bleu-mauve (A.F.S.S.A, 2009). Cette fluorescence fournit la base pour pratiquement toutes les méthodes physico-chimiques de leur détection et leur quantification.

I.5.3. Contamination en aflatoxines des denrées alimentaires

La présence des aflatoxines dans l'alimentation humaine et animale est le résultat d'une contamination par des espèces fongiques aflatoxinogènes. Le taux et le degré de contamination dépendent étroitement de la température, de l'humidité et des conditions de stockage. Les aflatoxines sont couramment rencontrées sur les cultures dans les champs avant la récolte dans les pays chauds et humides. La contamination après la récolte et/ou pendant le stockage est également possible lorsque le séchage des cultures est retardé. L'AFB₁ contamine les arachides, les pistaches, les amandes, mais aussi les graines de coton (Klich, 2007), ainsi que certaines céréales (maïs, blé, sorgho) et leurs produits dérivés. L'AFB₁ peut également être retrouvée dans les épices (EL Mahgubi *et al.*, 2013), les fruits secs (Juan *et al.*, 2008). Des traces d'AFB₁ peuvent être détectées dans les produits animaux (Bailly et Guerre, 2009; Herzallah, 2009; Hymery *et al.*, 2014). Des quantités plus importantes peuvent être détectées dans la viande et les œufs qui semblent être plus sensibles à une contamination par l'AFB₁ (Herzallah, 2013). De plus, des quantités d'AFM₁ peuvent aussi être transférées aux nourrisson par le lait des mères consommant des aliments contaminés par l'AFB₁ (Nemati *et al.*, 2010; Elzupir *et al.*, 2012).

Les conditions les plus favorables pour le développement d'*A. flavus* et la production d'aflatoxines dépendent essentiellement la nature de la flore fongique et ses particularités physiologiques, la nature et la composition du substrat (type et a_w), les conditions climatiques (latitude, température, humidité) et environnementales (autres microorganismes, inhibiteurs chimiques, présence de lésions sur le substrat, etc.) (Bhat *et al.*, 2010).

I.5.4. Métabolisme de l'aflatoxine B₁ dans l'organisme

En général, le métabolisme corporel des xénobiotiques dont font partie les mycotoxines subissent une biotransformation hépatique ou tissulaire conduisant à des

métabolites hydrophiles plus facilement excrétables (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1999). Les enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX) sont responsables de ces réactions. Ce processus se déroule en deux phases connues sous le nom de phase I et Phase II (Josephy *et al.*, 2005). La **Figure 5** présente les différentes phases du métabolisme des xénobiotiques dans un hépatocyte.

Les xénobiotiques pénètrent facilement dans la cellule s'ils sont hydrophobes, mais ils peuvent également en être expulsés *via* des pompes telles que la PgP (Pglycoprotéine), produit du gène *mdr* (multi drug resistance). Les xénobiotiques sont en charge par des enzymes de phase I, dits de fonctionnalisation, dont les plus importants sont les cytochromes P450 (CYP). Ces enzymes catalysent le plus souvent des réactions de monooxygénation qui permettent de rendre le xénobiotique plus polaire en créant dans sa structure un groupement chimique -OH, -NH₂, -COOH. Cette phase est dite « de fonctionnalisation ». Les enzymes de phase II conjuguent les xénobiotiques, fonctionnalisés ou non, avec un groupement (glutathion, acide glucuronique, méthyl, acétyl...), dont le rôle est soit de neutraliser un groupement réactif (thiol, amine, aldéhyde), soit de rendre le xénobiotique hydrophile afin de faciliter son élimination par l'organisme. Cette phase est dite « de conjugaison » (Beaune et Lorient, 2000). Enfin, si le métabolite obtenu est très hydrophile, il devra être transporté à travers la membrane cellulaire par des protéines de phase III, telles que le transporteur *mrp* (*multidrug related protein*). Cependant, cette phase n'implique aucune modification de la structure des xénobiotiques et donc il ne peut pas être qualifié de métabolisme (Diaz, 2000).

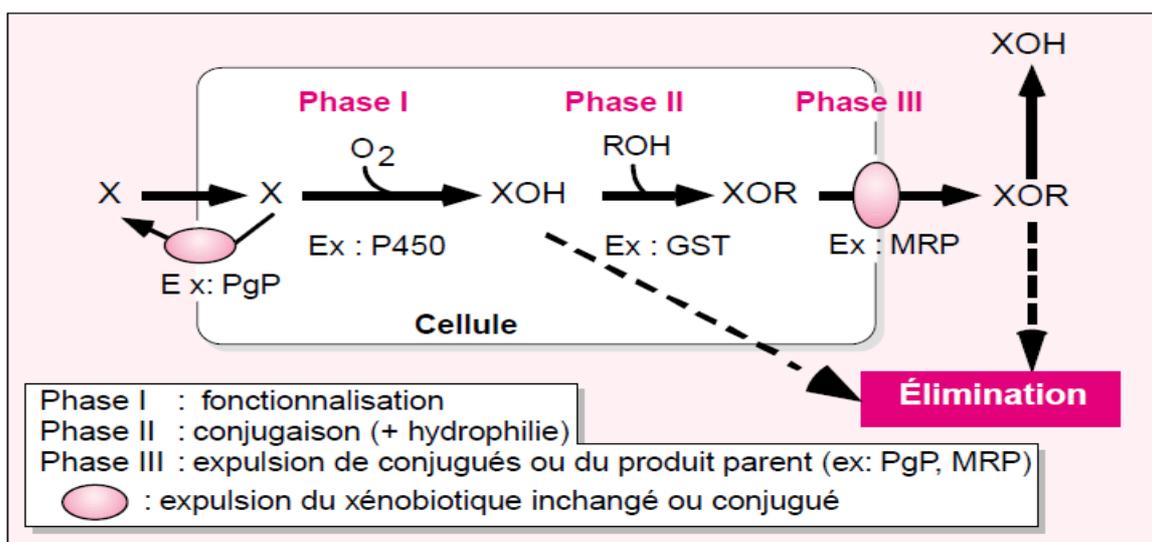


Figure 5. Métabolisme des xénobiotiques (Beaune et Lorient, 2000).

Les aflatoxines sont des composés hautement liposolubles et sont facilement absorbées par le site d'exposition. Généralement par le tractus gastro-intestinal et les voies respiratoires (Larsson et Tjalve, 2000; Agag, 2004).

Après l'entrée dans le corps, les aflatoxines sont absorbées à travers les membranes cellulaires où ils atteignent la circulation sanguine. Elles sont distribuées dans le sang aux différents tissus et au foie, organe principal du métabolisme des xénobiotiques (Wild et Montesano, 2009; Wu et Khlangwiset, 2010).

Les Aflatoxines, en particulier l'AFB₁, sont métabolisées par les enzymes de la famille des cytochromes P450 en AFB₁-8,9-époxyde (**Figure 6**), une forme réactive qui se lie de façon covalente à l'acide désoxyribonucléique (ADN) et à l'albumine sérique, formant des produits d'addition (Wild et Montesano, 2009; Wu et Khlangwiset, 2010). Les enzymes de la famille du CYP450 impliquées dans le métabolisme de l'AFB₁ sont le CYP3A4 et le CYP1A2. Tous les deux enzymes catalysent la biotransformation de l'AFB₁ en AFB₁-*exo*-8,9-époxyde hautement réactif. Le CYP1A2 est également capable de catalyser l'époxydation de l'AFB₁ pour donner une proportion élevée d'AFB₁-*endo*-époxyde et l'hydroxylation de l'AFB₁ pour former AFM₁, qui est un faible substrat pour l'époxydation (Guengerich *et al.*, 1998) et moins puissant que l'AFB₁ (Wild et Turner, 2002). Cela est généralement considéré comme la principale voie métabolique de détoxification pour les aflatoxines. Le CYP3A4 est le principal enzyme du CYP450 responsable de l'activation de l'AFB₁ en forme époxyde et aussi en AFQ₁, un métabolite de détoxification moins toxique. Le CYP3A5 métabolise l'AFB₁ principalement en *exo*-époxyde et quelques AFQ₁ (Wang *et al.*, 1998).

L'époxydation de l'AFB₁ en *exo*-8,9-époxyde, est une étape critique dans la voie génotoxique de ce carcinogène. La liaison de l'AFB₁- *exo*-8,9 époxyde à l'ADN cause des changements fonctionnels de la conformation de l'ADN (Raney *et al.*, 1993). L'époxyde est fortement instable et se lie avec une affinité élevée aux bases de Guanine dans l'ADN pour former l'AFB₁-N7- Guanine (Guengerich, 2001). L'AFB₁-N7-Guanine est capable de former de la Guanine (Purine) aux mutations transversales de Thymine (Pyrimidine) dans l'ADN et affecte ainsi le gène suppresseur p53 dans le cycle cellulaire (Li *et al.*, 1993; Bailey *et al.*, 1996). Le gène p53 est important dans la prévention de la progression du cycle cellulaire quand il ya des mutations d'ADN, ou pendant l'apoptose. L'AFB₁ induit la transvasions de la base G à la base T dans la troisième position du codon 249 (Gerbes et Caselmann, 1993; Li *et al.*, 1993; Mace *et al.*, 1997).

L'époxyde hydrolase et la glutathion-S-transférase (GST) sont toutes deux impliquées dans la désintoxication hépatique de l'AFB₁ activée, mais la conjugaison catalysée par la GST aux AFB₁-8,9-époxydes est censée jouer le rôle le plus important dans la prévention de la liaison de l'époxyde à la cible macromolécules comme l'ADN et diverses protéines cellulaires (Sherratt et Hayes, 2001) et un rôle vital dans la désintoxication de l'AFB₁. Les AFB₁- 8,9 - *exo* et *endo* époxydes sont conjuguées par le glutathion pour former de l'AFB-mercapturate et la réaction est catalysée par le GST (Johnson *et al.*, 1997; Farombi et Nwaokefor, 2005). Le conjugué glutathion-aflatoxine est transporté de cellules avec une protéine ATP-dépendante multidrogue-résistance par un processus accéléré (Farombi et Nwaokefor, 2005). Malgré une préférence pour la conjugaison de l'isomère AFB₁- *exo*-époxyde plus mutagène, la capacité relativement faible pour la désintoxication catalysée par la GST de l'AFB₁ bio-activée dans le poumon peut être un facteur important dans la susceptibilité du poumon à la toxicité de l'AFB₁. L'*exo* et l'*endo*- époxyde peuvent également être convertis non enzymatiquement en AFB₁-8,9-dihydrodiol qui dans son tour peut lentement subir une réaction d'ouverture de cycle catalysée par une base à un ion de phénolate de dialdéhyde (Guengerich *et al.*, 1998). L'AFB₁-dialdéhyde peut former des bases de Schiff avec des résidus de lysine dans la sérumalbumine formant complexe d'aflatoxine-albumine (Sabbioni, 1991). De même, le dialdéhyde d'aflatoxine est réduit en un dialcool dans une réaction catalysée dépendante du NADPH par l'aldéhyde réductase d'aflatoxine (AFAR) (Knight *et al.*, 1999). Cependant, l'alkylation de Guanine par AFB₁ produit de l'*exo*-8,9-époxyde qui est la forme réactif et carcinogène pour le foie (Brown *et al.*, 2009).

En *grosso-modo*, les métabolites AFM₁, AFQ₁ et AFP₁ ne sont pas de bons substrats pour l'époxydation, sont moins génotoxiques que l'AFB₁, et par conséquent, sont considérés comme des produits de désintoxication qui sont excrétés dans l'urine et les selles.

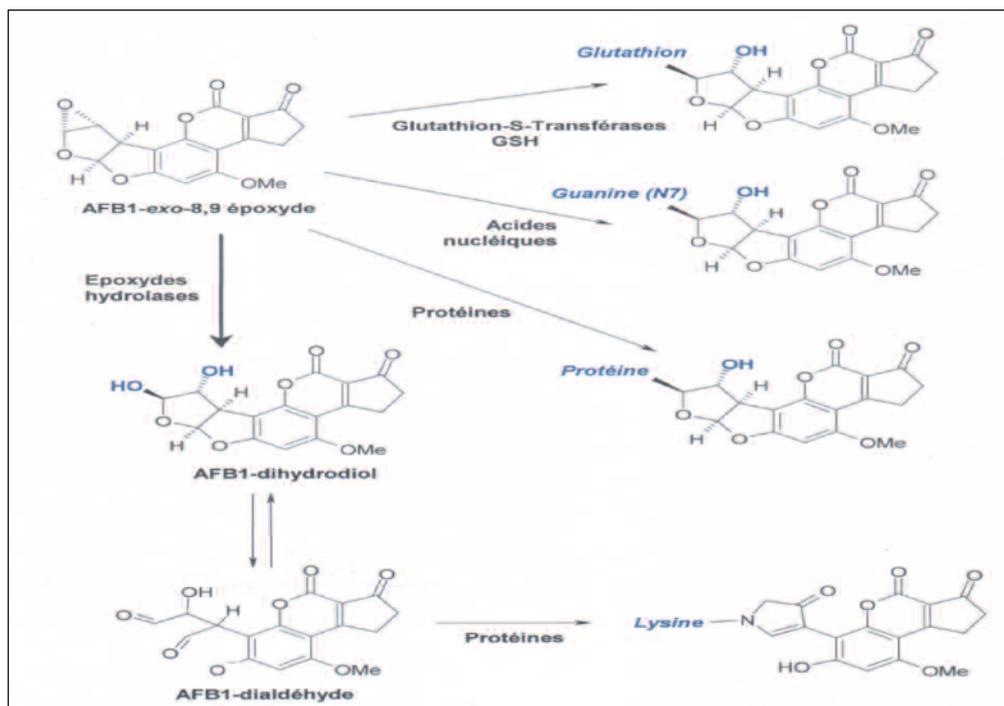


Figure 6. Bioconversion de l'AFB₁ exo-8,9-époxyde (Galtier *et al.*, 2006).

I.5.5. Toxicité des aflatoxines

En 2002, le Centre International de Recherche sur le Cancer (C.I.R.C) de l'OMS classe l'aflatoxine dans le groupe I, car il existe des preuves suffisantes de la cancérogénicité de ses molécules chez l'homme et l'animal, l'AFM₁ dans le groupe II B et l'AFG₁ dans le groupe III (A.F.S.S. A, 2009). Quant à l'AFG₂, les données actuellement disponibles sont insuffisantes pour la classer dans cette catégorie. La plus toxique des quatre aflatoxines naturelles est l'AFB₁, viennent ensuite par ordre décroissant de toxicité l'AFG₁ puis les AFG₂ et AFB₂ (Meissonnier, 2005).

a. Hépatotoxicité

En raison de ses capacités de bioactivation, le foie est la cible principale des aflatoxines. La principale conséquence d'une intoxication grave par l'AFB₁ est la nécrose hépatique qui se traduit par une forte augmentation des transaminases plasmatiques. Cette nécrose est associée à une infiltration de cellules inflammatoires. La réduction du nombre d'hépatocytes et leur dysfonctionnement provoquent une stéatose et une cholestase avec

l'augmentation des taux plasmatiques en bilirubine, phosphatases alcalines (PAL) et γ -glutamyl transférase (γ -GT).

Les études épidémiologiques réalisées dans le monde entier ont montré que les risques liés au développement du cancer du foie sont 30 fois plus élevés chez les individus ayant des antécédents d'hépatites B (Henry et Bosch, 2001). Cette situation est souvent rencontrée dans les pays en voie de développement, pour lesquels il n'existe pas de législation régulant les concentrations de l'AFB₁ dans l'alimentation, et dans lesquels la vaccination contre l'hépatite B n'est pas appliquée de façon systématique pour des raisons économiques et /ou politique.

b. Hématotoxicité

L'AFB₁ exerce des effets hématotoxiques secondaires se caractérisant par des altérations dans les fonctions de la moelle osseuse (une myélotoxicité qui affecte les lignées des granulocytes et monocytes) et l'anémie consécutive à une aflatoxicose serait due à une aplasie médullaire et une hémolyse mais aussi à une diminution de l'absorption de fer.

L'altération des fonctions hépatiques conduit à la diminution de la synthèse des facteurs de coagulation et des troubles de l'hémostase (Parent-Massin et Pachment, 1998).

c. Mutagénicité

L'AFB₁ n'est pas réactive ou mutagène par elle-même, mais elle peut être activée en un époxyde très électrophile qui peut former des adduits à l'ADN. Ces adduits génèrent une mutation qui se situe sur le codon 249 et qui pourra être le point de départ d'un processus de cancérogenèse hépatique. Des résultats *in vivo* ont montré que l'AFB₁ provoque très fréquemment cette mutation (Aguilar *et al.*, 1993). D'autres études effectuées sur le rat ont montré également que l'aflatoxine se lie à l'albumine plasmatique (Wild *et al.*, 1986).

d. Tératogénicité

L'AFB₁ peut aussi traverser la barrière placentaire et donc contaminer les fœtus *in utero*. Des adduits aflatoxine-albumine (AF-ALB) ont été identifiés dans le sang des mères et celui du cordon ombilical de nouveaux nés en Afrique (Wild *et al.*, 1991). L'enzyme CYP3A7 qui est la forme majeure de cytochrome P450 présente dans le foie fœtal humain, est également capable de transformer l'AFB₁ en son dérivé 8,9-époxyde (Wild et Turner, 2002),

induisant ainsi l'apparition d'effets tératogènes et des malformations congénitales (Bbosa *et al.*, 2013).

I.6. Méthodes de lutte contre les aflatoxines

Bien qu'il existe des stratégies préventives pour éviter le développement de moisissures, les mycotoxines peuvent persister dans les aliments.

Il n'existe pas de procédés de décontamination qui pourraient convenir à l'ensemble des mycotoxines. De plus, ces procédés actuels concernent essentiellement les grains de céréales oléagineux. Ils doivent être efficaces sans rendre les denrées traitées impropres à la consommation et, ils doivent également être faciles à mettre en œuvre et peu coûteuses. Ils sont classés selon qu'ils reposent sur des procédés chimiques, physiques ou biologiques.

I.1. Procédés physiques

- **Élimination des mycotoxines sur les aliments contaminés:** des méthodes telles que le lavage par de l'eau ou du carbonate de sodium afin de réduire la concentration des toxines. Le séchage, le broyage, les tris manuels ou mécanisés des gousses ou des amandes sont aussi un moyen d'élimination. Il faut noter la séparation mécanique de la coque et de la peau qui est le lieu essentiel de contamination ou encore le traitement par choc thermique. Il existe d'autres techniques comme l'irradiation par UV, rayons X ou micro-ondes, ou enfin l'extraction des aflatoxines par des solvants (Yiannikouris et Jouany, 2002; Ruppel *et al.*, 2004).
- **Utilisation de substances adsorbants afin de réduire l'adsorption digestive des toxines digérées:** L'ajout à la ration des adsorbants capables de fixer les mycotoxines permet de réduire leur biodisponibilité dans l'organisme animal et de limiter les risques liés à la présence de ces résidus dans les produits animaux destinés à la contamination humaine. Les aluminosilicates de sodium calcium hydratés (HSCAC) ainsi que les phyllosilicates dérivés de zéolites naturelles possèdent une grande affinité *in vitro* et *in vivo* pour l'AFB₁. Les bentonites sont composées d'une microstructure cristalline lamellaire dont la composition et l'adsorption varient du fait de l'interchangeabilité des cations positionnés sur les différentes couches. Leur efficacité a été montrée pour l'AFB₁. D'autres argiles comme la kaolinite, la sépiolite et la montmorillonite fixent l'AFB₁ (Diaz *et al.*, 1999).

I.6.2. Procédés chimiques

une variété d'agents chimiques tels que les acides, les bases (ammoniacale, soude), des agents oxydants (peroxyde d'hydrogène, ozone), des agents réducteurs (bisulfites), des agents chlorés, du formaldéhyde sont utilisés pour dégrader ou biotransformer les mycotoxines et plus particulièrement les aflatoxines (Yiannikouris et Jouany, 2002; Ruppel *et al.*, 2004).

I.6.3. Procédés biologiques

Certaines souches de bactéries lactiques, de propiobactéries et de bifidobactéries possèdent des structures pariétales capables de se lier aux mycotoxines. *Flavobacterium aurantiacum* peut fixer l'AFB₁ et la rendre inactive. Des microorganismes peuvent également métaboliser les mycotoxines (*Corynebacterium rubrum*) ou les bioconvertir (*Rhizopus*, *Aspergillus*). Une autre approche consiste à isoler des souches d'*A. flavus* et *A. parasiticus* non aflatoxinogènes en vue d'une biocompétition. Ces souches occupent la même niche écologique que les souches toxigènes et diminuent la contamination des plantes par les moisissures aflatoxinogènes. Ainsi les glucomannanes issus de la partie externe des parois de la levure *Saccharomyces cerevisiae* sont capables de lier *in vitro* certaines mycotoxines.

Ces méthodes doivent diminuer la concentration en toxine voire la dégrader, sans produire des résidus de dégradation toxiques, ni diminuer les qualités organoleptiques et nutritionnelles des aliments (Park *et al.*, 1988).

I.6.4. Les Huiles essentielle : une stratégie alternative de lutte contre la production des aflatoxines

I.6.4.1. Huiles essentielles

a. Définition, localisation et composition chimique

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

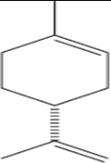
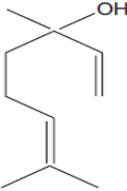
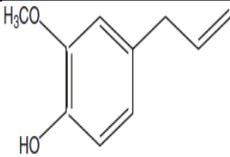
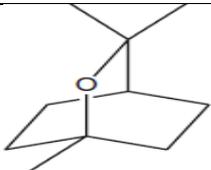
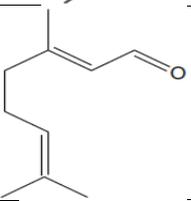
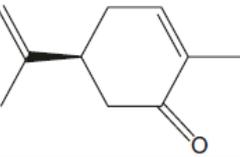
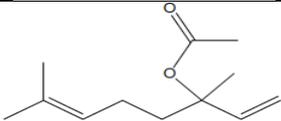
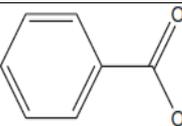
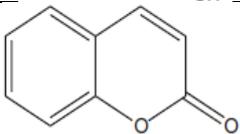
substances alors que le terme "essentiel" signifie leur préciosité et leur parfum typique de plantes (Li *et al.*, 2014).

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

En général, la plupart des HEs sont des liquides incolores, lucides et mobiles à température ambiante. Cependant, l'ensemble du spectre de couleurs des HEs va du jaune au noir brun avec toute l'échelle intermédiaire de couleurs. De plus, des solides tels que des cristaux (par exemple stéaroptènes) se trouvent dans les HEs de rose, camomille et certaines espèces d'*Eucalyptus*. L'odeur typique des HEs est dépendante des organes, des espèces et de l'origine des plantes et de chémotype. Contrairement aux huiles végétales, les HEs sont des huiles volatiles avec un indice de réfractions élevées et une rotation optimale à la suite de nombreux composés asymétriques. La densité relative des HEs est généralement inférieure à celle d'eau alors qu'il existe plusieurs exceptions. Elles sont généralement reconnues comme hydrophobes mais elles sont largement solubles dans les graisses, les alcools et la plupart des solvants organiques. Elles sont constituées de composés ayant diverses structures chimiques, qui sont produit dans toutes les plantes aromatiques et les arbres par la photosynthèse à travers deux voies. La première est la multiplication de l'isoprène activé (isopentényl pyrophosphate C₅) produits d'addition uniformes et inégaux. L'autre est la biosynthèse de l'acide shikimique, en dont certaines déviations de biomolécules sont responsables des composés aromatiques dérivés du phénylpropane tel que l'eugénol, l'anéthole, l'aldéhyde cinnamique, etc. Tous les composés des HEs peuvent être divisés en deux catégories principales, les hydrocarbures principalement les composés mono-, sesqui- et di-terpènes et oxygénés, pour les alcools, les oxydes, les aldéhydes, les cétones, les phénols, les acides et les esters /

lactones (Fernandez *et al.*, 2013). Les molécules des HEs sont classées dans le **Tableau IV** sur la base de leurs fonctions chimiques.

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

fonctions chimiques	Exemple de structure	Molécules	plantes
Hydrocarbure		Limonène α-pinène Phellandrène β-caryophyllène α-camphorène	Orange, citron, Géranium, anis, <i>Eucalyptus</i> , Clou de girofle,
Alcool		Linalol Prenol Menthol Farnesol Vetise linelol Phytol α-terpinéol	Ylang ylang, Menthe, Lavande, Cardamome, Camomille, Vétiver, Jasmin, <i>Citrus</i>
Phénol		Eugénol Thymol Anéthol Safrol	Thym, Clou de girofle, Anis, Safran
Ether-oxyde		1,8-cinéole Géranyl butyl éther	Rose, <i>Eucalyptus</i>
Aldéhyde		Géraniale Cinnamaldehyde Néral	Cannelle, <i>Citrus</i> , <i>Pelargonium</i>
Cétone		Carvone α- et β- vétivone Menthone	Vétiver, Carvi, Poivre noir
Esters		Acétate de linalyl Acétate de géranyl Neryl et α- Acétate de terpinyl	<i>Pélargonium</i> , Lavande, <i>Citrus</i>
Acide		Acid benzoïque Acide cinnamique	Pomme, Cannelle
Autres composés (molécule nitrogène et sulfuré, lactone, acides gras,...)		Coumarine Indole Diméthyl trisulfure	Gardénia, Jasmin, Rose, Lavande.

b. Méthode d'extraction des huiles essentielles

De nombreux procédés sont utilisés pour l'extraction des substances aromatiques. Cette opération est plus délicate puisqu'elle a pour but de capter les produits les plus subtils et les plus fragiles élaborés par le végétal et cela, sans en altérer la qualité. Les méthodes d'extraction sont adaptées aux propriétés les plus importantes des HEs, leur volatilité dans l'air et dans la vapeur d'eau et leur solubilité dans les solvants organiques.

- **L'Hydrodistillation** lors de laquelle le matériel végétal est immergé dans l'eau, le mélange est ensuite chauffé jusqu'à ébullition sous pression atmosphérique dans un alambic, où la chaleur permet la libération de molécules odorantes dans les cellules végétales (**Figure 7**). Les principaux composés volatils ne se dissolvent pas dans l'eau et l'HE peut être séparée par décantation après refroidissement dans un séparateur de phases (Lucchesi, 2005).

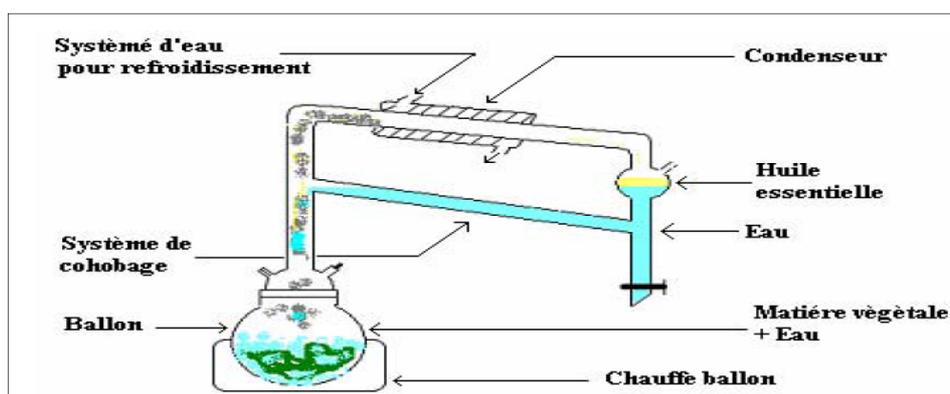


Figure 7. Montage d'hydrodistillation.

- **L'entraînement par la vapeur d'eau** lors de laquelle l'eau est bouillie dans un récipient situé en dessous, et à une certaine distance, du matériel végétal à distiller (**Figure 8**). A son passage, la vapeur d'eau saturante entraîne l'HE des plantes vers un condenseur où elle est liquéfiée et séparée de l'eau comme lors de l'hydrodistillation (Bruneton, 1993; Paris et Moyse, 1976).

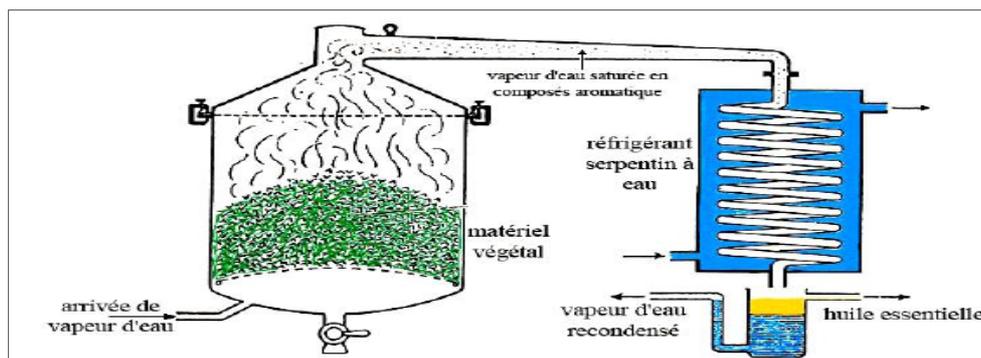


Figure 8. Montage d'entraînement à la vapeur d'eau.

- **L'Hydrodiffusion.** Contrairement à la distillation à la vapeur, la vapeur injectée dans ce système provient du haut de l'alambic vers le bas (Figure 9). Le mélange de vapeurs avec les HEs est directement condensé sous le support de la plante à travers un bac perforé. La façon de séparer les HEs est le même que celui des autres méthodes de distillation. Cette méthode permet de réduire la consommation de vapeur et le temps de distillation, tandis qu'un meilleur rendement peut être obtenu (Li *et al.*, 2014).

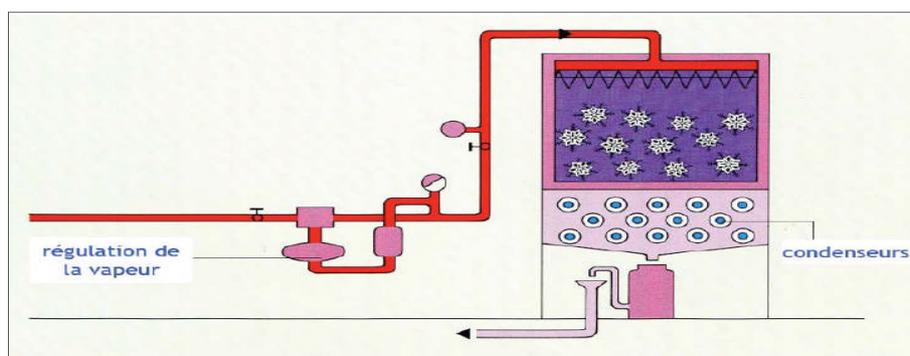


Figure 9. Montage d'hydrodiffusion.

- **L'extraction assistée par micro-ondes** est une nouvelle technique qui combine l'utilisation des micro-ondes et d'autres méthodes traditionnelles. Dans ce procédé, la matière végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte fermée dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle (Figure 10). Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques à savoir condensation, refroidissement, et décantation (Hemwimon *et al.*, 2007). Boukroufa *et al.* (2015) ont rapporté que les processus écologiques impliquant

des techniques à micro-ondes présentent l'avantage de raccourcir les temps d'extraction des HE. Les avantages en termes de réduction du temps dû aux micro-ondes par rapport à la hydrodistillation conventionnelle ont également été rapportés pour les HEs de citrus par Aboudaou *et al.* (2019) (3hrs *vs.* 30 min). En outre, cette technique a été proposée comme une méthode d'extraction «respectueuse de l'environnement», car elle est très propre qui évite la génération de résidus et l'utilisation de grandes quantités d'eau et de solvants chimiques par rapport aux autres techniques (pressage à froid, hydrodistillation). Le coût d'extraction réduit est clairement avantageux pour la méthode microonde proposée en termes d'énergie et de temps. En ce qui concerne l'impact sur l'environnement, la quantité calculée de dioxyde de carbone (CO₂) émis dans l'atmosphère est plus élevée dans le cas de l'hydro distillation (3 464 g de CO₂/g d'HE) que pour cette nouvelle méthode (70 g de CO₂/g d'HE) (Bousbia *et al.*, 2009).

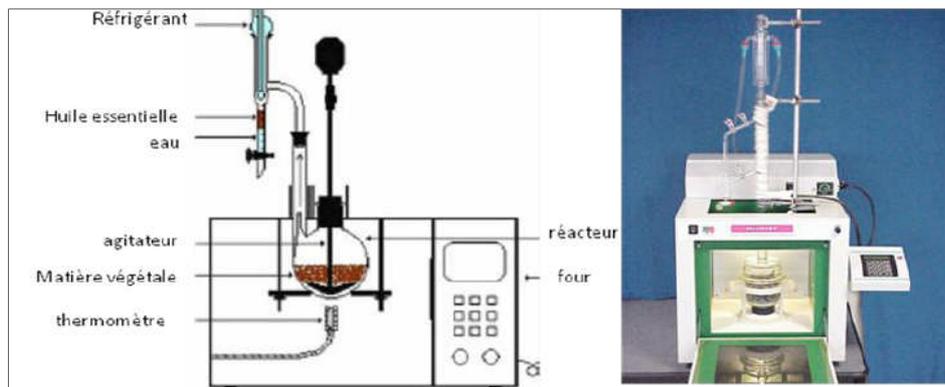


Figure 10. Montage d'extraction assistée par micro-ondes.

- **L'extraction au CO₂ supercritique** a pris ces dernières années beaucoup d'essor. Le principal avantage de cette technique est celui de combiner les caractéristiques des gaz et des liquides pendant le processus d'extraction (**Figure 11**). Cependant, le CO₂ ne permet pas de dissoudre certains composés moyennement polaires comme les alcools, les esters, les aldéhydes et les cétones (Fernandez-Perez *et al.*, 2000). Autre avantage, ce gaz ne pollue pas et est inoffensif car il est recyclé à l'intérieur du système. Les HEs extraites de cette manière ont l'avantage d'éviter la dégradation thermique associée à la distillation à pression atmosphérique. L'avantage, bien sûr, c'est

qu'aucun résidu de solvant ne reste, puisque, aux pressions et températures normales, le CO₂ revient simplement à l'état gazeux et s'évapore.

L'extraction aux fluides supercritiques est donc une technique intéressante qui apporte de nouvelles notes olfactives (méthode d'extraction plus complète et moins dégradante) (King, 2004; Turner, 2006).

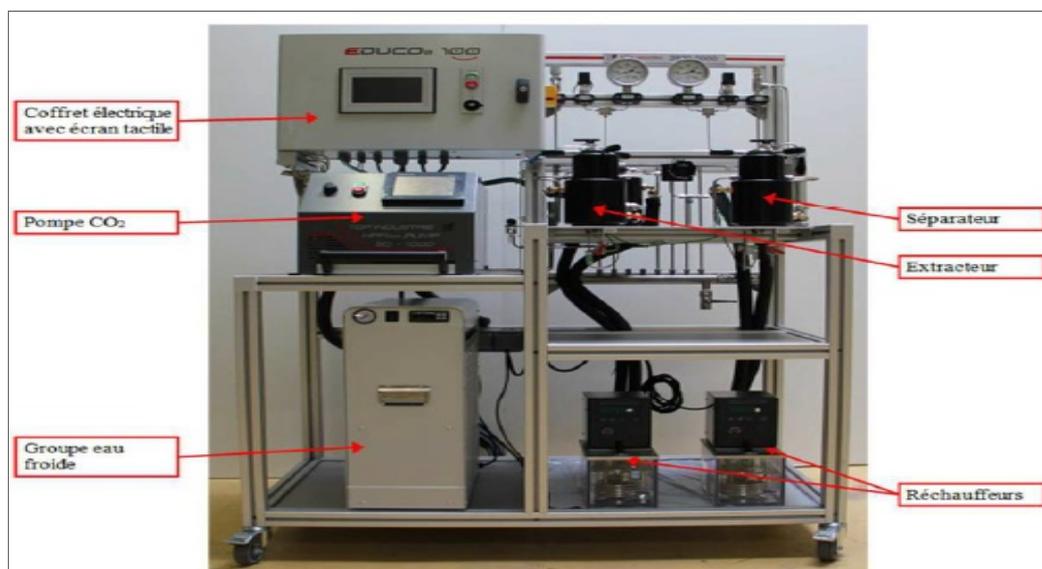


Figure 11. Montage d'extraction au CO₂ supercritique.

- **La distillation Turbo** est développée pour réduire la consommation d'énergie et d'eau pendant l'ébullition et refroidissement en hydrodistillation (**Figure 12**). L'extraction turbo permet une agitation et un mélange considérables avec un effet de cisaillement et de destruction sur les matières végétales. Avec cette méthode le temps de distillation est réduit. En outre, il s'agit d'une alternative pour l'extraction des HE d'épices ou de bois, qui sont relativement difficiles à distiller. En outre, un prototype d'éco-évaporateur pourrait être ajouté avec l'aspect de la récupération et la réutilisation de l'énergie transférée pendant la condensation pour chauffer l'eau dans la vapeur (Chemat, 2010).

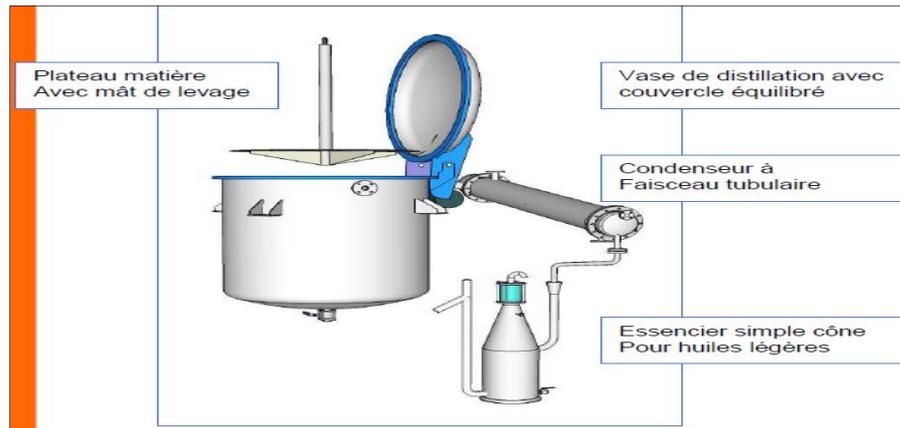


Figure 12. Montage de distillation Turbo.

- **L'extraction par ultrasons.** Dans le but d'augmenter les rendements d'extraction et de réduire la consommation d'énergie, l'extraction par les ultrasons a été développée pour améliorer l'efficacité et réduire le temps d'extraction. L'effondrement des bulles de cavitation générées lors de l'ultrasonication donne naissance à des micro-jets pour détruire les glandes des HEs afin de faciliter le transfert et la libération des HEs des plantes (**Figure 13**). Cet effet de cavitation dépend fortement de paramètres de fonctionnement (la fréquence et l'intensité des ultrasons, la température, le traitement temps) qui sont cruciales pour une conception et un fonctionnement efficaces des réacteurs sono (Porto *et al.*, 2009; Asfaw *et al.*, 2005). Cette technique a déjà prouvé son efficacité, Mason *et al.* (2011) ont constaté une augmentation sur le rendement ~ 44% lors d'extraction de l'HE provenant des agrumes japonais par rapport aux méthodes traditionnelles.



Figure 13. Montage d'extraction par ultrasons.

- **L'enfleurage** est réservé aux HEs à forte valeur ajoutée ; elle est notamment utilisée avec les fleurs telles le jasmin ou la tubéreuse qui continuent à produire des métabolites secondaires après la cueillette (**Figure 14**). Le procédé à froid consiste à absorber le parfum de ces fleurs en utilisant un corps gras à haut pouvoir d'absorption. Le corps gras, non renouvelé au cours du processus, est saturé en essence florale et l'HE est ensuite extraite de la graisse par de l'éthanol (Clarke, 2008).



Figure 14. Montage d'enfleurage.

D'autres méthodes d'extraction ont été développées, telles que les headspace dynamique et statique, l'extraction par fluide supercritique et la micro-extraction en phase solide (SPME).

c. Méthodes d'analyses des huiles essentielles

La détermination de la composition chimique des HEs est généralement réalisée par la combinaison de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse ou l'infrarouge (GC/SM ou GC/IRFT) sur deux colonnes de polarité différente (Hedges et Wilkins, 1991). Les composés sont alors identifiés d'après leur indice de rétention et leur spectre de masse. Suite aux travaux innovants de Formáček et Kubeczka (1982), une troisième méthode consiste à identifier les composants individuels d'une HE sur la base d'un spectre RMN ^{13}C de l'HE, sans séparation préalable de ses constituants.

Pour permettre la séparation de deux énantiomères, la GC chirale est la méthode généralement utilisée. Différentes approches peuvent être distinguées: l'injection directe du mélange dans la colonne chirale (l'identification nécessite souvent un système SM pour confirmer l'identité des pics), la séparation sur colonne chirale des deux composés énantiomères purifiés au préalable par une technique chromatographique achirale (Casabianca

et Graff, 1994) et l'utilisation de la chromatographie gazeuse multidimensionnelle (MDGC) qui permet l'injection directe de l'échantillon dans le chromatographe; la première colonne achirale conduit à une pré-séparation des composés, qui sont transférés vers la deuxième colonne chirale en utilisant la technique coupe-cœur (heart-cutting) (Bicchi et Pisciotta, 1990).

Les propriétés physiques et la composition chimique d'une HE sont déterminées dès leur obtention. Ces données seront utilisées pour authentifier une HE en vue de son exploitation industrielle.

I.6.4.2. Utilisation des huiles essentielles comme agents antifongiques et anti-aflatoxinogènes

a. Inconvénients des fongicides de synthèse

La première étape dans la lutte contre la contamination fongique est l'application des fongicides dans le champ. Ces derniers peuvent être appliqués après la récolte, à condition qu'ils ne nuisent pas l'apparence ou la qualité des produits traités (Amiri *et al.*, 2008). Les antimicrobiens chimiques tels que les benzimidazoles, les hydrocarbures aromatiques et les inhibiteurs de la biosynthèse des stérols ont été utilisés depuis des décennies dans le contrôle des maladies des plantes dans l'agriculture. Plus récemment, deux autres fongicides, chacun avec mode d'action différent, sont devenus importants dans le marché: pyriméthanil (anilinopyrimidine) et fludioxonil (phénylpyrrole).

L'usage excessif de fongicides de synthèse dans les cultures a été une cause majeure du développement des populations de pathogènes résistants, ce qui entraîne l'utilisation des concentrations plus élevées des antifongiques et l'augmentation conséquente de la présence de résidus toxiques dans les produits alimentaires. Certains de ces composés ne sont pas biodégradables, ils peuvent accumuler dans le sol, les plantes et l'eau, et par conséquent affecter l'être humain à travers la chaîne alimentaire.

Bien que les traitements chimiques aient été considérés comme le meilleur et le plus efficace moyen pour prévenir les maladies post-récolte. Le type et la concentration des fongicides autorisés pour l'application post-récolte sont limités en raison de leur long période de dégradation et les effets potentiels sur l'alimentation et la santé humaine (cancérogénicité, tératogénicité, la toxicité résiduelle élevée et aiguë, déséquilibre hormonal et spermatotoxicité). En raison de ces effets indésirables, des études récentes (Prakash *et al.*,

2015) ont abouti à la révocation de l'enregistrement de certains des fongicides plus efficaces. Le développement nouveaux fongicides alternatifs et biodégradables qui sont à la fois efficace et économiquement réalisable serait nécessaire (da Cruz Cabral *et al.*, 2013).

c. Les huiles essentielles comme antifongiques naturels

Afin de réduire l'utilisation des fongicides de synthèse dans les aliments, plusieurs traitements alternatifs ont été étudiés. Les métabolites produits par les plantes sont des alternatives prometteuses parce que les plantes produisent une grande variété de composés, soit dans le cadre de leur développement ou en réponse au stress ou à une attaque pathogène. Au cours des dernières années, un intérêt croissant s'est manifesté pour ces substances en raison de leur statut GRAS (généralement considérées saines).

Les HEs ont l'avantage potentiel d'être bioactifs dans leur phase vapeur, une caractéristique qui les rend attrayants comme fumigants possibles pour la protection des produits stockés. Leur activité antimicrobienne inhérente est généralement liée à la structure chimique de leurs composants, la concentration dans laquelle ils sont présents, ainsi que leurs interactions (synergie, potentialisation, etc.), ce qui peut accentuer leurs propriétés bioactives. Ils peuvent également contenir divers composés antioxydants qui sont aussi la base de leurs propriétés antimicrobiennes. Le fait qu'ils sont constitués par une grande variété de composés, leur confère d'autres avantages concernant leurs modes d'action avec la possibilité d'attaquer différents genres de champignons et entravent le développement de la résistance de l'agent pathogène.

Beaucoup de recherches ont été menées dans ce domaine au cours des dernières années. *Aspergillus* et *Fusarium* sont les genres de champignons les plus couramment utilisés pour tester les HEs, suivis par *Penicillium* et d'autres genres phytopathogènes. Le **Tableau V** résume les résultats présentés dans cette section.

Tableau V. Effets antifongiques des HEs.

Nom scientifique	Nom commun	champignons de test	Références
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Cannelle	<i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>Fusarium spp</i> , <i>Penicillium citrinum</i> et <i>P. viridicatum</i>	Velluti <i>et al.</i> (2004); Singh <i>et al.</i> (2007),
<i>Citrus limon L.</i>	Citron	<i>P. chrysogenum</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>A. niger</i> et <i>A. flavus</i>	Viuda-Martos <i>et al.</i> (2008),
<i>Citrus reticulata L.</i>	Mandarine	<i>P. chrysogenum</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>A. niger</i> et <i>A. flavus</i>	Viuda-Martos <i>et al.</i> (2008),
<i>Citrus sinensis L.</i>	Orange	<i>P. chrysogenum</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>A. niger</i> et <i>A. flavus</i>	Viuda-Martos <i>et al.</i> (2008),
<i>Cuminum cyminum</i>	Cumin	<i>F. solani</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. oxysporum f. sp. tulipae</i> , <i>F. verticillioides</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>Botrytis cinerea</i> et <i>Alternata citri</i>	Boyras et Özcan, (2005) ; Naeini <i>et al.</i> (2010),
<i>Cymbopogon spp</i>	citronnelle	<i>Fusarium spp.</i>	Velluti <i>et al.</i> (2004),
<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalyptus	<i>A. flavus</i> et <i>A. parasiticus</i>	Vilela <i>et al.</i> (2009),
<i>Foeniculum vulgare</i>	Fenouil	<i>Phytophthora infestans</i>	Soylu <i>et al.</i> (2006),
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romarin	<i>P. infestans</i> et <i>B. cinerea</i>	Soylu <i>et al.</i> (2006) ; Soylu <i>et al.</i> (2010),
<i>Thymus vulgaris</i>	Thym	<i>F. oxysporum</i> , <i>F. verticillioides</i> , <i>P. expansum</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>P. brevicompactum</i> , <i>A. flavus</i> et <i>Alternata alternata</i>	Feng et Zheng, (2007); Zabka <i>et al.</i> (2009),

d. Mécanisme d'action des huiles essentielles

Le mécanisme d'action des composés actifs dans les HEs n'est pas encore complètement élucidé. Cependant, il y a trois aspects sur lesquels la plupart des auteurs sont d'accord en attribuant leur fonction inhibitrice (Carson *et al.*, 2002; Ultee *et al.*, 2002; Burt , 2004; Turina *et al.*, 2006):

- la présence de groupes OH capables de former des liaisons hydrogènes qui ont des effets sur les enzymes, en modifiant diverses fonctions intracellulaires;

- l'action sur la morphologie due aux interactions avec les enzymes membranaires, entraînant la perte de rigidité et d'intégrité de la paroi cellulaire;
- Changements de la perméabilité des membranes cellulaires, granulation du cytoplasme et rupture de la membrane cytoplasmique. Les trois aspects sont intimement liés entre eux.

Le caractère hydrophobe de ces composés, les amène à traverser la membrane cellulaire et d'interagir avec des composés cellulaires, afin qu'ils puissent affecter à la fois la membrane et des enzymes intracellulaires. Certains composés hydrophobes présents dans les HEs peuvent modifier la perméabilité des membranes microbiennes pour des cations tels que H^+ et K^+ , et ainsi pourraient provoquer un changement dans le flux de protons, en modifiant le pH cellulaire et affectant la composition chimique des cellules et leur activité. La capacité des composés hydrophobes à partitionner ou à se dissoudre dans la phase lipidique de la membrane cytoplasmique est la clé pour leur activité, mais une solubilité plus élevée ne signifie pas toujours une plus grande action antimicrobienne. La perte de la perméabilité différentielle de la membrane cytoplasmique est généralement considérée comme la cause de la mort cellulaire, car cela peut entraîner un déséquilibre de la pression osmotique intracellulaire, la rupture subséquente des organites intracellulaires, la fuite du contenu cytoplasmique et finalement la mort cellulaire. L'interaction avec les membranes cellulaires peut également conduire à la perte de certains composants cellulaires, y compris l'ATP, la molécule principale de stockage d'énergie (Cox *et al.*, 2000; Lambert *et al.*, 2001; Di Pasqua *et al.*, 2006; Turgis *et al.*, 2009; da Cruz Cabral *et al.*, 2013; Saad *et al.*, 2013).

D'autres événements qui peuvent conduire à un dysfonctionnement de la membrane et une rupture ultérieure comprennent les événements suivants: la dissipation des deux composants de la force motrice de proton (le gradient de pH et de potentiel électrique); l'interférence avec le système de génération d'énergie (ATP) dans la cellule; l'inhibition des enzymes; et la prévention de l'utilisation du substrat pour la production d'énergie (Coutinho de Oliveira *et al.*, 201; El-Mogy et Alsanius, 2012). Ces actions conduisent à l'inhibition de la germination et la suppression de la croissance du mycélium.

e. Les huiles essentielles comme anti-aflatoxines B₁

Il y a une longue liste d'HEs utilisés pour diminuer l'effet d'AFB₁ dans les aliments. La capacité de ces produits dépend de la concentration dans laquelle ils sont appliqués et les conditions qui les entourent. Les résultats de différentes études sont regroupés dans le

Tableau VI. Ils montrent que de nombreuses huiles sont capables de bloquer la synthèse d'AFB₁ mais, dans la plupart des cas, cette inhibition est liée à un ralentissement ou à une inhibition de la croissance fongique

Tableau VI. Effet inhibiteur de quelques HEs sur la croissance d'*A. flavus* et la production d'AFB₁.

Nom scientifique	Nom commun	Concentration utilisée dans le milieu de culture	Inhibition de la croissance d' <i>A. flavus</i>	Inhibition de la production d'AFB ₁	Référence
<i>Ageratum conyzoides</i>	Agérate	0,1 µg/ml 0,04 µg/ml	49% 30%	100% 65%	Nogueira <i>et al.</i> (2010),
<i>Pimpinella anisum</i>	Anis	0,5 µg/g	100%	100%	Bluma <i>et al.</i> (2008),
<i>Ocimum sanctum</i>	Basilic	0,1 µg/ml 0,2 µg/ml	72,5% 90,1%	88,4% 100%	Kumar <i>et al.</i> (2010 a),
<i>O. sanctum</i>	Basilic	0,1 µl/ml 0,4 µl/ml	72,25% 100%	82,43% 100%	Kumar <i>et al.</i> (2013),
<i>Piper betle</i>	Bétel	0,4 µl/ml 0,6 µl/ml	26,7% 77,8%	74,50% 100%	Prakash <i>et al.</i> (2010),
<i>Callistemon lanceolatus</i>	Callistemon	0,546 mg/ml 0,819 mg/ml	79,6% 100%	100% 100%	Shukla <i>et al.</i> (2012),
<i>C. jensenianum</i>	Cannelle	4 µl/ml 6 µl/ml	63% 84%	84% 100%	Tian <i>et al.</i> (2012),
<i>Amomum subulatum</i>	Cardamone	0,25 mg/ml 0,5 mg/ml	25% 74%	69% 100%	Singh et Srivastava, (2008),
<i>Cicuta virosa</i>	Pruche à eau	1 µl/ml 4 µl/ml	60% 65,7%	31,9% 100%	Tian <i>et al.</i> (2011),
<i>C. citratus</i>	Citronnelle	0,2 mg/ml	3%	100 %	Paranagama <i>et al.</i> (2003),
<i>Coriandrum sativum</i>	Coriandre	0,75 µl/ml	66,5%	25%	Deabes <i>et al.</i> (2011),
<i>C. cyminum</i>	Cumin	0,4 µl/ml 0,5 µl/ml	52% 91 %	67% 100%	Kedia <i>et al.</i> (2014 b),
<i>Curcuma longa</i>	Curcuma	0,5 % (v/v)	nd	99%	Ferreira <i>et al.</i> (2013),
<i>F. vulgare</i>	Fenouil	0,75 µl/ml	54,4%	23%	Deabes <i>et al.</i> (2011),
<i>Mentha spicata</i>	Menthe	0,6 µl/ml 0,9 µl/ml	66,4% 84,9%	50,2% 100%	Kedia <i>et al.</i> (2014a),
<i>Cymbopogon martini</i>	Palmarosa- Géranium des Indes	0,3 µl/ml 0,4 µl/ml	50% 95%	80% 100%	Mishra <i>et al.</i> (2015),
<i>C. sinensis</i>	Orange	250 ppm 1000 ppm	18,2 % 100%	68,32% 100 %	Singh <i>et al.</i> (2010),
<i>C. maxima</i>	Pomélo	250 ppm 1000 ppm	23,4 % 100%	67,21 % 100 %	
<i>R. officinalis</i>	Romarin	0,45% (v/v)	0,00%	100 %	Rasooli <i>et al.</i> (2008),
<i>T. vulgaris</i>	Thym	0,3 µl/ml 0,7 µl/ml	46,9% 100%	75,6% 100%	Kumar <i>et al.</i> (2008),
<i>T. daenensi</i> <i>Satureja khozistanica</i>	Thym	62,5 mg/l 500 mg/l	6,45 % 100%	17,83 % 100%	Gorran <i>et al.</i> (2013),
<i>S. macrosiphonia</i>	Sarriette	62,5mg/l 500 mg/l	12,38% 100%	18,53 % 100%	
	Sarriette	62,5 mg/l 500 mg/l	3,07% 65,22%	10,22% 73,96%	
<i>Lippia rugosa</i>	Verveine	600 µg/ml 1000 µg/ml	5% 5%	61% 100%	Tatsadjieu <i>et al.</i> (2009).

En raison des excellents résultats obtenus avec ce type de biocontrôle, les chercheurs sont encore en quête vers de nouveaux produits naturels et de leurs composés actifs. Néanmoins, la plupart des recherches seraient nécessaires pour comprendre les mécanismes d'action sur les champignons aflatoxigènes afin de les transformer en sources potentielles dans le domaine agroalimentaire.

I.7. Application des huiles essentielles dans la prévention des aliments de la contamination

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

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

HEs	moisissure	Matrice alimentaire	Effet	Références
<i>C. virosa</i>	<i>A. flavus</i>	Tomates/cerises	<10% des fruits infectés à 200 µl / ml pour toutes les souches.	Tian <i>et al.</i> (2011),
<i>T. vulgaris</i> , <i>Satureja hortensis</i> et <i>S. aromaticum</i>	<i>A. flavus</i>	Ketchup	Concentrations inhibitrices maximales: 350 ppm (<i>T. vulgaris</i>), 500 ppm (<i>S. hortensis</i>).	Omidbeygi <i>et al.</i> (2007),
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	<i>A. flavus</i>	Blé	91% de protection à 100 µg / ml.	Kumar <i>et al.</i> (2007),
<i>Origanum majorana</i> , <i>C.sativum</i> , <i>Hedychium spicatum</i> , <i>Commiphora myrrha</i> et <i>Cananga odorata</i>	<i>A. flavus</i>	Bois chiche	> 75% de protection : 3 µl/ml (<i>O. majorana</i>), 2,5 µl/ ml (<i>H. spicatum</i>), 3 µl / ml (<i>C. myrrha</i>) et 2 µl / ml (<i>C. odorata</i>).	Prakash <i>et al.</i> (2012),
<i>Boswellia carterii</i>	<i>A. flavus</i>	Poivre noir	65,38% de protection à 1,75 µl / ml.	Prakash <i>et al.</i> (2014),
<i>C. cyminum</i> , <i>Laurus nobilis</i> , <i>M. pulegium</i> , <i>O. vulgare</i> , et <i>S. montana</i>	<i>A. flavus</i>	Rais	Protection à 50 µl : 60,0 % (<i>C. cyminum</i>), 49,8 % (<i>L. nobilis</i>), 46,8 % (<i>M. pulegium</i>), 55,9% (<i>O. vulgare</i>), et 57,4% (<i>S. montana</i>).	Razzaghi-Abyaneh et Rai, (2013),
<i>S. hortensis</i>	<i>A. flavus</i>	Citron	Protection des fruits à 6,25 µl / ml.	Dikbas <i>et al.</i> (2008),
<i>C. jensenianum</i> , <i>R. officinalis</i> , <i>L. nobilis</i> , <i>T. vulgaris</i> , <i>E.caryophyllata</i> .	<i>A. flavus</i>	Pain de seigle	Inhibition de la croissance fongique à 270 µl/l.	Suhr et Nielsen, (2003).

I.7.1. Limitations de l'utilisation des huiles essentielles

Les HEs sont utilisées comme agents naturels de conservation dans le domaine agroalimentaire: le poisson (Djenane, 2015), les viandes (Djenane *et al.*, 2011a,b; Djenane *et al.*, 2012a,b,c; Djenane *et al.*, 2013; Djenane *et al.*, 2018; Djenane *et al.*, 2019), les ovoproduits (Djenane *et al.*, 2019a,b) et, dans plusieurs d'autres produits. Bien que l'utilisation des HEs en fumigation sur des grains en stockage puisse constituer une stratégie intéressante, elle se heurte à plusieurs contraintes :

- **Phytotoxicité :** L'altération de l'intégrité de la membrane cellulaire suite à l'exposition aux HEs (responsable de leur effet anti-fongique) pourrait aussi affecter les plantes et induire une phytotoxicité à des concentrations légèrement plus élevées que celles utilisées pour lutter contre les champignons (Isman et Machial, 2006).
- **Toxicité pour les mammifères :** une exposition à des HEs ou bien à leurs composants peut-être toxique pour les mammifères. Hartnoll *et al.* (1993), ont reporté un cas d'ingestion de 5 ml d'huile essentielle de clou de girofle chez un enfant qui a entraîné une hépatotoxicité sévère et un coma. D'autres effets toxiques des HEs ont été rapportés comme, par exemple, une photosensibilisation entraînant des irritations dermiques et des brûlures lors d'exposition à la lumière (HE avec une teneur élevée de furanocoumarins) (Tisserand, 1997). Le linalool, présent dans les HE de thym et de lavande est également toxique pour des cellules dermique humaines (Prashar *et al.*, 2004).
- **Volatilisation rapide :** Les composés des HEs sont hautement volatiles et peuvent également se dégrader par oxydation suite à une exposition à la lumière ou une élévation de température. Cette perte d'activité nécessiterait donc leur réintroduction de manière continue pour maintenir l'effet protecteur (Kedia *et al.*, 2015).
- **Altération des qualités organoleptiques :** Les HEs sont constituées de substances aromatiques très fortes et sont souvent utilisées en industrie cosmétique pour leur odeur agréable. Leur application sur des aliments pourrait en changer les qualités organoleptiques et altérer le goût de ces derniers (Kumar *et al.*, 2010).

I. 8. Présentation et description botanique de quelques plantes utilisées dans cette étude

I. 8. 1. *Citrus limon* (L.) var. Eurêka

Nom commun : Citron

Noms scientifique : *Citrus limon* L.

Le citronnier est un arbre du genre *Citrus* (*Rutacées*) d'une hauteur de 3 à 4 m et d'une durée de vie d'environ 40 ans, supporte une température minimale de -2°C (Bousbia, 2011; Öntaşet *al.*, 2016) (**Figure 15**). Les feuilles composées, unifoliolées, alternées, de forme variables, lancéolées et elliptiques, à bord denticulé, de taille très variable de 5 à 10 cm. Les fleurs blanches et odorantes. Fruit ovoïde, de 5 à 10 cm de diamètre, à peau épaisse, adhérente, jaune clair à maturité odorante. Le fruit est de forme ovale, avec un mamelon plus au moins apparent à leur extrémité. La peau fine est colorée en jaune à maturité du fruit ; elle est pourvue de nombreuses glandes oléifères renfermant des essences.

Les HEs de citron sont utilisées comme agents naturels de conservation des aliments tels que les poissons (Mahmoud *et al.*, 2004 ; Djenane, 2015), les viandes (Fernandez-Lopez *et al.*, 2005) , les poulets (Fisher et Phillips, 2006), les produits laitiers (Holley et Patel, 2005). Leur utilisation est due à la présence des composés ayant des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes.

I. 8. 1.1. Classification

Selon Padrini et Lucheroni (1996), la classification de *Citrus limon* L. est la suivante :

Règne: Végétal

Embranchement: Spermaphyte

Classe: Eudicotylédones

Ordre: Rutales

Famille: Rutaceae

Genre: *Citrus*

Espèce : *Citrus limon* L.



Figure 15. *Citrus limon* L.

I.8.2. *Citrus sinensis* (L.) var. valencia

Nom commun : Orange douce

Noms scientifique : *Citrus sinensis* L.

L'oranger est un arbre appartient à la famille des *Rutacées*, d'une hauteur de 2 à 3 m avec un feuillage vert sombre persistant et légèrement ailé, la floraison blanche très parfumée (**Figure 16**). Les fruits mettent 10 à 12 mois pour murir de taille moyenne, de forme sphérique, et de couleur caractéristique orange (Bousbia, 2011; Patricia *et al.*, 2015). Viuda-Martos *et al.* (2008); Singh *et al.* (2010); Olaiya *et al.* (2016); Djenane, (2015); Djenane *et al.* (2019a,b) ont démontré que les HES d'orange ont un pouvoir antioxydant et antimicrobien très important.

I.8.2.1. Classification

D'après Parle et Chaturvedi (2012), la classification de *Citrus sinensis* L. est la suivante :

Règne: Végétal

Embranchement: Spermaphyte

Classe: Eudicotylédones

Ordre: Rutales

Famille: Rutaveae

Genre: *Citrus*

Espèce : *Citrus sinensis* L.



Figure 16. *Citrus sinensis* L.

I.8.3. *Cuminum cyminum*

Nom commun : Cumin

Noms scientifique : *Cuminum cyminum* L.

Le cumin est une plante herbacée annuelle de la famille des *Apiacées*, d'une hauteur de 30 cm (Vican, 2001), à feuilles parfumées, finement divisées, ombelles de petites fleurs blanches ou roses en été (Bremness, 2002). Le fruit est fusiforme, d'une couleur jaune clair, qui devient plus foncée au contact de l'air, velu, strié variant du vert au gris-brun (Bremness, 2002; Saha *et al.*, 2016), d'une odeur aromatique et un goût épicé et amer (**Figure 17**). Il est considéré comme l'une des épices les plus importantes et se classe le deuxième après le poivre noir. Il est utilisé comme épice pour son effet aromatique spécial, communément dans les cuisines de l'Inde, du Pakistan, de l'Afrique du Nord, du Moyen-Orient, du Sri Lanka, de Cuba, du nord du Mexique et de la Chine occidentale.

Le cumin est connu pour ses propriétés stimulantes, diurétiques, emménagogues, antispasmodiques et astringentes (Thippeswamy et Naidu, 2005). Il est également utilisé dans le traitement de la diarrhée, de la dyspepsie et de la jaunisse (Sultana *et al.*, 2006). Il a été signalé avoir des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes (Shahidi *et al.*, 2000; Hajlaoui *et al.*, 2010 ; Khosravi *et al.*, 2011; Naveen *et al.*, 2011; Mohammadpour *et al.*, 2012).

I. 8.3.1. Classification

D'après Quezel et Santa (1963), la classification de *C. cyminum* L.

Règne : Végétale

Embranchement : Spermaphytes

Classe : Dicotyledones

Ordre : Apiales

Famille : Apiaceae

Genre : *Cuminum*

Espèce : *Cuminum cyminum* L.



Figure 17. *Cuminum cyminum* L.

I.8.4. *Coriandrum sativum*

Nom commun : coriandre

Noms scientifique : *Coriandrum sativum* L.

La coriandre est une plante annuelle élancée, ramifiée, mesurant généralement en floraison de 30 à 60 cm mais pouvant atteindre 1,40 m. Le feuillage et la tige sont verts ou vert clair tirant parfois sur le rouge ou le violet pendant la floraison, glabres, luisants (notamment les faces inférieures des feuilles) (Bhat *et al.*, 2014). L'inflorescence, blanche ou rose-mauve très pâle, est typique des *Apiacées* (Nadeem *et al.*, 2013)

Les fruits sont globuleux, parfois légèrement allongés, de 3 à 6 mm de diamètre. Les fruits frais sont verts et dégagent la même odeur que les feuilles. Ils deviennent beige, puis ocre-brun clair au cours de leur maturation et développent une odeur plus aromatique (**Figure 18**). Ce sont des schizocarpes constitués de deux méricarpes hémisphériques accolés, surmontés de ce qui reste du stylopode (parfois des styles) et des dents du calice, ne se séparant qu'une fois très secs (Emamghoreishi *et al.*, 2005).

Le coriandre est une plante originaire des régions méditerranéennes et du Moyen-Orient, cultivée pour son usage culinaire, aromatique et médicinal (Mildner-Szkudlarz *et al.*, 2009). Cette plante est d'importance économique puisqu'elle est utilisée comme agent

aromatisant dans les produits alimentaires, les parfums, les cosmétiques et les médicaments (Neffati *et al.*, 2011). Il a été démontré que l'HE et divers extraits de coriandre possèdent des propriétés antibactériennes, antidiabétiques, anticancéreuses, antimutagènes, antioxydantes et anti-radicalaires (Sreelatha *et al.*, 2009; Zoubiri et Baaliouamer, 2010).

I.8.4.1. Classification

La classification botanique de *C. sativum* L. d'après Quezel et santa (1963)

Règne : Végétale

Embranchement : Spermaphytes

Classe : Dicotyledones

Ordre : Apiales

Famille : Apiaceae

Genre : *Coriandrum*

Espèce : *Coriandrum sativum* L.



Figure 18. *Coriandrum sativum* L.

I.8.5. *Laurus nobilis*

Nom commun : Laurier

Noms scientifique : *Laurus nobilis* L.

Le laurier est un arbuste mesurant de 2 à 6 m et jusqu'à 15 m de haut, à tige droite et grise dans sa partie basse, verte dans le haut. Les feuilles de forme lancéolée, alternes, coriaces, à bord ondulé, sont vert foncé sur leur face supérieure et plus clair à la face inférieure. Elles dégagent une odeur aromatique quand on les froisse. Les fleurs, blanchâtres, groupées par 4 à 5 en petites ombelles, apparaissent en mars-avril. C'est une plante dioïque :

les fleurs mâles et femelles sont sur des pieds séparés. Le fruit est une petite drupe ovoïde, noir violacé et nue (Pariante, 2001).

Le laurier est la seule espèce représentant la famille *lauraceés* dans la région méditerranéenne d'où elle est originaire, y compris des pays tels que l'Algérie, le Maroc, l'Italie, l'Espagne, le Portugal, la Turquie et la France (Demir *et al.*, 2004; Barla *et al.*, 2007, Dias *et al.*, 2014 ; Snuossi *et al.*, 2016) (**Figure 19**). Il est largement utilisé comme agents de saveur pour la préparation des aliments (Camejo-Rodrigues *et al.*, 2003; Ouchikh *et al.*, 2011). Ses feuilles sont utilisées pour supprimer l'hypoglycémie, les infections fongiques et bactériennes, pour traiter l'éructation, flatulences et des problèmes gastro-intestinaux. Il présente également des propriétés anti-inflammatoires, anti-convulsivantes, antiépileptiques, antimicrobiennes et antioxydantes (Conforti *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2006; Ouchikh *et al.*, 2011; Ozcan *et al.*, 2010; Polovka et Suhaj, 2010; Speroni *et al.*, 2011; Chmit *et al.*, 2014 ; Djenane *et al.* 2015; Taoudiat *et al.*, 2018).

I.8.5.1. Classification

La classification botanique de *L. nobilis* L. d'après Quezel et santa (1963) :

Règne : Végétale

Embranchement : Spermaphytes

Classe : Dicotylédone

Ordre : Laurales

Famille : Lauraceae.

Genre : *Laurus*

Espèce : *Laurus nobilis* L.



Figure 19. *Laurus nobilis* L.

I.8.6. *Thymus capitatus*

Nom commun : Thym

Noms scientifique : *Thymus capitatus* L.

Le *Thymus capitatus* (L.) Hoffm. et Link a les caractéristiques suivantes : calice comprimé latéralement, fortement rétréci à son extrémité, en forme d'utricule, à dents serrées les unes contre les autres. Corolle de 8-10 mm, longuement saillante, plus de 2 fois plus longue que le calice. Arbrisseau rigide à feuilles linéaires ou linéaires - lancéolées ciliolées. Inflorescences en glomérules courts et très denses-rocailles-très rare (**Figure 20**).

Le thym est très utilisé en médecine traditionnelle sous plusieurs formes : les feuilles sont utilisées en infusion contre la toux, en décoction pour guérir les maux de tête, hypertension et gastrites, en usage externe comme cicatrisants et antiseptiques. L'HE est largement utilisée comme agents antiseptiques dans plusieurs domaines pharmaceutiques et comme aromatisants pour de nombreux types de produits alimentaires. Elle a déjà prouvé ses propriétés antibactériennes, antifongiques et antioxydants (Bounatirou *et al.*, 2007; Mkaddem *et al.*, 2010).

I.8.6.1. Classification

D'après Quezel et Santa (1963), la classification de *Thymus capitatus* L. est la suivante :

Règne : Végétale

Embranchement : Spermaphytes

Classe : Dicotylédone

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : *Thymus*

Espèce : *Thymus capitatus* L.



Figure 20. *Thymus capitatus* L.

II.1. Matériel végétal

L'ensemble du matériel végétal a été récolté de différentes régions de l'Algérie durant la période allant de Mars-Juin 2015. L'identification botanique des différentes espèces a été réalisée au Département de botanique (Ecole Nationale d'Agronomie, d'Alger). L'identité des espèces a été également confirmée selon les clés botaniques dans la "Flore d'Algérie" (Quezel et Santa, 1963). Le **Tableau VIII** comprend les stations de récolte, les familles botaniques et les noms scientifiques des plantes, ainsi que les parties utilisées.

Avant toute extraction, un prétraitement adéquat est effectué, certaines espèces ont été triées, séparées et séchées à l'ombre dans un endroit bien aéré, ensuite les parties végétales ont été bien conservées jusqu'à leur utilisation et d'autres ont été utilisées directement à l'état frais.

Tableau VIII. Présentation des espèces étudiées

Espèce	Localité	Site de collection	Partie utilisée	Dénomination usuelle de la plante	Famille	Date de prélèvement
<i>C. limon</i>	ITAF Boufarik	Blida	Ecorce	Citron	Rutacées	04.03.2015
<i>C. sinensis</i>	ITAF Boufarik	Blida	Ecorce	Orange douce	Rutacées	04.03.2015
<i>C. sativum</i>	Reghaia	Alger	Grains	Coriandre	Apiacées	09.04.2015
<i>C. cyminum</i>	Reghaia	Alger	Grains	Cumin	Apiacées	30.4.2015
<i>L. nobilis</i>	Mesghana	Tizi-Ouzou	Feuilles	Laurie	Lauracées	13.05.2015
<i>T. capitatus</i>	Mesghana	Tizi-Ouzou	Partie aérienne	Thym	Lamiacées	26.06.2015

II. 2. Extraction et caractérisation des huiles essentielles

II. 2.1. Hydrodistillation

Les HEs sont extraites du matériel végétal par hydrodistillation à la pression atmosphérique, à l'aide d'un appareil de type Clevenger (**Figure 21**) préconisé par la pharmacopée européenne (Pharmacopée Européenne, 1997).

Le procédé consiste à immerger la matière végétale (200 g) dans un bain d'eau distillée (800 ml à 1,3 L) selon la durée de la distillation, qui est de trois à six heures en fonction de la matière, 3 h pour *C. cyminum* (Kedia *et al.*, 2014; Naeini *et al.*, 2014), *L.*

nobilis; 4 h pour *C. limon*, *C. sinensis* (José Velázquez-Nuñez *et al.*, 2013), *C. sativum* (Prakash *et al.*, 2012), et 6 h pour *T. capitatus* (Tabti *et al.*, 2014).



Figure 21. Montage d'hydrodistillation.

Le mélange est porté à ébullition par un chauffe-ballon. Le réfrigérant sert à condenser la vapeur en distillat (hydrolat) et l'extraction débute lorsque les premières gouttes tombe dans le collecteur. Le distillat est séparé en deux phases: l'HE constitue la phase supérieure et l'eau la phase inférieure. L'HE se concentre alors dans la phase organique. La solution organique d'HE ainsi obtenue est séchée par du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) (Sigma-Aldrich, France) puis récupérée, pesée et conservée dans des vials opaques colorés en brun, hermétiquement fermés et stockés dans un endroit frais ($\sim 4\text{ }^\circ\text{C}$) à l'abri de la lumière pendant 3 mois avant d'être utilisés (Prakash *et al.*, 2012).

II. 2.2. Calcul du rendement en huile essentielle

Le rendement (Rdt) des extractions d'HEs a été défini comme étant le rapport entre la masse d'HE obtenue et la masse de matière végétale utilisée selon la formule suivante (AFNOR, 2000):

$$\text{RdtHE} = [M/M0] \times 100$$

Où:

RdtHE: rendement de l'extraction d'HE en %;

M: masse d'HE en gramme;

M₀: masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme.

II. 2.3. Étude analytique des huiles essentielles

II.2.3.1. Propriétés organoleptiques

Les différentes caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur) des HEs ont été répertoriées.

II. 2.3.2. Propriétés physico-chimiques

a. Mesure des indices physiques

Ces analyses ont été faites en conformité aux normes A.F.N.O.R. (2000). Quelques caractères physiques ont été déterminés à savoir la densité, l'indice de réfraction, et deux indices chimiques en l'occurrence l'indice d'acide et l'indice d'ester.

❖ Indice de réfraction

L'indice de réfraction est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'HE maintenue à une température constante de 20 °C. Il a été déterminé par la lecture directe à l'aide d'un réfractomètre. L'indice de réfraction n_d^{20} à la température de référence a été donné par la relation suivante:

$$n_d^{20} = n_d^t + 0.0004 \cdot (t - t')$$

Où:

t = 20 °C

n_d^t : Valeur obtenue à la température **t**

❖ Densité relative

La densité relative à 20 °C d'une HE est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile à la masse d'un égal volume d'eau distillée. La densité relative a été donnée par l'expression:

$$d_{20}^{20} = \frac{m_e - m_0}{m_1 - m_0}$$

Où:

m_e: masse du pycnomètre rempli d'HE;

m₀: masse du pycnomètre vide;

m₁: masse du pycnomètre rempli d'eau distillée.

b. Mesure des indices chimiques

❖ Indice d'acide

L'indice d'acide est le nombre de milligrammes (mg) d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'HE. D'où, dans un ballon, la prise d'essai a été introduite et 5 ml d'éthanol (Sigma-Aldrich, France) et 5 gouttes de solution de phénolphaléine (Sigma-Aldrich, France) ont été ajoutées. Le liquide a été neutralisé avec la solution éthanolique de KOH (0,1 mole/l) contenue dans une burette, jusqu'à obtention d'une couleur rose. Le ballon et son contenu ont été réservés éventuellement pour la détermination de l'indice d'ester. L'indice a été donc donné par la formule:

$$IA = 5,61 V / m$$

Où:

5,61: correspond à 0,1mole/l de KOH;

V: volume en ml de la solution de KOH utilisée;

m: masse en g de la prise d'essai.

❖ Indice d'ester

Dans le ballon contenant la solution provenant de l'indice d'acide, 25 ml d'une solution de KOH ont été ajoutés à 0,5 mol/l, puis le réfrigérant a été adapté, placé sur le chauffe ballon et laissé chauffer pendant une heure. Après avoir été refroidis, 20 ml d'eau et 5 gouttes de la

solution de phénolphtaléine ont été ajoutés à 0,2%. L'excès de KOH a été titré avec la solution d'acide chlorhydrique (0,5 mol/l); parallèlement, un essai à blanc a été effectué dans les mêmes conditions, en remplaçant la solution provenant de l'indice d'acide par 5 ml d'éthanol. L'indice d'ester a été calculé par la formule:

$$IE = 28,05/m (V_0 - V_1)$$

Où:

28,05: correspond à 0,5mol/l de KOH;

V₀: volume en ml, de la solution d'acide chlorhydrique utilisé pour l'essai à blanc;

V₁: volume en ml, de la solution d'acide chlorhydrique utilisé pour la détermination de l'indice;

m: masse en grammes, de la prise d'essai.

II.2.4. Analyse par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/SM)

II. 2.4.1. Analyse en GC/MS

Les spectres de masse des composés volatils ont été obtenus sur un spectromètre de masse à quadripôle et ionisation par bombardement électronique Agilent couplé à un chromatographe Agilent doté d'un injecteur automatique. Les informations concernant le type de colonne, le détecteur et les réglages du CG/SM sont résumées dans le **Tableau IX**.

Tableau IX. Conditions opératoires des analyses GC/MS

Composant	Particularité et température
CG/SM	
Agilent	HP 6850 et 7890
Injecteur	250 °C
Volume injecté	2 µl dans l'hexane
Gaz vecteur	Hélium, 1,0 ml/min
Colonne	Capillaire, DB-5
Dimension de la colonne	30 m, 0,25 mm, 0,25 µm
Gradient	60 → 3 °C/min → 245 °C (4 min)
Ionisation	Impact électronique à 70 eV
Balayage automatique	50-550 amu
Source d'ion	230 °C
SM, quadripole	150 °C

II. 2.4.2. Identification des composés volatils

L'identification des composés volatils a été faite par CG/SM après une séparation des échantillons sur colonne capillaire apolaires (5DB). Le nom d'une molécule a été trouvé en comparant les spectres de masse (SM) obtenus avec la bibliographie notamment Adams (2007) en parallèle avec l'utilisation des indices de rétention (IR). Ces IRs ont été calculés sur les deux types de colonne apolaire et polaire en utilisant les temps de rétention (TR) des alcanes d'un mélange de *n*-alcanes (C8-C27) analysé dans les mêmes conditions chromatographiques (van Den Dool et Kratz, 1963) selon l'équation suivante:

$$IR = 100 \times Z + 100 \times n [(tRS - tRZ) / (tR(Z + n) - tRZ)]$$

Où:

tRS: temps de rétention absolu du soluté étudié;

tRZ: temps de rétention absolu de l'alcane à Z atomes de carbone qui précède le soluté;

tR(Z + n): temps de rétention absolu de l'alcane à (Z + n) atomes de carbone qui suit le soluté;

n: différence du nombre d'atome de carbone entre les deux alcanes (généralement n = 1).

Lorsque nous disposons des standards commerciaux purs, nous avons vérifié que le TR, l'IR et le SM du standard pur correspondaient bien, respectivement, au TR, IR et SM du composé à identifier.

II.3. Tests biologiques

II.3.1. Matériel fongique

La souche aflatoxinogène *Aspergillus flavus* NRRL 62477 (E73) qui nous a été fournie aimablement par l'Institut National Polytechnique de Toulouse (France) a été utilisée comme souche test pour le déroulement des travaux de la présente thèse. Certaines autres moisissures d'intérêt alimentaire ont été aussi utilisées, à savoir: *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus tamari*, *Aspergillus terreus*, *Fusarium* sp, *Penicillium* sp, *Rhizopus* sp qui nous ont été fournies par le Laboratoire de recherche sur les produits bioactifs et la valorisation de la biomasse de l'Ecole Nationale Supérieure de Kouba, Alger (**Annexe II**).

II.3.2. Milieux de culture

- Milieu CAM (Coconut Agar Medium) (Sigma-Aldrich, France).
- Milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Sigma-Aldrich, France).
- Milieu MEA (Malt Extract Agar) (Sigma-Aldrich, France).
- Milieu (G25N) (Glycerol Nitrate Agar) (Sigma-Aldrich, France).
- Milieu CYA (Czapek, Yeast, Agar) (Sigma-Aldrich, France).
- Milieu AFPA (*Aspergillus flavus* et *parasiticus* Agar) (Sigma-Aldrich, France).
- Milieu SMKY (Sucrose - Magnesium sulphate - potassium nitrate - Yeast extract) (Sigma-Aldrich, France).
- Milieu DRBC (Dichloran Rose Bengale Chloramphenicol Agar) (Sigma-Aldrich, France).

La composition chimique de ces milieux est mentionnée en **Annexe I**.

II.3.3. Identification de l'espèce d'*A. flavus* E73

a. Identification du genre

❖ Identification macroscopique

L'observation des colonies développées de cette souche, s'est faite tout d'abord à l'œil nu dans le but de déterminer s'il s'agit d'un *Aspergillus* en fonction des caractères morphologiques du mycélium. La souche *A. flavus* a été repérée visuellement à la surface de la gélose par sa forme et sa couleur caractéristique.

❖ Identification microscopique

L'observation microscopique s'est basée sur le mode de groupement des conidies (spores), le mode de conidiophore et de l'agencement des cellules conidiogènes.

❖ Préparation microscopique à l'aide d'un ruban adhésif transparent

Consiste à effectuer le prélèvement à l'aide d'un morceau de ruban adhésif transparent qui a été plaqué légèrement à la surface de la culture, puis collé sur une lame de microscope, l'observation microscopique a été faite au grossissement $\times 10$ et $\times 40$.

II.3.3.2. Identification de l'espèce

L'espèce appartient au genre *Aspergillus* a été identifiée par la méthode de single spore sur trois milieux: MEA à 25 °C, G25N à 25 °C et CYA à 37 °C. La couleur des colonies est rapportée après une et deux semaines de croissance. L'identification de l'espèce a été réalisée selon le guide Pitt et Hocking (2009).

a. Confirmation sur milieu AFPA

Ce milieu confirme l'appartenance au groupe *A. flavus* et *A. parasiticus*. Dans ce milieu la couleur du revers de la colonie est jaune-orange après une incubation de 5 à 7 jours à 28 ± 2 °C.

II.3.4. Test de confirmation du pouvoir aflatoxinogène de la souche

Deux milieux de culture ont été utilisés dans cette expérimentation. Le milieu CAM et le milieu SMKY.

a. Étude du pouvoir aflatoxinogène sur milieu de culture solide

La souche fongique a étéensemencée par point central sur milieu gélosé à base d'extrait de noix de coco déchiqueté (CAM), favorable à la production d'aflatoxines (Fente *et al.*, 2001). Après 48 à 72 h d'incubation à 28 °C, la souche productrice d'AFB₁ a développé une fluorescence bleue visible sous UV (365 nm) et un revers de la colonie jaune orangé visible à la lumière du jour. En vue d'une confirmation de la production d'AFB₁, la culture de cette souche fongique a subi une extraction au méthanol (Sigma-Aldrich, France). Trois rondelles de 6 mm de diamètre de milieu colonisé par le mycélium ont été découpées, puis introduites dans un tube Eppendorf de 2 ml, l'extraction de l'aflatoxine a été réalisée par l'addition de 1 ml de méthanol. Après incubation pendant une heure à température ambiante et à l'abri de la lumière, le mélange a été centrifugé pendant 10 minutes à 12000 tours /min et, le surnageant a été aspiré à l'aide d'une micropipette puis injecté dans un autre tube Eppendorf. Par la suite, la production d'aflatoxine a été confirmée par chromatographie sur couche mince (CCM) selon Calvo *et al.* (2004), où un volume de 50 µl d'échantillon est spoté sur plaque CCM, espacée de 2 cm. Le développement des chromatogrammes a été effectué dans une cuve standard (20 × 20 cm) préalablement saturée avec le système de solvant de développement Toluène/Alcool iso-amylque/Méthanol (90:32:2; v/v/v) (Sigma-Aldrich,

France). Après migration, les plaques ont été retirées et séchées. Les aflatoxines ont été détectées en plaçant les plaques sous lumière UV (365 nm). L'AFB₁ apparaît sous forme de tache bleue. L'intensité de la fluorescence des taches a permis de confirmer la présence d'aflatoxine.

b. Étude du pouvoir aflatoxinogène sur milieu de culture liquide

La méthode consiste à cultiver la souche *A. flavus* (rondelles) dans 25 ml du milieu liquide SMKY, après une période d'incubation de 10 jours à 28 ± 2 °C. L'extrait a été filtré sur papier filtre Whatman N° 1 (Sigma-Aldrich, Allemagne). Le filtrat a été extrait par 25 ml de chloroforme (Sigma-Aldrich, France). Après agitation, puis une décantation, la phase chloroformique inférieure a été récupérée et évaporée à sec à la température de 50 °C dans un évaporateur rotatif. Le résidu a été solubilisé dans 1 ml de chloroforme (Mishra *et al.*, 2013). Ensuite, la production d'aflatoxine a été confirmée par CCM en suivant les mêmes étapes de la **section 3.4.1**.

II.4. Préparation de l'inoculum

Les spores des jeunes cultures (cultures de 7 jours) de chaque souche ont été récupérées par un lavage des boîtes de Pétri, avec un volume de 10 ml d'une solution stérile de Tween-80 à 0,1% (v/v) (Sigma-Aldrich, France). La suspension a été ensuite filtrée à travers un tissu mousseline stérile entreposé sur un entonnoir stérile et, le filtrat récupéré représente l'inoculum. À 1 ml de la suspension de spores préalablement agitée, 9 ml d'eau Tweenée ont été ajoutés, la solution mère ainsi obtenue permet de préparer la gamme étalon. Le nombre de spores dans chaque dilution a été déterminé grâce à un comptage à l'aide de la cellule de Mallassez. La courbe d'étalonnage a été établie par la mesure de la densité optique (DO) de chaque dilution à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 625 nm en fonction du nombre de spores comptées sur la cellule (**Annexe III**).

Avant chaque inoculation, le nombre de spores a été estimé par référence à la courbe d'étalonnage. La suspension a été diluée de manière à obtenir un nombre de spores de 1×10^6 /ml.

II.5. Activité antifongique *in vitro* des huiles essentielles

L'évaluation de l'activité des HEs sur la croissance mycélienne de la souche test a été réalisée en utilisant la technique de contact direct. La méthode utilisée pour tester la sensibilité

de la souche fongique vis-à-vis des différentes HEs est celle de Singh (2008) et José Velázquez-Nuñez *et al.* (2013).

La difficulté rencontrée pour l'utilisation des HEs dans des milieux aqueux à cause de leur caractère hydrophobe. Des tests préliminaires ont été effectués sur le choix de l'émulsifiant: le méthanol, l'acétone (Sigma-Aldrich, Allemagne), l'éthanol (Sigma-Aldrich, France) et diméthyl sulfoxyde (DMSO) (Sigma-Aldrich, Allemagne). Les résultats obtenus ont révélé que le DMSO permet une très bonne dispersion des HEs et l'homogénéité du mélange.

La solution HE/DMSO (3%) obtenue a été incorporée au milieu gélosé de manière à obtenir les concentrations suivantes: 0,25; 0,5; 0,75; 1,00; 1,25; 1,5; 1,75; 2,00 mg/ml de milieu PDA. Le milieu ainsi supplémenté a été coulé dans des boîtes de Pétri à raison de 15 ml par boîte. Après solidification, 10 μ l de la suspension fongique (1×10^6 spores/ml) ont été déposés au centre du milieu de culture. Le témoin a été préparé sans HE. L'ensemble a été incubé dans une étuve à la température de 28 ± 2 °C (**Figure 22**).

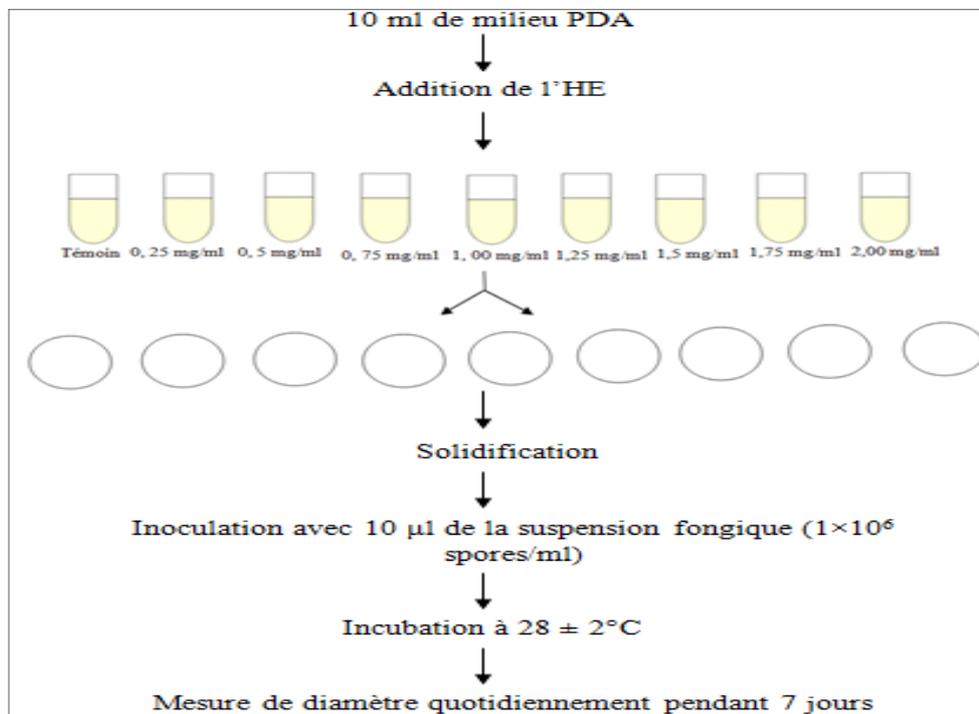


Figure 22. Schéma du test de l'activité antifongique des HEs sur *A. flavus*.

La croissance mycélienne est suivie en mesurant le diamètre suivant deux droites perpendiculaires au centre. Les mesures ont été faites quotidiennement pendant 7 jours. La

comparaison des dimensions obtenues avec celles des témoins a permet de calculer le pourcentage d'inhibition (I%) selon la formule suivante (Albuquerque *et al.*, 2006):

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

Dont:

D_{essai}: le diamètre de la zone de la croissance de l'essai en cm;

D_{témoin}: le diamètre de la zone de la croissance du témoin.

II.5.1. La fungitoxicité des huiles essentielles

L'étude de la nature d'inhibition des différentes HEs a été réalisée pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI), et les concentrations minimales fongicides (CMFs).

II.5.1.1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et fongicides (CMF)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) et fongicide (CMF) de chaque HE a été déterminée suivant la méthode de dilution en milieu liquide rapportée par Shukla *et al.* (2008). Dix (10) μ l de la suspension fongique (1×10^6 spores/ml) à tester ont été inoculés dans des tubes à essai contenant 10 ml du milieu liquide SMKY à différentes concentrations de l'HE (0,25; 0,5; 0,75; 1,00; 1,25; 1,5; 1,75; 2,00 mg/ml). Des tubes témoins contenant le milieu de SMKY, ont été inoculés seulement avec la suspension fongique. L'ensemble a été homogénéisé et incubé à 28 ± 2 °C pendant 7 jours. Après incubation, l'observation de la gamme a permet d'accéder à la CMI, qui correspond à la plus faible concentration en HE capable d'inhiber la croissance du microorganisme (Djenane *et al.*, 2012; Tatsadjieu *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2011).

Les tubes qui ont montrés une inhibition totale ont été réensemencés dans des boites qui contiennent 10 ml du milieu de culture PDA. Lorsqu'il y a une reprise de la croissance mycélienne, la concentration est dite fongistatique (CMFs) (Bajpai *et al.*, 2010). En revanche, s'il n'y en a plus, elle est appelée fongicide (CMFc) (Shukla *et al.*, 2012).

II.6. Test d'inhibition de la production des aflatoxines B₁

La quantité des AFB₁ produite en milieu SMKY par la souche toxigène a été mesurée par la méthode chromatographique sur couche mince, sur gel de silice et dosage du pouvoir absorbant à la longueur d'onde de 360 nm, suivant la méthode rapportée par Mishra *et al.* (2013) (**Annexe II**).

II.6.1. Test anti-aflatoxinogène

Des Erlen-Meyer de 100 ml contenant chacun 25 ml de milieu liquide SMKY, additionné de différentes concentrations de l'HE (0,25; 0,5; 0,75; 1,00; 1,25; 1,5; 1,75; 2,00 mg/ml), ont étéensemencés chacun avec 50 µl de suspension fongique (1×10^6 spores/ml). Le milieu SMKY sans HE a été utilisé comme contrôle négatif. Les cultures ont été incubées à 28 ± 2 °C en agitation continue ~ 150 rpm dans un shaker pendant 10 jours. Après incubation, les mycéliums produits dans les cultures liquides ont été retirés par filtration et lavage sur un papier filtre Whatman N°1. Le poids du mycélium (mg) a été déterminé après étuvage à 80°C pendant 12 h en utilisant la formule d'Imtiaj et Lee (2007):

$$P = P_1 - P_0$$

Dont:

P₀: poids du papier filtre en;

P₁: papier filtre et le matériel fongique après étuvage.

L'AFB₁ a été extraite deux fois à partir du filtrat avec 25 ml dans une ampoule à décanter. Après agitation, le mélange a été laissé reposer pendant toute la nuit. La phase chloroformique a été récupérée et évaporée à sec à la température de 50 °C dans un évaporateur rotatif. Le résidu a été solubilisé dans 1 ml de chloroforme.

Les plaques de gel de silice ont été préparées après mélange de 25g de gel de silice HF254 (Fluka, Allemagne) dans 60 ml d'eau distillée dans un Erlen-Meyer de 250 ml. Après une forte agitation, la pâte a été étalée de manière uniforme sur des plaques en verre propres en utilisant l'étaleur de Desaga réglé de manière à obtenir une couche de 0,25mm d'épaisseur. Les plaques ont été séchées à 40 °C pendant une nuit et régénérées à 105 °C juste avant d'être utilisées.

À l'aide d'une microseringue, des aliquotes de 50 µl de l'extrait aflatoxine ont été déposés sur la plaque sous forme de spots par petites fractions. Le standard d'AFB₁ a été spoté au même temps que les échantillons. Les plaques ont été ensuite placées dans une cuve de chromatographie dont l'atmosphère a été préalablement saturée avec le système solvant d'éluion Toluène/Alcool iso-amylque/Méthanol (90:32:2; v/v/v).

Après développement, les plaques ont été séchées sous hotte aérée toute la nuit, afin d'éliminer toute trace du solvant. Les chromatogrammes ont été ensuite observés sous lumière ultra-violette (UV) pour localiser les taches présentant une absorbance à 365 nm. Les taches fluorescentes ont été grattées, dissous dans 5 ml de méthanol; la solution obtenue a été centrifugée à 3000 g pendant 5 min. L'absorbance du surnageant a été effectuée dans un spectrophotomètre UV-Visible à 360 nm. La concentration de l'AFB₁ a été calculée par la formule selon Singh *et al.* (2008):

$$[\text{AFB}_1] \text{ en } \mu\text{g/ml} = [(D \times M)/(E \times L)] \times 1000$$

Dont:

D: absorbance;

M: poids moléculaire de l'aflatoxine (312 g/mol);

E: coefficient d'extinction molaire (21, 800 l/mole/ cm);

L: longueur du trajet optique (cellule de 1 cm).

En outre, l'inhibition de l'AFB₁ a été calculée comme suite (Tian *et al.*, 2012):

$$\text{I\%} = (1 - X/Y) \times 100$$

Où:

X (µg/ml): concentration de l'AFB₁ dans le traitement;

Y (µg/ml): concentration moyenne de l'AFB₁ dans témoin.

II.7. Spectre fongitoxique des huiles essentielles contre certaines moisissures d'intérêt alimentaire

La concentration minimale inhibitrice (CMI) et celle minimale fongicide (CMF) des HEs ont été déterminées en utilisant la méthode du milieu liquide SMKY contre neuve moisissures dominant à savoir *A. carbonarus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. ochracus*, *A. tamari*,

A. terreus, *Fusarium* sp, *Penicillium* sp, *Rhizopus* sp en suivant les mêmes étapes de la section 5.1.1.

II.8. Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles

II.8.1. Evaluation de l'activité de piégeage du radical libre par la méthode de DPPH

Ce test vise à mesurer la capacité de l'huile à piéger le radical relativement stable, 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]). Le piégeage de ce radical provoque un changement de couleur de la solution initiale du violet foncé au jaune suite à la réaction de sa réduction (diphényl-picrylhydrazine) (**Figure 23**).

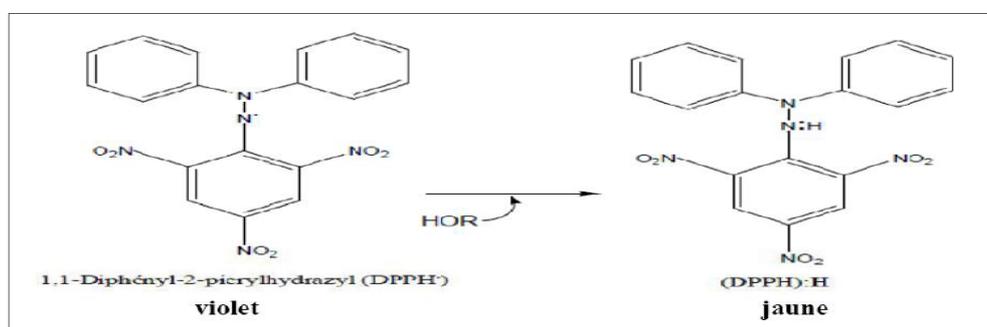


Figure 23. Réaction d'un donneur d'hydrogène (antioxydant) avec le radical DPPH[•]

Selon Brand-Williams *et al.* (1995), à 5 ml d'une solution méthanolique de DPPH fraîchement préparée (0,004%) (Sigma-Aldrich, Allemagne), 50 µl de diverses concentrations de chaque HE et de standard, Butyl-hydroxytoluène (BHT) (Sigma-Aldrich, France) (100 - 1000 µg/ml) ont été ajoutés. Les mélanges ont été agités au vortex et incubés dans l'obscurité à température ambiante pendant 30 min. La disparition du radical DPPH[•] a été suivie par spectrophotométrie à 517 nm contre un blanc (solution de méthanol) à l'aide d'un spectrophotomètre. Le pourcentage d'inhibition (I%) du radical a été calculé avec la formule suivante:

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

Où:

A_{blanc}: absorbance de la réaction de contrôle contenant tous les réactifs sauf l'huile;

A_{échantillon}: absorption de l'échantillon contenant une dose d'HE testée.

D'après Djenane *et al.* (2019a, b), la valeur de la concentration inhibitrice IC₅₀ représente la dose de l'HE qui cause la neutralisation de 50% des radicaux de DPPH. L'IC₅₀,

utilisée comme une estimation de l'activité antioxydant, a été estimée par extrapolation en traçant la courbe des pourcentages d'inhibition (I%) en fonction des concentrations.

II.8.2. Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode β -carotène/acide linoléique

C'est l'une des méthodes complémentaires utilisées pour le criblage de substances antioxydantes. Elle est basée sur le principe que l'acide gras insaturé (acide linoléique) qui s'oxyde spontanément en présence des espèces réactives de l'oxygène "Reactive Oxygen Species" (ROS). Alors, les produits de réaction déclenchant la transformation du β -carotène en sa forme incolore. Le degré de décoloration est mesuré par spectrophotométrie pour une estimation de l'activité antioxydante. La méthode utilisée est celle décrite par Miraliakbari and Shahidi (2008). Une solution stock de mélange émulsion β -carotène/acide linoléique (Sigma-Aldrich, France) a été préparée comme suit: 0,5 mg de cristaux de β -carotène a été dissous dans 1 ml de chloroforme et 1 ml de cette solution a été transféré dans un ballon contenant 25 μ l d'acide linoléique et 200 μ l de Tween-40. Après l'élimination complète de chloroforme par évaporation, 100 ml d'eau distillée enrichie en oxygène a été ajoutée sous agitation vigoureuse. Des aliquotes de 2,5 ml de ce mélange ont été transférés dans une série de tubes à essai contenant 350 μ l d'HE diluée dans le DMSO (concentration finale de 2 g/l). Après une agitation vigoureuse, les tubes ont été incubés à 50 °C pendant 2 h. L'échantillon négatif a été préparé en remplaçant l'HE par le DMSO. L'absorbance a été finalement mesurée à 470 nm contre un blanc (émulsion sans β -carotène). Les activités antioxydantes (I%) ont été calculées en utilisant la formule suivante (Shukla *et al.*, 2012):

$$I\% = (A_t/A_0) \times 100$$

Où:

A₀: absorbance respective de l'échantillon et du contrôle à t = 0 min;

A_t: absorbance respective de l'échantillon et du contrôle à t = 2 h.

II.9. Test de phytotoxicité et *in vivo* des huiles essentielles

II.9.1. Blé

Dans cette étude deux variétés de blé tendre (*Triticum aestivum*) ont été utilisées; AS 81189 A (Ain Abid) et HD 1220 (Hiddab). Les échantillons de blé ont été récoltés au champ,

pendant le stockage dans les silos en 2016; un poids déterminé de chaque variété (7,5 Kg) a été placé dans un sachet stérile et amené au laboratoire pour être analysé (**Tableau X**).

Tableau X. Sites de collecte et principales caractéristiques écologiques des deux variétés de blé.

Variété de blé	Localité	Site de collection (Silo)	Coordonnées géographiques		
			Latitude N	Longitude E	Altitude (m)
-AS 81189 A (Ain Abid) et HD1220 (Hiddab)	Alger	Dar El Baida	36°42'51''	3°12'45''	17

II.9.2. Détermination du taux d'humidité relative du blé

Le taux d'humidité relative (HR) de l'échantillon a été déterminé par la méthode de Mandeel (2005), en introduisant 30 g d'échantillon ($P_{éch.}$) broyés dans une coupelle tarée (t), elle-même positionnée dans une étuve réglée à 100 °C. L'échantillon a été ensuite pesé avec précision toutes les vingt-quatre heures, après avoir été refroidi à température ambiante dans un dessiccateur, et ce jusqu'à obtention d'un poids constant (P_f). L'humidité relative a été calculée selon la relation suivante:

$$HR\% = (P_{éch.} - P_f) / (P_{éch.} - t) \times 100$$

Où:

HR%: humidité relative en pourcentage;

$P_{éch.}$: poids de la prise d'essai avant l'étuvage;

P_f : poids de la prise d'essai après l'étuvage;

t : poids taré de boîte de Pétri.

La mesure de l'HR% est le résultat de la moyenne de trois essais de chaque échantillon.

II.9.3. Test de phytotoxicité

II.9.3.1. Tests préliminaires de germination

Dans le but d'obtenir des taux maximums de germination et de choisir une durée moyenne pour les tests de germination, des tests préliminaires de germination ont été réalisés. Toutes les graines des deux variétés ont été soumises à ces tests. Deux boîtes de Pétri pour chaque variété ont été utilisées, 10 ml d'eau distillée ont y été introduits. Ensuite, 10 graines de chaque variété ont été déposées sur le papier filtre humide dans chaque boîte. Les graines

ont été incubées dans une étuve à 23 ± 2 °C et, la germination des graines a été suivie chaque jour à la même heure. La durée d'incubation était de 10 jours. Au 8^{ème} jour d'incubation, toutes les graines germées ont développé une radicule et une tigelle. Après cette durée d'incubation nous avons remarqué qu'il n'y a plus de germination et que les racines ont commencé à se dessécher et certaines d'entre elles, ont présenté des longueurs importante et se chevauchent. Ces tests préliminaires ont permis aussi de déterminer la durée des tests finaux de germination (8 jours) (**Annexe II**).

II.9.3.2. Tests finaux de germination

La phytotoxicité des HEs a été déterminée en termes de germination de deux variétés des graines de blé tendre par rapport au témoin, avec la même méthode décrit par Kordali *et al.* (2008) appliquée sur des semis de pois chiche. Les graines ont été stérilisées avec d'hypochlorite de sodium (1%) pendant 5 min pour éviter toute contamination microbienne et ensuite rincées trois fois avec de l'eau distillée stérile. Les graines ont été ensuite déposées dans de l'eau distillée stérile pendant 1h. Les graines vides et non développées qui flottaient dans l'eau distillée stérile ont été écartées.

Deux couches de papier filtre humidifié avec 10 ml d'eau distillée ont été placées au fond de chaque boîte de Pétri. Par la suite, 50 graines de choix ont été placées sur le papier filtre. 10 µl de chaque HE a été laissé s'égoutter sur papier filtre Whatman N° 1 placé sur le couvercle à l'aide d'une micropipette. Les boîtes de Pétri ont été scellées avec du parafilm pour empêcher les vapeurs d'HE d'échapper en dehors des boites de Pétri puis incubées à 23 ± 2 °C. Des témoins ont été aussi préparés mais sans addition d'HE. Le taux de germination, la longueur de la radicule et de la tigelle ont été mesurées après le 8^{ème} jour.

a. Détermination des pourcentages de germination

Après 8 jours d'incubation, l'expérience a été arrêtée et le pourcentage de germination de chaque variété et dans chaque boîte a été déterminé. Le taux de germination correspond au pourcentage maximal de graines germées par rapport au total de graines semées, il a été estimé par la formule suivante:

$$\% = \frac{\text{Nombre des graine totales} - \text{Nombre des graines non germées}}{\text{Nombre des graine totales}} \times 100$$

b. Mesures des longueurs des radicules et des tigelles

Après avoir déterminé le nombre des graines qui ont germés dans chaque boîte, les longueurs de la radicule et de la tigelle ont été mesurées à l'aide d'un papier millimétré (Figure 24).



Figure 24. Mesure de la longueur de la radicule et de la tigelle d'une plantule traitée par HE.

II.9.4. Étude *in vivo* de l'effet des vapeurs des huiles essentielles sur le substrat

L'effet des vapeurs des HEs a été évalué selon la méthode préconisée par Prakash *et al.* (2012). Les graines de blé tendre de chaque variété ont été stérilisées avec une solution à 1% d'hypochlorite de sodium et rincées 3 à 5 fois avec l'eau distillée stérilisée. Un kilogramme de chaque variété a été conservé séparément dans des boîtes en plastique ayant un volume aérien de 2 l. Trois millilitre (3 ml) de suspension de spores ont été inoculés dans les échantillons de semences de chaque boîte à travers pulvérisation uniforme en utilisant la micropipette. Les échantillons de semences dans les boîtes en plastique ont été fumigés séparément avec les HEs à leurs valeurs de CMI. Les échantillons témoins ont été préparés en parallèle. Toutes les boîtes étanches à l'air ont été conservées et stockées pendant 6 mois à 28 ± 2 °C/61,91% RH (Annexe III). Après 6 mois de stockage, des analyses mycologiques ont été réalisées.

II.9.4.1 Analyse mycologique

Au cours de cette étude, la technique de suspension-dilution et ensemencement sur milieu gélosé a été utilisé. Le milieu utilisé est le DRBC. Ce milieu permet d'inhiber la

croissance des champignons envahissant et, de réduire la taille de mycélium de façon à mettre en évidence la plus part des champignons contaminant le produit analysé.

Les analyses mycologiques des échantillons ont été réalisées. Dix grammes (10 g) de chaque échantillon de graines ont été mis dans des flacons de 250 ml contenant 90 ml d'eau tweenée à 0,1% et homogénéisé par agitation de 15 min. Des dilutions décimales (10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4}) ont été réalisées à partir de la solution mère. Un millilitre (1 ml) de chaque dilution a été ensemençé sur la surface des boîtes de Pétri contenant 15 ml du milieu DRBC. L'incubation a lieu à $28 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 3 à 5 jours (**Figure 25**).

Le pourcentage de protection des graines dans les traitements a été calculé selon la formule proposée par Prakash *et al.* (2012):

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

Où:

% P: pourcentage de protection;

$D_{\text{témoin}}$: nombre total d'isolats d'*A. flavus* provenant d'échantillons de graines de témoin;

D_{essai} : nombre total d'isolats d'*A. flavus* à partir d'échantillons de graines les essais.

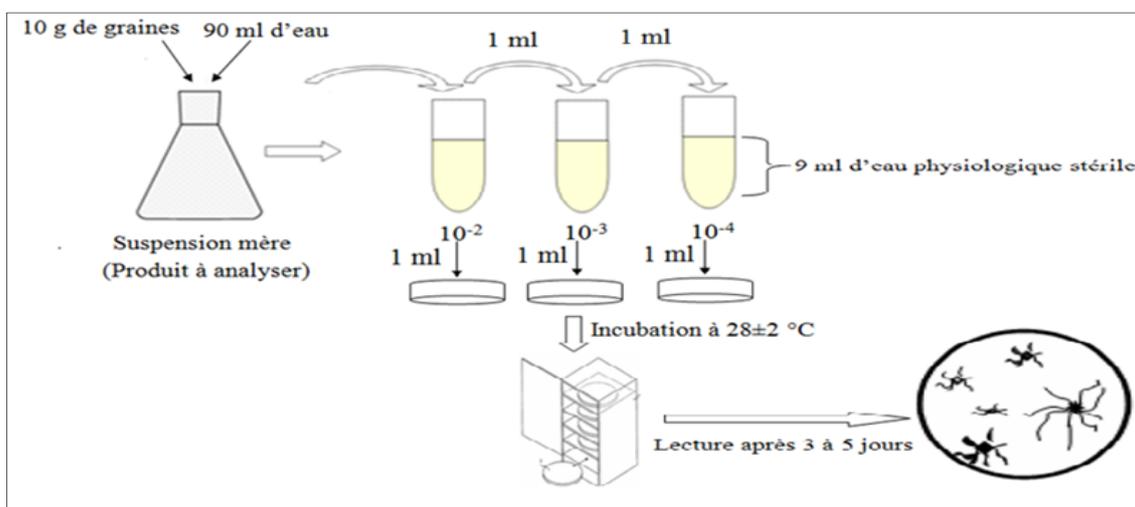


Figure 25. Étapes de dénombrement d'isolats d'*A. flavus* par étalement en surface.

II.10. Analyse statistique

Chaque expérience a été répétée trois fois, les valeurs sont représentées par la moyenne \pm écart type. Les résultats ont été analysés par le test ANOVA avec le logiciel STATISTICA version 6.1 (Stat Soft, Inc, France). Le niveau de signification a été fixé à $p < 0,05$.

III.1. Rendements en huile essentielle

Les rendements en HEs ont été calculés en fonction de la matière végétale sèche. Les valeurs obtenues représentent la moyenne des rendements d'extraction sur 3 extractions indépendantes. Les six plantes étudiées montrent des rendements variables, allant de 0,55% à 1,13% (p/p, poids sec). Ces derniers sont résumés dans le **Tableau XI**.

Les HEs de *C. limon* et *C. sinensis* ont donné des rendements de l'ordre de 0,62 et 0,55%, respectivement. Ces valeurs sont similaires à celles de Djenane (2015) pour les mêmes espèces (0,70 et 0,58%, respectivement) et par contre sont inférieures à celles signalées par Ahmad *et al.* (2006) et Sharma et Tripathi, (2008) concernant *C. limon* et *C. sinensis* (1,12 et 1,80%, respectivement). En outre, Rega *et al.* (2003) ont rapporté que les rendements en HEs chez les *Citrus* diffèrent selon l'espèce et ont signalé des rendements de 1 à 3%.

Les rendements obtenus pour les HEs de *C. cuminum* et *C. sativum* sont 1,08 et 0,7%, respectivement. Ces rendements sont comparables à ceux obtenus par d'autres auteurs. En effet, Ramy *et al.* (2010) ont indiqué que les rendements en HEs de *C. cuminum* et *C. sativum* étaient de l'ordre de 3,20 et 0,31%. Cependant, Benrejda *et al.* (2012) et Ravi *et al.* (2007) ont indiqué des rendements de 2,25 et 0,82%, respectivement.

Concernant, *L. nobilis* et *T. capitatus*, leurs rendements étaient de 1,13 et 0,82%, respectivement. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus pour Haddouchi *et al.* (2009) qui ont observé que le rendement de *L. nobilis* originaire de Tlemcen (Algérie) était de 1,2%. L'HE extraite de *L. nobilis* Iranien avait comme rendement 1,1% (Verdian-Rizi et Hadjiakhoondi, 2008). Cependant, le rendement de notre HE extraite à partir de laurier est plus élevé que celui de laurier originaire d'El Kala (Algérie): 1,3 vs. 0,6% (Ouibrahim *et al.*, 2013). Notre laurier a révélé un rendement inférieur par rapport à celui du Maroc: 1,3 vs. 2,5% (Yilmaz *et al.*, 2013). Concernant le rendement de l'huile de *T. capitatus* originaire de Tlemcen, Tabti *et al.* (2013) ont relevé un rendement de 0,52%. Par contre, Bounatirou *et al.* (2007) ont montré que le rendement en HEs de *T. capitatus* de Tunisie collecté dans divers localités pendant les différentes phases de développement, varie de 1% à 6%. L'HE de *T. capitatus* du Maroc a donné un rendement de 2,05% (El Ajjouri *et al.*, 2008).

Ces différences de rendement en HE peuvent être expliquées par les divers paramètres appartenant à deux catégories. Ceux intrinsèques qui correspondent aux espèces, aux organes

et à la maturité des plantes, ainsi qu'aux méthodes culturales, à la récolte, les interactions temporelles et environnementales (climat, sol, etc.) et, ceux extrinsèques comprenant l'extraction, le stockage et le conditionnement. Selon Vekiari *et al.* (2002), la période de récolte, l'organe de la plante, la durée de séchage et la méthode d'extraction sont des facteurs parmi d'autres qui peuvent aussi avoir un impact direct sur les rendements en HE.

Tableau XI. Variation des rendements d'extractions par hydrodistillation des HEs.

HE	Rendement (%)
<i>C. limon</i>	0,62 ± 0,13
<i>C. sinensis</i>	0,55 ± 0,05
<i>C. cyminum</i>	1,08 ± 0,15
<i>C. sativum</i>	0,70 ± 0,19
<i>L. nobilis</i>	1,13 ± 0,028
<i>T. capitatus</i>	0,82 ± 0,12

III.2. Caractéristiques organoleptiques et physico-chimiques des huiles essentielles extraites

La valeur commerciale d'une HE est estimée dans la plus part des cas par ses qualités organoleptiques (Aspect, odeur et couleur.) auxquelles s'ajoutent un certain nombre de constantes appelées indices. Ces constantes ont été normalisées au sein de certains organismes nationaux et internationaux (AFNOR, ISO) et aussi dans toutes les pharmacopées existantes.

Elles consistent à mettre au point les méthodes de détermination des critères physico-chimiques en fixant les conditions opératoires et les facteurs pouvant influencer la mesure, et en mettant au point des monographies pour les HEs les plus courantes avec indication détaillée de leurs caractéristiques. Outre leur facilité de mise en œuvre, ces méthodes permettent donc, d'évaluer la qualité d'une essence, de procéder à une analyse de routine, d'étudier l'évaluation dans le temps, et de comparer les échantillons entre eux. Chacun de ces composés de part leur volatilité dégage une odeur propre. Ainsi certaines plantes peuvent avoir une odeur similaire due à une molécule commune présente en quantité importante dans l'HE. Dans ces conditions, une fois le, ou les composés responsables d'une odeur identifié (s), si le caractère olfactif de ces composés s'avère intéressant, il serait alors rentable, selon le contexte économique, de produire des espèces végétales susceptibles de fournir une HE à

haute teneur moléculaire en composés recherchés (chémotype), et donc généralement de meilleure qualité (Nakahara *et al.*, 2003; Kanko *et al.*, 2004).

Comme les propriétés organoleptiques ne donnent qu'une idée fluctuante et fragmentaire d'une HE, le besoin d'une caractérisation plus précise s'est manifesté. Celle-ci a été obtenue par l'examen des propriétés globales de l'essence les plus facilement accessibles en particulier ses propriétés physico-chimiques.

III. 2.1. Caractéristiques organoleptiques

Les HEs extraites de plantes diverses ont présenté un aspect liquide, limpide et couleur jaune pâle pour *C. limon*, *C. sinensis*, *C. sativum* et *C. cyminum*, jaune pour *T. capitatus*, tandis que l'HE de *L. nobilis* a présenté un aspect liquide, limpide, mobile et incolore. Les HEs de *C. limon*, *C. sinensis* ont été caractérisées par une odeur caractéristique du zeste d'orange et du citron, alors que celles de *C. sativum* et *C. cyminum* étaient caractérisées par une odeur épicée, caractéristique. L'HE de *L. nobilis* a montré une odeur aromatique typique. L'HE de *T. capitatus* a présenté une odeur typique très forte. Le **Tableau XII** regroupe les différentes caractéristiques organoleptiques de toutes ces HEs.

Tableau XII. Caractéristiques organoleptiques des HEs étudiées.

Nom de la plante	Aspect	Odeur	Couleur
<i>C. limon</i>	Liquide limpide	Caractéristique	Jaune pâle
<i>C. sinensis</i>	Liquide limpide	Caractéristique	Jaune pâle
<i>C. sativum</i>	Liquide limpide	Épicée, caractéristique, désagréable	Jaune pâle
<i>C. cyminum</i>	Liquide limpide	Épicée, caractéristique : anisée et amère	Jaune pâle
<i>L. nobilis</i>	Liquide Limpide mobile	aromatique, agréable	Incolore
<i>T. capitatus</i>	Liquide Limpide	chaude	Jaune

III. 2.2. Caractéristiques physico-chimiques

Des critères physiques ont été déterminés à savoir la densité, l'indice de réfraction, et deux indices chimiques en l'occurrence l'indice d'acide et l'indice d'ester. Ces caractéristiques physico-chimiques constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'HE. Les caractéristiques physico-chimiques des huiles sont reportées dans le **Tableau XIII**.

Les valeurs des densités relatives ($D/20\text{ }^{\circ}\text{C}$) se sont limitées entre 0,838 et 0,934, la norme AFNOR (2000) préconise une densité comprise entre 0,906 pour les huiles de faible qualité et 0,990 pour les huiles de très haute qualité. Les normes AFNOR fixent aussi à 0,925, une densité en-dessous de laquelle l'huile est considérée de qualité III (3^{ème} catégorie).

Les indices de réfraction /20 °C obtenus se sont limités à 1,467-1,499, ce sont des valeurs révélatrices de la bonne qualité d'une HE. En effet, la norme AFNOR (2000) prévoit un indice de 1,495 pour les huiles de haute qualité et 1,513 pour les huiles de moindre qualité.

Pour une meilleure qualité, une HE doit être caractérisée par un indice d'acide (IA) inférieur. Nos HEs sont caractérisées par des IAs variant entre 2,28 et 5,29, considérés relativement élevés. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que les HEs ne sont pas fraîchement utilisées (3 mois de stockage). En réalité, une HE fraîche contient très peu d'acides libres selon AFNOR (2000) (entre 0,924 et 2,137). Et enfin, la dernière propriété physico-chimique déterminée, c'est l'indice d'ester (IE). Plus l'indice d'ester est élevé, mieux est la qualité d'une HE. Nos HEs ont révélé des IE variant entre 13,46 et 52,40. La norme AFNOR (2000) prévoit des IE variant entre 14,28 et 82,39. La détermination des propriétés physico-chimiques est une étape nécessaire mais non suffisante pour caractériser les HEs. Il est donc nécessaire de la compléter par une analyse chromatographique CG/SM, cette dernière, souvent utilisée comme moyen analytique complémentaire pour l'analyse structurale des substances volatiles.

Tableau XIII. Caractéristiques physico-chimiques des HEs étudiées.

Nom de la plante	D/20 °C	indices de réfraction /20 °C	IA	IE
<i>C. limon</i>	0,838 ± 0,016	1,477 ± 0,001	5,29 ± 0,034	13,46 ± 0,56
<i>C. sinensis</i>	0,850 ± 0,015	1,474 ± 0,003	3,03 ± 0,048	18,98 ± 0,70
<i>C. sativum</i>	0,864 ± 0,014	1,467 ± 0,003	3,49 ± 0,064	52,40 ± 0,49
<i>C. cyminum</i>	0,902 ± 0,018	1,499 ± 0,008	3,48 ± 0,022	46,76 ± 0,30
<i>L. nobilis</i>	0,916 ± 0,006	1,467 ± 0,002	5,05 ± 0,049	40,56 ± 0,35
<i>T. capitatus</i>	0,934 ± 0,007	1,499 ± 0,003	2,28 ± 0,04	33,35 ± 0,22

III.3. Composition chimique des huiles essentielles

Les HEs ont été soumises à des analyses détaillées par CG/SM. L'identification des constituants a été réalisée par l'utilisation des indices de rétention (IR), par l'analyse des spectres de masse des composés constitutifs et par la comparaison de ces données à celles de la base de donnée électronique, NIST et de base bibliographique (Adams, 2007) et celles obtenues sur des composés standards purs. Les constituants identifiés, selon leur ordre d'éluion sur la colonne apolaire DB-5, leurs indices de rétention et leurs pourcentages relatifs sont également répertoriées dans les **Tableaux XIV, XV et XVI**.

III. 3.1. *C. sinensis* et *C. limon*

L'analyse chromatographique a fait ressortir un nombre déterminé de constituants pour les deux HEs représentant 99,10 et 99,11% respectivement pour *C. sinensis* et *C. limon*. Ces analyses ont montré que le limonène (54,95%), le γ -terpinène (7,25%), le β -pinène (5,9%), le gèranial (3,63%), le néral (2,78%), l' α -terpinéol (1,88%), le nérol (1,61%), le néryl acétate (1,60%), le terpène-4-ol (1,49%), le gèraniol (1,45%) et le linalol (1,45%) sont les composants les plus abondants dans l'HE de *C. limon*. L'HE de *C. sinensis* a été dominée par le limonène (82,6%), le linalol (4,99%), le myrcène (1,56%) et l' α -terpinéol (1,08%).

Tableau XIV. Composés chimiques des HEs de *C. sinensis* et *C. limon*.

Composants	RI	%	
		<i>C. sinensis</i>	<i>C. limon</i>
<i>trans</i> -2-Hexenal	833	tr	-
α -Thujène	918	tr	0,19
α -Pinène	926	0,43	0,85
Camphène	943	-	tr
Sabinène	965	0,38	0,77
β -Pinène	971	0,3	5,9
Méthylheptenone	975	-	tr
Myrcène	981	1,56	1,07
Dehydro-1,8-cinéole	983	-	tr
<i>n</i> -Octanal	998	0,85	0,14
α -Phellandrène	1002	tr	tr
δ -3-Carène	1004	0,06	-
α -Terpipène	1011	0,06	0,32
<i>p</i> -Cymène	1020	-	0,91
Limonène	1026	82,6	54,95
<i>trans</i> - β -Ocimène	1038	0,07	0,1
γ -Terpinène	1051	0,6	7,25
<i>n</i> -Octanol	1065	0,08	0,09
<i>p</i> -Mentha-3,8-diène	1074	tr	-
Terpinolène	1079	0,11	0,71
<i>p</i> -Cymenène	1085	-	tr
Linalol	1095	4,99	1,45
<i>n</i> -Nonanal	1099	0,26	0,23
1, 3,8- <i>p</i> -Menthatriène	1108	-	0,05
Méthyl octanoate	1116	0,08	-
<i>cis</i> - <i>p</i> -Menth-2-en-1-ol	1119	tr	0,07
<i>cis</i> -Limonène oxide	1131	0,12	0,06
<i>cis</i> - <i>p</i> -Menth-2,8-dien-1-ol	1134	-	tr
<i>neo-allo</i> -Ocimène	1137	tr	0,08
Camphre	1141	-	0,05
Isonéral	1154	-	0,07
Bornéol	1167	-	0,08
Terpinène-4-ol	1175	0,49	1,49
Naphthalène	1179	tr	tr
<i>p</i> -Cymène-8-ol	1183	-	0,05
<i>n</i> -Butyl <i>n</i> -hexanoate	1185	tr	-
α -Terpinéol	1191	1,09	1,88
<i>cis</i> -Piperitol	1195	tr	tr

<i>n</i> -Decanal	1201	0,63	0,09
<i>trans</i> -Piperitol	1205	-	0,05
<i>trans</i> -Carvéol	1216	0,09	0,09
Citronellol	1224	0,37	0,94
Nérol	1220	0,16	1,61
Néral	1232	0,63	2,78
Carvone	1239	0,1	0,19
Géraniol	1248	0,15	1,45
Méthyl citronellate	1257	tr	tr
Géranial	1262	0,78	3,63
Perillaldehyde	1269	0,27	0,23
<i>o</i> -Acetanisole	1287	-	tr
Carvacroléthyléther	1297	0,06	0,06
<i>m</i> -Acetylanisole	1301	-	tr
Carvacrol	1305	-	tr
<i>p</i> -Vinyl-guaiacol	1309	tr	-
Méthylgéranate	1315	-	tr
Méthyl caprinate	1318	tr	-
Citronellyl acétate	1342	-	0,19
Néryl acétate	1353	tr	1,6
α -Copaene	1367	tr	-
Géranyl acétate	1371	-	0,78
Ethylcaprate	1389	tr	-
<i>cis</i> - α -Bergamotène	1404	-	0,11
β -Caryophyllène	1410	0,05	0,74
β -Copaene	1421	0,05	-
<i>trans</i> - α -Bergamotène	1428	tr	1,12
Géranyl Ppropionate	1441	-	tr
α -Humulène	1447	0,05	0,15
β -Santalène	1451	-	0,06
β -Acoradiène	1469	-	tr
<i>trans</i> - β -Farnesène	1475	-	0,08
Valencène	1484	0,15	0,2
Bicyclogermacrène	1486	-	0,32
α -Muuroène	1491	tr	-
E,E- α -Farnesène	1498	tr	0,18
β -Bisabolène	1501	tr	2,14
δ -Cadinene	1510	0,08	0,09
β -Sesquiphéllandrène	1519	tr	tr
<i>cis</i> - γ -Bisabolène	1533	-	tr
Elemol	1543	tr	-
<i>trans</i> -Sesquisabinène hydrate	1578	-	tr

γ -Eudesmol	1626	tr	tr
<i>t</i> -Muurolol	1638	-	tr
α -Cadinol	1650	0,02	0,05
β -Bisabolol	1664	-	0,06
α -Bisabolol	1683	-	0,27
β -Sinensal	1686	0,36	-
α -Sinensal	1743	0,11	-
Total identifié		99,10	99,11
Monoterpènes hydrocarbonés		86,25	73,27
Monoterpènes oxygénés		9,73	19,34
Sesquiterpènes Hydrocarbonés		0,54	5,3
Sesquiterpènes oxygénés		0,55	0,44
Autres		2,03	0,72

- = Non détecté

Dans la littérature, certains rapports ont été évoqués sur la composition des HES d'agrumes. Sharma et Tripathi (2008) ont montré que l'HE de *C. sinensis* (L.) Osbeck., est principalement constituée du limonène (84,2%) et du linalol (4,4%). José Velázquez-Nuñez *et al.* (2013) ont également identifié le limonène comme composant principal ~96,62%, lors d'une étude sur l'HE du *C. sinensis* var. Valencia. Djenane (2015), a démontré que l'HE de *C. sinensis* et *C. limon* provenant d'Algérie sont principalement constituées du limonène (77,37% et 51,4%, respectivement). Vekiari *et al.* (2002) ont montré que l'HE de *C. limon* est principalement composée du β -pinène (21,2%), du γ -terpinène (17,4%) et de l' α -pinène (9,8%). Pashazanousi *et al.* (2012) ont signalé trois monoterpènes majeurs: le limonène (60,2%), du β -pinène (12,1%) et γ -terpinène (11,8%) dans l'HE de *C. limon*. Moosavy *et al.* (2017) ont également rapporté que le limonène (46,93%), le γ -terpinène (16,89%), le tricyclène (6,67%), le 1- β -pinène (4,69%) et le 2- β -pinène (3,86%) sont les composants les plus abondants dans l'huile de *C. limon*. Lota *et al.* (2001) ont constaté que le limonène et l' α -pinène sont les principaux composés des HES d'orange aigre. Ahmad *et al.* (2006) ont isolé les HES de Malte (*C. sinensis*), de Mousami (*C. sinensis*), de Pamplémousse (*C. paradisi*) et d'Eureka citron (*C. limon*) par pressage à froid. Selon eux, les principaux constituants de l'huile de Malte étaient le limonène (61,08%), le citronellol (4,18%), le citral (7,74%), le bornéol (7,63%), l' α -terpinolène (2,06%) et le linalol (1,28%). Chez Mousami, les principaux composés étaient le limonène (76,28%), l' α -pinène (1,26%), le β -pinène (5,45%), le citral (1,74%) et le linalol (2,32%). Dans l'huile de pamplémousse, le limonène (86,27%), le myrcène (6,28%), le γ -terpinène (2,11%) et l' α -pinène (1,26%) étaient parmi les principaux

composants. Les principaux constituants présents dans l'huile de citron Eureka sont le limonène (53,61%), le terpinène (18,57%), l' α -pinène (11,80%), le myrcène (11,16%) et le β -pinène (2,63%). Gogoi *et al.* (2008) ont identifié le limonène comme composé majoritaire (84,12%) dans l'huile de *C. sinensis*. D'après Tundis *et al.* (2012), l'HE de *C. aurantifolia* a été caractérisée par 49 constituants dont les composants dominants sont le limonène (49,2%), le β -pinène (14,1%), le γ -terpinène (6,6%) et le β -myrcène (3,1%). L'HE de *C. aurantium* est composée de 15 composants, représentant 84,2%. Le limonène (65,8%) est l'hydrocarbure monoterpénique majeur suivi du β -myrcène (2,9%), l' α -pinène (1,8%), tandis que le linalol (1,8%) et le linalyl acétate (1,8%) ont représenté les monoterpènes oxygénés les plus représentatifs. L'hydrocarbure monoterpénique le plus abondant dans l'HE de *C. bergamia* est le limonène (38,1%), le linalyl acétate (28,9%), le γ -terpinène (7,3%), le linalol (6,4%) et le β -pinène (5,4%).

La composition chimique de l'HE de *C. medica* cv. diamante obtenue par différentes méthodes d'extraction (hydrodistillation, pressage à froid et CO₂ supercritique) a été étudiée. Ces huiles obtenues par hydrodistillation et compression à froid ont été caractérisées par le limonène (35,4% et 44,5%, respectivement) et le γ -terpinène H42 (24,5% et 26,2%, respectivement) (Menichini *et al.*, 2011). Jazet Dongmo *et al.* (2008) ont montré que l'analyse des HEs de deux variétés de *Citrus* a révélé que celle de *C. reticulata* var. Madagascar avait une composition chimique particulière par rapport à *C. sinensis* var Casagrande. Ses principaux composés sont le N- méthyl anthranilate de méthyle (57,6%), le γ -terpinène (20,2%) et le limonène (11,8%). Par ailleurs, les principaux composés de l'HE de *C. sinensis* ont révélé une prédominance du sabinène (35,4%), du Δ^3 -carène (10,2%), du Z- β -ocimène (6,9%), du linalol (6,8%) et du terpinen-4-ol (6,3%). Une autre étude a également montré que les HEs de *C. maxima* et *C. sinensis* ont été caractérisées par le limonène (31,83 et 90,66%, respectivement) comme constituant majeur. D'autres composants abondants dans l'huile de *C. maxima* étaient E-citral, 1-hexène-4-méthyl et Z-citral alors que le linalyl acétate est le deuxième composé le plus abondant identifié dans *C. sinensis* (Singh *et al.*, 2010).

III.3.2. *C. cyminum* et *C. sativum*

La CG/SM a permis de recenser 13 composés à partir de l'essence de *C. cyminum* dont le cuminaldéhyde, l'o-cymène, l' α -méthyl benzène méthanol et le β -pinène sont les constituants majoritaires représentés avec des pourcentages de 65,98%, 18,39%, 4,51%, 4,38% et 1,89%, respectivement. Les composants identifiés ont constitué 99,98% de l'huile.

Tableau XV. Composés chimiques des HEs de *C. cyminum* et *C. sativum*.

Composants	RI	%	
		<i>C. cyminum</i>	<i>C. sativum</i>
α - Pinène	929	0,22	2,69
Camphène	945	-	0,26
Limonène	967	-	0,17
Myrcène	974	-	0,36
β -Pinène	984	4,38	0,36
2-Vinyl-2,3-dihydro-4H-pyran	1017	0,27	-
o-Cymène	1021	18,39	2,65
Sabinène	1025	-	1,06
1,8-Cinéole	1028	0,23	-
γ -Terpinène	1053	-	3,33
<i>trans</i> -Linalol oxide	1066	-	0,21
Terpinolène	1081	-	0,21
<i>cis</i> -Linalool oxide	1082	-	0,20
Linalol	1101	-	78,86
Camphre	1143	-	2,28
4-t-Pentylcyclohexène	1163	0,26	-
Bornéol	1172	-	0,69
4-Terpinéol	1178	-	0,27
Tricyclo[5,1,0,0(2,8)]octane	1192	0,29	-
β -Fenchyl alcohol	1195	-	0,46
Méthyl chavicol	1196	0,29	-
Decyl aldéhyde	1203	-	0,26
<i>m</i> -Cuménol	1237	0,50	-
Cuminaldehyde	1242	65,98	-
Géraniol	1249	-	1,12
1-Phényl-1-butanol	1284	0,71	-
α -Méthyl- benzène méthanol	1288	4,51	-
<i>p</i> -Cymen-7-ol	1295	0,63	-
2-Thiophènealdehyde	1330	1,89	-
1-Méthyl-2 Phénylcyclopropane	1336	0,73	-
Géranyl acétate e	1374	-	4,54
Isomenthol	1390	0,70	-
Total identifié		99,98	99,98
Monoterpènes Hydrocarbonés		22,99	11,09
Monoterpenes oxygénés		72,84	88,89
Autres		4,15	0,00

- = Non détecté

Selon Saha *et al.* (2016), le cuminaldéhyde était le constituant majeur de l'HE de *C. cyminum*. Ses concentrations étaient de 52,6 et 37,3% pour une hydrodistillation et extraction par CO₂ supercritique, respectivement. Les autres constituants principaux sont le carenal (2-carene-10-al) (24,5-25,8%) et l'alcool cuminique (13,3-19,3%). Li et Jiang (2004) ont indiqué que les graines de cumin provenant de la Chine sont constituées du carenal (2-carene-10-al) (36,31%), de l'alcool cuminique (16,92%), du γ -terpinène (11,14%), du safranal (10,87%), du *p*-cymène (9,85%) du β -pinène (7,75%) comme composants principaux. Des observations similaires ont été rapportées par Uhl (2000). Cette étude a rapporté que le cuminaldéhyde (33%), le β -pinène (13%), le terpinène (29,5%), le *p*-cymène (8,5%), le *p*-mentha-1,3-diène-7-al (5,6%), l'alcool (2,8%) et le β -farnésène (1,1%). Une observation similaire a été signalée par Viuda-Martos *et al.* (2007), à l'exception de la présence d'alcool cuminique. Beis *et al.* (2000) ont rapporté que le *p*-mentha-1, 3-dien-7-al et le *p*-mentha-1, 4-dien-7-al sont également des constituants majeurs de l'HE de cumin en dehors du cuminaldéhyde, du *p*-cymène et du β -pinène. Rebey *et al.* (2012) ont signalé 38 composés dans l'HE de *C. cyminum*, représentant 98,07% des constituants totaux. Cette HE a été caractérisée par la domination des hydrocarbures terpéniques, constituant la classe principale (54,38%) suivi par les alcools (26,90%), les aldéhydes (15,83%), tandis que les cétones, époxydes, phénols et ester sont faiblement représentés. L'HE a été caractérisée par le γ -terpinène (25,58%) en tant que composé principal, suivi par le 1-phényl-1,2 éthanediol (23,16%), le cuminaldéhyde (15,31%), le β -pinène (15,16%) et le *p*-cymène (9,05%). En fait, plusieurs chimiotypes ont été rapportés selon l'origine du cumin étudié.

Quatorze (14) composés représentant 86,75% de l'HE extraite des graines de *C. cyminum* ont été identifiés selon Ladan (2015). Les composés détectés sont le thymol (40,65%), le γ -terpinène (24,51%), le β -pinène (5,38%), l' α -pinène (3,47%), le camphène (2,31%), le terpinène-4-ol (2,00%), le cuminaldéhyde (1,79%), l' α -thujène (1,45%), l' α -terpinolène (1,17%), le myrcène (1,07%), le limonène (1,04%), l' α -phyllanderène (0,94%) et l'acétoxylinolol (0,57%) et le sabinène (0,37%). Li *et al.* (2009) ont signalé les composés majoritaires de l'HE de graines de *C. cyminum*: cuminal, le safranal, le 2-éthylidène-6-méthyl-3,5-heptadiénal, l' α -proylbenzène- méthanol et le 1-méthyl-4- (1-méthyléthyl) -1,4-cyclohexadiène. Dans une autre étude réalisée par Derakhshan *et al.* (2008), les constituants principaux de l'HE de *C. cyminum* sont le cuminaldéhyde, le *p*-mentha-1,3-dien-7-al, le *p*-mentha-1,4-dien-7-al, le terpinène, le *p*-cymène et le β -pinène. Kedia *et al.* (2014) ont identifié 16 composants différents de l'HE de *C. cyminum*, représentant 97,45% de la

composition totale. Les composants les plus abondants de l'HE sont le cymène (47,08%), le γ -terpinène (19,36%), le cuminaldéhyde (14,92%) et le laevo- β -pinène (11,50%). Jalali-Heravi *et al.* (2007) ont utilisé la CG-SM pour caractériser les composants d'HE du cumin iranien. Au total, 19 composants ont été identifiés par des recherches directes de similarité pour l'huile de cumin. Ce nombre a été étendu à 49 composants, à l'aide de techniques chimiométriques. Les principaux constituants du cumin sont le γ -terpinène (15,82%), le 2-méthyl-3-phénylpropanal (32,27%) et le myrténique (11,64%).

l'HE de *C. sativum* est caractérisée par la présence de dix neuf (19) composés, dont les principaux: le linalol (78,86%), le géranyl acétate (4,54%), le γ -terpinène (3,33%), l' α -pinène (2,70%), le *p*-cymène (2,65%), le camphre (2,28%), le géraniol (1,12%) et le limonène (1,06%), ce qui ont représenté 99,98% du total. Dans des études réalisées pour évaluer la composition chimique de l'HE de *C. sativum* produite en Russie et en Bulgarie, Derbesy et Uzio (1993) et Frank *et al.* (1995), ont trouvé des valeurs très proches pour leurs principaux composés: le linalol (65,0% et 68,4%), l' α -pinène (3,0% et 2,5%) et le limonène (2,0% et 1,3%). Bhuiyan *et al.* (2009), ont isolé de l'HE extraite à partir des feuilles et des fruits de *C. sativum*. 44 composés principalement d'acides aromatiques dont les principaux sont: l'acide 2-décénoïque (30,82%), l'acide E-11-tétradécénoïque (13,4%), l'acide caprique (12,7%), l'alcool undécylique (6,4%) et le tridécanoïque (5,5%). D'autres constituants majeurs de l'huile des feuilles sont, l'acide undécanoïque (2,13%), le 2-dodécanal (1,32%), le 2-undécane (3,87%), le cyclododécane (2,45%), le décaméthylène glycol (1,15%), le décanal (1,35%) et le dodécanoïque (2,63%). Par contre, l'HE extraite de fruits était constituée de 53 composés dont les principaux sont le linalol (37,65%), le géranyl acétate (17,57%) et le γ -terpinène (14,42%). D'autres composés ont été aussi identifiés; le β -pinène (1,82%), le *m*-cymène (1,27%), le citronellal (1,96%), le citronellol (1,31%), le citral (1,36%), le géraniol (1,87%), le citronellyl acétate (1,36%), l' α -cedrène (3,87%) l' α -farnésène (1,22%) et le β -sesquiphellandrène (1,56%). Darughe *et al.* (2012) on identifié dans cette huile, trente six (30) composés, représentant 95,15% de total. Le camphre (44,99%), le cyclohexanol acétate (14,45%), le limonène (7,17%), l' α -pinène (6,37%), le β -elemène (3,66%), le terpinène (3,56%) et le géraniol (2,24%) sont les principaux composés. Dans l'analyse de l'HE de *C. sativum*, qui a été faite en Algérie, 17 constituants ont été identifiés. Ses principales composantes sont, le linalol (73,11%), le *p*-mentha-1, le 4-diène-7-ol (6,51%), l' α -pinène (3,41%) et le néryl acétate (3,22%) (Zoubiri et Baaliouamer, 2010). Les principaux composants des HEs de fruits de coriandre de Tunisie sont le linalol et le camphre (Neffati *et*

al., 2011). Cantore *et al.* (2004) ont indiqué que le linalol (64,5%), le camphre (6,4%), le *p*-cymène (6,3%) et l' α -pinène (5,1%) sont les principaux constituants de l'HE des fruits de coriandre.

III.3.3. *L. nobilis* et *T. capitatus*.

Le profil chimique de l'huile de *L. nobilis* concorde avec plusieurs investigations qui ont dénoté la forte teneur de cette HE en 1,8-cinéole (35,54%). Les monoterpènes les plus prédominants dans l'huile du laurier, sont le camphène (13,35%), le linalol (11,39%), le méthyl eugénol (7,78%), le sabinène (4,79%), l' α -pinène (4,66%) le β -pinène (3,21%) et le terpène-4-ol (3,15%).

Tableau XVI. Composés chimiques des HEs de *L. nobilis* et *T. capitatus*.

Composants	RI	%	
		<i>L. nobilis</i>	<i>T. capitatus</i>
α -Phéllandrène	920	0,59	-
Thujène	920	-	0,20
α -Pinène	928	4,66	1,14
Camphène	945	0,47	-
Sabinène	967	4,79	-
β -Pinène	973	3,23	0,18
1-Octen-3-ol	975	-	0,56
Myrcène	983	0,20	0,46
<i>n</i> -Octan-3-ol	995	-	0,11
δ -3-Carène	1005	0,59	-
α -Terpinène	1013	-	0,42
α -Terpinolène	1013	0,54	-
<i>p</i> -Cymène	1015	0,19	-
<i>m</i> -Cymène	1021	0,81	-
<i>p</i> -Cymène	1021	-	6,76
Limonène	1024	1,30	0,40
β -Phéllandrène	1026	-	0,16
1,8-Cinéole	1028	35,54	-
γ -Terpinène	1052	-	2,15
γ -Terpinène	1053	0,89	-
<i>cis</i> -Sabinène hydrate	1063	-	0,36
<i>trans</i> -Sabinène hydrate	1066	0,26	-
α -Terpinolène	1080	0,31	-
Linalol	1098	11,39	23,40
<i>Trans-p</i> -Mentha-1(7),8-dien-2-ol	1143	-	0,23
δ -Terpinéol	1169	0,23	-
<i>endo</i> -Bornéol	1171	0,40	0,23
Terpinéne-4-ol	1178	3,16	0,54
α -Terpinéol	1194	2,17	-
<i>m</i> -Mentha-4,8-diène	1195	-	0,44
<i>Trans</i> -Géraniol	1223	-	0,55
Nérol	1223	0,21	-
2-Isopropyl-5-méthyl-1-methoxybenzène	1226	-	1,65
Néral	1234	-	0,53
<i>Zeta</i> -Fenchène	1243	0,18	-
Géraniol	1249	-	14,22
Citral	1264	-	0,69
Thymol	1301	-	25,82
Sabinène	1307	0,69	-
<i>p</i> -Cymen-3-ol	1308	-	8,93
Camphène	1342	13,35	-

Eugénol	1350	1,00	-
Géranyle acetate	1374	-	1,79
β -Bourbonène	1377	-	0,20
β -Elemène	1383	0,31	-
Méthyl Eugénol	1398	7,78	-
β -Caryophyllène	1412	0,56	2,16
Acide cinnamique	1466	0,26	-
γ -Cadinène	1469	-	0,11
<i>D</i> -Germacrène	1475	-	0,70
Bicyclogermacrène	1489	0,17	-
β -Bisabolène	1503	-	1,54
Bicyclo [4,4,0]dec-1-en,2-isopropyl-5-méthyl-9-méthylène	1508	-	0,19
δ -Cadinène	1513	0,23	-
δ -Cadinène	1514	-	0,30
12-Nor-caryophyl-5-en-2-on	1531	0,21	-
Elemicine	1545	0,57	-
Spathuléol	1574	0,85	-
Caryophyllène oxide	1576	0,57	0,80
Valencène	1591	0,16	-
(<i>E,Z</i>)-1,2-diethylidèncyclopentane	1600	0,20	-
Aciphyllène	1655	-	0,21
<i>t</i> -Muurolol	1655	0,66	-
Longifolène	1693	0,23	-
1-Cyano-1,2-dihydro-1,2-diméthyl-5-methoxy-3,4-isoquinolinedione	2118	-	0,34
β -Bisabolène	2123	-	0,80
7-Amino-1,4-diméthylpyrimido (4,5) pyridazine-3,5-(1H,2H)-dione	2395	-	0,06
7-Amino-1,4-diméthylpyrimido (4,5) pyridazine-3,5-(1H,2H)-dione	2405	-	0,32
<i>n</i> -Ethyl-1,3-dithioisindoline	2466	-	0,17
2-Méthyl-3-phenylindole	2472	-	0,15
2-Méthyl-7-phenylindole	2535	-	0,12
Total identifié		97,77	99,88
Monoterpènes hydrocarbonés		32,77	12,24
Monoterpènes oxygénés		62,14	76,33
Sesquiterpènes Hydrocarbonés		2,23	5,6
Sesquiterpènes oxygénés		2,08	1,03
Autres		0,63	4,6

- = Non détecté

Kilic *et al.* (2005) ont rapporté que l'HE de *L. nobilis* de Turquie est principalement constituée du 1,8-cinéole (24,2-32,1%), du sabinène (7,1-7,6%), de l' α -terpinyl acétate (4,8-6,5%), de l' α -pinène (3,9-5,0%), et du β -pinène (3,0-3,8%). Zheng-kui *et al.* (1990) ont montré que le 1,8-cinéole (25,5-43,0%), le sabinène (2,1-6,8%), le linalol (4,4-22,7%), l' α -

terpinyl acetate (9,5-18,0%), et le méthyl eugénole (1,7-8,9%) sont les principaux constituants de l'HE de *L. nobilis* Chinoise. Le 1, 8-cinéole (42,3%), l' α -terpinyl acétate (11,2%), l' α -pinène (7,8%), le β -pinène (5,9%), et le sabinène (5,4%) sont les composés majoritaires chez l'HE de Tunisie (Bouzouita *et al.*, 2001). Flamini *et al.* (2007) ont signalé que le 1,8-cinéole (35,7%), l'E-sabinène hydrate (9,7%), l' α -terpinyl acétate (9,3%), le méthyl eugénole (6,8%), et le sabinène (6,5%) sont les composés les plus représentatifs de *L. nobilis* récoltés en Italie. Snuossi *et al.* (2016) ont rapporté que les constituants principaux d'HE de *L. nobilis* Tunisien étaient le 1,8-cinéole (56%), l' α -terpinyl acétate (9,0%), le 4-terpinéol (5,2%), le méthyl-eugénole (3,6%), le sabinène (3,5%) et l' α -pinène (3,2%). Caputo *et al.* (2017) ont trouvé que le 1,8-cinéole (31,9%), le sabinène (12,2%) et le linalol (10,2%) sont les principaux composants de l'HE de *L. nobilis* Italien. Ben Jemâa *et al.* (2012) ont démontré que les principaux composés communs de trois HES de lauriers provenant de l'Algérie, de la Tunisie et du Maroc étaient le 1,8-cinéole, le linalol et l'isovaléraldéhyde. Marzouki *et al.* (2009), ont également rapporté que les HES de *L. nobilis* cultivées en Tunisie et en Algérie n'ont pas révélé de différences dans leur composition chimique. Les deux huiles ont contenu les principaux constituants dans des proportions variables. Le 1,8-cinéole a représenté 31,0% de l'huile dans les échantillons tunisiens et seulement 17,0% dans l'huile algérienne.

Quand à l'HE de *T. capitatus*, quarante deux (42) constituants chimiques ont été identifiés et ses principaux composants sont le thymol (25,82%), le linalol (23,40%), le géraniol (14,22%), le *p*-cymène-3-ol (8,93%), et le *p*-cymène (6,76%). Des analyses chromatographiques en phase gazeuse de l'HE de *T. capitatus* ont indiqué que le carvacrol était présent à 81 à 83%, le *p*-cymène à 4,5 à 5%, le γ -terpinène à 2,6 à 3,3%, le caryophyllène à 1,5 à 1,6%, le β -myrcène à 1,6% et le linalol à 1,1 à 1,2% (Arras et Usai, 2001). Selon Mkaddem *et al.* (2010), l'analyse chimique de l'HE de *T. capitatus* tunisien de Matmata a conduit à l'identification et à la quantification de 11 composants, qui ont représenté 99,63%. Les principaux composants sont phénoliques (89,15%). Le thymol (89,06% de l'huile totale) est le composé principal suivi du *p*-cymène (5,04%) et de l' α -terpinène (3,19%). Chez d'autre *T. capitatus*, les principaux composants étaient le carvacrol (55,66%), le γ -terpinène (11,72%), le β -cymène (7,8%) (Bouchikhi Tani *et al.*, 2009). Cependant, le *p*-cymène (18%), le carvacrol (13,4%), le géranyl acétate (12,2%) sont les composants principaux de l'huile provenant d'une autre huile de *T. capitatus* (El Ouariachi *et al.*, 2011). L'HE de *T. capitatus* du Maroc principalement était composée par de carvacrol (70,92%) accompagné d'autres constituants à des teneurs relativement faibles: le *p*-cymène (6,34%), le γ -terpinène (4,92%),

le linalool (3,86%), l'E-caryophyllène (3,57%) et le β -pinène (2,48%) (Amarti *et al.*, 2008). Cette dominance du carvacrol dans l'HE de *T. capitatus* a également été signalée par Goren *et al.* (2003), Bounatirou *et al.* (2007) et Casiglia *et al.* (2015). Cependant, d'autres auteurs ont constaté que l'huile de *T. capitatus* de la Sardaigne (Italie) a été dominée par le thymol (29,3%) alors que le carvacrol ne représentait que 10,8% de cette essence (Cosentino *et al.*, 1999). Une autre étude tunisienne effectuée sur l'HE de *T. capitatus* a montré que les composés majoritaires de cette espèce sont le carvacrol (58,66-81,49%), le *p*-cymène (3,83-13,17%), le γ -terpinène (7,81-3,16%) (Hosni *et al.*, 2013).

III. 4. Principaux caractères morphologiques d' *A. flavus* E73

III. 4.1. Identification de genre

L'observation de l'aspect de la colonie (couleur, texture), des septations, de la forme et du branchement des hyphes, et des spores sont une partie des caractères observés pour identifier correctement le champignon.

a. Aspect macroscopique

Sur le milieu de culture *A. flavus* E73 forme des colonies duveteuses à poudreuses, aux abords blanc, puis jaune, puis vert-jaune. Le revers est jaunâtre (**Figure 26**).

b. Aspect microscopique

Les têtes conidiennes, unisériées, d'abord radiées. Les conidiophores sont hyalins. Les vésicules sont globuleuses. Les phialides sont directement insérées sur la vésicule (**Figure 26**).

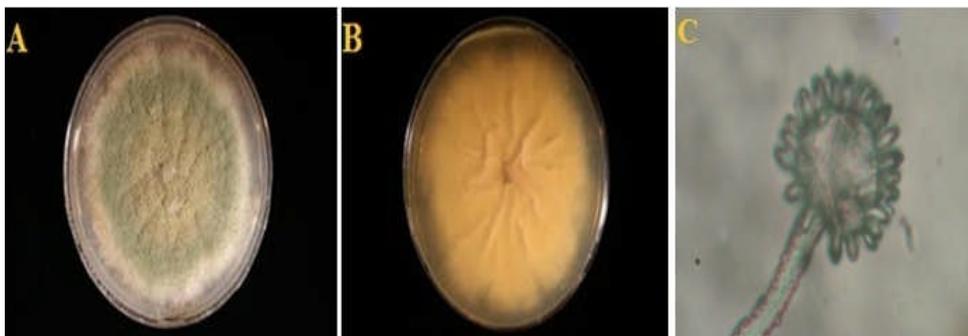


Figure 26. Aspect macroscopique (A et B) et microscopique (C) d'*A. flavus* E73.

4.2. Identification de l'espèce

Le **Tableau XVII** et la **Figure 27** montrent les caractères culturels rencontrés dans les quatre milieux de culture (MEA, G25N, CYA) selon la méthode de Pitt et Hocking (2009). L'identité de l'espèce d'*A. flavus* E73 a été confirmée sur milieu *Aspergillus flavus* et *parasiticus* (AFPA). Dans ce milieu, l'*A. flavus* E73 donne une couleur jaune-orangé à orange, cette coloration est due à la production de l'acide aspergillique (acide noaspergillique) par l'espèce fongique qui a réagit avec le citrate d'ammonium ferreux en formant un complexe coloré après une incubation à 37 °C pendant 7 jours. En plus des concentrations plus efficaces des ingrédients actifs, l'AFPA contient de dichloran et chloramphénicol pour inhiber l'épandage des champignons et des bactéries, respectivement. L'AFPA est recommandé pour la détection et le dénombrement des champignons potentiellement aflatoxigènes dans les noix, le maïs, les épices et d'autres produits. Ses avantages comprennent la rapidité (48 h d'incubation sont généralement suffisantes), la spécificité et la simplicité. En conséquence, il peut être un guide simple et routinier pour le dépistage d'une possible contamination par l'aflatoxine.

Tableau XVII. Identification d'*A. flavus* E73.

	Milieu	Température d'incubation	Lecture (couleur)
<i>A. flavus</i> E73	MEA	25 °C	Vert pistachio
	G 25N	25 °C	Vert d'olive
	CYA	25 °C	Vert foncé
	AFAP	37 °C	Revers orange

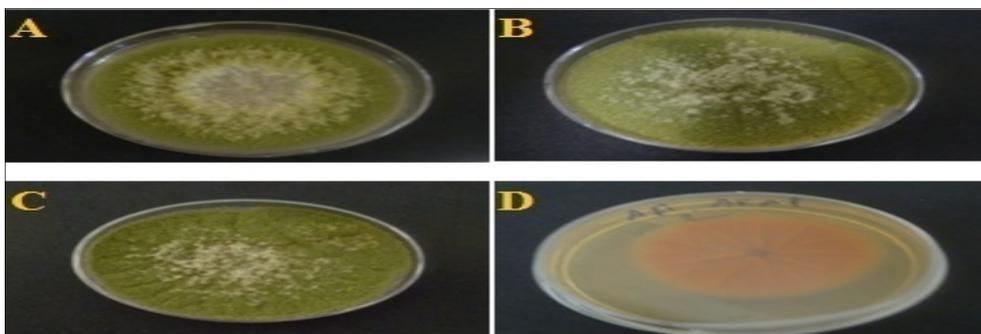


Figure 27. Aspect macroscopique d'*A. flavus* E 73 par la méthode de «pique centrale»: (A): milieu MEA à 25 °C; (B): milieu G25N à 25 °C; (C): milieu CYA à 25 °C; (D): milieu AFAP à 37 °C (revers).

III. 5. Étude du pouvoir producteur d'aflatoxine B₁ par *A. flavus* E 73

Au cours de cette étude, la souche d'*A. flavus* E73 a fait l'objet de l'étude du pouvoir producteur d'AFB₁. Le criblage de souche aflatoxinogène a été basé sur la mise en évidence de la fluorescence sous U.V à 365 nm sur milieu CAM et sur CCM. Le pouvoir producteur de la souche ayant donné une fluorescence bleue et un revers du milieu CAM jaune orangé a été confirmé par CCM. La détection de la production d'AFB₁ par visualisation de la fluorescence sur milieu CAM est aussi performante que la détection par CCM (**Figure 28 et 29**). L'examen de chromatoplaque sous U.V (365 nm) de l'extrait de filtrat de culture sur milieu SMKY a aussi révélé des résultats similaires.

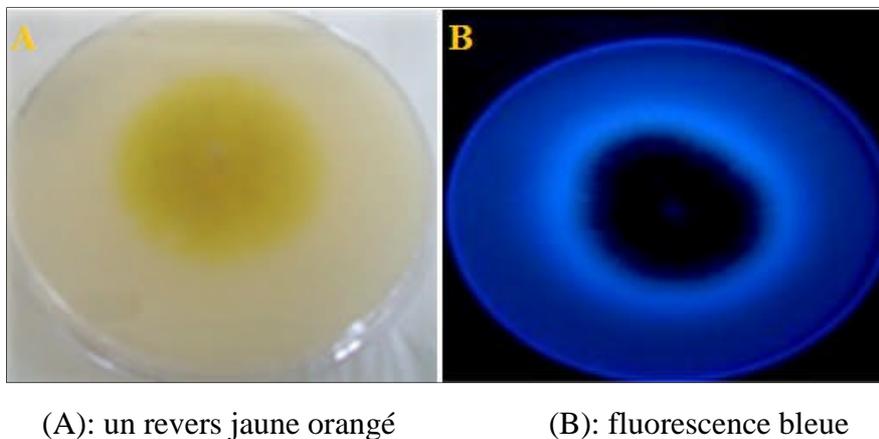


Figure 28. Mise en évidence par fluorescence sous lumière U.V. (365 nm) de la production d'AFB₁ par d'*A. flavus* E73 sur milieu CAM.

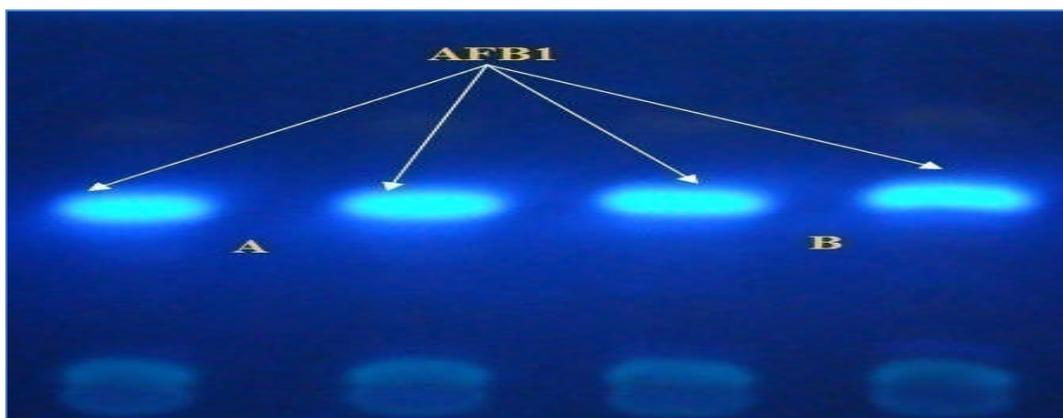


Figure 29. CCM sous UV 365 nm montrant les taches bleues d'AFB₁ produite par *A. flavus* E73 sur milieu SMKY (A) et CAM (B).

III. 6. Activité antifongique et anti-aflatoxine B₁

III. 6.1. Activité antifongique des huiles essentielles

Des différences d'efficacité ont été notées entre les différentes HEs sur la croissance de l'espèce fongique, *A. flavus* E73, potentiellement toxigène. L'action sur la croissance, a montré une sensibilité significative de la souche à tous les HEs par rapport au témoin ($p < 0,05$). Cette sensibilité est sous la dépendance de la composition chimique des HEs et la fonction des composés majoritaires à caractère antimicrobien. Généralement, les composants de faible poids moléculaire et hautement lipophiles des HEs passent facilement à travers les membranes cellulaires et provoquent une perturbation de l'organisation des cellules microbienne (Chao *et al.*, 2005).

III. 6.1.1. Effet des huiles essentielles de *C. sinensis* et *C. limon* sur la croissance d'*A. flavus* E73

Les effets inhibiteurs des HEs de *C. limon* et de *C. sinensis* sur la croissance d'*A. flavus* E73 au cours des sept jours d'incubation sont illustrés dans la **Figure 30**. Pour tous les traitements, la croissance de mycélium a été significativement réduite ($p < 0,05$) d'une façon proportionnelle aux concentrations des HEs (**Annexe II**), indiquant une activité dépendante de la dose, tandis que leur croissance a progressivement été augmentée avec le temps. La croissance mycélienne a été retardée de trois jours pour une concentration de 1,5 mg/ml pour *C. limon* et de deux jours pour 1,75 mg/ml pour *C. sinensis*. Le pourcentage d'inhibition de la croissance des mycéliums a été déterminé au 7^{ème} jour tel que présenté dans la **Figure 31**. Les résultats ont révélé que l'HE de *C. limon* a montré un taux d'inhibition de 75,14% sur la croissance mycélienne à une concentration de 1,5 mg/ml par rapport au témoin ($p < 0,05$). Une inhibition complète de la croissance d'*A. flavus* E73 a été observée à 1,75 mg/ml de l'HE de *C. limon*, tandis que l'HE de *C. sinensis* a présenté un pourcentage d'inhibition d'environ 68,24% à la même concentration par rapport au témoin ($p < 0,05$).

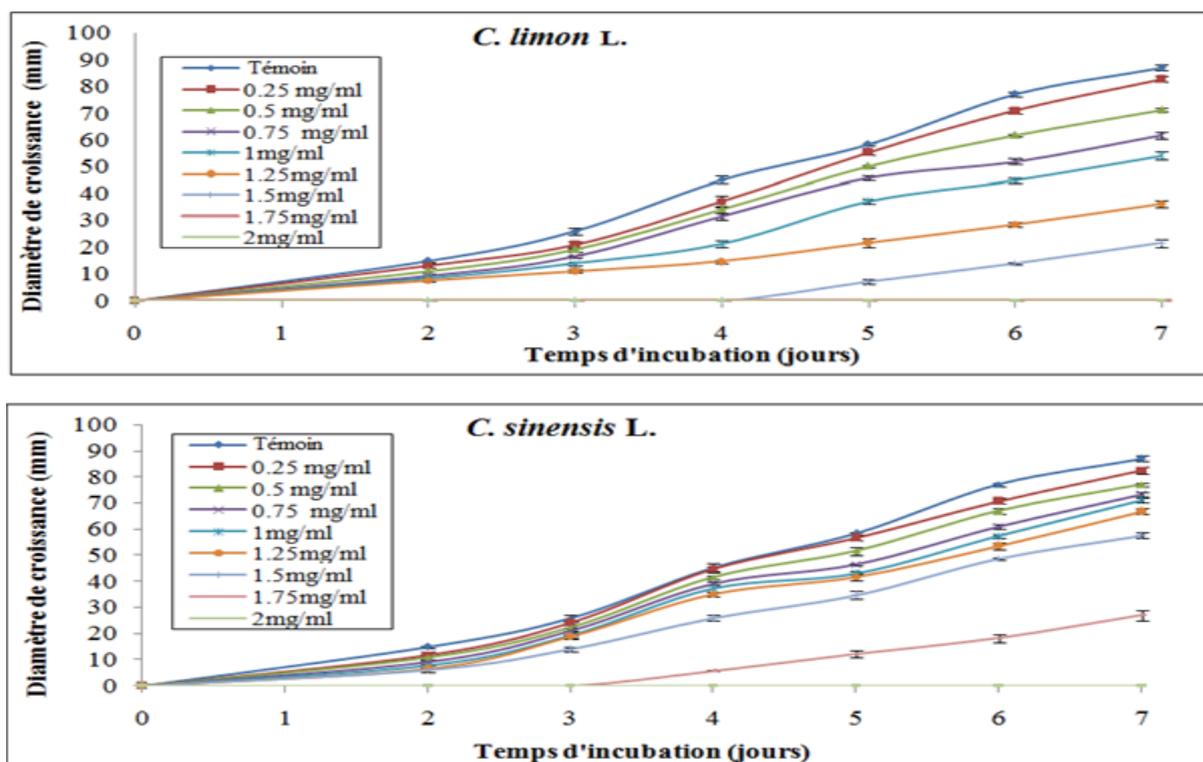


Figure 30. Effet de l’HE de *C. limon* et *C. sinensis* aux différentes concentrations sur la croissance de l’*A. flavus* E73 pendant 7 jours d’incubation.

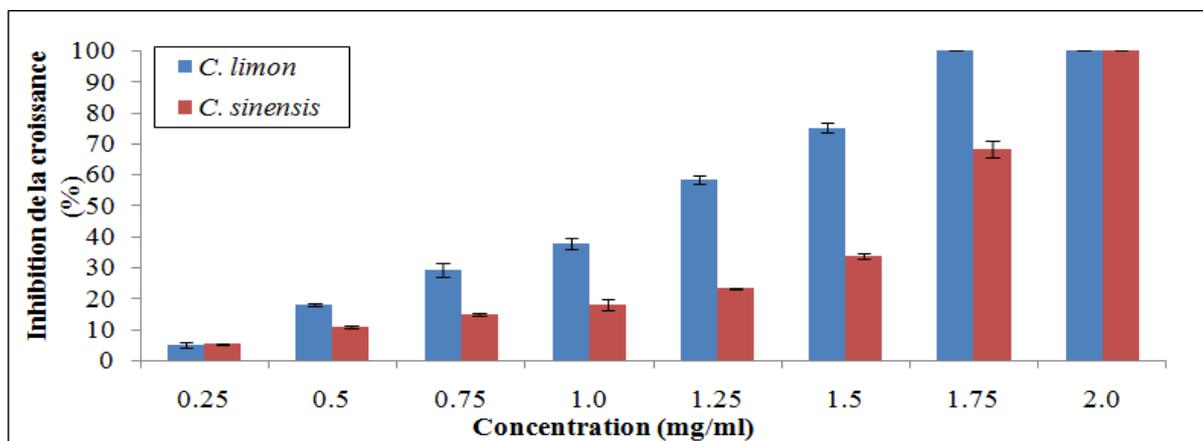


Figure 31. Les pourcentages d’inhibition de la croissance du mycélium de l’*A. flavus* après 7 jours d’incubation (*C. limon* et *C. sinensis*).

La différence observée dans l’activité antifongique entre les HEs de *C. limon* et *C. sinensis* peut être expliquée sur la base des différences de composition chimique de leurs fractions volatiles, comme indiqué précédemment par Caccioni *et al.* (1998). Ces auteurs ont observé divers degrés d’inhibition de la croissance fongique lors des tests avec des composants volatils de l’orange, de la mandarine, de la citrange et de citron contre *P.*

digitatum et *P. italicum*. L'activité antifongique de l'HE de *C. sinensis* contre *A. flavus* pourrait être expliquée par de la dominance du limonène (82,59%), probablement le constituant inhibiteur principal. Plusieurs chercheurs ont décrit l'activité antifongique du limonène, isolé de différentes plantes contre *A. parasiticus* (Greene-McDowelle *et al.*, 1999), *Rhizoctonia solani* (Angioni *et al.*, 2006), *A. niger* (Sharma et Tripathi, 2008), et *A. flavus* (Razzaghi-Abyaneh *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2010; José Velázquez-Nuñez *et al.*, 2013).

La paroi cellulaire fongique joue un rôle important dans la croissance et la viabilité des moisissures; les trois principaux éléments structuraux, le glucane, la chitine et le mannane, sont généralement considérés comme des cibles thérapeutiques. Yutani *et al.* (2011) ont révélé que l'HE de *C. sinensis* (Limonène 84,2%) était capable d'inhiber la croissance d'*A. niger*; il a également conduit à une altération morphologique irréversible, en particulier la perte de cytoplasme dans les hyphes fongiques et le point de bourgeonnement des hyphes. Ainsi, le linalol peut être responsable de l'effet inhibiteur de l'HE de *C. sinensis* sur la croissance d'*A. flavus* E73. Dans les travaux menés par Aloui *et al.* (2014), les HEs de *C. bergamia* Risso et de *C. sinensis* (L.) Osbeck ont montré la capacité d'inhiber la croissance d'*A. flavus*; l'HE de *C. bergamia* Risso était la plus efficace. Les auteurs ont attribué l'inhibition de la croissance d'*A. flavus* à la présence de linalol. Plusieurs auteurs ont déjà attribué la capacité antifongique des HEs des agrumes à la présence du linalol qui est présent à différentes concentrations dans les HEs des citrus (Veriotti et Sacks 2001; Vekiari *et al.*, 2002; Djenane, 2015). La plus importante activité antifongique de *C. limon* pourrait ne pas être attribuée à ce constituant pour sa faible proportion (54,96%) par rapport à *C. sinensis*. Il a été supposé que l'activité antifongique de cette HE a significativement été affectée par la présence de précurseurs biologiques de composés phénoliques, à savoir le γ -terpinène (Ahmad *et al.*, 2013; Haque *et al.*, 2016) et le *p*-cymène (Sekine *et al.*, 2007; Ozcan et Chalchat 2008; Gusarov *et al.*, 2009). Le *p*-cymène pourrait aussi jouer un rôle antifongique (Romagnoli *et al.*, 2010). L'activité antifongique est le résultat d'une perturbation de l'intégrité de la membrane cytoplasmique, entraînant une fuite de composants intracellulaires vitaux (Ultee *et al.*, 2002; Vale-Silva *et al.*, 2010). De même, l'HE de *C. limon* est riche en hydrocarbures monoterpéniques, les pinènes (α -pinène et β -pinène), comparé à l'HE de *C. sinensis*. Il a été démontré que ces composants possèdent une excellente activité antifongique (Bezic *et al.*, 2005, Souza *et al.*, 2005), pourraient être impliqués dans cette bonne activité antifongique provoquée par l'HE de *C. limon*. L'effet inhibiteur de cette huile peut également être expliqué par la présence de citronellol, de géraniol, d' α -terpinéol, de nérol, de linalol et de terpinen-4-

ol, qui se sont manifestés selon Hammer *et al.* (2003), par leur bonne activité antifongique contre *Aspergillus* et *Penicillium*. Le potentiel antifongique élevé de ces monoterpènes est en raison de leur bonne solubilité dans l'eau et de la présence d'un groupe fonctionnel d'alcool. Les alcools monoterpéniques augmentent la perméabilité de la membrane plasmique et inhibent le processus de respiration sur la membrane mitochondriale des champignons (Cox *et al.*, 2000, Deba *et al.*, 2008, Imelouane *et al.*, 2009).

Il a été suggéré que le citronellal a une activité antifongique bien connue (Lee *et al.*, 2008; Rammanee et Hongpattarakere, 2011; Tolba *et al.*, 2015; Trindade *et al.*, 2015). Suppakul *et al.* (2003) ont rapporté que le citronellal possède des propriétés antifongiques remarquables contre *A. flavus*, *A. ochraceus* et *F. oxysporum*. Bound *et al.* (2016) ont rapporté sa bonne inhibition sur la croissance de mycélium et la germination des spores de manière dose-dépendante, en détériorant la membrane plasmique des spores et conduisant à une conductivité extracellulaire plus élevée et libération de constituants cellulaires.

III. 6.1.2. Effet des huiles essentielles de *C. cyminum* et *C. sativum* sur la croissance d'*A. flavus* E73

L'activité antifongique des HEs de *C. cyminum* et de *C. sativum* est représentée dans la **Figure 32**. Une activité significative ($p < 0,05$) a été observée proportionnellement à la concentration des HEs de *C. cyminum* et de *C. sativum* (**Annexe II**). En effet, la croissance d'*A. flavus* E73 a été retardée de quatre jours à une concentration de 1,00 mg/ml pour *C. cyminum* et d'un jour à 1,25 mg/ml pour *C. sativum*. La croissance mycélienne de l'*A. flavus* a été totalement inhibée par les HEs de *C. cyminum* et *C. sativum* à 1,25 mg/ml et 1,50 mg/ml, respectivement. L'activité antifongique traduite par l'inhibition de la croissance de mycélium était proportionnelle à la concentration de l'huile, cela n'a pas empêché d'observer une évolution dans croissance mycélienne au cours d'incubation. Le pourcentage d'inhibition de la croissance d'*A. flavus* E73 par rapport au témoin ($p < 0,05$) est compris dans l'intervalle [24,26-84,88%] pour *C. cyminum* et [15,10-65,00%] pour *C. sativum* (**Figure 33**).

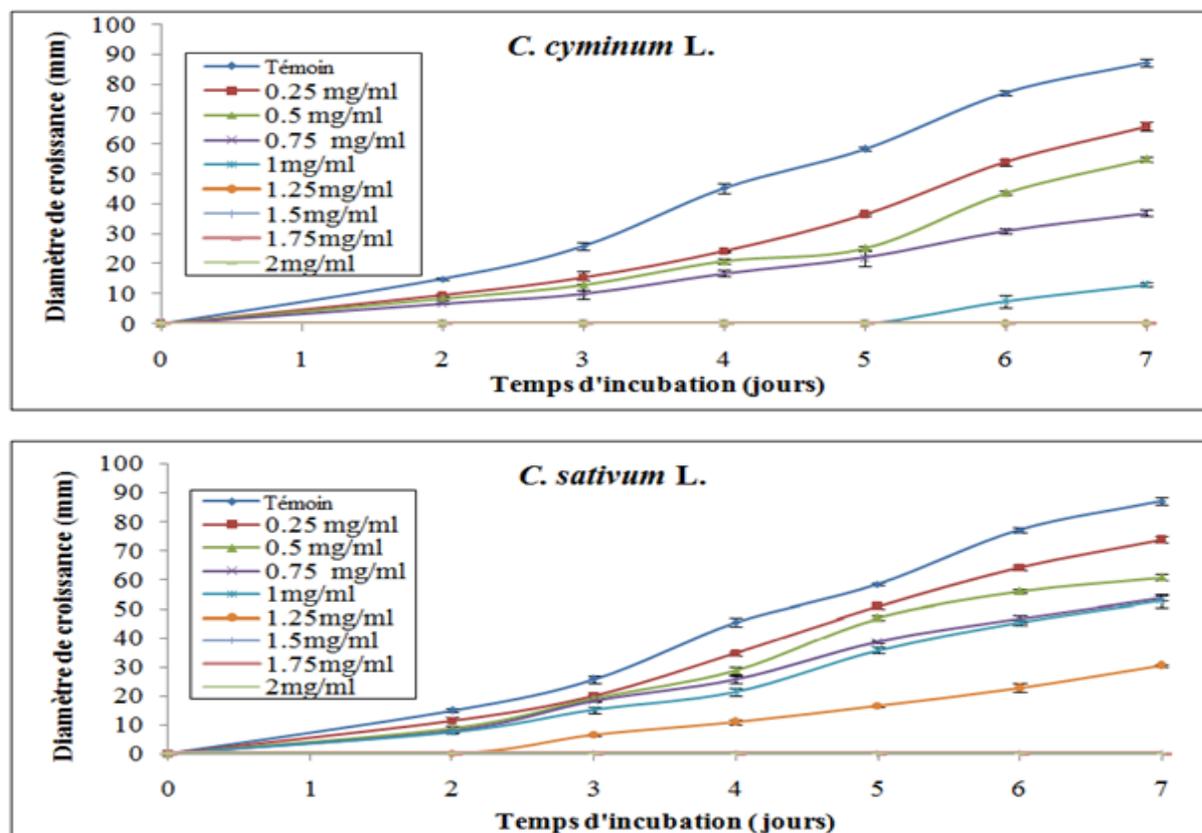


Figure 32. Effet de l'HE de *C. cyminum* et *C. sativum* aux différentes concentrations sur la croissance de l'*A. flavus* E73 pendant 7 jours d'incubation.

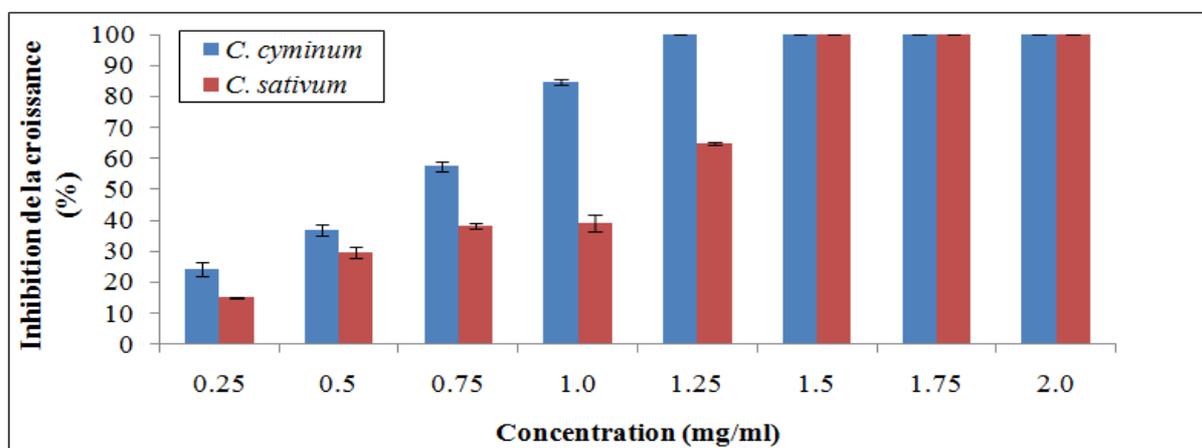


Figure 33. Les pourcentages d'inhibition de la croissance du mycélium de l'*A. flavus* après 7 jours d'incubation (*C. cyminum* et *C. sativum*).

L'HE de *C. cyminum* montre une bonne activité antifongique qui pourrait être attribuée au cuminaldéhyde (65,98%) majoritaire. Ce composé volatil s'est avéré avoir une forte activité antifongique (Singh et Upadyay, 1991; Tian *et al.*, 2011). Selon Smid *et al.* (1995), le cuminaldéhyde est un inhibiteur puissant de la croissance *in vitro* de *P. hirsutum*.

Ces auteurs ont constaté que l'inhibition de la croissance fongique par le cuminaldéhyde est une inhibition irréversible. Plus précisément, il est considéré comme un agent fongicide très puissant. Il exerce son action par l'inhibition de l'activité ATPases, la biosynthèse de la paroi cellulaire, et l'altération de la structure et de l'intégrité de la membrane.

L'activité antifongique de l'HE de *C. cuminum* pourrait être aussi attribuée à la présence de certains composants tels que le cymène et le β -pinène qui sont déjà connus pour leur activité antimicrobienne (Souza *et al.*, 2005). Outre, Kedia *et al.* (2014) ont révélé que la teneur en ergostérol dans la membrane plasmique d'*A. flavus* a significativement été réduite par les différentes concentrations de l'HE de *C. cuminum*. L'HE de *C. sativum* a montré un effet similaire qui agit sur la perturbation des voies normales de biosynthèse des stérols, conduisant à la réduction de la biosynthèse de l'ergostérol. L'absence ou la présence d'ergostérol dans les membranes fongiques entraîne des instabilités métaboliques de la cellule fongique, compromettant la reproduction et l'activité infectieuse (Ahmad *et al.*, 2011; Kerekes *et al.*, 2013; Rajput et Karuppayi, 2013; Freires de Almeida *et al.*, 2014).

III. 6.1.3. Effet des huiles essentielles de *L. nobilis* et *T. capitatus* sur la croissance d'*A. flavus* E73

Nos résultats ont montré une efficacité antifongique prononcée de l'HE de *L. nobilis* et de *T. capitatus* contre la souche testée ($p < 0,05$) (**Annexe II**). La croissance a été retardée de trois jours à 1,5 mg/ml pour *L. nobilis* et de cinq jours à 0,75 mg/ml pour *T. capitatus*. Aussi la croissance du mycélium était proportionnelle à la concentration de l'HE utilisée (**Figure 34**). Les pourcentages d'inhibition sur la croissance fongique ont varié par rapport au témoin ($p < 0,05$) de 13,93% à 76,08% pour *L. nobilis*, et de 40,49 % à 86,98% pour *T. capitatus* (**Figure 35**) par rapport au témoin ($p < 0,05$).

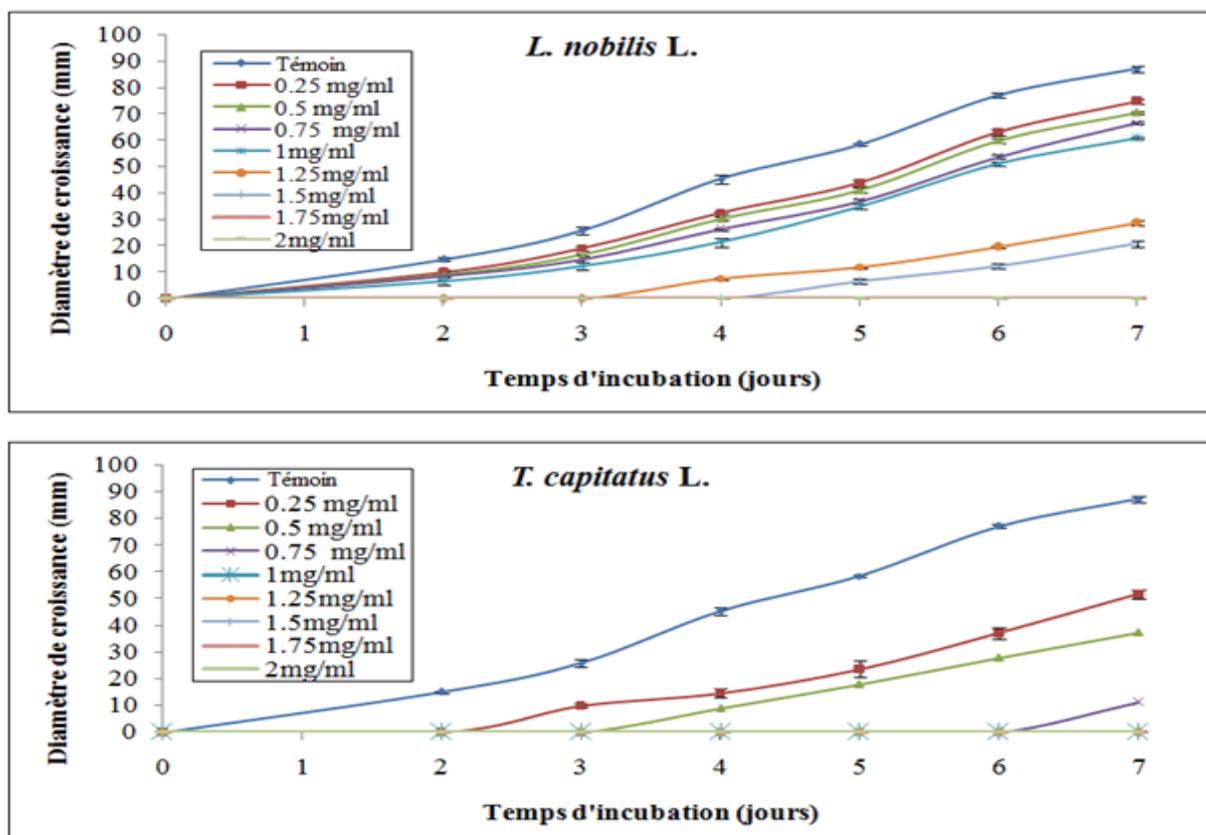


Figure 34. Effet de l'HE de *L. nobilis* et *T. capitatus* aux différentes concentrations sur la croissance de l'*A. flavus* E73 pendant 7 jours d'incubation.

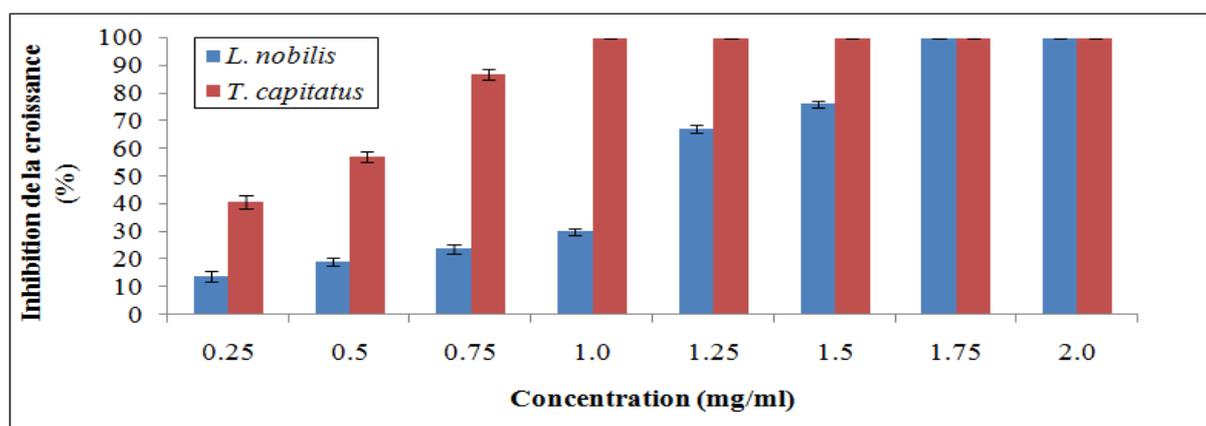


Figure 35. Les pourcentages d'inhibition de la croissance du mycélium de l'*A. flavus* après 7 jours d'incubation (*L. nobilis* et *T. capitatus*).

Daferera *et al.* (2000) ont indiqué que l'effet antifongique des HEs est une conséquence de la formation de liaisons hydrogènes entre les groupes hydroxyles des composés phénoliques des HEs et les sites actifs des enzymes cellulaires de la cible fongique. Dos Santos Oliveira et Badiale Furlong (2008) ont rapporté que le type de la structure

phénolique est plus important que la concentration en ces composés. Il a été démontré que les molécules possédant un groupe hydroxyle plus un système d'électrons délocalisés dans la structure du cycle phénolique ont une activité antifongique élevée (Safaei-Ghomi et Ahd, 2010).

Dans la présente étude l'HE de *L. nobilis* a montré une bonne activité antifongique. Nos résultats corroborent d'autres travaux sur le pouvoir antifongique de l'HE de *L. nobilis* Guynot *et al.* (2005) ont obtenu une bonne activité antifongique de l'HE de *L. nobilis* contre la croissance des *Aspergillus sp.* Ceylan et Fung (2004); Tajkarimi *et al.* (2010) dans leurs travaux ont révélé que l'HE de *L. nobilis* a présenté des activités modérées. Simiç *et al.* (2004) ont mis en évidence le pouvoir antifongique des HE d'*Aniba rosaeodora*, *L. nobilis*, *Sassafras albidum* et *C. zeylanicum* vis-à-vis d'espèces fongiques. L'HE de *C. zeylanicum* a été considérée comme l'agent antifongique le plus puissant, suivie par les HEs de *S. albidum* et d'*A. rosaeodora* aux effets moyens et enfin l'HE du *L. nobilis* avec un effet plus faible. Cette faible activité peut être attribuée à l'interférence entre le composé majeure 1,8-cinéole et la présence du sabinène (Simiç *et al.*, 2004). Safaei-Ghomi et Ahd (2010) ont indiqué que le 1,8-cinéole possède une activité antifongique potentielle. Hmiri *et al.* (2011) ont signalé que l'activité antifongique de l'HE d'*E. camaldulensis* riche en 1,8-cinéole est due au moins partiellement à l'action de ce monoterpène. Baghloul *et al.* (2016) ont indiqué que le 1,8-cinéole a apparié comme le composé antifongique le plus efficace dans l'HE de *R. officinalis* contre l'*A. niger*. Les travaux de Chebli *et al.* (2003); Shukla *et al.* (2012) et Caputo *et al.* (2017) ont montré que le 1,8-cinéole pur a provoqué une inhibition de la croissance mycélienne, mais à des concentrations plus élevées que les HEs dans leur totalité. D'après Gusarov *et al.* (2009), le 1,8-cinéole provoque des changements morphologiques hyphal et des dommages dans la membrane plasmique en provoquant une perméabilisation de la membrane. Ainsi, l'activité antifongique de notre HE pourrait être attribuée à la présence des autres composés tels que le linalool, les pinènes et le terpène-4-ol.

L'activité antifongique de l'HE *T. capitatus* contre *A. flavus* E73 pourrait être liée à la dominance du thymol et du linalol, du géraniol, du *p*-cymène-3-ol et du *p*-cymène. Selon Rasooli et Owlia (2005), Filipowicz *et al.* (2003) et Stevi'c (2014), il a été démontré que ces composés ont une forte activité antifongique.

L'activité antifongique des terpènes est généralement liée à leurs groupes fonctionnels, c'est-à-dire, à leur hydroxyle. Le thymol produit à partir de *p*-cymène, présente

un effet antifongique important; il peut provoquer des dommages dans la membrane cellulaire en interagissant avec les stérols et en particulier avec l'ergostérol (Dorman et Deans, 2000; Lima *et al.*, 2013).

De nombreuses études ont démontré l'activité antimicrobienne du thymol en raison de sa structure phénolique (Davidson et Naidu 2000; Skocibusic *et al.*, 2006). La nature antifongique de ce composé est due à sa capacité à modifier la morphologie du mycélium et à provoquer des agrégats entraînant une réduction de leur diamètre et des lyses de la paroi. De plus, le thymol est lipophile lui permettant d'interagir avec la membrane plasmique des cellules fongiques, altérant sa perméabilité ce qui provoque la perte de macromolécules et, par conséquent, la mort du champignon (Thompson, 1996; Lee *et al.*, 2008; Rammanee et Hongpattarakere, 2011; Tolba *et al.*, 2015; Trindade *et al.*, 2015). Un mécanisme similaire a été également observé avec d'autres monoterpènes, tels que le linalol, ce dernier, également pourrait interférer avec la stabilité fongique.

En générale, Il est difficile de corrélér l'activité antifongique avec des composés simples ou des classes de composés. À titre d'exemple, Vilela *et al.* (2009) ont testé l'HE d'*E. globulus* et son composé majeur 1,8-cinéole contre *A. flavus* et *A. parasiticus*. Ces auteurs ont constaté que l'activité antifongique de la molécule isolée n'est obtenue qu'à une forte concentration, ce qui pourrait indiquer que le composant majeur de l'huile n'est pas le seul composant responsable de la limitation de la croissance fongique.

Les HEs se constituent d'une grande variété de composés chimiques, ce qui rend difficile à établir une liaison directe entre un composé parmi d'autres et l'activité antimicrobienne. Il serait évident que, même les composants mineurs peuvent jouer un rôle critique dans les activités antifongiques, et il semble que les effets inhibiteurs sont le résultat de leur action synergique. Ainsi, la possibilité de développement d'une résistance à l'HE de la part du champignon serait réduite, et le spectre des organismes sensibles à son action serait plus large. De plus, les étapes de purification des composés impliqueraient des coûts plus élevés, de sorte que les HEs entières semblent être plus prometteuses dans l'application commerciale que les composés isolés (da Cruz Cabral *et al.*, 2013).

III.6.1.4. Concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration fongicide minimale (CMF) des huiles essentielles

La concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale fongicide (CMF) des HEs étudiées à l'encontre de la souche toxigène *A. flavus* E73 sont résumées dans le **Tableau XVIII**. Il n'existe pas des critères validés pour les points d'extrémité CMI concernant les essais *in vitro*. Néanmoins et, selon Aligiannis *et al.* (2001), l'activité antimicrobienne est considérée plus forte lorsque les valeurs de CMI sont comprises entre 0,05 mg/ml et 0,50 mg/ml, modérée quand elles sont comprises entre 0,6 mg/ml et 1,5 mg/ml et faibles lorsqu'elles sont supérieures à 1,50 mg/ml. Dans cette étude, nous avons testé jusqu'au maximum de concentration de 2,00 mg/ml. Parmi les HEs testées, la plus faible CMI contre *A. flavus* E73 a été obtenue avec l'HE de *T. capitatus* (1,00 mg/ml), cependant, les autres CMIs correspondants aux autres huiles sont les suivantes: *C. cyminum* (1,25 mg/ml), *C. sativum* (1,50 mg/ml), suivie par *C. limon* (1,75 mg/ml), *L. nobilis* (1,75 mg/ml) et *C. sinensis* (2,00 mg/ml). Les CMF des HEs ont été trouvées être *T. capitatus* (1,50 mg/ml), *C. cyminum* (1,50 mg/ml), *C. sativum* (2,00 mg/ml), suivi par *C. limon* (2,00 mg/ml), *L. nobilis* (2,00 mg/ml) et *C. sinensis* (> 2,00 mg/ml).

Table XVIII. Concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration fongicide minimale (CMF) des HEs.

HEs	CMI (mg/ml)	CMF (mg/ml)
<i>C. limon</i>	1,75 ± 0,00	2,00 ± 0,00
<i>C. sinensis</i>	2,00 ± 0,00	> 2,00
<i>C. sativum</i>	1,50 ± 0,00	2,00 ± 0,00
<i>C. cyminum</i>	1,25 ± 0,00	1,50 ± 0,00
<i>L. nobilis</i>	1,75 ± 0,00	2,00 ± 0,00
<i>T. capitatus</i>	1,00 ± 0,00	1,50 ± 0,00

Les CMI et les CMF des HEs vis-à-vis de la souche toxigène *A. flavus* E73 ont été déterminées par la méthode de dilution en milieu liquide SMKY. Cette méthode offre de meilleures conditions aux HEs d'être en contact étroit avec les spores fongiques et de diffuser de manière homogène à l'intérieur de milieu (Kalemba et Kunicka, 2003). Sharma et Tripathi (2008), ont prouvé que l'activité antifongique des HEs peut être mieux évaluée par la méthode

de dilution. Les mêmes observations ont été rapportées par Hammer *et al.* (2003). Dans la méthode de dilution, son seul inconvénient est qu'elle exige une grande quantité de l'HE (Mesa-Arango *et al.*, 2009). Des chercheurs divers ont mis en évidence le potentiel antifongique des HEs en termes de CMI contre la souche fongique *A. flavus*. Dans les travaux de José Velázquez-Nuñez *et al.* (2013) et Singh *et al.* (2010), l'HE de *C. sinensis* var. Valencia a affiché des CMI de 16 mg/ml et 0,75 mg/ml, respectivement. Viuda-Martos *et al.* (2008) ont démontré que l'HE de *C. limon* a présenté une valeur de CMI 0,94% (p/v). Cependant, Stević *et al.* (2014) ont signalé une valeur de 13,40 mg/ml pour *C. limon*. D'après Kedia *et al.* (2014) et Deabes *et al.* (2011), les valeurs CMI des HEs de *C. cuminum* et *C. sativum* ont été estimées à 1,00 mg/ml et 0,60 µl/ml, respectivement. L'HE de *L. nobilis* a exhibé une CMI de 40 µl/ml (Simiç *et al.*, 2004). Dobre et Niculi (2012) ont reporté qu'une inhibition totale de l'HE de *T. capitatus* a été observée à une CMI de 1000 ppm.

Afin d'obtenir une vision globale de l'activité des HEs sur un nombre significatif de microorganismes, il serait nécessaire de multiplier les expérimentations. La quantité de résultats obtenus devient donc importante. Cependant, la comparaison précise de toutes ces données est difficile pour plusieurs raisons: **1.-** L'action d'une HE est dépendante de sa nature et sa composition chimique; il est possible de distinguer différents chimiotypes au sein d'une même famille botanique de plantes. La composition exacte des huiles étudiées n'est pas toujours précisée dans la littérature scientifique et nous pouvons supposer que les différences de composition induites par la zone de provenance de l'huile peuvent influencer sur son activité. **2.-** L'action est dépendante aussi du microorganisme sur lequel elle agit. **3.-** La variété des méthodes utilisées; l'insolubilité des HEs dans l'eau, ou plus généralement dans les milieux utilisés en microbiologie, explique la variété des techniques employées. L'analyse fine de ces méthodes montre des variations de protocole: ajout ou non de surfactant pour solubiliser l'huile, dilution ou non dans le solvant, utilisation de différents milieux de culture, durées d'incubations variables. L'emploi de ces différentes méthodes peut donc induire des fluctuations dans la comparaison des résultats des différentes études.

Les notions de CMI et CMF ne sont pas définies de façon précise et universelle, les auteurs peuvent exprimer les résultats dans différentes unités. Par exemple, la CMI exprimée en % (v/v) ou en µg/ml ou en µl/ml ou encore en mg/ml ce qui rend difficile la comparaison des résultats entre eux. Tous ces facteurs mentionnés ci-dessus peuvent être la cause de divergences dans les résultats de CMI.

III. 6.2. Activité anti-aflatoxine B₁ des huiles essentielles

Les aflatoxines sont les toxines fongiques les plus nocives connues à l'heure actuelle; l'AFB₁ est inclus dans le groupe 1 par l'Agence internationale de recherche sur le Cancer (C.I.R.C, 2002). En conséquence, un autre test complémentaire a été effectué afin de mesurer les potentialités antifongiques que possèdent les HEs de *C. limon*, *C. sinensis*, *C. cuminum*, *C. sativum*, *L. nobilis* et *T. capitatus* non seulement sur la croissance de la souche toxigène *A. flavus* E73 mais aussi sur la production des toxines par cette souche, connue par ces immenses potentialités à produire l'AFB₁. Les résultats sont représentés dans le **Tableau XIX**,

Les résultats enregistrés expliquent clairement la relation proportionnelle entre les poids sec de mycélium et l'AFB₁ (dose-dépendance). A chaque fois que la dose de l'HE dans le milieu de culture SMKY était supérieure, la réduction de biomasse mycélienne a été accompagnée par une baisse dans la sécrétion de l'AFB₁.

Tableau XIX. Effet des HEs sur la biomasse et la production de l'AFB₁.

	Concentration (mg/ml)	Biomasse (mg)	Teneur en AFB ₁ (µg/ml)
<i>C. limon</i>	0,25	832,00 ± 9,16	768,07 ± 16,52
	0,5	776,33 ± 6,02	678,65 ± 37,97
	0,75	592,00 ± 7,54	524,76 ± 16,52
	1,00	469,66 ± 5,50	395,96 ± 21,85
	1,25	296,66 ± 5,77	248,07 ± 21,85
	1,5	182,33 ± 2,51	114,49 ± 14,31
	1,75	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	2,0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	<i>C. sinensis</i>	0,25	880,00 ± 5,60
0,5		833,66 ± 5,50	739,44 ± 21,86
0,75		784,00 ± 4,00	677,43 ± 8,26
1,00		715,00 ± 5,00	639,26 ± 21,85
1,25		655,33 ± 5,03	582,01 ± 21,86
1,5		596,66 ± 7,63	448,41 ± 21,82
1,75		304,00 ± 3,60	214,67 ± 28,62
2,0		0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>C. cuminum</i>		0,25	616,33 ± 4,50
	0,5	4720,00 ± 3,46	372,10 ± 14,31
	0,75	264,33 ± 3,51	195,59 ± 8,26
	1,00	120,00 ± 4,08	515,22 ± 28,62
	1,25	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	1,5	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	1,75	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	2,0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	<i>C. sativum</i>	0,25	716,00 ± 6,55
0,5		585,66 ± 6,02	491,37 ± 21,85
0,75		460,33 ± 8,96	381,65 ± 8,26
1,00		425,33 ± 5,03	372,10 ± 14,31
1,25		265,00 ± 4,58	205,06 ± 29,70
1,5		0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1,75		0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
2,0		0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>L. nobilis</i>		0,25	804,66 ± 5,03
	0,5	742,66 ± 2,51	663,11 ± 36,01
	0,75	651,66 ± 7,63	510,45 ± 21,86
	1,00	583,66 ± 4,04	477,06 ± 8,26
	1,25	284,00 ± 3,60	190,82 ± 29,78
	1,5	173,00 ± 5,56	124,03 ± 21,85
	1,75	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	2,0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	<i>T. capitatus</i>	0,25	470,00 ± 7,93
0,5		264,00 ± 3,60	176,50 ± 36,01
0,75		135,00 ± 5,00	52,47 ± 29,79
1,00		0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1,25		0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1,5		0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1,75		0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
2,0		0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Témoin		0	905,33 ± 6,11

III.6.2.1. Effet des huiles essentielles sur la biomasse mycélienne

La biomasse mycélienne a été significativement ($p < 0,05$) inhibée à toute concentration des HEs (0,25-2,00 mg/ml) en comparaison avec le témoin ($905,33 \pm 6,11$ mg/ml). Les résultats ont révélé que la biomasse mycélienne sous l'influence de l'HE de *C. limon* aux concentrations de 0,25 mg/ml et de 1,50 mg/ml a significativement réduit ($p < 0,05$) la production d'AFB₁ de $832,00 \pm 9,16$ mg à $182,33 \pm 2,51$. D'un autre côté, l'HE de *C. sinensis* a produit une inhibition significative ($p < 0,05$) de $880,00 \pm 5,56$ mg à $304 \pm 3,60$ mg, aux concentrations de 0,25 mg/ml et 1,75 mg/ml. L'inhibition complète de *C. limon* et de *C. sinensis* a été observée à 1,75 mg/ml et 2,00 mg/ml, respectivement. Les mêmes résultats ont été obtenus pour les HEs de *C. cuminum* et de *C. sativum* dont la biomasse mycélienne a été proportionnellement diminuée aux concentrations allant de 0,25 mg/ml à 1,00 mg/ml ($616,33 \pm 4,50$ mg- $120 \pm 4,08$ mg) et de 0,25 mg/ml à 1,00 mg/ml ($716,00 \pm 6,55$ - $265,00 \pm 4,58$). L'inhibition de la biomasse mycélienne totale a été constatée à 1,25 mg/ml et 1,5 mg/ml, respectivement, tandis que les HEs de *L. nobilis* et *T. capitatus*, elle a été enregistrée aux concentrations allant de 0,25 mg/ml à 1,72 mg/ml et de 0,25 mg/ml à 0,75 mg/ml (inhibition dans l'intervalle de $804,66 \pm 5,03$ mg à $173,00 \pm 5,56$ mg et de $470,00 \pm 7,93$ mg à $135,00 \pm 5,00$ mg, respectivement). L'inhibition totale a été enregistrée à 2,00 mg/ml et 1,5 mg/ml, respectivement.

Le pourcentage d'inhibition de la biomasse mycélienne est compris dans l'intervalle [8,09%-79,85%] pour *C. limon*, [2,79%-66,41%] pour *C. sinensis*, [31,91%-86,74%] pour *C. cuminum*, [20,91%-70,72%] pour *C. sativum*, [11,11%-80,88%] pour *L. nobilis* et [48,08%-85,08%] pour *T. capitatus* (**Figure 36**).

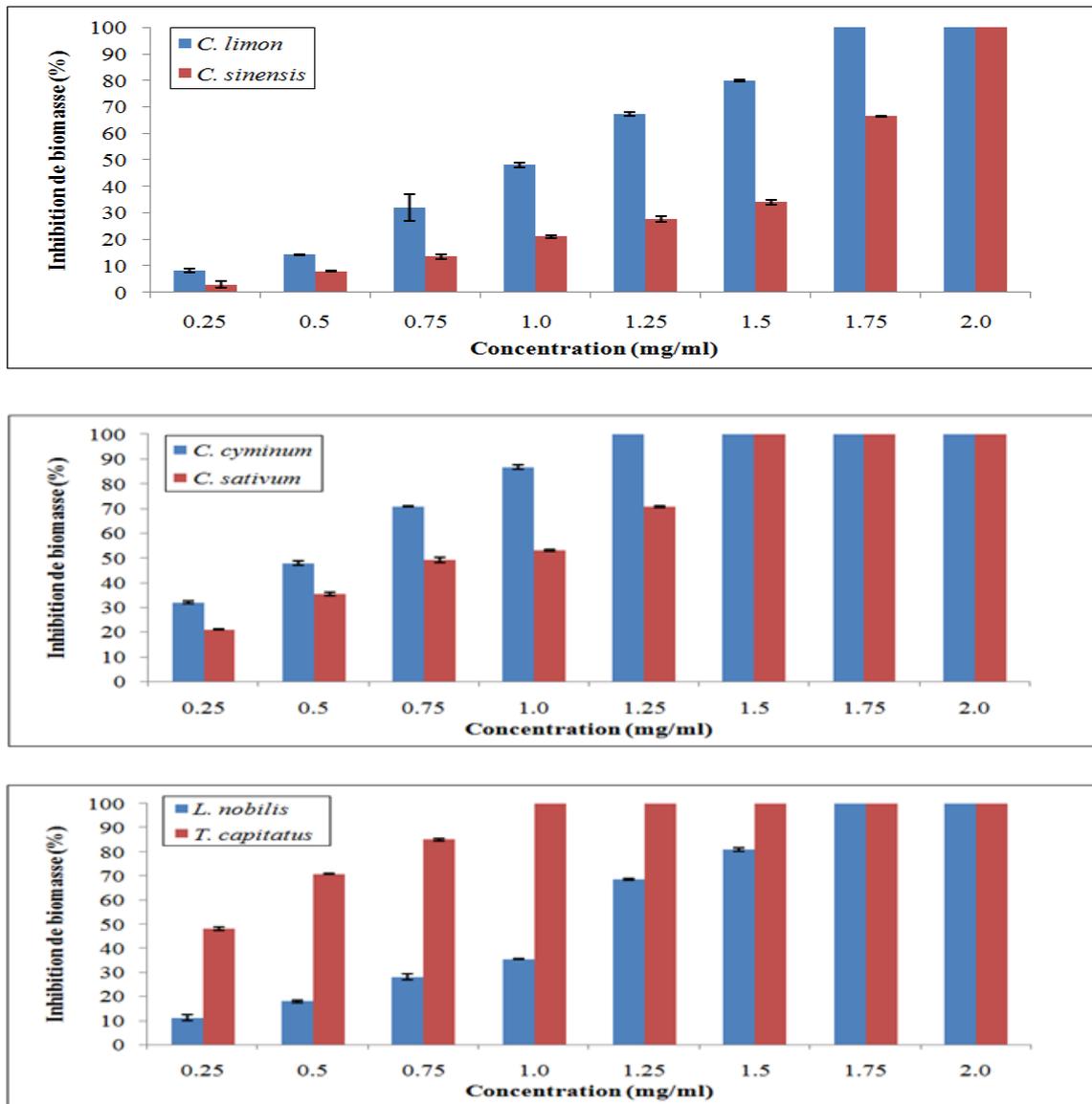


Figure 36. Effet des HES sur la biomasse mycélienne de l'*A. flavus* E73.

III. 6.2.2. Effet des huiles essentielles sur la production d'aflatoxine B₁

Toutes les HES exercent une meilleure activité anti-AFB₁. Cette activité dépend de la concentration en HE utilisée. La présence de l'HE de *C. limon* à des concentrations de 0,25 mg/ml et de 1,50 mg/ml a provoqué une réduction significative ($p < 0,05$) de production d'AfB₁ (de $768,07 \pm 16,52$ à $114,49 \pm 14,31$ $\mu\text{g/ml}$). Cependant, l'inhibition complète d'AfB₁ a été obtenue à une concentration de 1,75 mg/ml. D'un autre côté, une meilleure inhibition de l'AfB₁ est obtenue à des concentrations supérieures en HE de *C. sinensis*. Cette HE a produit une inhibition significative ($p < 0,05$) de $791,92 \pm 21,85$ $\mu\text{g/ml}$ à $214,67 \pm 28,62$

µg /ml, aux concentrations allant de 0,25 mg/ml à 1,75 mg/ml. Il est à noter que l'AFB₁ a été complètement inhibée à une concentration > 1,75 mg/ml

Les deux HEs de *C. cyminum* et de *C. sativum* ont aussi significativement inhibé ($p < 0,05$) la production d'AFB₁, aux concentrations comprises entre 0,25 et 1,00 mg/ml ($515,22 \pm 28,62$ - $57,24 \pm 14,31$ µg /ml) pour l'HE de *C. cyminum*. L'HE de *C. sativum* a aussi causé une réduction de la sécrétion d'AFB₁ de $667,88 \pm 21,86$ µg/ml à $205,06 \pm 29,70$ µg /ml (0,25 mg/ml-1,5 mg/ml). L'HE de *C. cyminum* a complètement inhibé l'AFB₁ à 1,25 mg/ml, alors que l'inhibition de l'AFB₁ par L'HE de *C. sativum* a été enregistrée à 1,5 mg/ml.

Pour l'HE de *L. nobilis*, une concentration comprise entre 0,25 et 1,5 mg/ml a significativement ($p < 0,05$) provoqué une inhibition de la production d'AFB₁ ($739,44 \pm 57,83$ - $124,03 \pm 21,85$). Aussi, l'huile de *T. capitatus* a significativement ($p < 0,05$) inhibé la production d'AFB₁ à des concentrations entre 0,25 et 0,75 mg/ml ($395,26 \pm 29,78$ et $52,47 \pm 29,79$ µg/ml) Cependant, une inhibition complète de la production d'AFB₁ a été obtenue à des concentrations de 1,75 mg/ml et 1,00 mg/ml.

Leur pouvoir inhibiteur d'AFB₁ s'est situé entre 11,5%-86,82% (*C. limon*), 9,24%-75,26% (*C. sinensis*), 40,64%-93,42% (*C. cyminum*), 23,02%-76,33% (*C. sativum*), 14,89%-85,71% (*L. nobilis*) et 54,35%-95,00% (*T. capitatus*) (**Figure 37**).

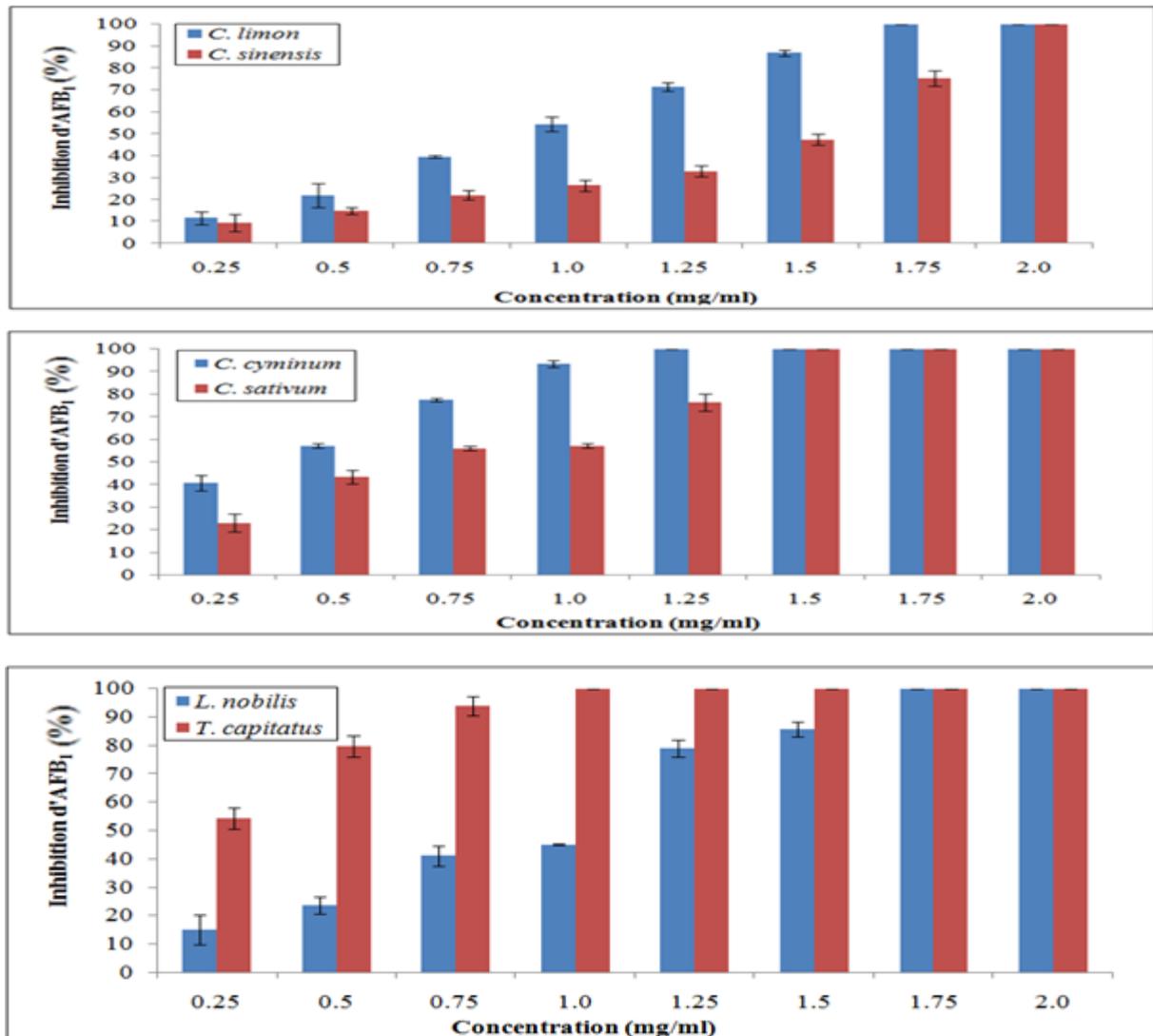


Figure 37. Effet des HEs sur la production d'AFB₁.

Depuis la découverte des aflatoxines dans les années 1960, des progrès rapides se sont développés en mycologie, biochimie et en génétique moléculaire pour clarifier les mécanismes de biosynthèse de ces métabolites.

La biosynthèse d'aflatoxines par les moisissures est considérée à l'heure actuelle comme l'une des meilleures voies métaboliques secondaires identifiées impliquant un processus complexe avec la participation de plus de 25 cluster gènes situés dans une région de 75 kb du chromosome fongique (Ehrlich *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2004). Différentes stratégies ont été utilisées pour prévenir la contamination par des aflatoxines, les cultures sensibles et les produits agricoles stockés (Cleveland et Bhatnagar, 1992; Philips *et al.*, 1994; Bhatnagar et Garcia, 2001). Les inhibiteurs naturels de la croissance fongique et de la

production d'aflatoxine sont des candidats potentiels pour remplacer les produits chimiques de synthèse.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Singh *et al.* (2010) et Bejarano *et al.* (2009). Ces derniers ont testé l'HE de *C. sinensis* et *C. limon* comme antifongiques naturels et, ont constaté une réduction en teneur d'AFB₁ jusqu'aux 68,33% et 73,6%, respectivement. Kedia *et al.* (2014) ont signalé que l'huile de *C. cyminum* a réduit de 67,30% de la production d'AFB₁. Prakash *et al.* (2012) ont observé un taux de réduction > 80% provoqué par l'HE de *C. sativum* vis-à-vis de la production de l'AFB₁. Dans d'autres études, Deabes *et al.* (2011) ont indiqué que l'HE de *C. sativum* peut réduire la production d'AFB₁ jusqu'à 25,38%. L'huile de feuilles de *L. nobilis* a permis une réduction de 98% de d'AFB₁ (Attanda *et al.*, 2007). Concernant *T. capitatus*, peu de travaux se sont déroulés sur l'activité anti-AFB₁ de ses HEs. D'après les résultats, l'HE de *T. capitatus* a généré le plus fort potentiel anti-AFB₁ comparé aux autres HEs. Ces résultats sont compatibles avec ceux de Kohiyama *et al.* (2015).

Nos résultats montrent que les HEs de *C. limon*, *C. sinensis*, *C. cyminum*, *C. sativum*, *L. nobilis* et *T. capitatus* inhibent la croissance d'*A. flavus* E73 et la production d'AFB₁ à concentrations égales. Nos résultats sont similaires à ceux de Reddy *et al.* (2009), qui ont montré que l'HE de *S. aromaticum* à 5 g/kg peut inhiber la croissance d'*A. flavus* et la production d'AFB₁. Mishra *et al.* (2012), ont indiqué que l'HE de *Syzygium jambos* à 0,4 µl/ml présenté à la fois une activité antifongique et une inhibition de la production d'AFB₁ ; mais l'inhibition de la production d'AFB₁ ne pourrait pas être entièrement attribuée à une croissance fongique réduite. De nombreuses études ont confirmé cette hypothèse. Kumar *et al.* (2010) ont rapporté que l'HE de *Lantana indica* à 1,5 et 0,75 µg /ml a complètement inhibé la croissance d'*A. flavus* et la production d'AFB₁, respectivement. Des résultats similaires ont été obtenus par Srivastava *et al.* (2008) concernant les plantes *Cinnamomum camphora* et *Alpina galanga*. La croissance d'*A. flavus* a été inhibée à une concentration de 1000 ppm pour les deux huiles extraites des deux plantes par contre la production d'AFB₁ a été enregistrée à 500 ppm pour *A. galanga* et 750 ppm pour *C. camphora*. Dans une autre étude réalisée par Vilela *et al.* (2009), l'inhibition de l'AFB₁ a nécessité une concentration d'*E. globulus* supérieure à celle de l'inhibition d'*A. flavus* et d'*A. parasiticus*.

Les aflatoxines sont synthétisées de manière extra-mitochondriale à partir de l'acétylcoenzyme A pendant une période d'utilisation rapide du glucose. Ainsi, l'inhibition de

la production d'AFB₁ pourrait être attribuée à l'inhibition du catabolisme glucidique chez l'*A. flavus* en agissant sur certaines enzymes afin de diminuer sa capacité de production d'AFB₁ (Tatsadjieu *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2012). Le mécanisme d'inhibition de la production d'AFB₁ n'est pas très clair selon ces auteurs. Les HEs pourrait interférer avec certaines étapes des voies métaboliques de l'*A. flavus*, qui contrôlent la biosynthèse de l'AFB₁; mais la détermination du mécanisme exact de la suppression de l'AFB₁ par ces HEs nécessite d'autres investigations.

III. 6.3. Fungitoxicités des huiles essentielles

L'activité antifongique *in vitro* des HEs a été aussi estimée vis-à-vis de quelques moisissures alimentaires. Lors de cette étude, les tests ont été aussi réalisés par les techniques de microdilution et sur milieu pour estimer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et concentrations minimales fongicides (CMF). Les résultats du spectre fungitoxique des HEs testées ont montré une large activité antifongique (**Tableau XX, XXI et XXII**).

L'HE de *C. limon* a exercé des activités contre la plupart de moisissures testées; les valeurs de CMI variant entre 0,75 mg/ml et 1,75 mg/ml. Parmi les moisissures, *Fusarium* sp. et *Rhizopus* sp. étaient les plus résistants. Concernant l'HE de *C. sinensis*, les résultats ont démontré que les souches *A. fumigatus*, *A. niger* et *A. tamari* étaient assez sensibles avec une concentration de 1,50 mg/ml. Contrairement aux souches d'*A. carbonarus*, *A. ochracus*, *A. terreus*, *Fusarium* sp. *Penicillium* sp. et *Rhizopus* sp. qui ont montré de faibles activités (CMI: 1,75–2,00 mg/ml).

Les valeurs CMI pour toutes les moisissures testées se sont situées entre 1,50 mg/ml et 2,00 mg/ml. L'HE de *C. cuminum* a inhibé la croissance de la plupart de moisissures avec des concentrations assez uniformes comprises entre 0,50 mg/ml et 1,75 mg/ml et, avec une activité antifongique bonne à faible. *A. carbonarus*, *Fusarium* sp. et *Rhizopus* sp., sont les moisissures qui ont montré plus de résistance à cette huile alors que *A. niger* est parmi les plus sensibles. Une activité bonne à faible dans l'inhibition de la croissance des mycéliums de toutes les moisissures testées a été aussi enregistrée pour l'huile de *C. sativum* (CMI: 0,50–2,00 mg/ml). *A. niger* est la moisissure la plus sensible à cette huile.

La croissance de mycélium des moisissures a été complètement inhibée par l'huile de *L. nobilis* aux concentrations variant entre 1,00 mg/ml et 1,91 mg/ml. Les valeurs les plus élevées de CMI ont été enregistrées contre *Fusarium* sp., il a fallu 1,91 mg/ml pour

l'inhibition totale de sa croissance. Les valeurs de CMI pour l'HE de *T. capitatus* contre la plupart de moisissures testés ont été enregistrées entre 0,91 mg/ml et 1,75 mg/ml. *A. fumigatus*, *A. terreus* et *Penicillium* sp. sont les plus sensibles à cette HE avec une uniformité similaire dans les valeurs de CMI (0,91 mg/ml). Parallèlement avec l'obtention de CMI, les CMF ont été déterminées pour toutes les huiles vis-à-vis toutes les moisissures testées (**Tableau XX, XXI et XXII**). Les valeurs sont très proches de la valeur de CMI, suggérant une activité fongicide des huiles testées.

Tableau XX. Spectre fongitoxique des HEs de *C. sinensis* et *C. limon*.

moisissures	CMI (mg/ml)		CMF (mg/ml)	
	<i>C. limon</i>	<i>C. sinensis</i>	<i>C. limon</i>	<i>C. sinensis</i>
<i>A. carbonarus</i>	1,00 ± 0,00	1,75 ± 0,25	1,25 ± 0,50	> 2,00
<i>A. fumigatus</i>	1,00 ± 0,43	1,50 ± 0,00	1,50 ± 0,25	1,75 ± 0,00
<i>A. niger</i>	1,50 ± 0,00	1,50 ± 0,14	1,75 ± 0,00	2,00 ± 0,00
<i>A. ochracus</i>	1,50 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	> 2,00
<i>A. tamari</i>	1,25 ± 0,25	1,50 ± 0,72	1,75 ± 0,00	1,75 ± 0,00
<i>A. terreus</i>	0,75 ± 0,25	1,75 ± 0,00	1,00 ± 0,25	1,75 ± 0,43
<i>Fusarium</i> sp.	1,75 ± 0,00	1,75 ± 0,00	2,00 ± 0,00	> 2,00
<i>Penicillium</i> sp.	1,50 ± 0,43	1,75 ± 0,00	1,75 ± 0,00	> 2,00
<i>Rhizopus</i> sp.	1,75 ± 0,00	2,00 ± 0,00	> 2,00	> 2,00

Tableau XXI. Spectre fongitoxique des HEs de *C. cyminum* et *C. sativum*.

moisissures	CMI (mg/ml)		CMF (mg/ml)	
	<i>C. cyminum</i>	<i>C. sativum</i>	<i>C. cyminum</i>	<i>C. sativum</i>
<i>A. carbonarus</i>	1,75 ± 0,25	1,50 ± 0,25	> 2,00	> 2,00
<i>A. fumigatus</i>	1,00 ± 0,75	1,00 ± 0,90	1,58 ± 0,28	1,75 ± 0,25
<i>A. niger</i>	0,50 ± 0,25	0,50 ± 0,43	1,25 ± 0,00	1,50 ± 0,25
<i>A. ochracus</i>	1,00 ± 0,00	1,25 ± 0,50	1,58 ± 0,14	2,00 ± 0,00
<i>A. tamari</i>	1,00 ± 0,50	1,0 ± 0,00	1,50 ± 0,00	1,75 ± 0,00
<i>A. terreus</i>	1,00 ± 0,25	1,25 ± 0,00	1,25 ± 0,00	2,00 ± 0,00
<i>Fusarium</i> sp.	1,50 ± 0,43	1,75 ± 0,43	2,00 ± 0,00	> 2,00
<i>Penicillium</i> sp.	1,25 ± 0,25	1,0 ± 0,25	1,75 ± 0,00	1,25 ± 0,00
<i>Rhizopus</i> sp.	1,58 ± 0,38	2,00 ± 0,00	> 2,00	> 2,00

Tableau XXII. Spectre fongitoxique des HEs de *L. nobilis* et *T. capitatus*.

moisissures	CMI (mg/ml)		CMF (mg/ml)	
	<i>L. nobilis</i>	<i>T. capitatus</i>	<i>L. nobilis</i>	<i>T. capitatus</i>
<i>A. carbonarus</i>	1,58 ± 0,14	1,25 ± 0,25	1,58 ± 0,38	1,41 ± 0,38
<i>A. fumigatus</i>	1,00 ± 0,25	0,91 ± 0,38	1,41 ± 0,14	1,25 ± 0,25
<i>A. niger</i>	1,50 ± 0,25	1,08 ± 0,38	> 2,00	1,25 ± 0,50
<i>A. ochracus</i>	1,33 ± 0,14	1,16 ± 0,38	1,66 ± 0,28	1,33 ± 0,62
<i>A. tamari</i>	1,25 ± 0,00	1,00 ± 0,25	1,25 ± 0,25	1,33 ± 0,14
<i>A. terreus</i>	1,16 ± 0,28	0,91 ± 0,52	1,25 ± 0,5	1,25 ± 0,25
<i>Fusarium</i> sp.	1,91 ± 0,14	1,41 ± 0,38	> 2,00	1,83 ± 0,14
<i>Penicillium</i> sp.	1,08 ± 0,14	0,91 ± 0,28	1,25 ± 0,25	1,25 ± 0,25
<i>Rhizopus</i> sp.	1,58 ± 0,38	1,75 ± 0,25	> 2,00	2,00± 0,00

Beaucoup de chercheurs ont confirmé la présence d'une activité antifongique chez les HEs. De même, nos résultats ont prouvé l'existence de cette activité et indiquent que nos HEs ont une activité antifongique intéressante contre une large gamme d'espèces fongiques testées. L'HE de *S. jambos* a présenté une activité fongistatique contre un large spectre de moisissures. Les CMI enregistrées ont été de l'ordre 0,3 µl/ml pour *A. niger*, *A. luchuensis*, *A. conicus* et *Penicillium* sp. et 0,4 µl/ml pour *A. terreus*, *A. wentii*, *A. tamari* et *P. expansum* et 0,3 µl/ml pour *A. fumigatus* et *F. oxysporum* (Mishra *et al.*, 2012).

Zabka *et al.* (2009) ont rapporté que les HEs obtenues à partir de *Carum carvi*, *Cymbopogon nardus*, *Pelargonium roseum*, *Pimenta dioica* et *T. vulgaris* étaient efficaces contre la croissance des espèces fongiques cibles *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *P. expansum*, *P. brevicompactum* et *A. fumigatus*. Dans une autre étude, l'huile de *C. ambrosioides* a montré un fort pouvoir d'inhibition envers la croissance d'*A. fumigatus*, *Botryodiplodia theobromae*, *F. oxysporum*, *Phythium debaryanum* et *Sclerotium rolfsii* (Kumar *et al.*, 2007). L'HE de *Peumus boldus* a montré une bonne activité contre *A. niger* et *Fusarium* spp. (Souza *et al.*, 2005).

Viuda-Martos *et al.* (2008) ont montré l'efficacité des HEs de *C. limon*, *C. sinensis*, *C. reticulata* et *C. paradisi* sur la croissance de *P. chrysogenum*, *P. verrucosum* et *A. niger*. L'inhibition de l'*A. niger* a été obtenue à 0,94% de toutes les HEs ont été utilisées. La réduction maximale de croissance de *P. chrysogenum* et de *P. verrucosum* a été observée avec l'HE de pamplemousse.

Une forte capacité antifongique de l'HE de feuille de cannelle a été démontrée par Singh *et al.* (2007) sur *A. niger*, *F. moniliforme*, *F. graminearum*, *P. citrinum* et *P. viridicatum*

Deba *et al.* (2008) ont testé les activités fongitoxiques des HEs de fleurs de *Bidens pilosa* (une plante largement distribuée dans les régions subtropicales et tropicales du monde) contre *Fusarium* spp. Ils ont constaté que *Fusarium solani* est l'espèce la plus efficace, suivie de *F. oxysporum*. Naeini *et al.* (2010) ont observé une grande sensibilités des *Fusarium* aux HEs d'herbes longtemps été utilisés comme épices ou sources médicinales importantes en Iran, en mettant l'accent sur la variabilité des effets antifongiques contre différents isolats de *Fusarium*. L'activité anti-*Fusarium* la plus élevée a été observée avec l'HE de *C. cyminum* et *Zataria multiflora* contre les espèces non toxigènes (*F. solani* et *F. oxysporum*) et celles toxigènes (*F. verticillioides*, *F. poae* et *F. equiseti*).

Prakash *et al.* (2012) ont évalué l'activité antifongique des HEs d'*O. majorana*, *C. sativum*, *H. spicatum*, *C. myrrha* et *C. odorata*. Elles se sont montrées actives contre *A. niger*, *A. candidus*, *A. terreus*, *A. fumigatus*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *F. nivale* et *P. italicum*.

La plupart de moisissures ont montré une certaine sensibilité aux différents traitements; une inhibition complète a été enregistrée avec des concentrations allant entre 1,5 à 3,5 µl/ml. Tzortzakis (2009) a signalé que l'HE de la *C. zeylanicum* a montré une activité fongistatique considérable contre *Rhizopus stolonifer* et *A. niger*. Passone *et al.* (2012) ont montré à leur tour que l'HE *Peumus bolidus* (1000 µl/l) a provoqué une inhibition complète de la croissance d'*A. niger* et *A. carbonarius* alors que la croissance mycélienne a complètement été inhibée par l'HE de *S. aromaticum* à une concentration de 5000 µl/l. Dans une étude sur l'activité antifongique des HEs de *C. maxima* et *C. sinensis* testées à une concentration de 750 ppm, une forte inhibition a été observée vis-à-vis de neuf (09) moisissures: *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Curvularia lunata*, *F. oxysporum*, *Helminthosporium oryzae* et *Trichoderma viride* (Singh *et al.*, 2010). Les HEs de *Eugenia caryophyllata*, *T. vulgaris*, *T. capitatus* ont été testées contre quatre souches fongiques *A. oryzae*, *A. brasiliensis*, *F. culmorum*, *F. graminearum*. Les résultats ont montré un large spectre d'inhibition exercé par l'huile de *T. capitatus* avec une CMI de 1000 ppm. Il a été indiqué que les HEs d'*E. caryophyllata* et *T. vulgaris* étaient plus

actives pour une CMI de 1500 ppm contre plusieurs souches fongiques (Dobre et Niculi, 2012).

Dans notre étude, la fungitoxicité des HEs ont été principalement testées sur des *Aspergillus* parcequ' ils sont capables de provoquer des dégâts importants, notamment ceux liés aux contaminations des denrées alimentaires, ils sont capables de coloniser de nombreux produits d'origine végétale et de produire des mycotoxines (Scheidegger et Payne, 2003). Parmi les mycotoxines produites par ce genre fongique, les aflatoxines, les ochratoxines et la patuline. Nous les avons aussi testées contre *Fusarium* et *Penicillium* car ils peuvent aussi produire des mycotoxines telles que zearalénone, citrinine, ochratoxine A, fumonisine, patuline et deoxynivalénol. Ces moisissures mycotoxinogènes devraient faire l'objet de moyens de lutte en utilisant les HEs; cela suggère que ces dernières peuvent présenter une alternative avec un large spectre d'application dans le contrôle biologique et la lutte contre les moisissures mycotoxinogènes.

III. 7. Activité antioxydante des huiles essentielles

Les antioxydants sont connus comme des molécules capables d'inhiber le processus d'oxydation. L'utilisation de certains antioxydants synthétiques cause des dommages hépatiques et de toxicité. En conséquence, les antioxydants naturels ont attiré plus d'attention de nos jours car ils ont une toxicité potentielle minimale et posent un risque minime. Deux méthodes différentes ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des HEs: l'activité de piégeage des radicaux DPPH et le blanchiment de l'acide β -carotène/acide linoléique.

III. 7.1. Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode du DPPH

L'activité antioxydante des HEs de *C. limon* , *C. sinensis* , *C. cyminum* , *C. sativum* , *L. nobilis* et *T. capitatus* a été évaluée par le test DPPH, exprimé en IC₅₀, L'IC₅₀ est inversement liée à la capacité antioxydante d'un composé ou d'une HE, car il exprime la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante est grande (performance supérieure). Les IC₅₀ ont été calculées à partir des graphes par extrapolation (**Annexes III**) et les résultats de cette activité figurent dans le **Tableau XXIII**.

Les HEs de *C. cyminum*, *L. nobilis* et *T. capitatus* étaient les plus actives et pouvaient ramener le radical libre stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) violet en diphényl-picrylhydrazine jaune avec des IC₅₀ de 494,93 µg /ml ± 8,82, de 601,81 µg /ml mg/ml ± 5,78 et 619,16 µg /ml ± 3,94, respectivement. Les HEs de *C. sinensis*, *C. sativum* et *C. limon* étaient les moins actives avec des IC₅₀ respectifs de 752,26 ± 6,09, de 756,43 ± 12,63 et 1570,10 ± 19,57.

L'activité antioxydant par la même méthode a été mesurée pour le BHT (antioxydant de référence). Ce dernier a manifesté un pouvoir antioxydant très puissant sur le radical libre DPPH, justifié par la faible valeur IC₅₀ obtenue (306,15 µg/ml). À la lumière des résultats obtenus, l'activité antioxydante de BHT est très différente et élevée par rapport aux HEs ($p < 0,05$). L'antioxydant de référence est le plus puissant piègeur du radical libre DPPH d'après l'analyse statistique, cela n'empêche pas qu'un certain nombre d'HEs sont très actifs et sont aussi d'excellents piègeurs après le BHT vue les valeurs IC₅₀ très basses obtenues expérimentalement. Ces résultats suggèrent que nos HEs contiennent des agents piègeurs de radicaux libres agissant comme antioxydants primaires. L'action de ces antioxydants est supposée être due à leur capacité de donation d'atomes d'hydrogène ou d'électrons (Lee *et al.*, 2007).

Tableau XXIII. Résultats de l'activité antioxydante.

HEs	IC ₅₀ (µg/ml)	β-carotène/acide linoléique (%)
<i>C. limon</i>	1570,10 ± 19,57	36,19 ± 0,64
<i>C. sinensis</i>	752,26 ± 6,09	55,56 ± 0,64
<i>C. cyminum</i>	494,93 ± 8,82	47,68 ± 0,68
<i>C. sativum</i>	756,43 ± 12,63	29,29 ± 1,19
<i>L. nobilis</i>	601,81 ± 5,78	45,48 ± 1,36
<i>T. capitatus</i>	619,16 ± 3,94	65,55 ± 0,87
Témoin: BHT	306,15 ± 4,49	94,77 ± 1,61

Les différents travaux concernant l'évaluation de la capacité des HEs de *C. limon*, *C. sinensis*, *C. cyminum*, *C. sativum*, *L. nobilis* et *T. capitatus* de piéger le radical DPPH• ont fourni des résultats différents qui varient d'un écotype à un autre. L'étude de Jazet Dondmo *et al.* (2008) a révélé que l'HE de *C. sinensis* var. Casagrande Caméronien était capable de piéger le radical DPPH• avec une IC₅₀ de l'ordre de 7,40 g/l, alors que l'HE de *C. sinensis*

var. Osbeck de l'Inde a présenté une IC_{50} de 9,45 $\mu\text{g/ml}$ (Singh *et al.*, 2010). Par ailleurs, Jazet Dongmo *et al.* (2013), Ben Hsouna *et al.* (2017) ont établi que l'HE de *C. limon* var. Eureka exerce un effet antiradicalaire à des concentrations de 3,12 mg/ml et 15,05 $\mu\text{g/ml}$, respectivement. Ramy *et al.* (2010) ont observé que les HEs de *C. cyminum* et de *C. sativum* ont présenté une IC_{50} de 72,3 et 74,05 $\mu\text{g/ml}$. Kedia *et al.* (2014) ont rapporté une valeur de 0,092 $\mu\text{l/ml}$ concernant l'HE de *C. cyminum*. D'après Mkaddem *et al.* (2010) et Tabti *et al.* (2014), l'HE de *T. capitatus* a montré une IC_{50} de 0,59 mg/l et 102 $\mu\text{l/ml}$, respectivement. Concernant l'HE de *L. nobilis*, Cherrat *et al.* (2014) ont trouvé que l'HE du laurier marocain avait une activité de piégeage DPPH efficace et, à de faibles concentrations (1,25 $\mu\text{l/ml}$). Snuossi *et al.* (2016) ont indiqué que *L. nobilis* récolté en Tunisie a présenté une activité antioxydante efficace mais à une concentration plus élevée (135 $\mu\text{g/ml}$). Boughendjioua (2017) a rapporté que l'HE du laurier Algérien possède une activité de piégeage DPPH efficace de l'ordre de 94,93 mg/ml et selon Yilmaz *et al.*, (2013), l'HE de laurier turque a donné une IC_{50} de 59,2 $\mu\text{g/ml}$.

Ces différences dans l' IC_{50} peuvent être attribuées à la différence dans la concentration de DPPH• utilisée dans le test d'une part (Sharma et Bhat, 2009) et d'autre part à l'influence des autres facteurs qui peuvent affecter la composition chimique et par conséquent la capacité antioxydante des échantillons, comme la variété, les conditions de la croissance de la plante, les conditions du stockage des HEs et les méthodes d'extraction pratiquées (Mastelic *et al.*, 2008).

De nombreuses études ont montré que les activités biologiques des HEs des plantes aromatiques sont liées à leur composition chimique et notamment aux composés majoritaires. Cependant, des composés minoritaires peuvent interagir directement, ou d'une façon synergique ou antagoniste, pour créer un mélange doté d'activité biologique. Plusieurs composés que nous avons détectés dans les HEs ont déjà été décrits comme antioxydants. Il s'agit notamment du limonène, α -pinène, β -pinène et myrcène et géraniol (Inouye *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2010; Jing *et al.*, 2014), terpène-4-ol (Lertsatitthanakorn *et al.*, 2006), linalol (Houghton, 2004), camphor (Bozin *et al.*, 2007), γ -terpinène et thymol (Ruberto et Baratta, 2000), cuminaldéhyde (Chen *et al.*, 2013) et 1,8-cinéole (Wang *et al.*, 2008). Il semble d'après ces résultats que l'activité antioxydante des HEs peut être due à la présence de différentes molécules.

III.7.2. Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode du β -carotène/acide linoléique

La dégradation par les phénomènes oxydatifs des lipides (peroxydation lipidique) a été largement étudiée dans les systèmes alimentaires. Un des mécanismes les plus connus est celui des acides gras insaturés, notamment l'acide linoléique (Moon et Shibamoto, 2009). Dans ce contexte, pour étudier l'activité antioxydante de nos HEs, la méthode de blanchiment du β -carotène a été utilisée. Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, suite à l'abstraction des atomes d'hydrogènes à partir de groupements méthylènes diallyliques de l'acide linoléique. Ces radicaux libres vont par la suite, oxyder le β -carotène hautement insaturé entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchiment du β -carotène (Kulisic *et al.*, 2004; Conforti *et al.*, 2006). C'est cette propriété de décoloration que nous avons employé pour l'évaluation de l'activité antioxydante de nos HEs.

À la lumière des tests DPPH, la méthode **β -carotène/acide linoléique** a donné de résultats différents ($p < 0.05$). Selon ce test, l'activité antioxydante la plus élevée a été associée à l'HE de *T. capitatus* (65,55%) suivie par l'HE de *C. sinensis* (55,56%), *C. cyminum* (47,68%) et *L. nobilis* (45,48%) (**Tableau 23**). Cependant, l'HE de *C. limon* est moins active (36,19%) tout comme l'HE de *C. sativum*, (29,29%). Toutes ces activités restent significativement ($p < 0,05$) inférieure à celle de BHT qui a donné un pourcentage d'inhibition de 94,77%.

L'HE de *C. sinensis* et *C. limon* se sont avérées être inhibiteurs de l'oxydation de l'acide linoléique. Les études de Kamal *et al.* (2013) et Ben Hsouna *et al.* (2017) ont démontré l'efficacité de *C. sinensis* et *C. limon* à inhiber la dégradation du β -carotène. En outre, les HEs de *C. cyminum* et de *C. sativum* ont montré une activité antiradicalaire. Cependant, elles étaient moins efficaces dans le test de blanchissement du β -carotène. Gachkar *et al.* (2007) ont observé que l'aptitude de *C. cyminum* à réduire l'oxydation de l'acide linoléique était meilleure que son potentiel antiradicalaire. Une autre étude a prouvé que l'HE de *C. sativum* possède une faible capacité à inhiber l'oxydation de l'acide linoléique (Prakash *et al.*, 2012). L'HE de *L. nobilis*, s'est avérée moins efficace dans le test de blanchissement du β -carotène. Ozcan *et al.* (2005) ont montré que l'HE de *L. nobilis* possède une forte activité antioxydante, nettement supérieure à notre HE. Selon les résultats,

l'HE de *T. capitatus* a manifesté la plus forte aptitude à inhiber la formation des radicaux par l'acide linoléique par rapport aux autres HEs testées. Nos résultats ont rejoint ceux de M'hir *et al* (2012), qui ont confirmé la bonne performance de l'HE de *T. capitatus*.

D'après les résultats obtenus, nos HEs testées semblent inhiber l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β -carotène par rapport au contrôle positif BHT. Ces résultats sont probablement dus à la haute spécificité de l'essai du blanchissement du β -carotène pour les composés lipophiles (Gachkar *et al.*, 2007).

III.8. Relation entre l'activité antioxydante et la production d'Aflatoxine B₁

Lorsqu'ils sont exposés à un stress oxydatif environnemental, les moisissures activent plusieurs lignes de défense afin de se protéger contre les dommages cellulaires que peuvent induire l'apparition de ROS. Il a été suggéré que la première ligne de défense est représentée par l'activation d'enzymes anti-oxydantes (catalases (CAT), superoxyde dismutases (SOD), peroxydases). Les SOD et les CAT sont les enzymes anti-oxydantes majeures. Une modulation de l'activité des SOD et des CAT a été directement associée à un changement des niveaux de ROS mais aussi à une modulation de la production d'aflatoxines chez *A. flavus* (Grintzalis *et al.*, 2014). De plus, il a été démontré que la production d'aflatoxines est induite par une augmentation du stress oxydatif (ROS) chez *A. flavus* et *A. parasiticus* et que les souches aflatoxinogènes exigent des taux supérieurs d'oxygène par rapport aux souches non aflatoxinogènes (Jayashree et Subramanyam, 2000). Narasaiah *et al.* (2006) ont rapporté que les ROS jouent un rôle vital dans le déclenchement de la production d'aflatoxine ou de ses intermédiaires précurseurs. La peroxydation lipidique est la conséquence de la formation de ROS et s'est avérée être impliquée dans la synthèse de l'aflatoxine. Zjalic *et al.* (2006) et Kim *et al.* (2008) ont montré que la biosynthèse des aflatoxines est liée à la formation de ROS et à la peroxydation des cellules fongiques. D'un autre côté, Ferreira *et al.* (2013) ont rapporté que le mécanisme d'effet d'inhibition de l'HE de *Curcuma longa* L. et de la curcumine pour la production d'aflatoxines peut être lié à l'inhibition des étapes ternaires de la biosynthèse des aflatoxines impliquant la peroxydation et l'oxygénation des lipides. Selon Farag *et al.* (1989), la présence des groupes phénoliques pour former les liaisons hydrogène avec les sites actifs des enzymes cibles est capable d'augmenter l'activité antimycotoxigène. Jayashree et Subramanyam (1999) ont signalé que les composés phénoliques inhibent la production d'aflatoxine sans effet significatif sur la croissance de l'organisme. Hua *et al.* (1999) ont montré que les composés phénoliques présentent une activité inhibitrice sur la biosynthèse de

l'AFB₁ par *A. flavus*. Ils ont montré une capacité de constituants phénoliques à inhiber la peroxydation lipidique. En outre, Il a été démontré que l'activité anti-toxinogène des composés phénoliques, constituants, entre autres, des HEs, est associée à une inhibition de l'activité de MnSOD (ou Sod2), une SOD mitochondriale qui a pour rôle de détoxifier des radicaux libres générés au cours de cette respiration (Kim *et al.*, 2006, 2004). Ce phénomène entraîne l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale et, par la suite, le blocage de la synthèse d'acétyl-CoA, précurseur de l'aflatoxine. Ceci pourrait donc contribuer à l'effet anti-aflatoxinogène observé des HEs (Prakash *et al.*, 2012).

Les HEs de *C. limon*, *C. sinensis*, *C. cyminum*, *C. sativum*, *L. nobilis* et *T. capitatus* ont montré une activité antioxydante significative ($p < 0,05$). Par conséquent, la haute efficacité inhibitrice de l'AFB₁ de ces HEs peut être due à leurs propriétés antioxydantes en se liant à l'inhibition de la peroxydation et de l'oxygénation des lipides dans le processus de biosynthèse de l'AFB₁. En raison de l'efficacité anti-aflatoxigène ainsi que antioxydante, ces HEs peuvent protéger les matières premières à base de plantes de la contamination par l'AFB₁ et peuvent également améliorer leur qualité en empêchant la conversion de leurs métabolites secondaires actifs aux composants moins efficaces en raison du stress oxydatif.

III. 9. Phytotoxicité des huiles essentielles

La phytotoxicité de nos HEs a été évaluée pour déterminer leur effet sur la germination et la croissance des semis de blé tendre d'AS 81189 A (variété Ain Abid) et d'HD 1220 (variété Hiddab) (**Tableau XXIV**).

III.9.1. Effet sur la germination

Les résultats concernant les traitements des graines de blé des deux variétés par les HEs sur le taux de germination sont présentés dans le **Tableau XXIV**. Nous avons observé que les HEs de *C. limon*, de *C. sinensis*, de *C. cyminum*, de *C. sativum* et de *T. capitatus* n'ont montré aucun effet significatif sur la germination des graines de HD1220 (Hiddab) et d'AS 81189 A (Ain Abid) par rapport au témoin non traité ($p > 0,05$). D'un autre côté, le taux de germination des graines de blé des deux variétés traitées avec l'HE de *L. nobilis* est significativement différent de celui du témoin ($p < 0,05$), ce qui a engendré un effet néfaste sur la germination des graines de blé (**Annexe II**).

III. 9.2. Effet sur la longueur de la radicule et de la tigelle

Les HEs de *C. limon* et *C. sinensis*, n'ont pas affecté significativement la longueur de la radicule et de la tigelle des deux variétés de blé en comparaison avec les témoins ($p > 0,05$). Les tests de l'effet des HEs de *C. cyminum* et de *C. sativum*, que nous avons effectués sur les deux variétés montrent les tigelles et les radicules de la variété Ain Abid sont plus affectées par la présence de l'HE de *C. sativum* ($p < 0,05$).

La longueur des radicules et des tigelles des graines d'Ain Abid traitées avec l'HE de *T. capitatus* a été diminuée, mais l'effet de cette HE sur la longueur des radicules et des plumules des graines de Hiddab par la même huile était plus élevée ($p < 0,05$). Les effets phytotoxiques de l'HE de *T. capitatus* sur la croissance des semis HD1220 (Hiddab) pourraient s'expliquer par la présence du composé phénolique (thymol). Paster *et al.* (1995), ont signalé que le traitement par le thymol peut réduire la germination des graines de blé. Angelini *et al.* (2003) ont révélé que le thymol possède un fort effet sur la croissance des plantules. L'HE de *L. nobilis* a montré un effet inhibiteur élevé sur les radicules et les tigelles de deux variétés de blé ($p < 0,05$). Cet effet est supérieur à celui des autres HEs testées dans cette étude.

Bien que le mécanisme herbicide de l'HE n'a pas été étudié dans la présente étude, il est bien connu que les monoterpènes dans les HEs ont des effets phytotoxiques qui peuvent causer des changements anatomiques et physiologiques dans les semis de la plante, conduisant à l'accumulation de globules lipidiques dans le cytoplasme, réduction de certains organites tels que les mitochondries, éventuellement en raison de l'inhibition de la synthèse de l'ADN ou de la perturbation des membranes entourant les mitochondries et les noyaux (Koitabashi *et al.*, 1997; Zunino et Zygadlo, 2004; Nishida *et al.*, 2005). Kordali *et al.* (2008) ont rapporté que les HEs constituées de nombreux composants majeurs et d'autres composés mineurs peuvent affecter l'activité phytotoxique.

De nombreux auteurs ont étudié la phytotoxicité de certains HEs. Cinq plantes (*O. majorana*, *C. sativum*, *H. spicatum*, *C. myrrha*, et *C. odorata*) ont été testées pour leur phytotoxicité sur le pois chiche et, ils ont été jugés non phytotoxiques (Prakash *et al.*, 2012). Shukla *et al.* (2012) ont testé l'effet de l'HE de *Callistemon lanceolatus* et de son composant majeur le 1, 8-cinéole sur la germination des grains de pois chiches. Ces auteurs ont noté qu'il n'y avait pas d'effet indésirable, suggérant leur nature non-phytotoxique. Des résultats

similaires ont été obtenus par Kedia *et al.* (2014), qui ont rapporté que l'HE du cumin n'a révélé aucun effet phytotoxique sur la germination des graines de blé et de pois chiche.

Au cours du test phytotoxique, les HEs (sauf *L. nobilis*) n'ont pas présenté un effet néfaste sur les grains de blé montrant leur caractère non phytotoxique pour le traitement des denrées alimentaires stockées même à des fins de semis. L'huile de *L. nobilis* peut seulement être recommandée pour les produits alimentaires stockés à des fins de consommation. Cependant, le profil de sécurité des huiles doit être enregistré.

Tableau XXIV. Effet des HEs sur la germination et la croissance des grains de blé.

Echantillons	Taux de germination (%)	Croissance des grains (mm)	
		Radicule	Tigelle
HD1220 (Hiddab)			
- <i>C. limon</i>	80,00 ± 4,00	52,66 ± 3,92	43,70 ± 1,70
- <i>C. sinensis</i>	77,33 ± 3,05	45,50 ± 1,81	38,50 ± 2,50
- <i>C. cyminum</i>	82,00 ± 2,00	58,53 ± 1,09	46,50 ± 0,26
- <i>C. sativum</i>	78,66 ± 4,16	58,03 ± 2,74	50,00 ± 2,68
- <i>T. capitatus</i>	87,33 ± 5,03	27,93 ± 2,93	18,76 ± 2,87
- <i>L. nobilis</i>	60,00 ± 6,00	21,40 ± 2,62	14,60 ± 2,10
- Témoin	92,66 ± 3,05	67,7 ± 2,98	57,83 ± 1,30
AS 81189 A (Ain Abid)			
- <i>C. limon</i>	72,66 ± 3,05	60,06 ± 4,24	52,96 ± 6,16
- <i>C. sinensis</i>	71,33 ± 3,05	59,73 ± 2,07	49,03 ± 2,25
- <i>C. cyminum</i>	83,33 ± 4,16	53,03 ± 2,03	45,40 ± 2,51
- <i>C. sativum</i>	85,33 ± 5,05	37,53 ± 2,40	22,00 ± 1,83
- <i>T. capitatus</i>	87,33 ± 4,16	58,40 ± 0,80	44,30 ± 0,70
- <i>L. nobilis</i>	59,33 ± 3,05	18,53 ± 1,13	9,00 ± 0,85
- Témoin	90,66 ± 4,16	69,4 ± 2,98	60,30 ± 4,59

III. 10. Essai *in vivo*: Fumigation des huiles essentielles sur des aliments (blé)

Les résultats des essais *in vivo* dans le système alimentaire sont basés sur le pourcentage de protection du blé contre *A. flavus* E73 dans les traitements non inoculés et inoculés. Les HEs ont montré une efficacité remarquable dans les échantillons de blé fumigés pendant le stockage jusqu'à 6 mois fournissant jusqu'à > 75% de protection des graines de blé fumigées de la contamination par *A. flavus* E73 (**Tableau XXV**).

Tableau XXV. Protection des grains (%) de blés traités avec les HEs après 6 mois de stockage.

HEs	Concentration (mg/ml)	Le nombre total d'isolats d' <i>A. flavus</i>		Protection (%)
		Témoin	Traitements	
HD1220 (Hiddab)				
- <i>C. limon</i>	1,75	43	12	72,09
- <i>C. sinensis</i>	2,00	43	18	58,13
- <i>C. cyminum</i>	1,25	43	14	67,64
- <i>C. sativum</i>	1,50	43	17	60,46
- <i>L. nobilis</i>	1,75	43	10	76,74
- <i>T. capitatus</i>	1,00	43	7	83,72
AS 81189 A (Ain Abid)				
- <i>C. limon</i>	1,75	33	11	66,66
- <i>C. sinensis</i>	2,00	33	15	54,54
- <i>C. cyminum</i>	1,25	33	8	75,75
- <i>C. sativum</i>	1,50	33	13	60,60
- <i>L. nobilis</i>	1,75	33	16	51,51
- <i>T. capitatus</i>	1,00	33	10	69,69

En général, pour obtenir le même effet dans les produits alimentaires que ceux observés dans les essais *in vitro*, des concentrations plus élevées des HEs doivent être utilisées comme ils l'ont déjà rapporté certains auteurs (Tian *et al.*, 2011; Djenane *et al.*, 2012; El-Mogy et Alsanius, 2012; Kedia *et al.*, 2014; Prakash *et al.*, 2014; Djenane *et al.*, 2018,2019). Cela pourrait être expliqué par le fait que lorsque les HEs sont en contact avec la matrice alimentaire, hautement hydrophobe, les substances volatiles actives de l'huile seront liées par des composants alimentaires (glucides, lipides et protéines), les autres composants sont répartis dans le produit selon leur affinité avec l'eau. Si c'est le cas, la saveur indésirable et sensorielle des changements peuvent survenir. Il a été suggéré que les lipides dans les aliments pourraient former un revêtement autour du micro-organisme, en les protégeant d'agents antimicrobiens. En outre, la plus faible teneur en eau dans les aliments par rapport aux milieux de laboratoire pourrait entraver le transfert des molécules antimicrobiennes au site actif dans la cellule microbienne. Le taux d'humidité joue un rôle important pendant le traitement. Paster *et al.* (1995), ont supposé que la pénétration des huiles dans les parties internes du grain pourrait être améliorée en présence de l'eau, et donc des microorganismes pathogènes pourraient plus facilement être contrôlés dans les parties intérieures des grains moites. Par conséquent, la nature du système alimentaire, la densité de l'inoculum fongique,

les conditions de stockage et leur teneur en humidité doivent être pris en compte lors de la prescription de la concentration *in vivo* des HEs contre la contamination alimentaire par des moisissures.

D'après prakash *et al.* (2012), les conservateurs organiques répandus pourraient montrer seulement l'activité antioxydante et étant très faible en tant qu'inhibiteur de croissance fongique et suppresseur d'aflatoxine. En outre, il existe également des rapports sur l'amélioration de la sécrétion de l'aflatoxine par de nombreux conservateurs synthétiques (Badii et Moss, 1988). Les HEs devraient être plus avantageuses que les produits synthétiques conservateurs en raison de leur nature biodégradable. Les HEs sont un mélange de différents composants majeurs et mineurs qui agissent ensemble pour leurs activités biologiques. Pour cette raison, il y aurait moins de chance de développement de souches fongiques résistantes comme il a été rapporté pour le cas de nombreux conservateurs synthétiques (Ishii, 2006). Actuellement, de nombreuses formulations d'HEs commercialisées pourraient ainsi être utilisées dans les cultures agricoles selon le cahier des charges de «l'Agriculture Biologique» tels SporanTM (Huile de romarin), PromoxTM (Thym), Base naturelle DMC (romarin, sauge, combinaison d'huile de *citrus*) et Citri-VTM® (combinaison d'huile de *citrus*) (Shukla *et al.*, 2009; Phillips *et al.*, 2012), E-RaseTM (HE de jojoba), SporanTM (HE de romarin), PromaxTM (HE de thym) (Dayan *et al.*, 2009), CinnamiteTM et ValeroTM (HE de cannelle) (Isman, 2000), Talent[®] (à base de carvone, HE de cumin ou d'aneth) et eugenol-Tween[®] (Prakash *et al.*, 2015).

Les HEs sont volatiles, les vapeurs peuvent facilement être éliminées des aliments fumigés après séchage au soleil. À cet égard, la technologie de microencapsulation est employée pour utiliser les HEs comme antimicrobiens pour la conservation des denrées alimentaires stockées et dans l'industrie alimentaire pour la stabilisation de la saveur avec libération contrôlée des vapeurs (Burt, 2004; Donsi *et al.*, 2011).

Les HEs des plantes aromatiques et médicinales sont potentiellement utiles comme agents antimicrobiens et leur utilisation comme les médicaments sont reconnus depuis longtemps (Kim *et al.*, 2005). L'attraction de la société moderne vers les produits à base de plantes désirent des ingrédients moins synthétiques dans les aliments et la recommandation que ces produits à base de plantes sont GRAS en tant qu'additifs alimentaires pour l'exploitation des HEs comme additifs alimentaires (Smid et Gorris, 1999).

Les conclusions de la présente étude justifient des recherches futures pour l'application de ces HEs à grande échelle comme fumigants dans les systèmes alimentaires pour améliorer leur durée de conservation en contrôlant leurs pertes de contamination des moisissures et peroxydation lipidique.

L'objectif principal de ce travail de thèse était de tester des HEs de six plantes locales (*C. limon*, *C. sinensis*, *C. cyminum*, *C. sativum*, *L. nobilis* et *T. capitatus*) pour leur capacité à inhiber la croissance d'*A. flavus* et la production d'AFB₁. En effet, cinquante cinq ans après sa découverte, la présence de l'AFB₁ dans la chaîne alimentaire est toujours un sujet d'actualité et ce composé reste un contaminant majeur de par sa toxicité. Plusieurs stratégies de lutte ont été développées pour contrer le développement des souches aflatoxinogènes et, par la suite, la production d'aflatoxines. Ces méthodes sont surtout reposées sur une lutte chimique dont l'efficacité est de plus en plus limitée et controversée.

Cette étude a porté dans un premier temps sur l'extraction des HEs par hydrodistillation, caractérisation physico-chimique et analyse de la composition chimique de ces huiles par CG/SM. Dans un deuxième temps, la recherche d'activité biologique et les potentialités que peuvent avoir ces HEs *in vitro*, à savoir les capacités antifongique, antiaflatoxinogène et antioxydante. Ensuite, étude *in vivo* de l'effet des vapeurs des HEs sur le substrat.

Sur le plan chimique, les HEs ont montré une composition variée, où le limonène était le composé majoritaire dans les HEs de *C. sinensis* (82,6%) et *C. limon* (54,95%). Les HEs de *C. cyminum* et *C. sativum* ont été dominées par le cuminaldéhyde (65,98%) et le linalol (78,86%), respectivement. Le 1,8-cinéole (35,54%) était le composé le plus dominant dans l'HE de *L. nobilis*, alors que celle de *T. capitatus* a été caractérisée par prédominance de deux composants, le thymol (25,82%) et le linalol (23,40%). Les résultats de cette étude ont montré clairement que les HEs étaient capables d'inhiber la croissance de la souche aflatoxinogène (*A. flavus*). Cette inhibition se situe entre 4,96% et 100%. De plus, les potentialités de toutes ces HEs ne se limitent pas seulement à une action antifongique mais elles exercent aussi une action antiaflatoxinogène. En effet, un maximum de réduction de l'AFB₁ a été observé (95,00%).

Les résultats du spectre fungitoxique contre neuf moisissures *A. carbonarus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. tamari*, *A. terreus*, *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. et *Rhizopus* sp. ont montré une large activité antifongique des HEs testées.

L'activité antioxydante des HEs a été évaluée en utilisant les méthodes suivantes : la méthode de DPPH et la méthode du β -carotène/acide linoléique. Généralement, ces HEs ont présenté une activité antioxydante. Elle était cependant inférieure par comparaison à l'antioxydant de référence (BHT).

Le stress oxydatif est signalé comme l'un des causes de l'augmentation de la production l'AFB₁ par des souches toxigènes d'*Aspergillus* sp. Par conséquent, nous pouvons conclure que la haute efficacité inhibitrice de l'AFB₁ par les six HEs est due à leur nature anioxydative.

Aucun effet indésirable suite aux différents traitements par les HEs (sauf pour *L. nobilis* L.) n'a été observé sur la germination des graines de blé de HD1220 (Hiddab) et d'AS 81189 A (Ain Abid), suggérant la nature non-phytotoxique de ces HEs. Les tests *in vivo* ont révélé que les HEs ont montré une efficacité remarquable chez le blé fumigé stocké, fournissant une protection > 75% des graines de blé de HD1220 (Hiddab) et d'AS 81189 A (Ain Abid).

En ce qui concerne les perspectives qui découlent de ce travail, elles sont de trois natures: Tout d'abord, étudier l'activité antifongique et antiaflatoxinogène non seulement des HEs utilisées séparément, mais également en mélange, permettant ainsi une probable synergie.

La technique de micro-encapsulation des composés bioactifs pourrait représenter une perspective intéressante à notre étude. Les microcapsules pourraient permettre le maintien de la stabilité des molécules actives et leur dispersion facile dans la denrée traitée. La nature chimique des principes actifs identifiés sera un point clé dans le choix de la matière enrobante ainsi que dans la nature physico-chimique ou mécanique du procédé utilisé pour la micro-encapsulation.

- Abdellah, Z. (2004). Détermination des mycotoxines dans les aliments et étude de la réduction des aflatoxines par les bactéries lactiques isolées des ferments panaires traditionnels. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah. Thèse de doctorat, pp.162. Maroc.
- Aboudaou, M., Ferhat, M.A., Hazzit, M., Ariño, A. & Djenane, D. (2019). Solvent free-microwave green extraction of essential oil from orange peel (*Citrus sinensis* L.): Effects on shelf life of flavoured liquid whole eggs during storage under commercial retail conditions. *Journal of Food Measurement and Characterization* (Accepté pour publication).
- Adams, R.P. (2007). Identification of essential oils components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Carol Stream, Illinois, USA: Allured Publishing Corporation, pp. 29.
- A.F.N.O.R. (2000). Huiles essentielles, recueil de normes françaises. AFNOR, Paris, la défense, France, pp. 663.
- A.F.S.S.A (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments).(2009). Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport synthétique, pp.309.
- Agag, B.I. (2004). Mycotoxins in foods and feeds: Aflatoxins. *Association of Universal Bulletin of Environmental Research*. **7(1)**, 173-191.
- Aguillar, F., Hussain, S.P. & Cerutti, P. (1993). Aflatoxin B₁ induces the tranversion of G-T in codon 249 of the p 53 tumour suppresser in human hepatocyte. *Proceedings of The National Academy*. **90**, 8586-8590.
- Ahmad, A., Khan A., Kumar, P., Bhatt, R.P. & Manzoor, N. (2011). Antifungal activity of *Coriaria nepalensis* essential oil by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *Yeast*. **28**, 611-617.
- Ahmad, A., Khan, A. & Manzoor, N. (2013). Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazole. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. **48**, 80-86.
- Ahmad, M.M., Rehman, S., Iqbal, Z., Anjum, F.M. & Sultan, J.I. (2006). Genetic variability to essential oil composition in four *Citrus* fruit species. *Pakistan Journal of Botany*. **38**, 319-324.
- Alassane-Kpembi, I., Schatzmayr, G., Taranu, I., Marin, D., Puel, O. & Oswald, I.P. (2016). Mycotoxins co-contamination: Methodological aspects and biological relevance of

- combined toxicity studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. DOI: 10.1080/10408398.1140632.
- Albuquerque, C.C., Camara, T.R., Marian, R.D.R., Willadino, L., Marcelino, C. & Ulisses C. (2006). Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. **49**, 527-535.
- Aligiannis, N., Kalpotzakis, E., Mitaku, S. & Chinou, I.B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **40**, 4168-4170.
- Aloui, H., Khwaldia, K., Licciardello, F., Mazzaglia, A., Muratore, G., Hamdi, M. & Restuccia, C. (2014). Efficacy of the combined application of chitosan and *Locust Bean Gum* with different *Citrus* essential oils to control postharvest spoilage caused by *Aspergillus flavus* in dates. *International Journal of Food Microbiology*. **170**, 21-28.
- Amarti, F., Satrani, B., Aafi, M., Ghanmi, M., Farah, A., Aberchane, M., El Ajjouri, M., El Antry, S. & Chaouch, A. (2008). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus capitatus* et de *Thymus bleicherianus* du Maroc. *Phytothérapie*. **6**, 342-347.
- Amiri, A., Dugas, R., Pichot, A.L. & Bompeix G. (2008). *In vitro* and *in vitro* activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. *International Journal of Food Microbiology*. **126**, 13-19.
- Angelini, L.G., Carpanese, G., Cioni, P.L., Morelli, I., Macchia, M. & Flamini, G. (2003). Essential oils from Mediterranean *Lamiaceae* as weed germination inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**, 6158-6164.
- Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S. & Cabras P. (2006). Chemical composition, seasonal variability and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *Stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**, 4364-4370.
- Arrasi, G. & Usai, M. (2001). Fungitoxic activity of 12 essential oils against four postharvest *Citrus* pathogens: Chemical analysis of *Thymus capitatus* oil and its effect in subatmospheric pressure conditions. *Journal of Food Protection*. **64(7)**, 1025-1029.
- Asfaw, N., Licence, P., Novitskii, A.A. & Poliakoff, M. (2005). Green chemistry in Ethiopia: the cleaner extraction of essential oils from *Artemisia afra*: a comparison of clean technology with conventional methodology. *Green Chemistry*. **7**, 352-356.
- Bailly, J.D. & Guerre P. (2009). Mycotoxin analysis in muscle. *Safety of Meat and Processed Meat*. Springer, New York, USA, pp.83-124.

- Bailey, E.A., Iyer, R.S., Stone, M.P. & Harris, T. (1996). Mutational properties of the primary aflatoxin B₁-DNA adduct. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. **93**, 1535-1539.
- Bajpai, V.K. & Kang, S.C. (2010). Antifungal activity of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *Journal of the American Oil Chemists Society*. **87**, 327-336.
- Barla, A., Topcu, G., Oksuz, S., Tumen, G. & Kingston, D.G.I. (2007). Identification of cytotoxic sesquiterpenes from *Laurus nobilis* L. *Food Chemistry*. **104**, 1478-1484.
- Barros, M.I.D.L., Duenas, M., Rita, C., Alves, M., Beatriz, P.P.O., Santos-Buelga, C. & Isabel C.F.R. F. (2014). Nutritional and antioxidant contributions of *Laurus nobilis* L. leaves: Would be more suitable a wild or a cultivated sample?. *Food Chemistry*. **156**, 339-346.
- Bbosa, G.S., Kitya, D. & Lubega, A. (2013). Review of the biological and health effects of aflatoxins on body organs and body systems. In *Aflatoxin - Recent Advances and Future Prospects*. **12**, 240 - 265.
- Beaune, H.P & Lorient, M. (2000). Bases moléculaires de la susceptibilité aux xénobiotiques : aspects métaboliques. *Médecine/Sciences*. **16**, 1051-6.
- Behera, S., Nagarajan, S. & Rao, L.J.M. (2004). Microwave heating and conventional roasting of cumin seeds (*Cuminum cyminum* L.) and effect on chemical composition of volatiles. *Food Chemistry*. **87**, 25-29.
- Beis, S. H., Azcan, N., Ozek, T., Kara, M. & Baser, K.H.C. (2000). Production of essential oil from cumin seeds. *Chemistry of Natural compounds*. **36**, 265-268.
- Bejarano, R.R.J. & Centeno, B.S.J. (2009). Extracto de *Citrus limon* para el control de aflatoxinas y hongos aflatoxigénicos en alimentos concentrados para pollos de engorde producidos en Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. **29(1)**, 57-61.
- Benabdelkader, T. (2012). Biodiversité, Bioactivité et Biosynthèse des Composés Terpéniques Volatils des Lavandes Aillées, *Lavandula stoechas* Sensu Latto, un complexe d'espèces méditerranéennes d'intérêt pharmacologique. Université Jean monnet, Saint-Etienne. Thèse de Doctorat, pp.23. France.
- Ben Jemâa, J.M., Tersim, N., Toudert, K.T. & Larbi Khouja, M. (2012). Insecticidal activities of essential oils from leaves of *Laurus nobilis* L. from Tunisia, Algeria and Morocco, and comparative chemical composition. *Journal of Stored Products Research*. **48**, 97-104.

- Ben Hsouna, A., Ben Halima, N., Smaoui, S. & Hamdi, N. (2017). *Citrus lemon* essential oil: chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat. *Lipids in Health and Disease*. **16**,146.
- Benrejda, A., Dridi, F. & Nabiev, M. (2012). Extraction and analysis of essential oil of Cumin. *Asian Journal of Chemistry*. **24(5)**, 1949-1951.
- Bezic, N., Skocibusic, M. & Dunkic, V. (2005). Phytochemical composition and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. and *Satureja cuneifolia* Ten. essential oils. *Acta Botanica Croatica*. **64**, 313-322.
- Bhat, S., Kaushal, P., Kaur, M. & Sharma, H.K. (2014). Coriander (*Coriandrum sativum* L.): Processing, nutritional and functional aspects. *African Journal of Plant Science*. **8(1)**, 25-33.
- Bhat, R., Rai, R.V. & Karim, A.A. (2010). Mycotoxins in food and feed: Present Status and Future Concerns. Comprehensive Reviews. *Food Science and Food Safety*. **9**, 57-81.
- Bhatnagar, D. & Garcia, S. (2001). *Aspergillus*. In: Labbe R.G., Garcia S., Guide to Foodborne Pathogens. John Wiley and Sons, New York, pp.35- 49.
- Bhuiyan, M.N.I., Begum, J. & Sultana, M. (2009). Chemical composition of leaf and seed essential oil of *Coriandrum sativum* L. from Bangladesh. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. **4**, 150-153.
- Bicchi, C. & Pisciotta, A. (1990). Use of two-dimensional gas chromatography in the direct enantiomer separation of chiral essential oil components. *Journal of Chromatography A*. **508**, 341-348.
- Bluma, R., Amaiden, M.R., Daghero, J. & Etcheverry, M. (2008). Control of *Aspergillus* section *Flavi* growth and aflatoxin accumulation by plant essential oils. *Journal of Applied Microbiology*. **105**, 203-14.
- Bondy, G.S. & Pestka, J.J. (2000). Immunomodulation by fungal toxins. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews*. **3**, 109-143.
- Botton, B. (1990). Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle, 2^{ème} édition, Masson édition, Paris, pp. 512.
- Bouchikli Tani, Z., Khelil M.A., Bendaho, M. & Mestari, M. (2009). Action des huiles essentielles de trois plants aromatique de l'Ouest Algérien sur la *Mite tineola bisselliella*. *Revue Ivoirien de Science Technologique*. **14**, 175-186.

- Boughendjioua, H. (2017). Effective antifungal and antioxidant properties of essential oil extracted from the leaves of *Laurus nobilis* L. wild-growing in Algeria. *International Journal of Bioscience*. **11(4)**, 164-172.
- Boukroufa, M., Boutekdjiret, C., Petigny, L., Rakotomanomana, N., Chemat, F. (2015). *Ultras Sonochem*. **24**, 72-79.
- Bounatirou, S., Smiti, S., Miguel, M.G., Faleiro, L., Faleiro, L., Rejeb, M.N., Neffati, M., Costa, M.M., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G. & Pedro, L.G. (2007). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. *Food Chemistry*. **105**, 146-155.
- Bound, J.D., Murthy, P.S. & Srinivas, P. (2016). 2, 3-Dideoxyglucosides of selected terpene phenols and alcohols as potent antifungal compounds. *Food Chemistry*. **210**, 371-380.
- Bousbia, N. (2011). Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires. Ecole Nationale Supérieure Agronomique. Thèse de doctorat, pp. 39. Algérie.
- Bousbia, N., Vian, M.A., Ferhat, M.A., Meklati, B.Y., Chemat, F. (2009). *Journal of Food Engineering*. **90**, 409-413.
- Bouzouita, N., Nafti, A., Chaabouni, M.M., Lognay, G.C., Marlier, M. Zghoulli, S. & Thonart, P. (2001). Chemical composition of *Laurus nobilis* oil from Tunisia. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. **13**, 116-117.
- Boyras, N. & Özcan M. (2005). Antifungal effect of some spice hydrosols. *Fitoterapia*. **76**, 661-665.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. **28**, 25-30.
- Bremness, L. (2002). Plantes aromatiques et médicinales. Bordas édition. Paris, France, pp. 303.
- Brown, K.L. Bren, U., Stone, M.P. & Guengerich, F.P. (2009). Inherent Stereospecificity in the Reaction of Aflatoxin B₁ 8, 9-epoxide with deoxyguanosine and efficiency of DNA catalysis. *Chemical Research in Toxicology*. **22(5)**, 913-917.
- Bruneton, J. (1993). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 2^{ème} édition : TEC et DOC, Lavoisier, Paris, France, pp. 915.
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foodsea review. *International Journal of Food Microbiology*. **94**, 223-253.
- Caccioni, D.R.L., Guizzardi, M., Biondi, D.M., Renda, A. & Ruberto, G. (1998). Relationship between volatile components of *Citrus* fruit essential oils and antimicrobial action on

- Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Microbiology*. **43**, 73-79.
- Cairns, V., Hope, R. & Magan, N. (2004). Environmental factors and competing mycoflora affect growth and ochratoxin production by *Penicillium verrucosum* on wheat grain. *Aspects of Applied Biology*. **68**, 81-90.
- Calvo, A.M., Bok, J., Brooks, W. & Keller, N.P. (2004). VeA is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology*. **70**, 4733-4739.
- Camejo-Rodrigues, J., Ascencao, L., Bonet, M.A. & Valles, J. (2003). An ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in natural park of "Serra de Sao Mamede" (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*. **89**, 199-209.
- Cantore, P.L., Iacobellis, N.S., Marco, A.D., Capasso, F. & Senatore, F. (2004). Antibacterial activity of *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare* Miller Var. *vulgare* (Miller) essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **52**, 7862-7866.
- Caputo, L., Nazzaro, F., Souza, L.F., Aliberti, L., De Martino, L., Fratianni, F., Coppola, R. & De Feo, V. (2017). *Laurus nobilis*: Composition of essential oil and its biological activities. *Molecules*. **22**, 930.
- Carson, C.F, Mee, B.J. & Riley, T.V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **46**, 1914-1920.
- Casabianca, H. & Graff, J.B. (1994). Separation of linalyl acetate enantiomers: Application to the authentication of bergamot food products. *Journal of High Resolution Chromatography*. **17**, 184-186.
- Casiglia, S., Bruno, M., Scandolera, E., Senatore, F. & Senatore F. (2015). Influence of harvesting time on composition of the essential oil of *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. et Link. growing wild in northern sicily and its activity on microorganisms affecting historical art crafts. *Arabian Journal of Chemistry*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.05.017>.
- Ceylan, E. & Fung, Y.C.D. (2004). Antimicrobial activity of spices. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*. **12**, 1-55.
- Chao, L.K., Hua, K.F., Hsu, H.Y., Cheng, S.S., Lin, J.Y. & Chang, S.T. (2005). Study on the anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **53**, 7274-7278.

- Chebli, B., Achouri, M., Idrissi Hassani, L.M. & Hmamouchi, M. (2003). Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan *Labiatae* against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. *Journal of Ethnopharmacology*. **89**, 165-169.
- Chemat, F., Abert-Vian, M. & Fernandez, X. (2013). Microwave-assisted extraction of essential oils and aromas. In: Chemat, F. Microwave-assisted extraction for bioactive compound: Theory and practice. Springer, New York, USA, pp. 5366.
- Chemat, F. (2010). Techniques for oil extraction. In: *Sawamura M Citrus essential oils: flavor and fragrance*. Wiley, New Jersey, USA, pp. 398.
- Chen, C.C., Chen, Y., His, Y.T., Chang, C.S., Huang, L.F., Ho, C.T., Way, T.D. & Kao, J.Y. (2013). Chemical constituents and anticancer activity of *Curcuma zedoaria* roscoe essential oil against non-small cell lung carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **61**, 11418-11427.
- Cherrat, L., Espina, L., Garcia-Gonzalo, D., Bakkali, M., Pagan, R. & Laglaoui, A. (2014). Chemical composition and antioxidant properties of *Laurus nobilis* L. and *Myrtus communis* L. essential oils from Morocco and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes for food preservation. *Journal of Science and Food Agriculture*. **94**, 1197-1204.
- Chmit, M., Kanaan, H., Habib, J., Abbass, M., Mcheik, A. & Chokr, A. (2014). Antibacterial and antibiofilm activities of polysaccharides, essential oil, and fatty oil extracted from *Laurus nobilis* growing in Lebanon. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* . **7(1)**, S546-S552.
- C.I.R.C. (2002). Le Centre International de Recherche sur le Cancer. Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans, world health organization. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. *Summary of Data Reported and Evaluation*. **82**, 171-175.
- Clarke, S. (2008). Processing, extraction and purity. Essential chemistry for aromatherapy. 2^{ème} édition, Elsevier, Londres, pp.316.
- Cleveland, T. E. & Bhatnagar, D. (1992). Molecular strategies for reducing aflatoxin levels in crops before harvest. In Bhatnagar, D. & Cleveland, T.E. Molecular approaches to improving food quality and safety. New York: Van Nostrand Reinhold, pp.205-228.
- Conforti, F., Statti G., Uzunov, D. & Menichini, F. (2006). Comparative chemical composition and antioxidant activities of wild and cultivated *Laurus nobilis* L. leaves and *Foeniculum vulgare* sub sp. *piperitum* (Ucria) Coutinho seeds. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **29**, 2056-2064.

- Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisanol, B., Satta, M., Mascial, V., Arzedil, E. & Palmas, F. (1999). *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*. **29** (2), 130-135.
- Coutinho, de Oliveira, T.L., de Araújo Soares, R., Mendes Ramos, E., das Graças Cardoso, M., Alves, E. & Piccoli, R.H. (2011). Antimicrobial activity of *Satureja montana* L. essential oil against *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. *International Journal of Food Microbiology*. **144**, 546-555.
- Cox, D., Mann, M., Markham, L., Bell, C., Gustafson, E., Warmington, R. & Wylli, G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*. **88**, 170-175.
- Da Cruz Cabral, L., Pinto, F.V. & Patriarca, A. (2013). Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International Journal of Food Microbiology*. **166**, 1-14.
- Daferera, D.J., Ziogas, B.N. & Polissiou, M.G. (2000). GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **48**, 2576-2581.
- Darughe, F., Barzegar, M. & Sahari, M.A. (2012). Antioxidant and antifungal activity of Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil in cake. *International Food Research Journal*. **19** (3). 1253-1260.
- Davidson, P.M. & Naidu, A.S. (2000) Phyto-phenol. In: Naidu, A. S. (Ed.), Natural food antimicrobial systems. Boca Raton, FL: CRC press, pp.818.
- Dayan, F.E., Cantrell, C.L. & Duke, S.O. (2009) Natural products in crop protection. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **17**, 4022-4034.
- Deabes, M.M., El-soud, N.H.A. & El-kassem, L.T.A. (2011). *In vitro* inhibition of growth and aflatoxin B₁ production of *Aspergillus flavus* strain (ATCC 16872) by various medicinal plant essential oils. *Macedonian Journal of Medical Science*. <http://dx.doi.org/3889/MJMS.1857-5773.0190>.
- Deba, F., Xuan, T., Yasuda, M. & Tawata, S. (2008). Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*. *Food Control*. **19**, 346-352.
- Degryse, A.C., Ianis, D. & Voinier, M.A. (2008). Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. Atelier santé et environnement-IGS-EHESP, pp. 2-3.

- Demir, V., Guhan T., Yagcioglu, A.K. & Degirmencioglu, A. (2004). Mathematical modeling and the determination of some quality parameters of air-dried bay leaves. *Biosystems Engineering*. **88** (3), 325-335.
- Derakhshana, S., Sattari, M. & Bigdelib, M. (2008). Effect of subinhibitory concentrations of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seed essential oil and alcoholic extract on the morphology, capsule expression and urease activity of *Klebsiella pneumonia*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **32**, 432-436.
- Derbesy, R. & Uzio, R. (1993). Application of chiral phase chromatography to quality control of coriander essential oil. *Annales des Falsifications et de l'Expertise Chimique et Toxicologique*. **92**, 369-378.
- Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G. & Mauriello, G. (2006). Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**, 2745-2749.
- Diaz, D.E., Hagler, W.M., Hopkins, B.A., Eve, J.A. & Whitlow, L.W. (1999). The potential for dietary sequestrants to reduce the transmission of dietary aflatoxin to milk of dairy cows and to bind aflatoxin *in vivo*. *Journal of Dairy Science*. **82** (1), 838.
- Diaz, G.J. (2000). Basolateral and canalicular transport of xenobiotics in the hepatocyte : A review. *Cytotechnology*. **34** (3), 225-236.
- Dikbas, N., Kotan, R., Dadasoglu, F. & Sahin, F. (2008). Control of *Aspergillus flavus* with essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis*. *International Journal of Food Microbiology*. **124**, 179-182.
- Djenane, D., Yangüela, J., Derriche, F., Bouarab, L. & Roncalés P. (2012c). Extrait de feuilles d'olivier; tests *in vitro* vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis et *Pseudomonas aeruginosa* ; application sur la viande de dinde. *Phytothérapie*. **10**(1),10-18.
- Djenane, D. & Roncalés, P. (2018). Carbon Monoxide in Meat and Fish Packaging: Advantages and Limits. *Foods* , **7**(2), 12.
- Djenane, D. (2015). Chemical profile, antimicrobial and antioxidant activity of Algerian *Citrus* essential oils and their application in *Sardina pilchardus*. *Foods*. **4**, 208-228.
- Djenane, D., Aboudaou, M., Ferhat M. A., Ouelhadj, A. & Ariño, A. (2019b). Effect of the aromatisation with summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil on the oxidative

- and microbial stabilities of liquid whole eggs during storage. *Journal of Essential Oil Research*. <https://doi.org/10.1080/10412905.2019.1610516>.
- Djenane, D., Aïder, M., Yangüela, J., Idir, L., Gómez, D. & Roncalés, P. (2012). Antioxidant and antibacterial effects of Lavandula and Mentha essential oils in minced beef inoculated with *Esherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* during storage at abuse refrigeration temperature. *Meat Science*. **92**, 667-674.
- Djenane, D., Gómez, D., Yangüela, J., Roncalés, P. & Ariño, A. (2019a). Olive leaves extract from Algerian oleaster (*Olea europaea* var. *sylvestris*) on microbiological safety and shelf-life stability of raw *Halal* minced beef during display. *Foods*. **8(1)**, 10; <https://doi.org/10.3390/foods8010010>.
- Djenane, D., Lefsih, K., Yangüela, J., & Roncalés, P. (2012b). Composition chimique et activité anti-*Salmonella* Enteritidis CECT 4300 des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*, *Lavandula angustifolia* et *Satureja hortensis*. Tests *in vitro* et efficacité sur les œufs entiers liquides conservés à 7 ± 1 °C. *Phytothérapie*. **9(6)**, 343-353.
- Djenane, D., Yanguela, J., Amrouche, T., Bounrit, S., Bousaad, N. & Ronclaès, P. (2011a). Chemical composition and antimicrobial effects of essential oils of *Eucalyptus globulus*, *Myrtus communis* and *Satureja hortensis* against *Esherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in minced beef. *Food Science and Technology International*. DOI: 10.1177/1082013211398803.
- Djenane, D., Yangüela, J., Gómez, D., & Roncalés, P. (2012a). Perspectives on the use of essential oils as antimicrobials against *Campylobacter jejuni* CECT 7572 in retail chicken meats packaged in microaerobic atmospheres. *Journal of Food Safety*. **32**, 37-47.
- Djenane, D., Yanguela, J., Montañés, L., Djerbal, M. & Roncalès, P. (2011b). Antimicrobial activity of essential oils of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media; efficacy and synergistic potential in minced beef. *Food Control*. **22**, 1046-1053.
- Djenane, D., Yangüela, J., Roncalés, P. & Aider, M. (2013). Use of Essential Oils as Natural Food Preservatives: Effect on the Growth of *Salmonella* Enteritidis in Liquid Whole Eggs Stored Under Abuse Refrigerated Conditions. *Journal of Food Research*. **2 (3)**, 65-78.
- Dobre, A.A. & Nicul, P. (2012). Preliminary research to develop activity packaging for bakery products using essential oils. *Scientific Bulletin, Series F, Biotechnologies*. **XVI**.

- Donsi, F., Annunziata, M., Sessa, M. & Ferrari, G. (2011). Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT- Food Science and Technology*. **44**, 1908-1914.
- Dorman, H.J.D. & Deans, S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. **88**, 308-316.
- Dos Santos Oliveira, M. & Badiale Furlong, E. (2008). Screening of antifungal and antimycotoxigenic activity of plant phenolic extracts. *World Mycotoxin Journal*. **1**, 139-146.
- Ehrlich, K.C., Yu J. & Cotty P.J. (2005). Aflatoxin biosynthesis gene clusters and flanking regions. *Journal of Applied Microbiology*. **99**, 518-5277.
- Einafshar, S., Poorazrang, H., Farhoosh, R. & Seiedi, S.M. (2012). Antioxidant activity of the essential oil and methanolic extract of cumin seed (*Cuminum cyminum*). *European Journal of Lipid Science Technology*. **114**, 168-174.
- Elzupir, A.O., Abas, A.R., Fadul, M.H., Modwi, A.K., Ali, N.M.I., Jadian, A.F.F., Ahmed, N.A., Adam, S.Y., Ahmed, N.M., Khairy, A. & Khalil, E.G. (2012). Aflatoxin M₁ in breast milk of nursing Sudanese mothers. *Mycotoxin Research*. **28**, 131-4.
- Emamghoreishi, M., Khasaki, M. & Aazam, M.F. (2005). *Coriandrum sativum*: Evaluation of its anxiolytic effect in the elevated plus-maze. *Journal of Ethnopharmacology*. **96**, 365-370.
- Esteban, A., Abarca, M.L., Bragulat, M.R. & Cabanes, F.J. (2006). Effect of pH on ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate species. *Food Additives and Contaminants*. **23**, 616-622.
- El Ajjouri, M., Satrani, B., Ghanmi, M., Aafi, A., Farah, A., Rahouti, M., Amarti, F. & Aberchane, M. (2008). Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* Pomel et *Thymus capitatus* (L.) Hoffm. & Link contre les champignons de pourriture du bois d'œuvre. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*. **12(4)**, 345-351.
- El Khoury, R. (2016). Maitrise du risque aflatoxique : utilisation d'extraits naturels et mise en évidence de leurs mécanismes d'action. Institut National Polytechnique de Toulouse. Thèse de doctorat, pp.9. France.
- El Mahgubi, A., Bailly, S., Tadrist, S., Querin, A., Ouadia, A., Oswald, I.P. & Bailly, J.D. (2013). Distribution and toxigenicity of *Aspergillus* section *Flavi* in spices marketed in Morocco. *Food Control*. **32**, 143-148.

- El Mogy, M.M. & Alsanius, B.W. (2012). Cassia oil for controlling plant and human pathogens on fresh strawberries. *Food Control*. **28**, 157-162.
- El Ouariachi, E.M., Paolini, J., Bouyanzer, A., Tomi, P., Hammouti, B., Salghi, R., Majidi, L. & Costa, J. (2011). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and solvent extracts of *Thymus Capitatus* (L.) Hoffmanns and link from Morocco. *Journal of Medicinal Plants Research*. **5(24)**. 5773-5778.
- F.A.O. (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2004). Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO: *Food and Nutrition paper*. FAO, Rome, pp. 81.
- Farag, R.S., Daw, Z.Y., Hewedi, F.M. & El-Baroty, G.S.A. (1989). Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *Journal of Food Protection*. **52**, 665-667.
- Farombi, E.O. & Nwaokeafor, I.A. (2005). Antioxidant mechanisms of kolaviron: Studies on serum lipoprotein oxidation, metal chelation and oxidative membrane damage in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. **32**, 667-674.
- Feng, W. & Zheng, X. (2007). Essential oils to control *Alternaria alternata* in vitro and *in vivo*. *Food Control*. **18**, 1126-1130.
- Fente, C.A., Ordaz, J.J., Vazquez, B.I., Franco, C.M. & Cepeda, A. (2001). New additive for culture media for rapid identification of aflatoxin-producing *Aspergillus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. **67(48)**, 58-62.
- Fernandez, X., Chemat, F. & Do, T.K.T. (2013). Essential oils: Virtues and applications. Vuibert, Paris.
- Fernandez-Lopez, J., Zhi, N., Aleson-Carbonell, L., Perez- Alvarez, J.A. & Kuri, V. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science*. **69(3)**, 371-380.
- Fernandez-Perez, V., Jimenez-Carmona, M.M., De Castro, M.D.L. Perez-Correa, J. & Cuevas-Valenzuela, Jose. (2000). An approach to the staticdynamic subcritical water extraction of laurel essential oil: Comparison with conventional techniques. *Analyst*. **125**, 481-485.
- Ferreira, F.D., Kimmelmeier, C., Arrotéia, C.C., da Costa, L.C., Mallmann, C.A., Janeiro, V., Ferreira, F.M.D., Mossini, S.A.G., Silva, E.L. & Machinski, M. (2013). Inhibitory effect of the essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* Link. *Food Chemistry*. **136**, 789-793.

- Ferreira, A., Proenca, C., Serralheiro, M.L.M. & Araujo, M.E.M. (2006). The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology*. **108**, 31-37.
- Filipowicz, N., Kaminski, M., Kurlenda, J., Asztemborska, M. & Ochocka, J.R. (2003). Antibacterial and antifungal activity of juniper berry oil and its selected components. *Phytotherapy Research*. **17**, 227-231.
- Firmin, S. (2012). Efficacité de détoxification de l'aflatoxine B₁ et de l'ochratoxine A par un adsorbant organique: Evaluation par la balance d'excrétion et les paramètres toxicocinétiques chez le rat et la brebis laitière. Université Blaise Pascal. Thèse de doctorat, pp.17. France.
- Fisher, K. & Phillips, C.A. (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* *in vitro* and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*. **101**, 1232-1240.
- Flamini, G., Tebano, M., Cioni, P.L., Ceccarini, L., Simone Ricci, A. & Longo, I. (2007). Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of *Laurus nobilis* L. and a novel method which uses microwaves applied *in situ*, without resorting to an oven. *Journal of Chromatography A*. **1143**, 36-40.
- Formáček, V. & Kubeczka, K.H. (1982). Essential oil analysis by capillary gas chromatography and carbon-13 NMR spectroscopy, John Wiley and Sons, Chichester, USA, pp.480.
- Frank, C., Dietrich, A., Kremer, U. & Mosandl, A. (1995). GC-IRMS in the authenticity control of the essential oil of *Coriandrum sativum* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **43**, 1634-1637.
- Freires de Almeida, I., Murata, R.M., Furletti, V.F., Sartoratto, A., Matias de Alencar, S., Figueira, G.M., de Oliveira Rodrigues, J.A., Duarte, M.C.T. & Rosalen, P.L. (2014). *Coriandrum sativum* L. (Coriander) essential oil: Antifungal activity and mode of action on *Candida* spp. and molecular targets affected in human whole-genome expression. *PLoS ONE*. **9**, 990-86.
- Fremy, J.M. & Thomann, C. (2009). Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. *Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments*, France, pp. 179.

- Frisvad, J.C. & Samson, R.A. (2004). *Emericella venezuelensis*, a new species with stellate ascospores producing stérigmatocystine and aflatoxin B₁, System. *Applied Microbiology*. **27**, 672-680.
- Frisvad, C. J., Skouboe, P. & Samson, A. R. (2005). Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and new efficient producer of aflatoxin B₁, sterigmatocystine and 3-Omethylsterigmatocystine *Aspergillus rumbelli* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*. **28**, 442-453.
- Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A. & Rasooli, I. (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*. **102**, 898-904.
- Galtier, P., Loiseau, N., Oswald, I.P. & Puel, O. (2006). Toxicologie des mycotoxines : dangers et risques en alimentation humaine et animale. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire*, tome, **159** - N°1.
- Gerbes, A.L. & Caselmann, W.H. (1993). Point mutations of the 53 gene, human hepatocellular carcinoma and aflatoxins. *Journal of Hepatology*. **19**, 312-315.
- Gogoi, P., Baruah, P. & Nath, S.C. (2008). Microbiological Research. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiology Reseach*. **163**, 337-344.
- Golinski, P., KostECKI, M., Lasocka, I., Wisniewska, H., Chelkowski, J. & Kaczmarek, Z. (1996). Moniliformin accumulation and other effects of *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc. On kernels of winter wheat cultivars. *Journal of Phytopathology*. **144**, 495-499.
- Goren, A.C., Bilsela, G., Bilsela, M., Demira, H. & Kocabas, E.E. (2003). Analysis of essential oils of *Coridothymus capitatus* (L.) and its antibacterial and antifungal activity. *Zeitschrift Fur Naturforsschung. B*. **58**, 687-690.
- Gorran, A., Farzaneh, M., Shivazad, M., Rezaeian, M. & Ghassempour, A. (2013). Aflatoxin B₁-reduction of *Aspergillus flavus* by three medicinal plants (Lamiaceae). *Food Control*. **31**, 218-223.
- Greene-McDowelle, D.M., Ingber, B., Wright, M.S., Zeringue, H.J.J., Bhatnagar, D. & Cleveland, T.E. (1999). The effects of selected cotton-leaf volatiles on growth, development and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus*. *Toxicon*. **37**, 883-893.
- Grintzalis, K., Vernardis, S.I., Klapa, M.I. & Georgiou, C.D. (2014). Role of oxidative stress in sclerotial differentiation and aflatoxin B₁ biosynthesis in *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology*. **80**, 5561-5571.

- Guengerich, F.P. (2001). Forging the links between metabolism and carcinogenesis. *Mutation Research*. 195-209.
- Guengerich, F.P., Johnso, W.W., Shimada, T., Ueng, Y.F., Yamazaki, H. & Langouët, S. (1998). Activation and detoxication of aflatoxin B₁. *Mutatation Research*, **402**, 121-128.
- Gusarov, I., Shatalin, K., Starodubtseva, M. & Nudler, E. (2009). Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics. *Science*. **325**, 1380-1384.
- Guynot, M.E., Marin, S., Setu, L., Sanchis, V. & Ramos, A.J. (2005). Screening for antifungal activity of some essential oils against common spoilage fungi of bakery products. *Food Science and Technology International* . **11(1)**, 25- 32.
- Haddouchi, F., Lazouni, H.A., Meziane, A. & Benmansour, A. (2009). Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. *African Science*. **05 (2)**, 246 - 259.
- Hajlaoui, H., Mighri, H., Noumi, E., Snoussi, M., Trabelsi, N., Ksouri, R. & Bakhrouf, A. (2010). Chemical composition and biological activities of Tunisian *Cuminum cyminum* L. essential oil: A high effectiveness against *Vibrio* spp. strains. *Food Chemistry and Toxicology*. **48**, 2186-2192.
- Hammer, K.A., Carson, C. F. & Riley, T.V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*. **86 (6)**, 985-990.
- Hammer, K.A., Carson, C.F. & Riley, T.V. (2003). Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Journal of Applied Microbiology*. **95**, 853-860.
- Haque, E., Irfan, S., Kamil, M., Sheikh, S., Hasan, A., Ahmad, A., Lakshmi, V., Nazir, A. & Mir, S.S. (2016). Terpenoids with antifungal activity trigger mitochondrial dysfunction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. **85**, 436-443.
- Hartnoll, G., Moore, D. & Douek, D. (1993). Near fatal ingestion of oil of cloves. *Archives of disease in childhood*. **69**, 392-393.
- Hedayati, M.T., Pasqualotto, A.C., Warn, P.A., Bowyer, P. & Denning, D.W. (2007). *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*. **153**, 1677-1692.
- Hedges, L.M. & Wilkins, C.L. (1991). Component analysis of *Eucalyptus* oil by gas chromatography-fourier transform-infrared spectrometry-mass spectrometry. *Journal of Chromatography Science*. **29**, 345-350.
- Hemwimon, S., Pavasant, P. & Shotiprux, A. (2007). Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Separation and Purification Technology*. **54**, 44-50.

- Hendrickse, R.G. (1984). The influence of aflatoxins on child Health in the tropics with particular reference to kwashiorkor. *Transaction of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*. **78**, 427-435.
- Henry, S.H. & Bosch, F.X. (2001). Foodborne disease and mycotoxin epidemiology, in Foodborne Disease Handbook. 2^{ème} édition, Hui, Y.H., Smith, R.A., Spoerke, J.R. & Marcel Dekker, D.G., New York, USA, pp. 698.
- Heritage, J., Evans, E.G.V. & Killington, R.A. (1996). Introductory microbiology. Edition : Cambridge University Press, pp. 234.
- Herzallah, S.M. (2013). Aflatoxin B₁ residues in eggs and flesh of laying hens fed aflatoxin B₁ contaminated diet. *American Journal of Agricultural and Biological Science*. **8**, 156-161.
- Herzallah, S., Alshawabkeh, K. & Al Fataftah, A. (2008). Aflatoxin decontamination of artificially contaminated feeds by sunlight, γ -radiation, and microwave heating. *Journal of Applied Poultry Research*. **17**, 515-521.
- Hmiri, S., Rahouti, M., Habib, Z., Satrani, B., Ghanmi, M. & El Ajjouri, M. (2011). Evaluation du potentiel antifongique des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et d'*Eucalyptus camaldulensis* dans la lutte biologique contre les champignons responsables de la détérioration des pommes en conservation. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*. **80**, 824- 836.
- Holley, R.A. & Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*. **22(4)**, 273-292.
- Horn, B.W. & Dorner, J.W. (1998). Soil populations of *Aspergillus* species from section *Flavi* along a transect through peanutgrowing regions of the United States. *Mycologia*. **90**, 767-776.
- Hosni, K., Hassen, I., Chaabane, K., Jemli, M., Dallali, S., Sebei, H. & Casabianca, H. (2013). enzyme-assisted extraction of essential oils from thyme (*Thymus capitatus* L.) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): Impact on yield, chemical composition and antimicrobial activity. *Industrial Crops and Products*. **47**, 291-299.
- Houghton, P.J. (2004). Activity and constituents of sage relevant to the potential treatment of symptoms of Alzheimer's disease. *Herbal Gram*. **61**, 38-54.
- Hua, S.S.T., Grosjean, O. K. & Baker, J.L. (1999). Inhibition of aflatoxin biosynthesis by phenolic compounds. *Letters in Applied Microbiology*. **29**, 289-291.
- Hymery, N., Vasseur, V., Coton, M., Mounier, J., Jany, J.L., Barbier, G. & Coton, E. (2014). Filamentous fungi and mycotoxins in Cheese: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **13**, 437-456.

- Imelouane, B., Amhamdi, H., Wathelet, P., Ankit, M., Khedid, K. & El Bachiri, A. (2009). Chemical composition of the essential oil of thyme (*Thymus vulgaris* from Eastern Morocco. *International Journal of Agriculture and Biology*. **11**, 205-208.
- Intiaj, A. & Lee, T.S. (2007). Screening of antibacterial and antifungal activities from Korean wild mushrooms. *World Journal of Agricultural*. **3(3)**, 316-321.
- Inouye, S., Takizawa, T. & Yamaguchi, H. (2001). "Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact". *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **47(5)**, 565-573.
- Ishii, H. (2006). Impact of fungicide resistance in plant pathogens on crop disease control and agricultural environment. *Japan Agricultural Research Quarterly*. **40**, 205-211.
- Isman, M.B. & Machial, C.M. (2006). Pesticides based on plant essential oils: From traditional practice to commercialization. *Advances in Phytomedicine*. **3**, 29-44.
- Isman, M.B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*. **19**, 603-608.
- Jalali-Heravi, M., Zekavat, B. & Sereshti, H. (2007). Use of gas chromatography–mass spectrometry combined with resolution methods to characterize the essential oil components of Iranian cumin and caraway. *Journal of Chromatography A*. **1143**, 215-226.
- Jarvis, B.B. & Miller, J.D. (2005). Mycotoxins as harmful indoor air contaminants. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **66**, 367-372.
- Jayashree, T. & Subramanyam, C. (1999). Antiaflatoxigenic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. *Letters in Applied Microbiology*. **28**, 179-183.
- Jayashree, T. & Subramanyam, C. (2000). Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Free Radical Biology and Medicine*. **29**, 981-985.
- Jazet Dongmo, P.M., Tchoumboungang, F., Boyom, F.F., Sonwa, E.T., Zollo, P.H.A. & Chantal, M. (2013). Antiradical, antioxidant activities and anti-inflammatory potential of the essential oils of the varieties *Citrus limon* and *Citrus auratifolia* growing in Cameroon. *Journal of Asian Scientific Research*. **3(10)**, 1046-1057.
- Jazet Dongmo, P.M., Kuate, J., Ngouana, V., Damesse, F., Tchinda Sonwa, E., Zollo, P.H.A. & Menut, C. (2008). Comparaison des propriétés antiradicalaires et antiinflammatoires des huiles essentielles de *Citrus reticulata* var. Madagascar et *Citrus sinensis* var. Casagrande du Cameroun. *Fruits*. **63**, 201-208.

- Jiambo, Y., Dianjun, S. & Zhiwu, W. (1995). Determination of toxin T-2 in the staple food from the sick families in kashin-Beck Diseases areas. *China Journal of Endemiology*. **14**, 146- 149.
- Jiang, Y., Jolly, P.E., Preko, P., Wang, J. S., Ellis, W.O., Phillips, T.D. & Williams, J.H. (2008). Aflatoxin-related immune dysfunction in health and in human immunodeficiency virus disease. *Clinical and Developmental Immunology*. <http://dx.doi.org/790-309/10.1155/790309>.
- Jing, L., Lei, Z., Li, L., Xie, R., Xi, W., Guan, Y., Sumner, L.W. & Zhou, Z. (2014). “Antifungal activity of *Citrus* essential oils”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **62(14)**, 3011-3033.
- Johnson, W. W., Ueng, Y.F., Widersten, M., Mannervik, B., Hayes, J.D., Sherratt, P.J., Ketterer, B. & Guengerich, F.P. (1997). Conjugation of highly reactive aflatoxin B₁ exo-8,9-epoxide catalyzed by rat and human glutathione transferases: Estimation of kinetic parameters. *Biochemistry*. **36**, 3056-3060.
- José Velázquez-Nuñez, M., Avila-Sosa, R., Palou, E. & López-Malo, A. (2013). Antifungal activity of orange (*Citrus sinensis* var. Valencia) peel essential oil applied by direct addition or vapor contact. *Food Control*. **31**, 1-4.
- Josephy, P.D., Guengerich, F.P. & Miners, J.O. (2005). “Phase I” and “Phase II” drug metabolism: Terminology that we should phase out. *Drug Metabolism Reviews*. **37 (4)**, 575-580.
- Jouany, J.P., Yiannikouris, A. & Bertin, G. (2009). Risk assessment of mycotoxins in ruminants and ruminant products. *Options Méditerranéennes. Séries A*. **224**, 205-224.
- Juan, C., Zinedine, A., Moltó, J.C., Idrissi, L. & Mañes, J. (2008) .Aflatoxins levels in dried fruits and nuts from Rabat-Salé area, Morocco. *Food Control*. **19**, 849-853.
- Kalemba, D. & Kunicka, A . (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. **10**, 813-829.
- Kamal, G. M., Ashraf, M.Y., Hussain, A. I., Shahzadi, A. & Chughtai, M. I. (2013). Antioxidant potential of peel essential oils of three pakistani *Citrus* species : *Citrus reticulata*, *Citrus sinensis* and *Citrus paradisi*. *Pakistan Journal of Bototany*. **45(4)**, 1449-1454.
- Kanko, C., Sawaliho, B., Kone, S. & Koukoua, G. (2004). Study of Physicochemical Properties of essential oils from *Lippia Multiflora*, *Cymbopogon Citrates*, *Cymbopogon Nardus*, *Cymbopogon gigantescus*. *Comptes Rendus Chimie*. **7(10-11)**, 1039-1042.

- Kedia, A., Dwivedy, A.K., J.H.A, D.K. & Dubey, N.K. (2016). Efficacy of *Mentha spicata* essential oil in suppression of *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in chickpea with particular emphasis to mode of antifungal action. *Protoplasma*. **253**, 647-653.
- Kedia, A., J.H.A, D.K. & Dubey, N.K. (2015). Plant essential oils as natural fungicides against stored product fungi. In *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs* (Méndez-Vilas A., Ed.).© FORMATEX, pp. 214.
- Kedia, A., Prakash, B., Mishra, P.K., Chanotiya, C.S. & Dubey, N.K. (2014a). Antifungal, antiaflatoxic, and insecticidal efficacy of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil. *International Biodeterioration and Biodegradation*. **89**, 29-36.
- Kedia, A., Prakash, B., Mishra, P.K. & Dubey, N.K. (2014b). Antifungal and antiaflatoxic properties of *Cuminum cyminum* (L.) seed essential oil and its efficacy as a preservative in stored commodities. *International Journal of Food Microbiology*. **1(7)**, 168-169.
- Kerekes, E.B., Deak, E., Tako, M., Tserennadmid, R., Petkovits, T., Vagvolgyi, C. & Krisch, J. (2013). Anti-bio film forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related microorganisms. *Journal of Applied Microbiology*. **115**, 933-942.
- Khosravi, A.R., Shokri, H., Minooeianhaghighi, M. (2011). Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus parasiticus* by *Cuminum cyminum*, *Ziziphora clinopodioides* and *Nigella sativa* essential oils. *Foodborne Pathogens and Disease*. **8 (12)**, 1275-1280.
- Kilic, A., Kollmannsberger, H. & Nitz, S. (2005). Glycosidically bound volatiles and flavor precursors in *Laurus nobilis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**, 2231-2235.
- Kim, J.H., Mahoney, N., Chan, K.L., Molyneux, R. & Campbell, B.C. (2006). Controlling food-contaminating fungi by targeting antioxidant stress-response system with natural phenolic compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **70**, 735-739.
- Kim, J.H., Yu, J., Mahoney, N., Chan, K.L., Molyneux, R.J. & Varga, J. (2008). Elucidation of the functional genomics of antioxidant-based inhibition of aflatoxin biosynthesis. *International Journal of Food Microbiology*. **122**, 49-60.
- Kim, J.H., Campbell, B.C., Mahoney, N.E., Chan, K.L. & Molyneux, R.J. (2004). Identification of phenolics for control of *Aspergillus flavus* using *Saccharomyces*

- cerevisiae* in a model target-gene bioassay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **52**, 7814-7821.
- Kim, J.H., Campbell, B.C., Yu, J., Mahoney, N., Chan, K.L., Molyneux, R.J., Bhatnaga, D. & Cleveland, T.E. (2005). Examination of fungal stress response genes using *Saccharomyces cerevisiae* as a model system: targeting genes affecting aflatoxin biosynthesis by *Aspergillus flavus* Link. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **67**, 807-815.
- King, J.W. (2004). Critical fluid technology for the processing of lipid-related natural products. *Comptes Rendus Chimie*. **7**, 647-659.
- Klich, M. A. (2009). Health effects of *Aspergillus* in food and air. *Toxicology and Industrial Health*. **25**, 657-667.
- Klich, M.A. (2007). *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology*, **8**, 713-22.
- Knight, L.P., Primiano, T., Groopman, J.D., Kensler, T.W. & Sutter, T.R. (1999). cDNA cloning, expression and activity of a second human aflatoxin B₁ metabolizing member of the aldo-keto reductase superfamily, AKR7A3. *Carcinogenesis*. **20**, 1215-1223.
- Kohiyama, C.Y., Ribeiro, M.M.Y., Mossini, S.A.G., Bando, E., Bomfim, N.D.S., Nerilo, S.B., Rocha, G.H.O., Grespan, R., Mikcha, J.M.G. & Machinski, M. (2015). Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production of *Thymus vulgaris* L. by *Aspergillus flavus* Link. *Food Chemistry*. **173**, 1006-1010.
- Koitaishi, R., Suzuki, T., Kawazu, T., Sakai, A., Kuroiwa, H. & Kuroiwa, T. (1997). 1,8-cineole inhibits root growth and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* L. *Journal of Plant Research*. **110**, 1-6.
- Kordali, S., Cakir, A., Ozer, H., Cakmakci, R., Kesdek, M. & Mete, E. (2008). Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and *p*-cymene. *Bioresource Technology*. **99**, 8788-8795.
- Kulisic, T., Radonic, A., katalinic, V. & Milos, M. (2004). Use of different methods for the testing activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*. **85**, 633-640.
- Kumar, A., Dubey, N.K. & Srivastava, S. (2013). Antifungal evaluation of *Ocimum sanctum* essential oil against fungal deterioration of raw materials of *Rauvolfia serpentina* during storage. *Industrial Crops and Products*. **45**, 30- 35.

- Kumar, A., Shukla, R., Singh, P. & Dubey, N.K. (2010 a). Chemical composition, antifungal and antiaflatoxic activities of *Ocimum sanctum* L. essential oil and its safety assessment as plant based antimicrobial. *Food and Chemical Toxicology*. **48**, 539-543.
- Kumar, A., Shukla, R., Singh, P., Anuradha. & Dubey, N.K. (2010 b). Efficacy of extract and essential oil of *Lantana indica* Roxb. against food contaminating moulds and aflatoxin B₁ production. *International Journal of Food Science and Technology*. **45**, 179-185.
- Kumar, A., Shukla, R., Singh, P., Prasad, C.S. & Dubey, N.K. (2008). Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation of food commodities. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **9**, 575-580.
- Kumar, R., Mishra, A.K., Dubey, N.K. & Tripathi, Y.B. (2007). Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity. *International Journal of Food Microbiology*. **115**, 159-164.
- Ladan, M. A. R. (2015). Essential oil of the seeds of *Cuminum cyminum* L. (*Apiaceae*). *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*. **4 (3)**, 161-163.
- Langseth, W., Stenwing, H., Sogn, L. & Mo, E. (1993). Growth of moulds and production of mycotoxins in wheat during drying and storage. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil and Plant Science*. **43**, 32-37.
- Le Bars, J. (1988). Toxicogenesis as a fonction of the ecological conditions of the grain/microorganims system. In "Presrvation and storage of grains, seeds and their by products", J.L.MULTON, Lavoisier pub. New-York, Paris, pp. 366.
- Lee, S. H., Chang, K. S., Su, M. S., Huang, Y. S. & Jang, H. D. (2007). Effects of some Chinese medicinal plant extracts on five different fungi. *Food Control*. **18**, 1547-1554.
- Lee, Y.S., Kim, J., Shin, S.C., Lee, S.G. & Park, I.K. (2008). Antifungal activity of *Myrtaceae* essential oils and their components against three phytopathogenic fungi. *Flavour and Fragrance Journal*. **23**, 23-28.
- Lertsatitthanakorn, P. & Taweechaisupapong, S. (2006). *In vitro* bioactivities of essential oils used for acne control. *International Journal of Aromatherapy*. **16**, 43-49.
- Leveau, J.Y. & Bouix, M. (1993). Microbiologie industrielle : les micro-organismes d'intérêt industriel. Édition : Tec et Doc, Lavoisier et APRIA, France, pp. 612.
- Leyral, G. & Vierling, E. (2001). Microbiologie et toxicologie des aliments : Hygiène et sécurité alimentaires. 3^{ème} édition, DOIN, Paris, pp. 738.
- Li, D., Cao, Y., He, L., Wang, N.L. & Gu, J.R. (1993). Aberrations of 53 genes in human hepatocellular carcinoma from China. *Carcinogenesis*. **14**, 169-173.

- Li, R. & Jiang, Z. (2004). Chemical composition of the essential oil of *Cuminum cyminum* L. from China. *Flavour and Fragrance Journal*. **19**, 311-313.
- Li, X.M., Tian, S.L., Pang, Z.C., Shi, J.Y. & Feng, Z.S. (2009). Extraction of *Cuminum cyminum* essential oil by combination technology of organic solvent with low boiling point and steam distillation. *Food Chemistry*. **115**, 1114-1119.
- Li, Y., Fabiano-Tixier, A.S. & Chemat, F. (2014). Essential oils as agents in green chemistry. Springer Cham Heidelberg, New York, Dordrecht, London, pp.78.
- Lima, I.O., De Oliveira Pereira, F., De Oliveira, W.A., De Oliveira Lima, E., Menezes, E.A., Cunha, F.A. & De Fátima, M.F.M.D. (2013). Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. *Journal of Essential Oil Research*. **25**, 138-142.
- Lipps, P.E. & Deep, I.W. (1991). Influence of tillage and crop rotation on yield, stalk rot and recovery of *Fusarium* and *Trichoderma* spp. from corn. *Plant Disease*. **75**, 828-833.
- Liu, Y. & Wu, F. (2010). Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: A risk assessment. *Environmental Health Perspectives*. **118(6)**, 818-824.
- Lota., Marie-Laure, D., De Rocca Serra, C., Jacquemon, F., Tomi. & Casanova, J. (2001). Chemical variability of peel and leaf essential oils of sour orange. *Flavour Fragrance Journal*. **16(12)**, 89-96.
- Lucchesi, M.E. (2005). Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Université de la réunion. Thèse de Doctorat. MULTON, J.L., Lavoisier pub. New-York, Paris, pp. 366.
- Mace, D., Aguilar, F., Wang, J.S. & Vautravers, P. (1997). Aflatoxin B₁-induced DNA adduct formation and 53 mutations in CYP450-expressing human liver cell lines. *Carcinogenesis*. **18**, 1291-1297.
- Mahmoud, B. S. M., Yamazaki, K., Miyashita, K., Il-Shik, S., Dong- Suk, C. & Suzuki T. (2004). Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds. *Food Microbiology*. **21(6)**, 657- 666.
- Mancini, E., Senatore, F., Monte, D. D., De Martino, L., Grulova, D., Scognamiglio, M., Snoussi, M. & De Feo, V. (2015). Studies on chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of five *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Molecules*. **20(7)**, 12016-12028.
- Mandeel, Q.A. (2005). Fungal contamination of some imported spices. *Mycopathologia*. **159**, 291-298.

- Maraqqa, A., Alsharoa, N. F., Farah, H., Albjeirami, W. M., Shakya, A. K. & Sallal, A. J. (2007). Effect of *Nigella sativa* extract and oil on aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *Turkish Journal of Biology*. **31**, 155-159.
- Marin, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, G. & Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*. **60**, 218-237.
- Marin, S., Sanchis, V., Arnau, F., Ramos, A.J & Magan, N. (1998). Environmental factors *in vitro* interactions and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize grain. *Mycological Research*, **102**, 831-837.
- Marzouki, H., Khaldi, A., Chamli, R., Bouzid, S., Piras, A., Falconieri, D. & Marongiu, B. (2009). Biological activity evaluation of the oils from *Laurus nobilis* of Tunisia and Algeria extracted by supercritical carbon dioxide. *Natural Product Research*. **23**, 230-237.
- Mason, T., Chemat, F. & Vinatoru, M. (2011) .The extraction of natural products using ultrasound and microwaves. *Current Organic Chemistry*. **15**, 237-247
- Mastelic, J., Jerkovic, I., Blazevic, I., Poljak-Blazi, M., Borovic, S., Bace, I.I., Smreckiv., Žarkovic, Z., Brcic-Kostic, K., Vikic-Topic, D. & Muller, N.(2008). Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol, and eugenol derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **56(11)**, 3989-96.
- Meissonier, G.M., Oswald, I.P. & Galtier, P. (2005). Aflatoxicoses chez le porc -Étude bibliographique de données cliniques et expérimentales. *Revue de Médecine Vétérinaire*. **156(12)**, 591-605.
- Meissonier, G.M., Pinton, P., Laffitte, J., Cossalter, A. M., Gong, Y.Y., Wild, C.P., Bertin, G., Galtier P. & Oswald, I.P. (2008). Immunotoxicity of aflatoxin B₁: impairment of the cell-mediated response to vaccine antigen and modulation of cytokine expression. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **231**, 142-9.
- Menichini, F., Tundis, R., Bonesi, M., De Cindio, B., Loizzo, M.R., Conforti, F., Statti, G.A., Menabeni, R., Bettini, R. & Menichini, F. (2011). Chemical composition and bioactivity of *Citrus medica* L. cv. Diamante essential oil obtained by hydrodistillation, cold-pressing and supercritical carbon dioxide extraction. *Natural Product Research*. **25**,789-99.
- Mesa-Arango, A.C., Montiel-Ramos, J., Zapata, B., Durán, C., Betancur-Galvis, L. & Stashenko, E. (2009). Citral and carvone chemotypes from the essential oils of

- Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. **104** (6), 878-884.
- M'hir, S., Sifi, S., Chammem, N., Sifaoui, I., Mejri, A., Hahdi, M. & Abderrabba, M. (2012). Antioxidant effect of essential oils of *Thymus*, *Salvia* and *Rosemarinus* on the stability to oxidation of refined oils. *Annals of Biological Research*. **3**(9), 4259-4263.
- Mildner-Szkudlarz, S., Zawirska-Wojtasiak, R., Obuchowski, W. & Gośliński, M. (2009). Evaluation of antioxidant activity of green tea extract and its effect on the biscuits lipid fraction oxidative stability. *Journal of Food Science*. **74**, 362-370.
- Miller, D.L. (1998). Global significance of mycotoxins: Mycotoxins and Phycotoxins- Developpements in *Chemistry, Toxicology and Food Safety*. Editors: Miraglia M., Van Egmond H., Brera C. et Gilbert J. USA, pp. 610.
- Miraliakbari, H. & Shahidi, F. (2008). Antioxidant activity of minor components of tree nut oils. *Food Chemistry*. **111**(2), 421-427.
- Mishra, P.K., Kedia, A. & Dubey, N.K. (2015). Chemically characterized *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats. essential oil for shelf life enhancer of herbal raw materials based on antifungal, antiaflatoxicogenic, antioxidant activity, and favorable safety profile. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*. **3504**, 1-10.
- Mishra, P.K., Shukla, R., Singh, P., Prakash, B., Kedia, A. & Dubey, N.K. (2012b). Antifungal, anti-aflatoxicogenic, and antioxidant efficacy of Jamrosa essential oil for preservation of herbal raw materials. *International Biodeterioration and Biodegradation*. **74**, 11-16.
- Mishra, P.K., Singh, P., Prakash, B., Kedia, A. & Dubey, N.K. (2013). Assessing essential oil components as plant-based preservatives against fungi that deteriorate herbal raw materials. *International Biodeterioration and Biodegradation*. **80**, 16-21.
- Mkaddem, M. G., Romdhane, M., Ibrahim, H., Ennajar, M., Lebrihi, A., Mathieu, F. & Bouajila, J. (2010). Essential oil of *Thymus capitatus* Hoff. et Link. from Matmata, Tunisia: Gas Chromatography-Mass Spectrometry analysis and antimicrobial and antioxidant activities. *Journal of Medicinal Food*. **13** (6), 1500-1504.
- Mohammadpour, H., Moghimipour, E., Rasooli, I., Fakoor, M.H., Astaneh, S.A., Moosaie, S.S. & Jalili, Z. (2012). Chemical composition and antifungal activity of *Cuminum cyminum* L. essential oil from Alborz mountain against *Aspergillus* species. Jundishapur. *Journal Natural Pharmaceutical Products*. **7** (2), 50-55.

- Moon, J.K. & Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **57** (5), 1655-1666.
- 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.
- Moosavy, M.H., Hassanzadeh, P., Mohammadzadeh, E., Mahmoudi, R., Khatibi, S.A. & Mardani, K. (2017). Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of lemon (*Citrus limon*) peel *in vitro* and in a food model. *Journal of Food Quality and Hazards Control*. **4**, 42-48.
- Moss, M.O. & Frank, J.M. (1985). Influence of the fungicide tridemorph on T-2 toxin production by *Fusarium sporotrichioides*. *Transactions of the British Mycological Society*. **84**, 585-590.
- Nadeem, M., Anjum, F.M., Khan, M.I., Tehseen, S., El-Ghorab, A. & Sultan, J.I. (2013). Nutritional and medicinal aspects of coriander (*Coriandrum sativum* L.). A review. *British Food Journal*. **115**(5), 743-755.
- Naeini, A., Naderi, N. J. & Shokri, H. (2014). Analysis and *in vitro* anti-*Candida* antifungal activity of *Cuminum cyminum* and *Salvadora persica* herbs extracts against pathogenic *Candida* strains. *Journal de Mycologie Médicale*. **24**, 13-18.
- Naeini, A., Ziglari, T., Shokri, H. & Khosravi, A.R. (2010). Assessment of growth-inhibiting effect of some plant essential oils on different *Fusarium* isolates. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*. **20**, 174-178.
- Nakahara, K., Alzoreky, N.S., Yoshihashi, T. & Nguyen, H.T. (2003). *Jarq-Japan Agricultural Research Quarterly*. **37**(4), 249-252.
- Narasaiah, K.V., Sashidhar, R. & Subramanyam, C. (2006). Biochemical analysis of oxidative stress in the production of aflatoxin and its precursor intermediates. *Mycopathologia*. **162**, 179-189.
- Naveen, S., Siddalinga, S.M. & Khanum, F. (2011). Antioxidant potential of some common plant sources. *International Journal of Pharmaceutical Research and Development*. **3** (1), 154-174.
- Neffati, M., Sriti, J., Hamdaoui, G., Kchouk, M.E. & Marzouk, B. (2011). Salinity impact on fruit yield, essential oil composition and antioxidant activities of *Coriandrum sativum* fruit extracts. *Food Chemistry*. **124**, 221-225.
- Nemati, M., Mehran, M.A., Hamed, P.K. & Masoud, A. (2010). A survey on the occurrence of aflatoxin M₁ in milk samples in Ardabil, Iran. *Food Control*. **21**(7), 1022-1024.

- Nguefack, J., Dongmo, J.B.L., Dakole, C.D., Leth, V., Vismer, H.F. & Torp, J. (2009). Food preservative potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against mycotoxigenic fungi. *International Journal of Food Microbiology*. **131**, 151-156.
- Nguyen, M.T. (2007). Identification des espèces de moisissures potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam. Etude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines. Institut national polytechnique de Toulouse .Thèse de doctorat, pp.23- 28, 32- 35. France.
- Nishida, N., Tamotsu, S., Nagata, N., Saito, C. & Sakai, A. (2005). Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla*: Inhibition of cell proliferation and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings. *Journal Chemical Ecology*. **31**, 1187-1203.
- Nogueira, J.H.C., Gonçalves, E., Galletti, S.R., Facanali, R., Marques, M.O.M. & Felício, J.D. (2010). *Ageratum conyzoides* essential oil as aflatoxin suppressor of *Aspergillus flavus*. *International Journal of Food Microbiology*. **137**, 55-60.
- Nostro, A., Cellini, L., Bartolomeo, S.D., Campli, E.D., Grande, R. & Cannatelli, M.A. (2005). Antibacterial effect of plant extracts against *Helicobacter pylori*. *Phytotherapy Research*. **19**, 198-202.
- Omidbeygi, M., Barzegar, M., Hamidi, Z., Naghdibadi, H. (2007). Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control*. **18**, 1518-1523.
- O.M.S (Organisation Mondiale pour la Santé) (2002). Evaluation de certaines mycotoxines dans les aliments. Rapport de la cinquante-sixième réunion du comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires, Série de rapports techniques de l'OMS, no 906, Organisation mondiale de la santé (OMS), Genève, Suisse.
- Öntaş, C., Baba, E., Kaplaner, E., Kucukaydin, S., Öztürk, M., Kafkas, M.E.D. (2016). Antibacterial activity of *Citrus limon* peel essential oil and *Argania spinosa* oil against fish pathogenic bacteria. *vetdergikafkas* . **22(5)**, 741-749.
- Oswald, I.P., Marin, D.E., Bouhet, S., Pinton, P., Taranu, I. & Accensi, F. (2005). Immunotoxicological risk of mycotoxins for domestic animals. *Food Additives and Contaminants*. **22**, 354-360.
- Ouchikh, O., Chahed, T., Ksouri, R., Taarit, M.B., Faleh, H., Abdelly, C. (2011). The effects of extraction method on the measured tocopherol level and antioxidant activity of *L. nobilis* vegetative organs. *Journal of Food Composition and Analysis*. **24**, 103-110.

- Ouibrahim, A., Tlili-Ait-kaki, Y., Bennadja, S., Amrouni, S., Djahoudi, A.G, & Djebbar, M.R. (2013). Evaluation of antibacterial activity of *Laurus nobilis* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Ocimum basilicum* L. from Northeast of Algeria. *African Journal of Microbiology Research*. **7(42)**, 4968-4973.
- Ozcan, B., Esen, M., Sangun, M.K., Coler, I A. & Caliskan, M. (2010). Effective antibacterial and antioxidant properties of methanolic extract of *Laurus nobilis* seed oil. *Journal of Environmental Biology*. **31**, 637-641.
- Ozcan, M. & Chalchat, J. (2005). Effect of different locations on the chemical composition of essential oils of laurel (*Laurus nobilis* L.) leaves growing wild in Turkey. *Journal of Medicinal Food*. **8**, 408-411.
- Ozcan, M.M. & Chalchat, J.C. (2008). Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. **59**, 691-698.
- Padrini, F. & Lucheroni, M. T. (1996). Le grand livre des huiles essentielles - guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences et l'aromassage energetiques avec plus de 100 photographies. Edition: De Vecchi, Paris, pp.670.
- Paranagama, P.A., Abeysekera, K.H., Abeywickrama, K. & Nugaliyadde, L. (2003). Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemon grass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. *Letters in Applied Microbiology*. **37**, 86-90.
- Parent-Massin, D. & Parchment, R.E. (1998). Haematotoxicity of mycotoxins. *Revue de Médecine Vétérinaire*. **149**, 591-598.
- Pariente, L. (2001). Dictionnaire des sciences pharmaceutiques et biologiques. 2^{ème} édition, académie nationale de pharmacie, Paris, pp.1643.
- Paris, H. & Moyse, R.R. (1976). Précis de matière médicale. 2^{ème} édition (tome1), Masson Cie, Paris, pp.512.
- Park, D.L., Lee, L.S., Price, R.L. & Pohland, A.E. (1988). Review of decontamination of aflatoxin by amination, current status and regulation. *Journal Association of Official Analytical Chemists*. **71**, 685-702.
- Parle M. & Chaturvedi D. (2012). Orange : Range of benefits. *International Research Journal of Pharmacy*. **3 (7)**, 59-63.
- Peraica, M., Domijan, M.A., Fuchs, R., Lucic, A. & Radic, B. (1999). The occurrence of ochratoxin A in blood in general population of Croatia. *Toxicology Letters*. **110**, 105-112.

- Pashazanousi, M.B., Raeesi, M. & Shiralli, S. (2012). Chemical composition of the essential oil, antibacterial and antioxidant activities, total phenolic and flavonoid evaluation of various extracts from leaves and fruit peels of *Citrus limon*. *Asian Journal of Chemistry*. **24(10)**, 4331-4334.
- 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. *International Journal of Food Microbiology*. **159**, 198-206.
- Paster, N., Menashero, M., Ravid, U. & Juven, B. (1995). Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *Journal of Food Protection*. **58(1)**, 81-85.
- Paterson, R.R.M. (2006). Fungi and fungal toxins as weapons. *Mycological Research*. **110**, 1003-1010.
- Patricia, K.D., Martial, B.O.G. & Yvonne, D.K.K.J. (2015). Phytochemical screening of essential oil of *Citrus sinensis* by gas chromatography-flame ionization detector. *Journal of Agricultural Science and Technology*. **5**, 193-196.
- Peraica, M., Domijan, A.M., Fuchs, R., Lucic, A. & Radic B. (1999). The occurrence of ochratoxin A in blood in general population of Croatia. *Toxicology Letters*. **110**, 105-112.
- Pfohl-Leszkowicz, A. (1999). Ecotoxicogénèse. In : Les mycotoxines dans l'alimentation, évaluation et gestion du risqué. Editon : TEC et DOC, Lavoisier, Paris, pp.478.
- Pharmacopée Européenne. (1997). 3^{ème} édition, Conseil de l'Europe. Sainte Ruffine, Maisonneuve S.A, pp.1918.
- Philips, T.D., Clement, B.A. & Park, D.L. (1994). Approaches to reduction of aflatoxins in foods and feeds. In : Eaton D.L. et Groopman J.D. (Editors), the toxicology of aflatoxins: Human health, veterinary and agricultural significance. New York: Academic Press, pp.544.
- Phillips, C.A., Laird, K. & Allen, S.C. (2012). The use of Citri-V™® — an antimicrobial *Citrus* essential oil vapours for the control of *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus Niger* and *Alternaria alternata* *in vitro* and on food. *Food Research International*. **47**, 310-314.
- Pinton, P. (2012). Toxicité et mode d'action, du déoxynivalenol et de ses dérivés acétyles sur l'intestin. Ecole doctorale 472. Thèse de doctorat, pp.10. France.

- Pitt *et al.* (2001). Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds, a decade in review. *In: De Koe, W.J., Samson, R.A., van Egmond, H.P, Gilbert, J. & Sabino, M. (Editors). Mycotoxins and phycotoxins at the turn of the millennium, Guarujá (Brazil), pp.153-172.*
- Pitt, J. I. & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. 3^{ème} édition , Springer, London, New York, pp.524.
- Polovka, M. & Suhaj, M. (2010). Detection of caraway and bay leaves irradiation based on their extracts antioxidant properties evaluation. *Food Chemistry*. **119**, 391-401.
- Porto, C., Decorti, D. & Kikic, I. (2009). Flavour compounds of *Lavandula angustifolia* L. to use in food manufacturing: Comparison of three different extraction methods. *Food Chemistry*. **112**, 1072-1078.
- Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P.K. & Dubey, N.K. (2015) Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities - Potentials and challenges. *Food Control*. **47**, 381-391.
- Prakash, B., Mishra, P.K., Kedia, A., Dubey, N.K. (2014). Antifungal, antiaflatoxin and antioxidant potential of chemically characterized *Boswellia carterii* Birdw essential oil and its *in vivo* practical applicability in preservation of *Piper nigrum* L. fruits. *LWT - Food Science and Technology*. **56**, 240-247.
- Prakash, B., Shukla, R., Singh, P., Kumar, A., Mishra, P.K. & Dubey, N.K. (2010). Efficacy of chemically characterized *Piper betle* L. essential oil against fungal and aflatoxin contamination of some edible commodities and its antioxidant activity. *International Journal of Food Microbiology*. **142**, 114-119.
- Prakash, B., Shukla, R., Singh, P., Mishra, P.K., Dubey, N.K. & Kharwar, R.N. (2011). Efficacy of chemically characterized *Ocimum gratissimum* L. essential oil as an antioxidant and a safe plant based antimicrobial against fungal and aflatoxin B₁ contamination of spices. *Food Research International*. **44**, 385-390.
- Prakash, B., Singh, P., Kedia, A. & Dubey, N.K. (2012). Assessment of some essential oils as food preservatives based on antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activities and *in vivo* efficacy in food system. *Food Research International*. **49**, 201-208.
- Prashar, A., Locke, I.C. & Evans, C.S. (2004). Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. *Cell Proliferation*. **37**, 221-229.
- Quezel, P. & Santa, S. (1963). Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales (Vol II). Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, pp.11701.

- Rajput, S.B. & Karuppayil, S.M. (2013). Small molecules inhibit growth, viability and ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*. *Springerplus*. **2**, 26.
- Rammanee, K. & Hongpattarakere, T. (2011). Effects of tropical *Citrus* essential oils on growth, aflatoxin production, and ultrastructure alterations of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Food Process Biotechnology*. **4**, 1050-1059.
- Ramos, C., Teixeira, B., Batista, I., Matos, O., Serrano, C., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Nunes, M.L. & Marques, M. (2012). Antioxidant and antibacterial activity of essential oil and extracts of bay leaf *Laurus nobilis* L. (*Lauraceae*) from Portugal. *Natural Product Research*. **6**, 518-529.
- Ramy, M., Sayed, F. & Gada Ibrahim, M. (2010). Chemical compositions, antiviral and antioxidant activities of seven essential oils. *Journal of Applied Science Research*. **6** (1), 50-62.
- Raney, V. M., Harris, T. M. & Stone, M. P. (1993). DNA conformation mediates aflatoxin B₁-DNA binding and the formation of guanine N7 adducts by aflatoxin B₁ 8, 9- exo-epoxide. *Chemical Research in Toxicology*. **6**(1), 64-68.
- Rasooli, I. & Owlia, P. (2005). Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Phytochemistry*. **66**, 2851-2856.
- Rasooli, I., Fakoor, M.H., Yadegarinia, D., Gachkar, L., Allameh, A. & Rezaei, M.B. (2008). Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. *International Journal of Food Microbiology*. **122**, 135-9.
- Ravi, R., Prakash, M. & Bhat, K.K. (2007). Aroma characterization of coriander (*Coriandrum sativum* L.) oil samples. *European Food Research and Technology*. **225**, 367-374.
- Razzaghi-Abyaneh, M. & Rai, M. (2013). Antifungal Metabolites from Plants. Springer Heidelberg, New York, Dordrecht, London, pp.467.
- Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Bagher Rezaee, M., Jaimand, K., Alinezhad, S., Saberi, R. & Yoshinari, T. (2009). Chemical composition and antiaflatoxigenic activity of *Carum carvi* L., *Thymus vulgaris* and *Citrus aurantifolia* essential oils. *Food control*, **20**, 1018-1024.
- Rebey, I. B., Jabri-Karoui, I., Hamrouni-Sellami, I., Bourgou, S., Limam, F. & Marzouk, B. (2012). Effect of drought on the biochemical composition and antioxidant activities of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds. *Industrial Crops Products*. **36**, 238-45.
- Reddy, K.R.N., Reddy, C.S. & Muralidharan, K. (2009). Potential of botanicals and biocontrol agents on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* infecting rice grains. *Food Control*. **20**, 173-178.

- Reddy, K.R.N., Raghavender, C.R., Salleh, B., Reddy, C.S. & Reddy, B.N. (2011). Potential of aflatoxin B₁ production by *Aspergillus flavus* strains on commercially important food grains. *International Journal of Food Science and Technology*. **46**, 161-165.
- Rega, B., Fournier, N., Guichard, E. & Russell, R. (2003). Citrus flavour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**, 117-133.
- Rojas, T.R., Sampayo, C.A.F., Vázquez, B.I., Franco, C.M., Cepada, A. (2005). Study of interferences by several metabolites from *Aspergillus* spp. in the detection of aflatoxigenic strains in media added with cyclodextrin. *Food Control*. **16**, 445-450.
- Romagnoli, C., Andreotti, E., Maietti, S., Mahendra, R. & Mares, B. (2010). Antifungal activity of essential oil from fruits of Indian *Cuminum cyminum*. *Pharmaceutical Biology*. **48** (7), 834-338.
- Rubert, J., Soler, C. & Manes, J. (2012). Application of an HPLC-MS/MS method for mycotoxin analysis in commercial baby foods. *Food Chemistry*. **133**, 176-183.
- Ruberto, G. & Baratta, M. (2000). Antioxidant activity of selected essential oil compounds in two lipid model systems. *Food Chemistry*. **69**, 167-174.
- Ruppel, P., Delfosse, P.H. & Hornick, J.L. (2004). La contamination de la filière laitière par les mycotoxines : un risque pour la santé publique en Afrique subsaharienne. *Annales de Médecine Vétérinaire*. **148**, 141-146.
- Saad, N.Y., Muller, C.D. & Lobstein, A. (2013). Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal*. **28**, 269-279.
- Saha, S., Walia, S., Kundu, A., Sharma, K., Singh, J., Tripathi, B. & Raina, A. (2016). Compositional and functional difference in cumin (*Cuminum cyminum*) essential oil extracted by hydrodistillation and SCFE. *Food Science and Technology*. **2**, 1143-166
- Saleemullah, I.A., Khalil, I.A. & Shah, H. (2006). Aflatoxin contents of stored and artificially inoculated cereals and nuts. *Food Chemistry*. **98**, 690-703.
- Samson, R.A., Hong, S.B. & Frisvad, J.C. (2006). Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology*. **44**, 133-148.
- Samson, R., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C. & Andersen, B. (2010). Food and Indoor Fungi. Utrecht : CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, pp.390.
- Samson, R.A., Houbraken, J.A., Kuijpers, A.F.A., Frank, M.J. & Frisvad, J.C. (2004). New ochratoxin or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*. **50**, 45-61.
- Samson, R.A. & Pitt, J.I. (2000). Integration of Modern Methods for *Penicillium* and *Aspergillus*. Harwood academic publishers, Amsterdam, the Netherlands, pp.510.

- Santini, A. & Ritieni, A. (2013). Additional information is available at the end of the chapter in Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects. *In: Razzaghi-Abyaneh M. Aflatoxins: Risk, exposure and remediation. Janeza Trdine, Croatia, pp.406.*
- Scheidegger, K.A. & Payne, G.A. (2003). Unlocking the secrets behind secondary metabolism, a review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. *Journal of Toxicology and Toxin Review.* **22**, 427-463.
- Sekine, T., Sugano, M., Majid, A. & Fujii, Y. (2007). Antifungal effects of volatile compounds from black zira (*Bunium persicum*) and other spices and herbs. *Journal of Chemical Ecology.* **33**, 2123-2132.
- Shahidi, F. (2000). Antioxidants in food and food antioxidants, *Nahrung.* **3**, 158-163.
- Sharma, N. & Tripathi, A. (2008). Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological Research.* **163**, 337-344.
- Sharma, O.P & Bhat, K.T. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry.* **113**, 1202-1205.
- Sherratt, P.J. & Hayes, J.D. (2001). Glutathione S-transferase. *Enzyme Systems that metabolise drugs and other xenobiotics.* **9**, 320-351.
- Shukla, R., Kumar, A., Prasad, C.S., Srivastava, B. & Dubey, N.K. (2008). Antimycotic and antiaflatoxicogenic potency of *Adenocalymma alliaceum* Miers. on fungi causing biodeterioration of food commodities and raw herbal drugs. *International Biodeterioration and Biodegradation.* **62**, 348-351.
- Shukla, R., Kumar, A., Singh, P. & Dubey, N. K. (2009). Efficacy of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil and its monoterpene aldehyde constituents against fungi isolated from some edible legume seeds and aflatoxin B₁ production. *International Journal of Food Microbiology.* **135**, 165-170.
- Shukla, R., Singh, P., Prakash, B. & Dubey, N.K. (2012). Antifungal, aflatoxin inhibition and antioxidant activity of *Callistemon lanceolatus* (Sm.) Sweet essential oil and its major component 1,8-cineole against fungal isolates from chickpea seeds. *Food Control.* **25**, 27-33.
- Simiç, A., Sokoviç, M. D., Ristiç, M., Grujiç-Jovanoviç, S., Vukojeviç, J. & Marin, P. D. (2004). The chemical composition of some *Lauraceae* essential oils and their antifungal activities. *Phytotherapy Research.* **18**, 713-717.

- Singh, G., Maurya, S., de Lampasona, M.P. & Catalan, C.A.N. (2007). A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, *oleoresins* and their constituents. *Food and Chemical Toxicology*. **45**, 1650-1661.
- Singh, P. & Srivastava, B. (2008). Spices and efficacy of essential oil of *Amomum subulatum* as a novel aflatoxin B₁ suppressor. *Journal of Herbs*. **6475**, 37-41.
- Singh, P., Shukla, R., Prakash, B., Kumar, A., Singh, S., Mishra, K.P. & Dubey, N.K. (2010). Chemical profile, antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. *Food and Chemical Toxicology*. **48**, 1734-1740.
- Singh, P., Srivastava, B., Kumar, A., Kumar, R., Dubey, N.K. & Gupta, R. (2008). Assessment of *Pelargonium graveolens* oil as plant-based antimicrobial and aflatoxin suppressor in food preservation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **88**, 2421-2425.
- Singh, G. & Upadhyay, R.K. (1991). Fungitoxic activity of cumaldehyde, main constituent of the *Cuminum cyminum* L. *Fitoterapia*. **62**, 86.
- Sinha, K.K. & Bhatnagar, D. (1998). Mycotoxins in agriculture and food safety. Marcel Dekker : New York, USA, pp. 520.
- Škocibusic, M., Bezić, N. & Dunkić, V. (2006). Phytochemical composition and antimicrobial activities of essential oils from *Satureja subspicata* Vis. Growing in Croatia. *Food Chemistry*. **96**, 20-28.
- Smid, E.J. & Gorris, L.G.M. (1999). In M. S. Rehman (Ed.), Handbook of food preservation. New York: Marcel Dekker, pp.1088.
- Smid, E.J., Dewitte, Y. & Gosris, L.G.M. (1995). Secondary plant metabolites as control agents of postharvest *Penicillium* rot on tulip bulbs. *Postharvest Biology and Technology*. **6**, 303-312.
- Snuossi, M., Trabelsi, N., Ben Taleb, S., Dehmeni, A., Flamini, G. & De Feo, V. (2016). *Laurus nobilis*, *Zingiber officinale* and *Anethum graveolens* essential oils: Composition, antioxidant and antibacterial activities against bacteria isolated from fish and shellfish. *Molecules*. **21**, 1414.
- Souza, E.L.d, Lima, E.d.O., Freire, K.R.d.L. & Sousa, C.P.d. (2005). Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. **48**, 245-250.

- Soylu, E.M., Kurt, S. & Soylu, S. (2010). *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *International Journal of Food Microbiology*. **143**, 183-189.
- Soylu, E.M., Soylu, S. & Kurt, S. (2006). Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia*. **161**, 119-128.
- Speroni, E., Cervellati, R., Dall'Acqua, S., Guerra, M. C., Greco, E. & Govoni, P. (2011). Gastroprotective effect and antioxidant properties of different *Laurus nobilis* L. leaf extracts. *Journal of Medicinal Food*. **14**, 499-504.
- Sreelatha, S., Padma, P.P. & Umadevi, M. (2009). Protective effects of *Coriandrum sativum* extracts on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*. **47**, 702-708.
- Sreenivasulu, N., Grimm, B., Wobus, U. & Weschke, W. (2000). Differential response of antioxidant compounds to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*). *Plant Physiology*. **109**, 435-442.
- Stević, T., Berić, T., Šavikina, K., Soković, M., Godevac, D., Dimkić, I. & Stanković, S. (2014). Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant. *Industrial Crops and Products*. **55**, 116-122.
- Suhr, I.K. & Nielsen, V.P. (2003). Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal of Applied Microbiology*. **94**, 665-674.
- Sultana, S., Ripa, F.A. & Hamid, K. (2010). Comparative antioxidant activity study of some commonly used spices in Bangladesh. *Pakistan Journal of Biological Science*. **13(7)**, 340-343.
- Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K. & Bigger, S.W. (2003). Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *Journal of Food Science*. **68**, 408-420.
- Tabti, L., El Amine Dib, M., Gaouar, N., Samira, B. & Tabti, B. (2014). Antioxidant and antifungal activity of extracts of the aerial parts of *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns against four phytopathogenic fungi of *Citrus sinensis*. *Jundishapur Journal Natatural Pharmaceutical Products*. **9(1)**, 49-54.
- Tabuc, C. (2007). Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Institut national polytechnique de Toulouse et université de Bucarest. Thèse de doctorat, pp. 65. France.

- Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A. & Cliver, D.O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*. **21(9)**, 1199-1218.
- Tani, Z.B., Khelil, M.A., Bendahou, M. & Mestari, M. (2009). Action des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de l'Ouest Algérien sur la mite *Tineola bisselliella*. *Revue Ivoirienne de Science et Technologie*. **14**, 175 -186.
- Taoudiat, A., Djenane, D., Ferhat, Z., Spigno, G. (2018). The effect of *Laurus nobilis* L. essential oil and different packaging systems on the photo-oxidative stability of Chemlal extra-virgin olive oil. *Journal of Food Science and Technology*. **55(10)**, 4212-4222.
- Tatsadjieu, N., Jazet, M., Ngassoum, M.B., Etoa, X., Mbofung, M.F. (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.
- Tatsadjieu, N.L., Dongmo, P.M.J., Ngassoum, M.B., Etoa, F.X. & Mbofung, C.M.F. (2009). Investigations on the essential oil of *Lippia rugosa* from Cameroon for its potential use as antifungal agent against *Aspergillus flavus* Link ex. Fries. *Food Control*. **20**, 161-166.
- Thippeswamy, N.B. & Naidu, K.A. (2005). Antioxidant potency of cumin varieties cumin, black cumin and bitter cumin on antioxidant systems. *European Food Research and Technology*. **220**, 472-476.
- Thompson, D.P. (1996). Inhibition of growth of mycotoxigenic *Fusarium* species by butylated hydroxyanisole and/or carvacrol. *Journal of Food Protection*. **59**, 412-415.
- Tian, J., Ban, X., Zeng, H., He, J., Huang, B. & Wang, Y. (2011). Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. *International Journal of Food Microbiology*. **145**, 464-470.
- Tian, J., Huang, B., Luo, X., Zeng, H., Ban, X., He, J. & Wang, Y. (2012). The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand.-Mazz essential oil and its potential use as a food preservative. *Food Chemistry*. **130**, 520-527.
- Tisserand, R. (1997). Essential oil Safety III. Carcinogenesis, Phototoxicity. *The International Journal of Aromatherapy*. **8**, 23-27.
- Tolba, H., Moghrani, H., Benelmouffok, A., Kellou, D. & Maachi, R. (2015). Essential oil of Algerian *Eucalyptus citriodora*: Chemical composition, antifungal activity. *Journal Medical Mycology*. **25**, 128-133.
- Tozlovanu, M. (2008). Evaluation du risque de contamination alimentaire en mycotoxines néphrotoxiques et cancérogènes (notamment l'ochratoxine A): Validation de

- biomarqueurs d'exposition et d'effet. Institut national polytechnique de Toulouse
Thèse de doctorat, pp. 25. France.
- Trindade, L.A., De Araujo Oliveira, J., De Castro, R.D. & De Oliveira Lima, E. (2015). Inhibition of adherence of *C. albicans* to dental implants and cover-screws by *Cymbopogon nardus* essential oil and citronellal. *Clinical Oral Investigation*. **19**, 2223-2231.
- Troller, J.A. (1980). Influence of aw on micro-organisms in foods. *Food Technology*. 34- 76
- Tundis, R., Loizzo, M.R., Bonesi, M., Menichini, F., Mastellone, V., Colica, C. & Menichini, F. (2012). Comparative study on the antioxidant Capacity and Cholinesterase Inhibitory activity of *Citrus aurantifolia* Swingle, *C. aurantium* L., and *C. bergamia* Risso and Poit. peel essential oils. *Journal of Food Science*. **77** (1), H40-H46.
- Turgis, M., Han, J., Caillet, S. & Lacroix M. (2009). Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi*. *Food Control*. **20**, 1073-1079.
- Turina, A.V., Nolan, M.V., Zygodlo, J.A. & Perillo, M.A. (2006). Natural terpenes: Self-assembly and membrane partitioning. *Biophysical Chemistry*. **122**,101-113.
- Turner, C. (2006). Modern extraction techniques. Food and agricultural samples. *ACS Symposium Series* 926. Edition, American Chemical Society, Washington, DC, pp.189.
- Tzortzakis, N.G. (2009). Impact of cinnamon oil-enrichment on microbial spoilage of fresh produce. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **10**, 97-102.
- Uhl, S.R. (2000). Handbook of Spices, Seasonings, and Flavorings. Technomic Publication, USA, pp. 329.
- Ultee, A., Bennik, M.H.J. & Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol essential fraction against the food borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied Environmental Microbiology*. **68**, 1561-1568.
- Vale-Silva, L.A., Gonçalves, M.J., Cavaleiro, C., Salgueiro, L. & Pinto, E. (2010). Antifungal activity of the essential oil of *Thymus x viciosoi* against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Planta Medica*. **76**, 882-888.
- Van den Dool, H. & Kratz, P.D. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*. **11**, 463-471.
- Varga, J., Baranyi, N., Chandrasekaran, M. & Vágvölgyi, C. (2015). Mycotoxin producers in the *Aspergillus* genus: An update. *Acta Biologica Szegediensis*. **59**, 151-167.

- Varga, J., Rigo, K., Toth, B., Teren, J. & Kozakiewicz, Z. (2003). Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. *Food Technology and Biotechnology*. **41**, 29-36.
- Vekiari, S.A., Protopapadakis, E.F., Papadopoulou, P., Papanicolaou, D., Panou, C. & Vamvakias, M. (2002). Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a lemon variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **5(1)**, 147-153.
- Velluti, A., Marín, S., Gonzalez, P., Ramos, A.J. & Sanchis, V. (2004). Initial screening for inhibitory activity of essential oils on growth of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* on maize-based agar media. *Food Microbiology*. **21**, 649-656.
- Verdian-rizi, M. & Hadjiakhoondi, A. (2008). Essential oil composition of *Laurus nobilis* L. of different growth stages growing in Iran. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung Tübingen*. **63(11-12)**, 785-788.
- Veriotti, T. & Sacks, R. (2001). High-speed GC and GC/time-of-flight MS of lemon and lime oil samples. *Analytical Chemistry*. **73(18)**, 4395-4402.
- Vican, P. (2001). Encyclopédie des plantes médicinales. Larousse. Paris, France, pp. 355.
- Vilela, G.R., De Almeida, G.S., D'Arce, M.A.B.R., Moraes, M.H.D., Britob, J.O., Da Silva, M.F.d.G.F., Silva, S.C., De Stefano Piedade, S.M., Calori-Domingues, M.A. & Da Gloria, E.M. (2009). Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill. against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. *Journal of Stored Products Research*. **45**, 108-111.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J. & Perez-Alvarez, J.A. (2007). Chemical composition of the essential oils obtained from some spices widely used in Mediterranean region. *Acta Chimica Slovaca*. **54**, 921-926.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J. & Pérez-Álvarez, J. (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*. **19**, 1130-1138.
- Wang, H., Dick, R., Yin, H., Licad-Coles, E., Kroetz, D.L., Szklarz, G., Harlow, G., Halpert, J.R. & Correia, M.A. (1998). Structure-function relationships of human liver cytochromes 450A: Aflatoxin B₁ metabolism as a probe. *Biochemistry*. **37**, 12536-12545.

- Wang, S.Y, Chen, C.T, Sciarappa, W., Wang, C.Y., Camp, M.J. (2008). Fruit quality, antioxidant capacity and flavonoid content of organically and conventionally grown blueberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **56**, 5788-5794.
- Wild, C.P. & Montesano, R. (2009). A model of interaction: aflatoxin B₁ and hepatitis viruses in liver cancer aetiology. *Cancer Letters*. **286**, 22-28.
- Wild, C.P. & Turner, P.C. (2002). The toxicity of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis*. **17**, 471-481.
- Wild, C.P., Gaener, R.C., Montesano, R. & Tursi, F. (1986). Aflatoxin B₁ binding to plasma albumin and liver DNA upon chronic administration to rats. *Carcinogenesis*. **6**, 853-858.
- Wild, C.P., Rasheed, F.N., Jawla, M.F.B., Hall, A.J., Jansen, L.A.M. & Montesano, R. (1991). *In-utero* exposure to aflatoxin in West Africa. *The Lancet*. **337**, 1602.
- Wu, F. & Khlangwis , P. (2010). Health economic impacts and cost-effectiveness of aflatoxin reduction strategies in Africa: Case studies in biocontrol and postharvest interventions. *Food Additives and Contaminants*. **27**, 496-509.
- Yehouenou, B., Noudogbessi, J.P., Sessou, P., Avlessi, F. & Sohounhloúé, D. (2010). Étude chimique et activités antimicrobiennes d'extraits volatils des feuilles et fruits de *Xylopi aethiopica* (Dunal) A. Rich. Contre les pathogènes des denrées alimentaires. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*. **029**, 19- 27.
- Yiannikouris, A. & Jouany, J.P. (2002). Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal. *Productions Animales*. **15**, 3-16.
- Yilmaz, E.S., Timur, M. & Aslim, B. (2013). Antimicrobial, antioxidant activity of the essential oil of bay laurel from hatay, Turkey. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. **16 (1)**, 108-116.
- Yu, J., Chang, P.K., Ehrlich, K.C., Cary, J. W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Payne, G.A., Linz, J.E., Woloshuk C.P., & Bennett, J.W. (2004). Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*. **70**, 1253-1262.
- Yutani, M., Hashimoto, Y., Ogita, A., Kubo, I., Tanaka, T. & Fujita, K. (2011). Morphological changes of the filamentous fungus *Mucor mucedo* and inhibition of chitin synthase activity induced by anethole. *Phytotherapy Research*. **25**, 1707-1713.
- Zabka, M., Pavela, R. & Slezakova, L. (2009). Antifungal effect of *Pimenta dioica* essential oil against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi. *Industrial Crops and Products*. **30**, 250-253.

- Zabka, M., Pavela, R. & Slezakova, L. (2009). Antifungal effect of *Pimenta dioica* essential oil against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi. *Industrial Crops and Products*. **30**, 250-253.
- Zain, M.E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*. **15**, 129-144.
- Zheng-kui, L., Ying-fang, H., Guo-ping, G. & Yu-hong, G. (1990). Chemical constituents of the essential oils from the leaves of *Laurus nobilis* and tendency in changes of the constituents month by month. *Acta Botanica Sinica*. **32**, 878-882.
- Zhiri, A., Baudoux, D. & Breda, M.L. (2005). Huile essentielles chémotypées et leurs synergies. Edition Inspir développement, pp. 46.
- Zjalic, S., Reverberi, M., Ricelli, A., Granito, V.M., Fanelli, C. & Fabbr, A.A. (2006). *Trametes versicolor*: A possible tool for aflatoxins control. *International Journal of Food Microbiology*. **107**, 243-246.
- Zoubiri, S. & Baaliouamer, A. (2010). Essential oil composition of *Coriandrum sativum* seed cultivated in Algeria as food grains protectant. *Food Chemistry*. **122**, 1226-1228.
- Zunino, M.P. & Zygadlo, J.A. (2004). Effect of monoterpenes on lipid oxidation in maize. *Planta*. **219**, 303-309.

Annexe I**Compositions des milieux de culture****Milieu PDA (Pomme de terre, Dextrose, Agar)**

Pomme de terre	200 g
Agar	15 g
Glucose	20 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 5,6 ± 0,2

Extract de Malt Agar (MEA)

Extrait de Malt.....	20 g
Glucose.....	20 g
Peptone.....	20 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 5,6 ± 0,2

G25N (25% Glycérol Nitrate Agar)

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

pH = 7

Czapek concentré

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

Milieu CYA (Czapek Yeast extract Agar)

Saccharose	30 g
------------------	------

Extrait de levure	5 g
Czapek concentré	10 ml
K ₂ HPO ₄	1 g
Agar	15 g
Eau distillée.....	1000 ml
pH = 6,7 ± 0,2	

Milieu AFPA

Peptone.....	10 g
Extrait de levure	20 g
Citrate d'ammonium ferreux	0,5 g
Chloramphénicol	100 mg
Agar.....	15 g
Dichloran (2,6 dichloro-4-nitroaniline).....	2 mg
Eau distillée	1000 ml
pH = 6 ± 0,2	

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

Noix de coco.....	100 g
Agar.....	20 g
β-cyclodextrine (β-cyd)	3 g
Eau distillée.....	1000 ml
pH = 7	

Milieu SMKY

Saccharose	200 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,5 g
KNO ₃	0,3 g
Extrait de levure	7 g
Eau distillée.....	1000 ml
pH = 6,8 ± 0,2	

Milieu DRBC

Glucose.....	10 g
Peptone	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g

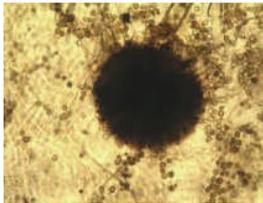
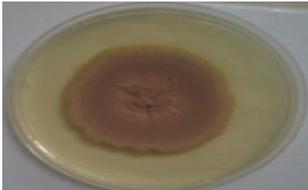
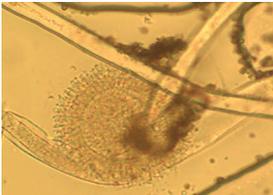
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,5 g
Rose Bengale.....	25 mg
Dichloran (2,6 dichloro-4-nitroaniline).....	2 mg
Chloramphénicol.....	100 mg
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml

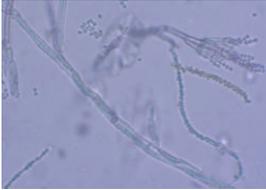
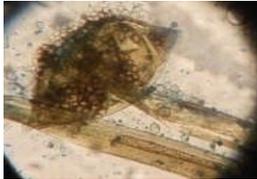
pH = 5,6 ± 0,2

N.B. Tous les milieux sont stérilisés par autoclavage à 120 °C/15 min.

Annexe II

Tableau 1. Caractères macroscopiques et microscopiques des moisissures utilisées

Souche	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
<i>A. carbonarius</i>		
<i>A. fumigatus</i>		
<i>A. niger</i>		
<i>A. ochraceus</i>		
<i>A. tamari</i>		
<i>A. terreus.</i>		
<i>Fusarium sp.</i>		

<i>Penicillium</i> sp.		
<i>Rhizopus</i> sp.		

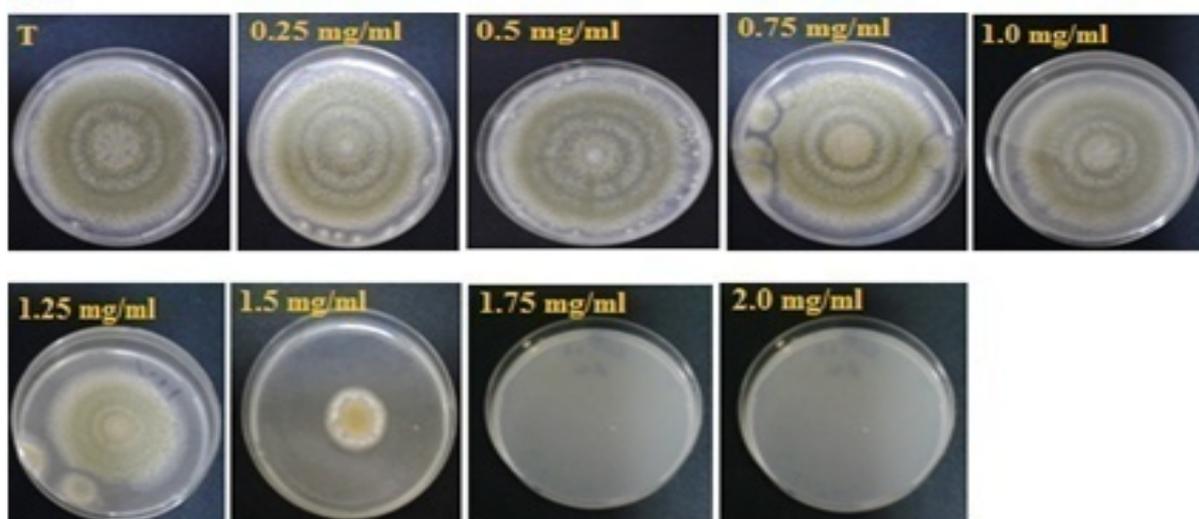
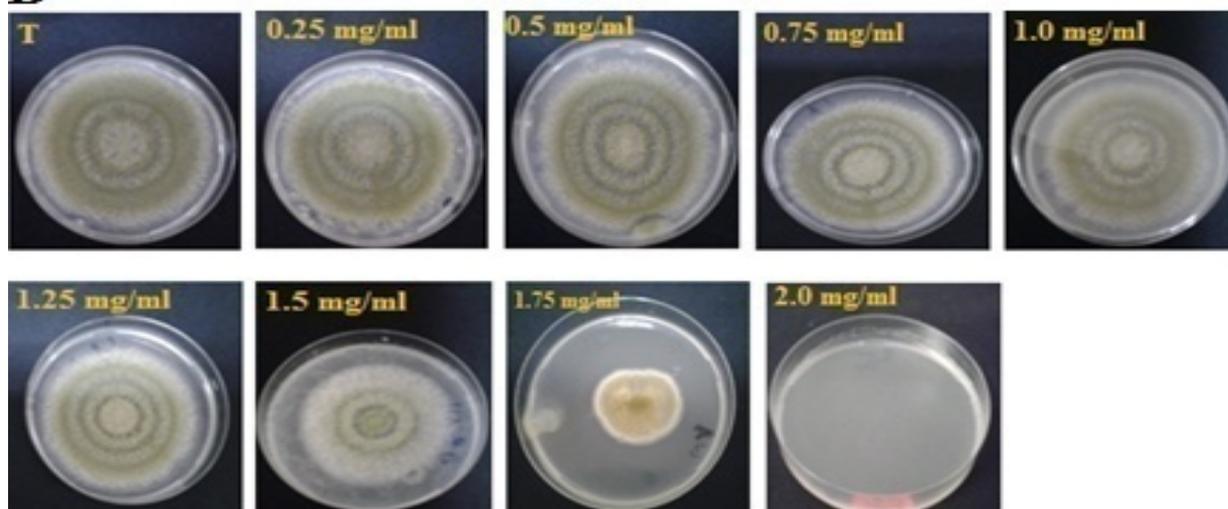
A**B**

Figure 1. Effet des HEs de *C. limon* (A) et *C. sinensis* (B) sur la croissance mycélienne de l'*Aspergillus flavus* E73.

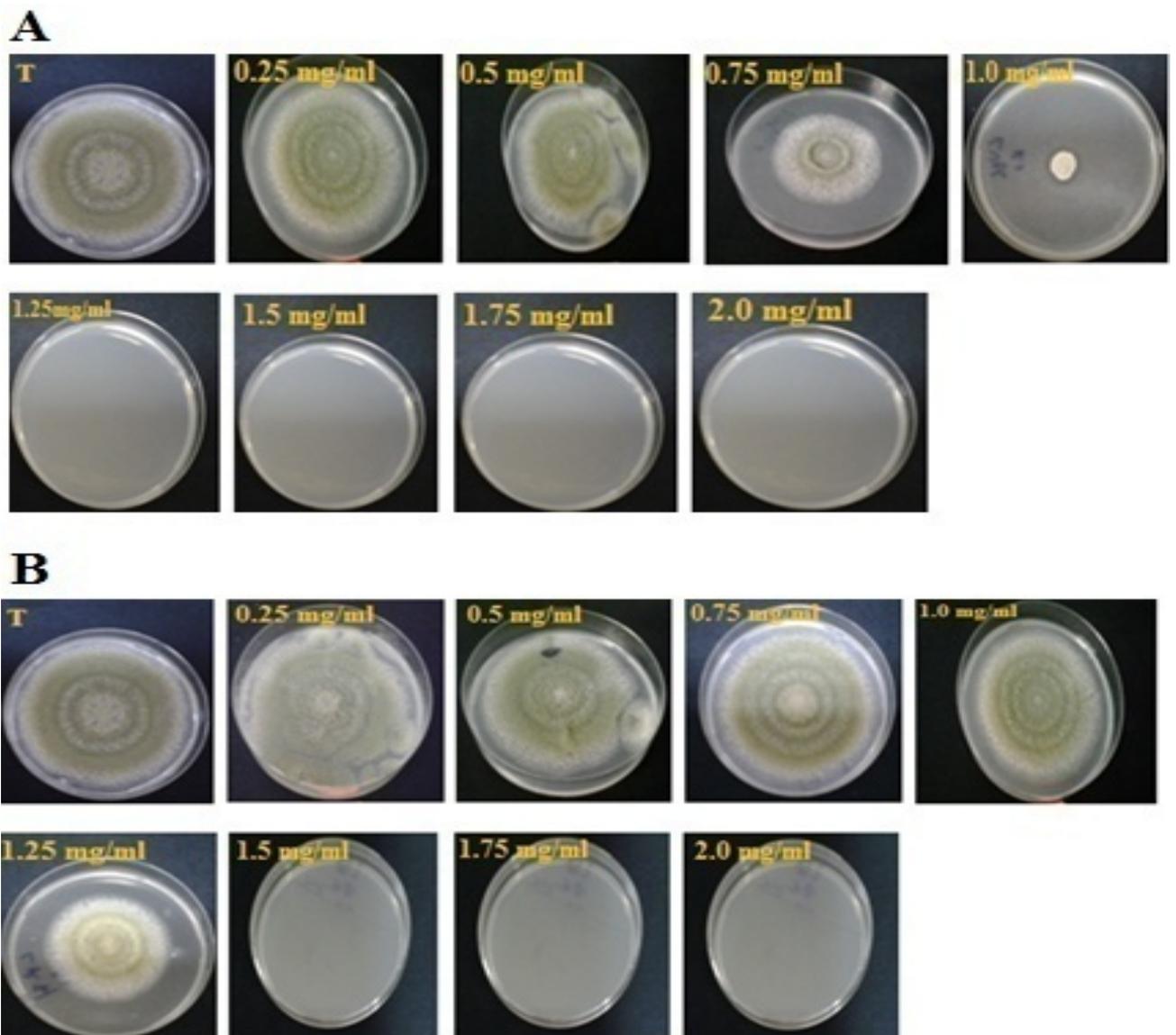


Figure 2. Effet de l'HE de *C. cyminum* (A) et *C. sativum* (B) sur la croissance mycélienne de l'*Aspergillus flavus* E73.

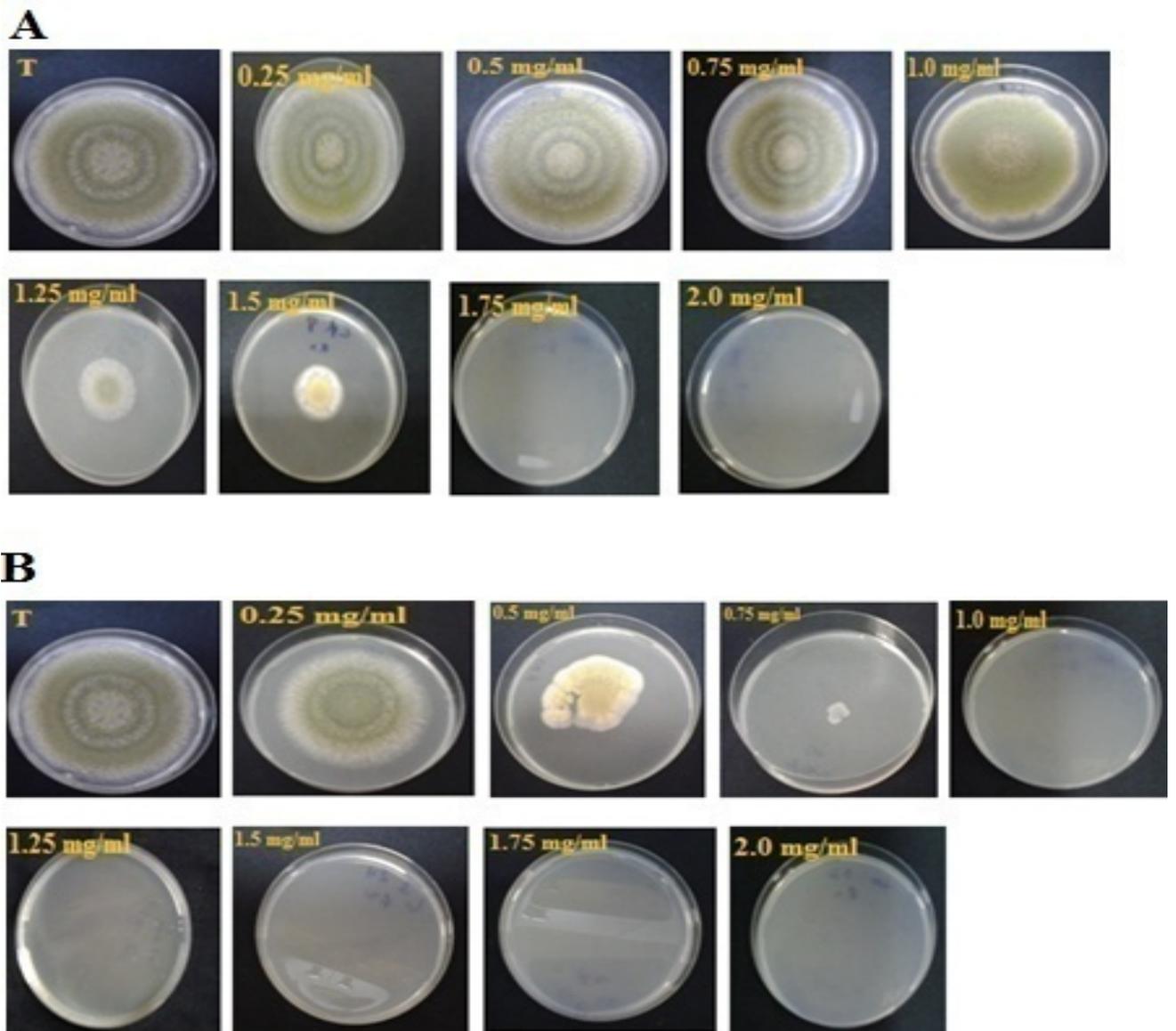


Figure 3. Effet de l'HE de *L. nobilis* (A) et *T. capitatus* (B) sur la croissance mycélienne de l'*Aspergillus flavus* E73.



Figure 4. Les étapes de test d'inhibition de la production des AFB₁.



Figure 5. Test préliminaire de germination de deux variétés des graines de blé:
Germination après 8 jours d'incubation.

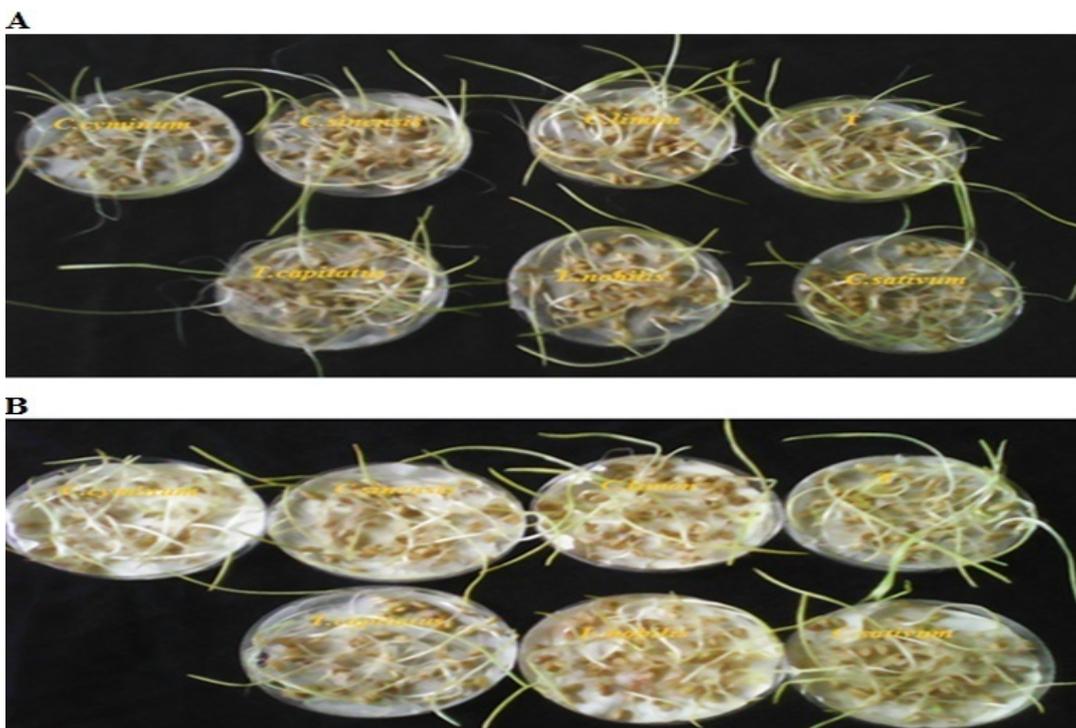


Figure 6. Effet des HEs sur la germination de deux variétés des graines de blé: A.
HD1220 (Hiddab); B. AS 81189 A (Ain Abid).

Annexe III

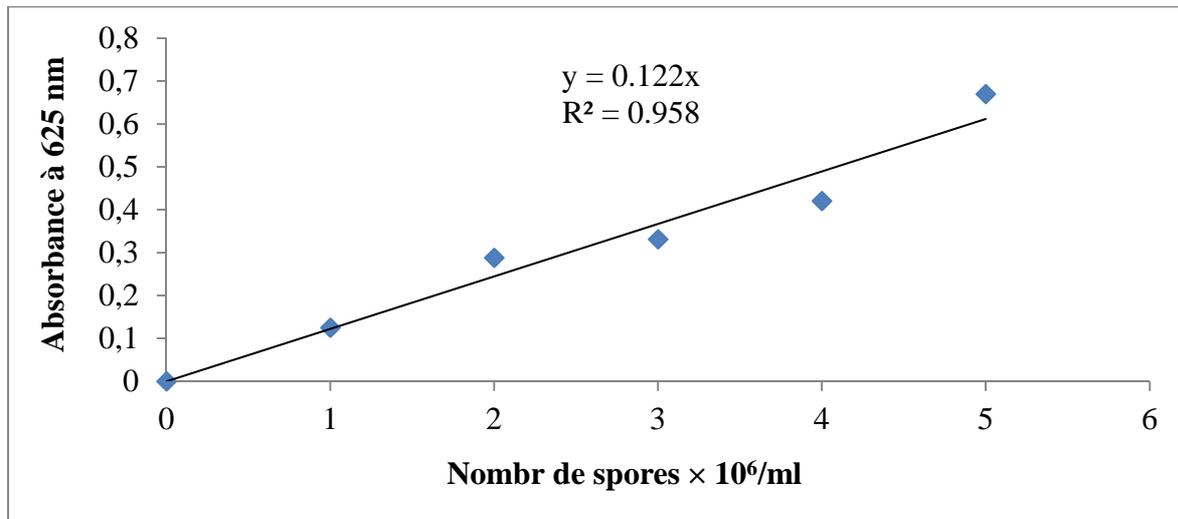


Figure 1. Courbe d'étalonnage des spores d' *Aspergillus flavus*.

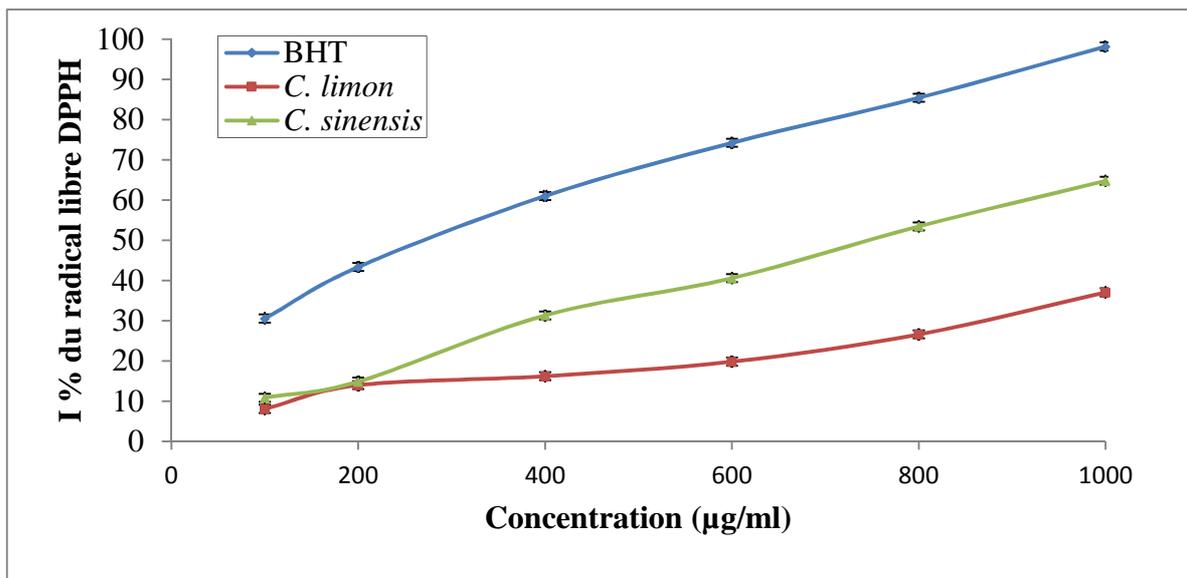


Figure 2. Activité antioxydante des HES de *C. limon* et *C. sinensis*.

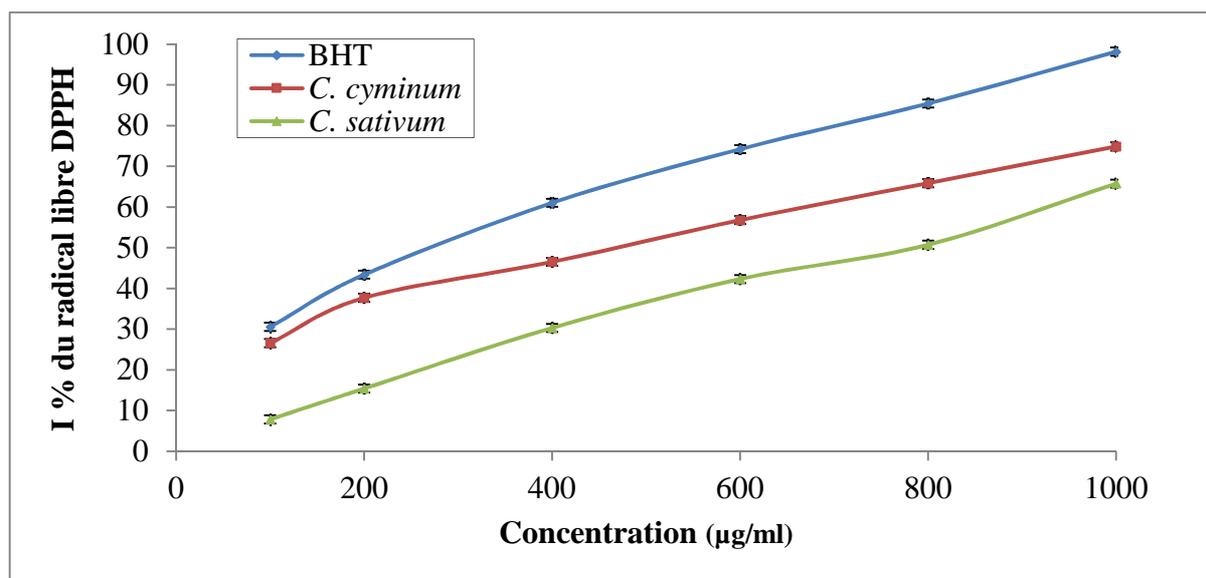


Figure 3. Activité antioxydante des HEs de *C. cyminum* et *C. sativum*.

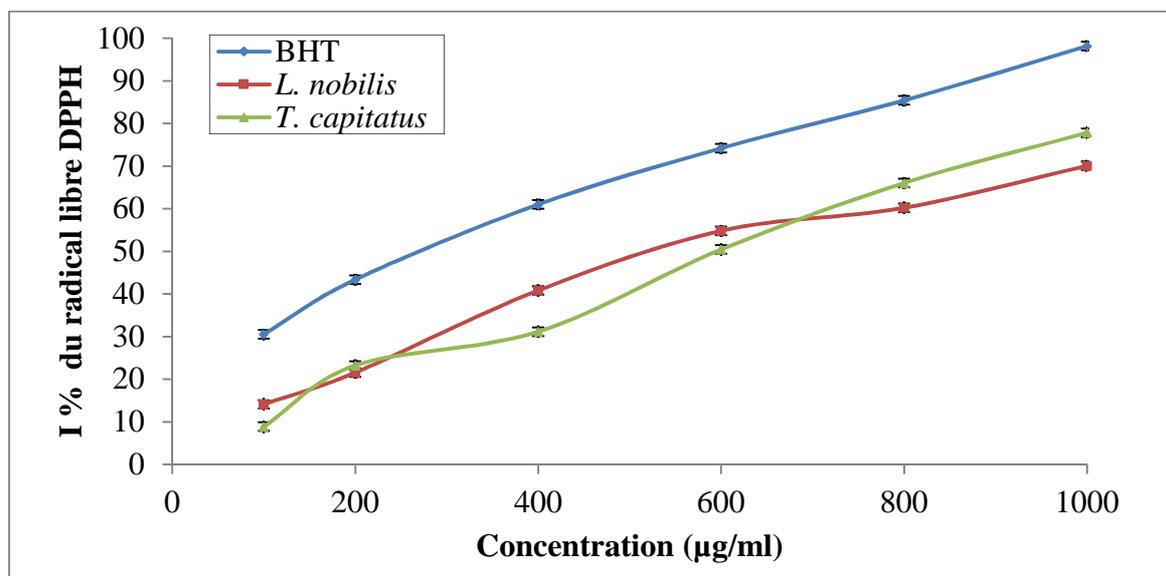


Figure 4. Activité antioxydante des HEs de *L. nobilis* et *T. capitatus*.

Annexe III

Tableau I. Les taux d'humidités relatives.

Concentration (v/v)	Température (°C)			
	20	25	30	40
10	94,67	94,29	94,27	95,62
20	87,82	87,56	87,36	87,85
25	81,55	81,66	81,70	85,42
30	75,28	74,93	74,79	77,07
35	67,29	66,51	66,62	68,10
40	56,74	56,83	56,56	58,26
45	46,19	45,88	46,19	48,32
50	35,36	35,57	35,51	38,05
55	25,26	25,89	26,05	28,11
60	16,37	16,71	17,00	18,92
65	09,18	09,43	09,71	11,03
70	04,12	04,34	04,52	05,59
75	01,62	01,72	01,82	02,38
80	00,48	00,52	00,58	00,83
85	00,15	00,16	00,18	00,28
90	00,03	00,03	00,04	00,06
95	/	/	/	00,01