

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou

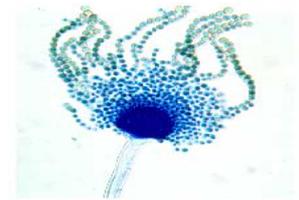


Faculté des sciences Biologiques et des sciences Agronomiques
Département de Biochimie-Microbiologie

Mémoire
Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Magister
En : Sciences biologiques
Option : Biochimie Appliquée et biotechnologies



Par
M^{elle} : SENANI Nassima



THÈME :

Etude du pouvoir antifongique (inhibition de croissance et de production d'aflatoxines) des composés et extraits polyphenoliques issus des olives et sous produits de l'olivier (feuilles et margines) variété *chamlal* sur deux souches, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*.

Soutenu le 11 /11/ 2010 devant le jury :

Mr : Mati Abderrahmane	Professeur à l'UMMTO	Président
Mme : Mati-Moulti Farida	Maître de conférences A à l'UMMTO	Rapporteur
Mr : Benallaoua Said	Professeur à l'UAMB	Examineur
Mr : Riba Amar	Maître de conférences A à l'UMBB	Examineur
Mr : Houali Karim	Maître de conférences A à l'UMMTO	Examineur

Remerciements

En préambule à ce mémoire, je tiens particulièrement à exprimer ma profonde gratitude à M^{me} MATI F., Maître de conférences en biochimie à l'UMMTO, en me proposant ce sujet et qui a mis à ma disposition les conditions matérielles nécessaires pour la réalisation de ce travail, ainsi que pour ses qualités relationnelles.

Je tiens à remercier Monsieur MATI A., Professeur en Biochimie Appliquée à l'université M. MAMMERI de Tizi-Ouzou, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et avoir accepté de présider le jury.

Je tiens à présenter toute ma gratitude ainsi que mon amitié aux personnes du laboratoire de recherche sur les produits bioactifs et la valorisation de la biomasse de ENS de Kouba, pour leur aide précieuse et leur gentillesse et tous particulièrement Monsieur Riba. A et tous les membres du laboratoire.

J'exprime mes respectueux dévouements aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'examiner ce travail :

- M^f BENALLAOUA. S. Professeur à l'université de BEJAIA ;
- M^f RIBA.A. Maître de conférences à l'université de BOUMERDES ;
- M^f HOUALI. K. Maître de conférences à l'UMMTO.

Enfin, que tout ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail, soient assurés de ma profonde sympathie.

Dédicaces

Ce travail est dédié à :

- mes très chers parents, qui m'ont toujours encouragé et soutenu tout au long de ces années d'études jusqu'à la faculté, pour tout l'amour qu'ils m'ont donné et qu'ils me donnent encore ;
- mes frères et sœurs, qui m'ont toujours supporté ;
- mon fiancé M^r OULARBI. A., qui me redonne toujours confiance en moi ;
- mes très chers amis et mes collègues du laboratoire qui m'ont soutenu et encouragé au cours de la réalisation de ce mémoire, en leur espérant une bonne continuation dans leurs travaux.

« Dans un domaine de recherche en pleine expansion comme la biologie, on constate que toute avancée des connaissances génère autant d'interrogations qu'elle apporte de réponses. »

Pierre Joliot

Sommaire

Sommaire

Liste des abréviations.

Index des tableaux et des figures

	pages
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. PRINCIPALES CARACTERISTIQUES FONGIQUES ET MYCOTOXICOGENESE	4
1.1. Les Principaux genres fongiques producteurs d'aflatoxines	4
1.2. Des mycotoxines en général aux aflatoxines en particulier	5
1.3. Les aflatoxines	8
1.3.1. Origine et propriétés physicochimiques des aflatoxines.....	8
1.3.2. Facteurs influençant la production d'aflatoxines	11
1.3.3. Effets toxiques des aflatoxines.....	11
1.3.4. Métabolisme et mécanisme d'action des aflatoxines.....	12
1.4. Méthodes d'extraction et de caractérisation des aflatoxines	15
1.5. Procédés de lutte contre la production de mycotoxines	15
II. LES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES	17
2.1. Caractéristiques physicochimiques des composés phénoliques	17
2.2. Structure et classification des composés phénoliques	17
2.1.1. Formes les plus simples.....	18
2.1.1.1. Les acides phénoliques.....	18
2.1.1.2. Les flavonoïdes.....	21
2.1.2. Formes condensées	23
2.1.2.1. Les Tanins	23
2.1.2.2. Les lignines	23
2.1.3. Formes liées à des macromolécules non phénoliques.....	23
2.3. Les grandes lignes de la biosynthèse des composés phénoliques	23
2.4. Sources des composés phénoliques	26
2.5. Rôle des composés phénoliques	26
2.6. Les composés phénoliques des olives et produits dérivés	28
2.6.1. Les feuilles d'oliviers	28
2.6.2. Les drupes d'olives	28
2.6.3. L'huile d'olive	28
2.6.4. Les olives de table	29
2.6.5. Les margine	29
2.6.6. Les grignons	29
2.7. Modes d'action des composés phénoliques	32
2.8. Relation structure-activité antioxydante	32
2.9. Intérêt biologique des composés phénoliques	33
2.10. Les méthodes d'extraction et techniques analytiques des composés phénoliques	35
PARTIE II : PARTIE EXPERIMENTALE	
I.MATERIEL ET MÉTHODES	37
1.1. Matériel	37

1.1.1. Matériel végétal	37
1.1.2. Les souches fongiques testées	37
1.1.3. Appareillages.....	38
1.1.4. Réactifs et produits chimiques.....	38
1.2. Méthodes	39
1.2.1. Méthodes d'extraction des polyphénols de divers produits de l'olivier	39
1.2.1.1. Extraction des polyphénols de la pulpe des olives vertes.....	39
1.2.1.2. Extraction des polyphénols à partir des feuilles d'olivier.....	39
1.2.2.3. Extraction des polyphénols à partir des margines.....	41
1.3. Analyse des extraits phénoliques.....	42
1.3.1. Dosage des composés phénoliques.....	42
1.3.2. Test in vitro de l'activité antioxydante des extraits phénoliques.....	42
1.4. Tests microbiologiques	43
1.5. Etude de l'influence des composés et des extraits phénoliques sur la croissance et la production d'Aflatoxines par <i>A.flavus</i> et <i>A.parasiticus</i>	44
II. RÉSULTATS ET DISCUSSION	47
2.1. Analyse des extraits phénoliques.....	47
2.1.1. Résultats du dosage des polyphénols totaux.....	47
2.2. Résultat du test in vitro de l'activité antioxydante	50
2.2.1. Effet scavenger du radical DPPH.....	50
2.3. Tests microbiologiques.....	53
2.3.1. Les résultats des tests préliminaires.....	53
2.3.2. Résultats du test antifongique des extraits et composés phénoliques avec la méthode des disques.....	59
2.3.3. Résultats du test de Mesure de l'activité des extraits et composés phénoliques sur les deux souches fongiques <i>Aspergillus flavus</i> et <i>Aspergillus parasiticus</i> par la méthode de contact direct sur milieu CAM.....	62
2.3.3.1. En présence des composés phénoliques.....	62
2.3.3.2. En présence des extraits phénoliques	75
2.3.4. Résultats obtenus sur la production d'aflatoxines des souches en présence des extraits et composés phénoliques par identification à l'UV	83
2.3.4.1. En présence des composés phénoliques	83
2.3.4.2. En présence des extraits phénoliques.....	94
2.3.5. Résultats obtenus sur l'identification de la production d'aflatoxines des souches testées en présence des extraits et composés phénoliques par CCM.....	101
Discussion général.....	106
Conclusion.....	114
Références bibliographiques.....	117
Annexe	

LISTE DES ABREVIATIONS

AF (B1, B2, G1, G2, M): Aflatoxines (B1, B2, G1, G2, M)

a_w : activité d'eau

CAM: (Coconut Agar Medium) milieu de noix de coco.

CCM : chromatographie sur couche mince.

CP: composés phénoliques.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

DPPH : 1,1-diphényl -2-picryl-hydrazyl

EAG : Equivalent acide gallique.

EC50: concentration effectrice à 50%

FAO: (Food and Agricultural Organization of the United Nation).

IARC: (International Agency for Research on Cancer) centre international de la recherche contre le cancer.

IC50: concentration inhibitrice à 50%

ml : millilitre

mm : millimètre

OMS : organisation mondiale de la santé

PDA: (Pomme de terre, Dextrose, Agar)

PP : polyphénols

PPT : polyphénols totaux

PPB: (Parts per billion) parties par milliard

R_f : rapport frontal

SD: standard deviation

INDEX DES FIGURES

N°	Intitulés	Pages
1	Micromorphologie du genre <i>Aspergillus</i>	4
2	Métabolisme et mécanisme d'action de l'aflatoxine B1	14
3	Les principaux acides phénoliques et quelques-uns de leurs dérivés simples	20
4	La structure générale des flavonoïdes	21
5	Les grandes lignes de la biosynthèse des principaux groupes de composés phénoliques	25
6	Structure chimique des dérivés sercoïridoïdes et des alcools phénoliques de l'huile d'olive vierge	30
7	Structure chimique des dérivés sercoïridoïdes des alcools phénoliques de l'olive	30
8	Structure chimique des lignanes présents dans l'olive et l'huile d'olive vierge	31
9	Les structures chimiques des composés phénoliques les plus abondants des feuilles d'olivier	31
10	Photo des olives et feuilles d'olivier. Variété <i>chamlal</i> de la région de Tadmaït	37
11	Diagramme d'extraction des composés phénoliques à partir de la pulpe d'olives vertes	40
12	Diagramme d'extraction des composés phénoliques à partir des feuilles d'olivier	40
13	Diagramme d'extraction des composés phénoliques à partir des margines	41
14	Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.	42
15	Courbe étalon obtenue en fonction de la concentration de l'acide gallique et des densités optiques à 760nm	48
16	Teneur en polyphénols totaux (g/100g de matière végétale).	48
17	Activité antiradicalaire des extraits d'oliviers et d'acide gallique	51
18	Les APR des extraits phénoliques et de l'acide gallique.	52
19	la mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (366nm) de la Production des aflatoxines des souches tests <i>d'Aspergillus flavus</i> et <i>d'Aspergillus parasiticus</i> sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à 28°C.	54
20	Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extraits d'aflatoxines des deux souches tests <i>A. flavus</i> et <i>A. parasiticus</i> . Par chromatographie sur gel de silice (révélation à l'UV).	55
21	Aspect des deux souches tests <i>A. flavus</i> et <i>A. parasiticus</i> après traitement avec le méthanol. Sur milieu CAM Après 7 jours d'incubation à 28°C.	57
22	Aspect des deux souches tests <i>A. flavus</i> et <i>A. parasiticus</i> après traitement avec le DMSO. Sur milieu CAM Après 7 jours d'incubation à 28°C.	58
23	Aspect de l'activité antifongique des extraits phénoliques synthétiques testés avec la méthode des disques sur milieu CAM semi solide après 3 jours d'incubation.	61
24	Effet de la vanilline sur la croissance des deux souches <i>A. flavus</i> et <i>A. parasiticus</i> sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à 28°C.	64

25	Aspect des deux souches tests après traitement avec la vanilline à différentes concentrations sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à 28°C.	65
26	Effet de l'acide caféique sur la croissance des deux souches <i>A. flavus</i> et <i>A. parasiticus</i> sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à 28°C.	66
27	Aspect des deux souches tests après traitement avec l'acide caféique à différentes concentrations sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à 28°C.	67
28	Effet de l'acide gallique sur la croissance des deux souches <i>A. flavus</i> et <i>A. parasiticus</i> sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à 28°C.	68
29	Aspect des deux souches tests après traitement avec l'acide gallique à différentes concentrations sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à 28°C.	69
30	Effet de l'oleuropeine sur la croissance des deux souches <i>A. flavus</i> et <i>A. parasiticus</i> sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à 28°C.	70
31	Aspect des deux souches tests après traitement avec l'oleuropéine à différentes concentrations sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à 28°C.	71
32	Effet des tannins sur la croissance des deux souches <i>A. flavus</i> et <i>A. parasiticus</i> sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à 28°C.	72
33	Aspect des deux souches tests après traitement avec les tannins à différentes concentrations sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à 28°C.	73
34	Récapitulatif des pourcentages d'inhibition des composés phénoliques sur les deux souches tests <i>A. flavus</i> et <i>A. parasiticus</i> sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à 28°C.	74
35	Effet de l'extrait de feuilles sur la croissance des deux souches <i>A. flavus</i> et <i>A. parasiticus</i> sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à 28°C.	76
36	Aspect des deux souches tests après traitement avec l'extrait de feuilles à différentes concentrations sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à 28°C.	77
37	Effet de l'extrait de pulpes d'olives sur la croissance des deux souches <i>A. flavus</i> et <i>A. parasiticus</i> sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à 28°C.	78
38	Aspect des deux souches tests après traitement avec l'extrait de pulpes à différentes concentrations sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à 28°C.	79
39	Effet de l'extrait de margines d'olives sur la croissance des deux souches <i>A. flavus</i> et <i>A. parasiticus</i> sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à 28°C.	80
40	Aspect des deux souches tests après traitement avec l'extrait de margines à différentes concentrations sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à 28°C.	81
41	Récapitulatif des pourcentages d'inhibition sur les deux souches tests <i>A. flavus</i> et <i>A. parasiticus</i> sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à 28°C (Feuilles, Pulpes, Margines).	82
42	Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (366nm) de la production d'aflatoxines par <i>Aspergillus parasiticus</i> sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et à différentes concentrations de la vanilline après 7 jours d'incubation à 28°C.	84
43	Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (366nm) de la production d'aflatoxines par <i>Aspergillus flavus</i> sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et à différentes concentrations de la vanilline après 7 jours d'incubation à 28°C.	85
44	Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (366nm) de la production d'aflatoxines par <i>Aspergillus parasiticus</i> sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et à différentes concentrations d'acide caféique après 7 jours d'incubation à 28°C.	86
45	Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (366nm) de la production	87

	d'aflatoxines par <i>Aspergillus flavus</i> sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et à différentes concentrations d'acide caféique après 7 jours d'incubation à 28°C.	
46	Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (366nm) de la production d'aflatoxines par <i>Aspergillus parasiticus</i> sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et à différentes concentrations d'acide gallique après 7 jours d'incubation à 28°C.	88
47	Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (366nm) de la production d'aflatoxines par <i>Aspergillus flavus</i> sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et à différentes concentrations d'acide gallique après 7 jours d'incubation à 28°C.	89
48	Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (366nm) de la production d'aflatoxines par <i>Aspergillus parasiticus</i> sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et à différentes concentrations d'oleuropéine après 7 jours d'incubation à 28°C.	90
49	Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (366nm) de la production d'aflatoxines par <i>Aspergillus flavus</i> sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et à différentes concentrations d'oleuropéine après 7 jours d'incubation à 28°C.	91
50	Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (366nm) de la production d'aflatoxines par <i>Aspergillus parasiticus</i> sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et à différentes concentrations de tannins après 7 jours d'incubation à 28°C.	92
51	Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (366nm) de la production d'aflatoxines par <i>Aspergillus flavus</i> sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et à différentes concentrations de tannins après 7 jours d'incubation à 28°C.	93
52	Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (366nm) de la production d'aflatoxines par <i>Aspergillus parasiticus</i> sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et à différentes concentrations d'extrait des feuilles après 7 jours d'incubation à 28°C.	95
53	Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (366nm) de la production d'aflatoxines par <i>Aspergillus flavus</i> sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et à différentes concentrations d'extrait des feuilles après 7 jours d'incubation à 28°C.	96
54	Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (366nm) de la production d'aflatoxines par <i>Aspergillus parasiticus</i> sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et à différentes concentrations d'extrait de pulpes après 7 jours d'incubation à 28°C.	97
55	Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (366nm) de la production d'aflatoxines par <i>Aspergillus flavus</i> sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et à différentes concentrations d'extrait de pulpes après 7 jours d'incubation à 28°C.	98
56	Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (366nm) de la production d'aflatoxines par <i>Aspergillus parasiticus</i> sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et à différentes concentrations d'extrait de margines après 7 jours d'incubation à 28°C.	99
57	Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (366nm) de la production d'aflatoxines par <i>Aspergillus flavus</i> sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et à différentes concentrations d'extrait de margines après 7 jours d'incubation à 28°C.	100

58	Photographies des chromatogrammes obtenus sur les extraits d'aflatoxines des deux souches tests <i>A. parasiticus</i> (a) et <i>A. flavus</i> (b). Après traitement avec les extraits phénoliques d'olivier (Feuilles, pulpes et margines) respectivement. Chromatographie effectuée sur gel de silice (révélation à l'UV à 366nm).	102
59	Photographies des chromatogrammes obtenus sur les extraits d'aflatoxines des deux souches tests <i>A. parasiticus</i> (a) et <i>A. flavus</i> (b). Après traitement avec les polyphénols standards (Vanilline, acide caféique et acide gallique) respectivement. Chromatographie effectuée sur gel de silice (révélation à l'UV à 366nm).	104
60	Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extraits d'aflatoxines des deux souches tests <i>A. flavus</i> et <i>A. parasiticus</i> respectivement. Après traitement avec les polyphénols (Ol : oleuropeine, T : tannins) respectivement. Chromatographie effectuée sur gel de silice (révélation à l'UV à 366nm).	105

INDEX DES TABLEAUX

N°	Intitulés	Pages
I	Tableau I: Effet identifiés ou suspectés des principales mycotoxines et mécanismes d'action cellulaire et moléculaire identifiés expérimentalement	7
II	Tableau II : propriétés physicochimiques des principales aflatoxines.	9
III	Les principales classes de composés phénoliques	18
IV	Principales classes de flavonoïdes	22
V	Activité biologique des composés phénoliques.	34
VI	Résultats du dosage des polyphénols totaux (PPT) des extraits d'olivier à partir de la pulpe d'olives, des feuilles et des margines d' <i>Olea europea</i> L. variété <i>chamlal</i> .	47
VII	L'activité antiradicalaire des extraits phénoliques et de l'acide gallique.	51
VIII	Influence du solvant sur la croissance d' <i>Aspergillus flavus</i> et <i>Aspergillus parasiticus</i> avec la méthode de contact direct.	56
IX	Zones d'inhibitions en (mm, moyenne \pm SD) des extraits phénoliques d'olivier (feuilles, pulpes, margines) et composés phénoliques testés sur les deux souches fongiques <i>Aspergillus flavus</i> et <i>Aspergillus parasiticus</i> sur CAM après 3 jours d'incubation.	60
X	Pourcentages (%) d'inhibition de la vanilline sur les deux souches <i>A. flavus</i> et <i>A. parasiticus</i> .	64
XI	Pourcentages (%) d'inhibition de l'acide caféique sur les deux souches <i>A. flavus</i> et <i>A. parasiticus</i> .	66
XII	Pourcentages (%) d'inhibition de l'acide gallique sur les deux souches <i>A. flavus</i> et <i>A. parasiticus</i>	68
XIII	Pourcentages (%) d'inhibition de l'oleuropéine sur les des deux souches <i>A. flavus</i> et <i>A. parasiticus</i> .	70
XIV	Pourcentages (%) d'inhibition des tannins sur les deux souches <i>A. flavus</i> et <i>A. parasiticus</i> .	72
XV	Pourcentages (%) d'inhibition des deux souches d' <i>A. flavus</i> et <i>A. parasiticus</i> .	76
XVI	Pourcentages (%) d'inhibition de l'extrait de pulpes sur les deux souches <i>A. flavus</i> et <i>A. parasiticus</i> .	78
XVII	Pourcentages (%) d'inhibition des margines sur les deux souches <i>A. flavus</i> et <i>A. parasiticus</i> .	80

Résumé

Les aflatoxines et les mycotoxines d'une manière générale posent un problème sérieux de sante publique par leurs effets néfastes (hépatotoxiques, immunotoxiques, tératogènes, et cancérigènes...etc) et d'ordre économique. A l'heure actuelle les polyphénols captent l'intérêt des chercheurs et occupent une place impressionnante parmi plusieurs recherches menées concernant l'efficacité de ces molécules de part leur particularité à avoir un pouvoir antioxydant et une activité inhibitrice sur diverses espèces pathogènes.

Dans ce travail, la variété d'olivier *chamlal* a été choisie pour sa prépondérance et sa résistance aux pathogènes. Les concentrations en polyphénols obtenues par les extraits des produits et sous produits d'olivier (pulpes, feuilles et margines) sont de l'ordre de $[7,49 \pm 0,31]$ mg/g, $[16,78 \pm 1,02]$ mg/g, $[2,62 \pm 0,30]$ mg/ml respectivement exprimés en équivalent d'acide gallique. Ces extraits phénoliques ont montrés une activité antifongique vis à vis des deux souches de moisissures *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* potentiellement pathogènes et contaminatrices de diverses matrices biologiques en particulier dans le domaine agroalimentaire. Des composés phénoliques ont été aussi testés individuellement (vanilline, acide caféique, acide gallique, oleuropéine, tannins) afin d'évaluer leurs pouvoir inhibiteur sur ces deux souches. Les résultats obtenus avec la méthode de contact direct avec les composés et des extraits phénoliques aux concentrations de 0,1%, 1% et 2,5% dans le milieu CAM (milieu a base de noix de coco, sélectif) ont montrées qu'aux faibles doses ils exercent une activité inhibitrice de croissance et voir même anti-aflatoxinogène vis à vis des deux souches fongiques. La production d'aflatoxines a été évaluée par UV a 366nm et les résultats ont été confirmés aussi bien qualitativement que semi-quantitativement par CCM. Les meilleurs résultats ont été obtenus à la concentration de 2,5%.

Ces résultats suggèrent une valorisation des produits et sous produits oléicole qui sont une source non négligeable en composés phénoliques, leur utilisation comme moyens de lutte biologique contre les moisissures particulièrement le genre *Aspergillus* s'avère prometteuse dans le secteur agro-alimentaire

En effet l'emploi de ces substances naturelles constitue une alternative qui permet aux industriels du secteur agroalimentaire de s'affranchir de l'étiquetage systématique relatif aux ingrédients synthétiques (antioxydants et antifongiques synthétiques...) qui suscitent la suspicion du consommateur parfois à sa juste valeur.

Mots-clés : polyphénols, extraits polyphénoliques d'oliviers, *Aspergillus parasiticus*, aflatoxines, variété d'olives *chamlal*, *Aspergillus flavus*, pouvoir antioxydant, pouvoir antifongique, pouvoir anti-aflatoxinogène

Abstract

Aflatoxins and the mycotoxins generally pose a serious problem of public health by their harmful effects (hepatotoxic, immunotoxic, teratogenic, and carcinogenic... etc) and of an economic nature. At present the polyphenols collect the interest of the researchers and occupy an impressive place among several research undertaken concerning the effectiveness of these molecules of share their characteristic has to have an antioxidant capacity and an inhibiting activity on various pathogenic species.

In this work, the variety of olive-tree *chamlal* was selected for its preponderance and its resistance to the pathogenic ones. The concentrations in polyphenols obtained by the extracts of the products and under products of olive-tree (drupes, leaves and olive mill waste water) are about [7.49 ± 0.31] mg/g, [16.78 ± 1.02]mg/g, [2.62 ± 0.30] mg/ml express in gallic equivalent of acid. These phenolic extracts have watches an antifungal activity against two species of moulds potentially pathogenic *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* and contaminants of various biological matrices in particular in the agroalimentary field. Phenolics compounds also have individually tested (vanillin, caffeic acid, gallic acid, oleuropein and tannins) in order to evaluate their inhibiting capacity on these two species. The results obtained with the method of direct contact with phenolics compounds and of the phenolic extracts to the concentrations of 0.1%, 1% and 2.5% in the selective CAM medium (Coconut Agar medium) showed that with low dose they carry on an inhibiting activity of growth and to see even anti-aflatoxinogenic against the two fungal species. The production of aflatoxins was evaluated by UV at 366nm and the results were confirmed as well qualitatively as semi-quantitatively by TLC. The best results were obtained has the concentration of 2.5%.

These results suggest a beneficiation products and under products olive-growing which are a considerable source compose some phenolic, their use as average of biological fight against the moulds particularly the *Aspergillus* kind proves to be promising in the agro-alimentary sector.

Indeed the use of these natural substances constitutes an alternative which makes it possible to the industrialists of the agroalimentary sector to be freed from systematic labelling relating to the synthetic ingredients (antioxidant and synthetic antifungal....) which causes the suspicion of the consumer sometimes to his right value.

Key words: polyphenols, polyphenolic extract from olive-trees, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, aflatoxins, olives *chamlal* variety, antioxidant capacity, antifungal capacity, anti-aflatoxinogenic capacity.

Introduction générale

INTRODUCTION GÉNÉRALE:

Selon RICHARD (2007) et BROCHARD et LE BACLE (2009), les moisissures sont des contaminants fréquents de nombreux substrats végétaux et de certains produits d'origine animale. Leur présence peut améliorer les qualités organoleptiques du produit ou, au contraire, l'altérer et conduire à l'accumulation de métabolites secondaires toxiques nommés les mycotoxines.

Les mycotoxines retiennent l'attention au niveau mondial en raison de leurs effets néfastes sur la santé de l'homme et de l'animal (effets hépatotoxiques, immunotoxiques, tératogènes et cancérigènes...etc.) (D'MELLO et MCDONALD, 1997 ; SCUDAMORE et LIVESEY, 1998 ; BADEA *et al.*, 2009 ; DORIANE GOUAS *et al.*, 2009). Approximativement 25% des approvisionnements alimentaires du monde sont contaminés par les mycotoxines annuellement (RAWAL *et al.*, 2010).

En addition, les mycotoxines se retrouvent accumulées dans le mycélium et les spores fongiques, elles sont aussi adsorbées dans les poussières et sont transportées sous forme d'aérosols en agrégats liés à des particules minérales ou organiques. Ce qui constitue une autre voie d'exposition pour l'homme par inhalation (MILLER, 1992 ; WILD et HALL, 1996 ; JARVIS et MILLER, 2005).

La lutte contre les mycotoxines dans les aliments est l'un des axes des travaux menés au niveau mondial dans le cadre du *Codex alimentarius*. Des règlements ou des recommandations ont été édictés au niveau national puis européen, et des valeurs guides existent au niveau mondial pour fiabiliser les échanges commerciaux des denrées alimentaires du point de vue de la sécurité sanitaire (DRAGACCI *et al.*, 2005). A l'heure actuelle, l'Europe régleme la contamination par les aflatoxines (dans les céréales, les fruits secs et les épices), l'ochratoxine (dans les céréales brutes et transformées, le café, le jus de raisin et le vin) et la patuline (dans le jus de pomme et le cidre) (ANONYME 1, 2009).

A coté de dispositions fixant des teneurs maximales dans les denrées, d'autres mesures, destinées à en prévenir l'apparition dans l'alimentation sont exigeantes. Il s'agit d'une part de limiter la contamination des produits par les moisissures à tous les stades de la chaîne de production (culture au champ, récolte, stockage, transformation...) et d'autre part de détecter le plus précocement possible les mycotoxines dans les matières premières avant que ces dernières ne soient transformées en produit final (BINDER, 2007 ; MAGAN et ALDRED, 2007).

Actuellement, les méthodes couramment utilisées permettent de quantifier directement la mycotoxine. Ces techniques restent relativement onéreuses et ne permettent donc pas la mise en œuvre de plan d'échantillonnage contenant plusieurs centaines voire des milliers d'échantillons à analyser (TURNER *et al.*, 2009). En plus, une fois contaminées, les denrées alimentaires peuvent difficilement être débarrassées de ces toxines en raison de leur bonne stabilité thermique et jusqu'à présent, il n'existe pas de procédés de décontamination fiables permettant de retirer la mycotoxine sans dénaturer le produit (DRAGACCI *et al.*, 2005 ; BINDER, 2007).

La découverte des aflatoxines a sollicité l'intérêt des scientifiques à l'égard de la toxicité de ces substances. La dénomination aflatoxine dérive de la première lettre du genre *Aspergillus* et des trois premières lettres de l'espèce *flavus* une des principales espèces productrices de cette dernière (RAWAL *et al.*, 2010). Elles sont les plus recherchées parmi les groupes des mycotoxines existants.

Selon l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer, les premières observations ont révélé qu'à fortes concentrations, les aflatoxines sont des poisons violents, et qu'administrées à petites doses à des animaux du laboratoire, elles produisent un cancer du foie, l'AFB1 (aflatoxine B1) est un cancérigène probable classé dans le groupe 1 (IARC, 1993 ; RAWAL *et al.*, 2010).

Grâce à l'enrichissement des connaissances sur les voies de biosynthèse des toxines, certaines molécules biochimiques présentes dans les végétaux s'avèrent, de part leur structure et propriétés chimiques, être de bons candidats susceptibles d'interférer avec la production de toxines (ANONYME 5, 2006 ; BLUMA et ETCHEVERRY, 2008 ; PASSONE *et al.*, 2009 ; REDDY *et al.*, 2009).

Bien que une grande partie du XX^{ème} siècle ait été consacrée à la mise au point de molécules de synthèse, la recherche de nouveaux agents pharmacologiques actifs via le screening de sources naturelles s'est soldé dans la découverte d'un grand nombre de molécules bioactives, C'est pour cela que l'ethnobotanique et l'ethnopharmacologie s'emploient à recenser, partout dans le monde, des plantes réputées actives et dont il appartient à la recherche moderne de préciser les propriétés et valider les usages (GURIB-FAKIM, 2006 ; QUIROGA *et al.*, 2008).

À l'heure actuelle les polyphénols captent l'intérêt des chercheurs et occupent une place impressionnante parmi plusieurs recherches menées depuis plus d'une dizaine d'années, concernant le concept d'alimentation santé (SCALBERT *et al.*, 2002 ; CEVALLOS-CASALS *et al.*, 2010). Beaucoup d'études ont été menées concernant l'efficacité de ces molécules et leur pouvoir inhibiteur sur divers espèces pathogènes (DERBEL et GHEDIRA, 2005 ; FALLEH *et al.*, 2008 ; PETTI et SCULLY, 2009).

Les études menées montrent que les acides, férulique, p-coumarique, caféique, sinapique et chlorogénique inhibaient très efficacement la production de trichothécènes. Cette inhibition semble étroitement corrélée au potentiel antioxydant que possèdent ces molécules. Les acides phénoliques bloqueraient la synthèse de toxines en réduisant l'expression des principaux gènes codant les enzymes des voies de biosynthèse (BOUTIGNY *et al.*, 2008 ; ANONYME 5, 2006). Ces substances sont présentes dans les olives et ses dérivés, leur pouvoir bénéfique ainsi que leurs actions concernant la santé humaine a été longtemps étudié (CEVALLOS-CASALS *et al.*, 2010).

Dans ce contexte il est clair qu'une tentative de valorisation des polyphénols provenant des olives et des sous produits des industries oléicoles comme les margines, les grignons et les feuilles d'oliviers sur l'inhibition de la sporulation ainsi que la production des aflatoxines pourrait être très intéressante comme une nouvelle stratégie de lutte biologique contre ces dernières.

Le présent mémoire a pour objectifs :

- l'actualisation des données concernant les polyphénols, les aflatoxines et les souches fongiques productrices aussi bien au niveau physico-chimique que par leur mode d'action ;
- d'opter pour des méthodes d'extractions les plus simples des composés phénoliques à partir des produits et sous produits de l'olivier (olives vertes, feuilles et margines) de la variété *chamlal*. Parmi les variétés d'*Olea europea L.*, notre choix s'est porté sur la variété *Chamlal*, c'est al variété la plus répandue en Algérie elle représente 40% de l'oliveraie, elle est cultivée en grande Kabylie où elle représente en moyenne 90% du verger oléicole de cette région. Variété vigoureuse de Kabylie, particulièrement réputée pour la qualité et les propriétés de son huile. Variété dominante, son aire de culture s'étend de la Mitidja jusqu'aux Bibans (YAKOUB-BOUGDAL, 2005 ; YAKOUB-BOUGDAL *et al*, 2007) ;
- de quantifier les extraits phénoliques par un dosage simple à mettre en œuvre ;
- évaluer le pouvoir piègeur (scavenger) des différents extraits phénoliques de l'olivier mais aussi de polyphénols pris individuellement (acide gallique) vis-à-vis d'un radical libre relativement stable qui est le (DPPH) qui permet d'avoir une idée sur leur capacité anti oxydative ;
- et enfin évaluer les potentialités inhibitrices (antifongiques) des polyphénols totaux extraits des pulpes d'olives, des feuilles et de margines et d'évaluer également certains polyphénols pris individuellement (acide caféique, acide gallique, la vanilline et des tannins) sur la croissance de deux espèces fongiques appartenant à la section *Flavi*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*. Ces deux espèces contaminent de nombreuses cultures et une grande variété de fruits secs. *A. flavus* est la plus répandue des espèces de cette section et occupe des niches écologiques très diverses (RIBA, 2008). Elle se retrouve plus fréquemment sur le maïs et le coton. Cette espèce est considérée comme « champignon d'entreposage » bien que la contamination débute fréquemment dans les champs (WHITLOW et HAGLER, 2002). Dans des conditions de croissances optimales elle est capable de produire une quantité biologiquement significative de toxines en l'espace de quelques jours (RUPPOL *et al*, 2004) . D'autre part l'étude de l'influence des extraits phénoliques sur *A. parasiticus* s'est révélée très intéressante par comparaison avec *A. flavus*. Il semble que ces deux espèces soient physiologiquement très semblables (TABUC, 2007). Notant que *A. parasiticus* est plus spécifique de l'arachide.

PARTIE I

Synthèse bibliographique

I. PRINCIPALES CARACTERISTIQUES FONGIQUES ET MYCOTOXICOGENESE :

1.1. Les Principaux genres fongiques producteurs d'aflatoxines :

Les genres les plus importants de point de vue économique et agroalimentaire sont les *Aspergillus*, les *Penicillium* et les *Fusarium* qui représentent les contaminants les plus fréquents des aliments. On les retrouve principalement dans les céréales, mais aussi dans de nombreux autres produits végétaux et d'origine animale (VARGA *et al.*, 2003).

Les *Aspergillus* ont une large répartition géographique, mais sont plus souvent associés aux régions à climat chaud et humide (et donc en particulier les pays d'Afrique, d'Asie du Sud et d'Amérique du Sud), que la croissance des champignons toxigènes (surtout ceux produisant les aflatoxines) est la plus favorisée (CASTEGNARO et PFOHL-LESZKOWICZ, 2002 ; TABUC, 2007). Ils se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, les denrées alimentaires, les céréales. De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont présentes dans l'environnement humain, notamment dans la poussière et l'air (MORIN, 1994). Les espèces de cette section sont capables de se développer à des températures comprises entre 10 et 48°C avec une température optimale de 33°C (DOMSCH *et al.*, 1980). Ces champignons peuvent se développer dans un milieu présentant une activité de l'eau (a_w) située entre 0,78 et 0,80 avec un pH allant de 2,1 à 11,2 (AYERST, 1969 ; OLUTIOLA, 1976).

Les *Aspergillus* appartiennent à la classe des *Ascomycètes* (GEISER *et al.*, 1998). Le thalle, hyalin ou coloré, présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, terminés en vésicule (Figure 1).

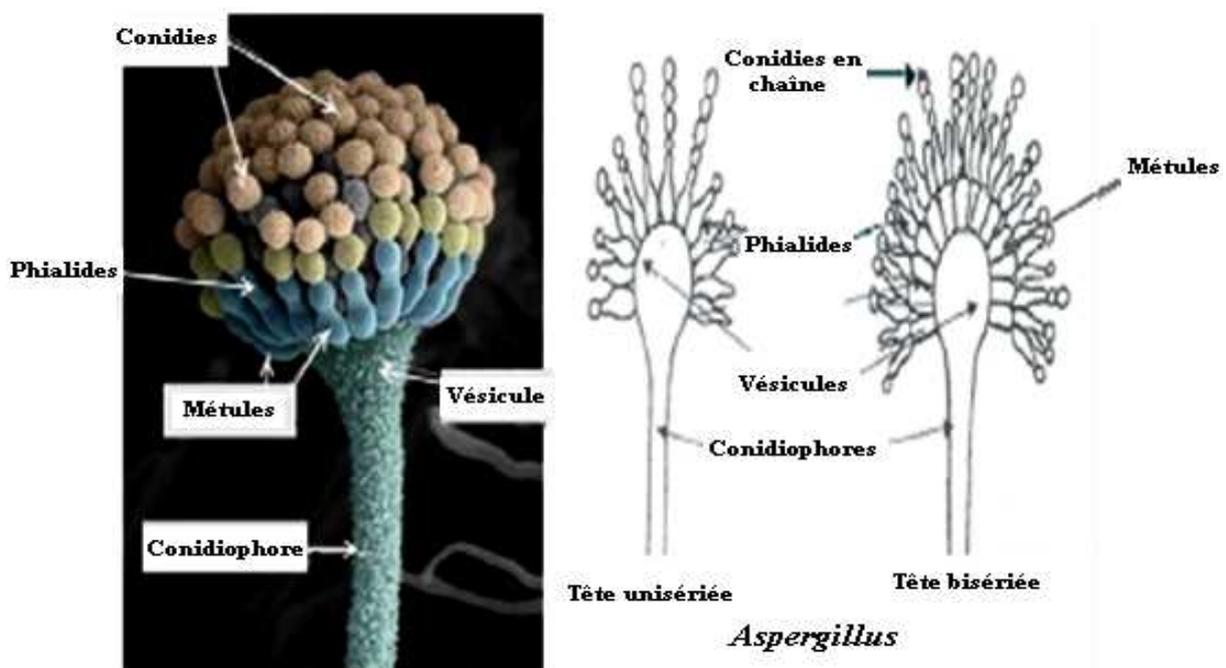


Figure 1 : La micromorphologie du genre *Aspergillus*

Certaines espèces d'*Aspergillus* sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie des produits biotechnologiques notamment pour la production de métabolites utiles telle que les enzymes, acides organiques (JARD, 2009).

De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont aussi connues pour leur capacité à produire des mycotoxines responsables de pathologies animales et humaines, notamment par le biais de contamination des denrées alimentaires (PITT *et al.*, 2000). Ce genre comprend environ 185 espèces réparties en 18 groupes morphologiquement, génétiquement et physiologiquement proches (RAPER et FENNELL, 1965 ; BOTTON *et al.*, 1990 ; ROQUEBERT, 1998 ; RIBA, 2008). Une vingtaine d'espèces est impliquée dans des pathologies animales et humaines. En effet certaines espèces d'*Aspergillus* sont des pathogènes opportunistes; leur développement nécessite des conditions locales favorables (cavernes tuberculeuses, cancer bronchopulmonaire, broncho-pneumopathies chroniques obstructives, emphysèmes, mucoviscidose...) (BACULARD et TOURNIER, 1995) ou générales (corticothérapies prolongées, hémopathies malignes, chimiothérapies aplatissantes, SIDA...) (BADILLET *et al.*, 1987 ; MORIN, 1994). *Aspergillus flavus* est responsable d'aspergilloses pulmonaires ou généralisées (BACULARD et TOURNIER, 1995 ; KHAN ZU *et al.*, 1999 ; GEORGIANNA et PAYNE, 2008).

1.2. Des mycotoxines en général aux aflatoxines en particulier :

Les mycotoxines couvrent une gamme très vaste de familles chimiques. C'est la conséquence du métabolisme secondaire fongique. Le métabolisme secondaire diffère du métabolisme primaire fondamentalement le même pour tous les êtres vivants par la nature aléatoire de son activation et par la diversité des composés formés et la spécificité des souches impliquées. Il n'est pas lié à la croissance cellulaire mais répond généralement à des signaux issus de l'environnement du champignon (YIANNIKOURIS et JOUANY, 2002). Si le métabolisme primaire est commun à toutes les espèces fongiques et se rapproche des voies métaboliques générales permettant la synthèse et le catabolisme des glucides, lipides et protéines, le métabolisme secondaire peut être en revanche spécifique d'une espèce, voire d'une souche fongique et de ses caractéristiques génétiques.

Les voies de biosynthèse sont longues et complexes et les réactions sont catalysées par des enzymes de spécificité différente de celles du métabolisme primaire. La détermination des schémas métaboliques de biosynthèse de certaines mycotoxines a été rendu possible grâce à l'utilisation d'inhibiteurs enzymatiques et de précurseurs métaboliques (STEYN, 1980 ; LUCHESE et HARRIGAN, 1993 ; EL KHOURY, 2007).

Les mycotoxines sont peu volatiles. Elles se retrouvent dans le mycélium et les spores (D'MELLO et MCDONALD, 1997) et peuvent diffuser dans le substratum et contaminer les produits agricoles. Les mycotoxines sont aussi adsorbées dans les poussières et sont transportées sous forme d'aérosols en agrégats liés à des particules minérales ou organiques. Des études ont été faites pour rechercher la présence des mycotoxines dans les spores fongiques (HAGGBLOM, 1987 ; SORENSON *et al.*, 1987 ; MILLER, 1992 ; LAND *et al.*, 1994 ; FISCHER *et al.*, 2000). En effet chaque moisissure produit un très grand nombre de spores qui se présentent très souvent sous un aspect poudreux et coloré à la surface de la moisissure. Les spores peuvent résister à des conditions environnementales extrêmes, ce qui favorise leur survie dans différents milieux. Elles peuvent être transportées par les courants

d'air ou par les humains et les animaux domestiques et se retrouver éventuellement dans les habitations et les édifices (MILLER, 1992).

En milieu agricole, industriel et même en milieu intérieur, l'inhalation de spores et de fragments fongiques peut entraîner ou aggraver des réactions immunologiques et allergiques, avoir des effets toxiques ou causer des infections (MILLER, 1992 ; JARVIS et MILLER, 2005). Le contact cutané direct avec des spores constitue une autre voie de contamination (CASTEGNARO et PFOHL-LESZKOWICZ, 2002).

La contamination des moisissures sur les aliments ne signifie pas obligatoirement la présence de mycotoxines. La production des mycotoxines peut s'effectuer depuis le champ jusqu'à l'assiette. Cependant, le type de mycotoxines contaminant les aliments ainsi que la quantité de mycotoxine produite dépendent de plusieurs éléments comme les espèces fongiques, les conditions écologiques dans lesquelles les champignons se développent. Il dépend également de la stabilité de ces toxines dans le milieu alimentaire (CASTEGNARO et PFOHL-LESZKOWICZ, 2002). Il y aurait, selon les auteurs des centaines de mycotoxines répertoriées. Seule une vingtaine est considérée comme potentiellement dangereuse pour l'homme et l'animal, les aflatoxines dont l'aflatoxine B1 (AFB1) et l'ochratoxine (OTA) ont été classées comme cancérigènes avérés par le Centre International de Recherche contre le Cancer (CIRC). (DAOHONG ZHANG *et al.*, 2009).

Du fait de leur production et concentration dans les produits alimentaires, les mycotoxines ne constituent pas une classe chimique, mais peuvent se classer selon leur voie de biosynthèse (figure 2) en trois grands groupes d'après TURNER (1971) ; STEYN (1980) et TURNER et ALBRIDGE (1983):

- **Les composés dérivés des acides aminés (peptides)** : l'alcaloïde de l'ergot (ergotamine), la roquefortine, l'acide cyclopiazonique, l'acide aspergillique, les fumitremorgènes, gliotoxine, sporidesmines, tryptoquivaline, dicéto-pipérazines, etc.
- **Les composés dérivés des terpènes** : la toxine T2, déoxynivalénol, fusarénone, diacétoxyscirpénol, roridines, verrucarines, trémorgènes, etc.
- **Les composés dérivés des polycétoacides (polyacétates)** : les ochratoxines, les aflatoxines, la zéaralénone, les fumonisines, la citrinine, l'acide pénicillique, la patuline, les rubratoxines, les stérigmatocystines... (ATOUI, 2006 ; TABUC, 2007 ; GEORGIANNA et PAYNE, 2008 ; RIBA, 2008 ; SHIMA *et al.*, 2009).

Leur structure chimique est très diversifiée, ce qui explique leurs effets biologiques différents: cancérigène, mutagène, tératogène, oestrogénique, neurotoxique, ou immunosuppresseur (Tableau I) (ANONYME 1, 2009).

Tableau I: Effets identifiés ou suspectés des principales mycotoxines et mécanismes d'action cellulaire et moléculaire identifiés expérimentalement (ANONYME 1, 2009).

Toxine	Effets	Mécanismes d'action cellulaires et moléculaires
Aflatoxine B1 + M1	Hépatotoxicité Génotoxicité Cancérogénicité Immunomodulation	Formation d'adduit à l'ADN Peroxydation 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 Mutagénèse in vitro	inhibition indirecte d'enzymes
Trichothécène (toxine T-2, désoxynivalénol, 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.
Zéralénone	Fertilité et reproduction	Liaison aux récepteurs oestrogéniques bioactivation par des réductases Conjugaison aux glucuronyltransférases.
FumonisineB1	Lésion du système nerveux central. Hépatotoxicité. Génotoxicité. Immunomodulation.	Inhibition de la synthèse de céramide Altération du rapport sphinganine/ sphingosine Altération du cycle cellulaire.

1.3. Les aflatoxines :

1.3.1. Origine et propriétés physicochimiques des aflatoxines :

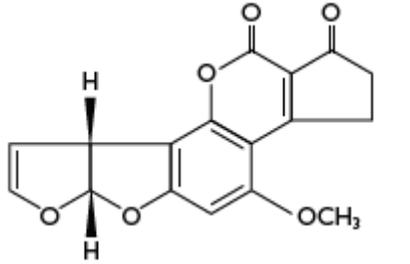
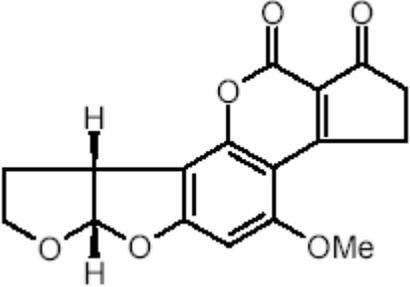
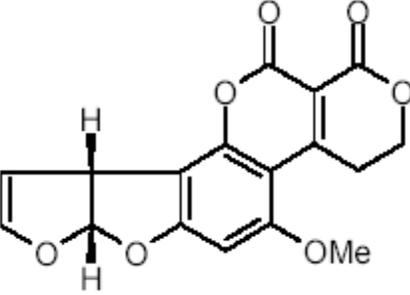
Les espèces principalement connues pour leur capacité à synthétiser des aflatoxines appartiennent à la section *Flavi* sont. *A. flavus*, qui produit principalement l'aflatoxine B1 et l'aflatoxine B2 alors qu'elle ne produit habituellement ni l'aflatoxine G1 ni l'aflatoxine G2 et *A. parasiticus* qui produit les 4 aflatoxines (B1, B2, G1 et G2) (DORNER *et al*, 1984 ; GABAL *et al*, 1994 ; FERNANDEZ *et al*, 1997 ; RIZZI *et al*, 2003 ; ALI *et al*, 2005 ; KELLER *et al*, 2005; LIANG ZHI-HONG *et al*, 2008).

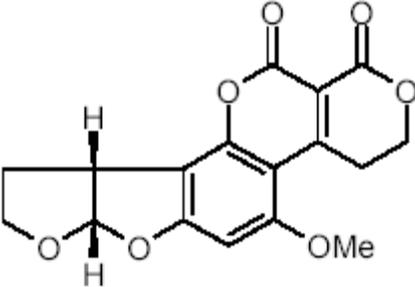
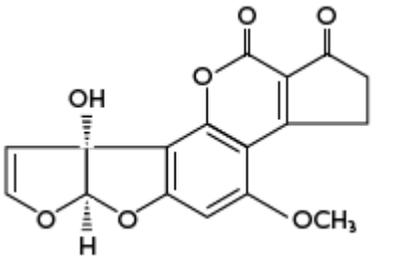
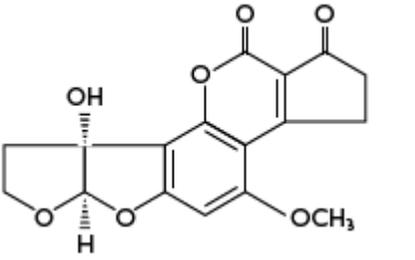
Bien que plus de 20 aflatoxines aient été identifiées les 04 principales aflatoxines détectées dans les produits végétaux contaminés sont l'AFB1, l'AFB2, l'AFG1, l'AFG2 et l'AFM1 est ce retrouvent en quantité importante dans ces produits. En outre, l'Aflatoxine M1 issu du métabolisme de l'AFB1 lors de l'ingestion de produits contaminés est cité au cours de beaucoup de discussions sur mycotoxines, ont les trouvent souvent principalement dans les tissus animal et les liquides biologiques (lait et urines) (KAAN *et al*, 2008 ; DAOHONG ZHANG *et al*, 2009).

Une des plus célèbres mycotoxines est possédant le profil toxicologique le plus sérieux, l'aflatoxine B1 (AFB1) dont la structure chimique est élucidée dans le Tableau II. Des dérivés secondaires de l'AFB1 (AFB2, AFG1, AFG2, AFM1) ont été identifiés. Ils sont caractérisés au niveau moléculaire par des structures de coumarines bifuraniques auxquelles sont accolées des pentanones (AFB) ou des lactones hexatomiques (AFG) (EL KHOURY, 2007 ; RIBA, 2008 ; DAOHONG ZHANG *et al*, 2009). Toutes les aflatoxines se rattachent à l'un de ces deux types de structure (AFB, AFG) et ne diffèrent entre elles que par la position de divers radicaux sur le noyau.

Les aflatoxines sont des cristaux incolores ou jaune pâle-fluorescents de façon très intense sous une lumière ultra-violette. Les aflatoxines B1 et B2 émettent une fluorescence bleue les aflatoxines G1, G2, une fluorescence vert jaune. Ces couleurs de fluorescence sont l'origine du nom des mycotoxines (B pour *Blue* et G pour *Green*). L'aflatoxine M1 présente une fluorescence bleu-violette sous irradiation ultra-violette. Le M vient de *Milk*, car ce métabolite a été tout d'abord isolé du lait (PFOHL-LESZKOWICZ, 1999 ; DORIANE GOUAS *et al*, 2009). Les structures chimiques, les données spectrales des différentes aflatoxines, les masses molaires de ces différents dérivés ainsi que Les points de fusion sont représentés dans le tableau II. Les aflatoxines sont des molécules de faible poids moléculaire (312 à 330 g/mol), très peu solubles dans l'eau, insolubles dans les solvants non polaires. Très solubles dans les solvants organiques moyennement polaires (chloroforme et alcool méthylique), elles sont assez facilement extraites (ANONYME 3, 2006).

Tableau II : Propriétés physicochimiques des principales aflatoxines (COLE et COX, 1981 ; COLE et SCHWEIKERT, 2003 ; EL KHOURY, 2007)

Dénomination	Formule brute	Structure	Masse moléculaire g/mol	Point de fusion	Absorption maximale à la lumière UV dans le méthanol	
					λ max (nm)	ϵ
Aflatoxine B1	$C_{17}H_{12}O_6$		312,3	268-269 (Cristallisation dans le chloroforme)	265 360-362	12 400 21 800
Aflatoxine B2	$C_{17}H_{14}O_6$		314,3	286-289 (Cristallisation dans un mélange de chloroforme et de pentane)	265 360-362	12 100 24 000
Aflatoxine G1	$C_{17}H_{14}O_6$		328,3	244-246 (cristallisation dans un mélange de chloroforme et de méthanol)	265 360-362	9 600 17 700

Aflatoxine G2	$C_{17}H_{14}O_7$		330,3	237-240 (Cristallisation dans une solution d'acétate d'éthyle)	265 360-362	8 200 17 100
Aflatoxine M1	$C_{17}H_{12}O_7$		328,3	299 (cristallisation dans une solution de méthanol)	265 357	14 150 21 250
Aflatoxine M2	$C_{17}H_{14}O_7$		330,29	293	264 357	12 100 22 900

1.3.2. Facteurs influençant la production d'aflatoxines :

La prolifération des moisissures et la synthèse des mycotoxines peuvent avoir lieu avant ou après la récolte, durant l'entreposage, le transport ou la transformation du produit (ANONYME 6, 1997). Il s'agit d'un phénomène d'une grande complexité qui dépend d'une combinaison des facteurs température et humidité ainsi que de l'oxygénation au niveau du substrat. Les stress thermique, hydrique (sècheresse) et physique (lésions causées par les insectes) favorisent la contamination par les moisissures et la synthèse de mycotoxines (DOWD, 1998 ; PFOHL-LESZKOWICZ *et al*, 2002 ; NESCI et ETCHEVERRY, 2006 ; YIANNIKOURIS et JOUANY, 2002). Les conditions les plus favorables pour le développement d'*A. flavus* et la production d'aflatoxines sont :

- Activité de l'eau supérieure à 0,83;
- Température comprise entre 25 et 40°C ;
- la présence d'oxygène ;
- le développement du champignon sur des plantes stressées ;
- la présence d'insecte et de graines abimées ;
- le stockage en milieu chaud et humide ;
- la Composition du substrat : en effet la composition qualitative et quantitative des substances nutritives (des glucides, principalement) peut influencer la production de mycotoxines. La présence de certaines molécules dans le substrat peut aussi influencer la production de mycotoxines. Ainsi l'acide phytique diminue la synthèse d'aflatoxine par *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus flavus*. En effet la présence de l'acide phytique complexe le zinc indispensable à la biosynthèse des aflatoxines, alors que la proline stimule cette production (TABUC, 2007).

1.3.3. Effets toxiques des aflatoxines :

Les teneurs maximales en aflatoxines exprimées en ngg⁻¹ données par l'union européenne sont de 2 ngg⁻¹ pour les AFB1 et 4 ngg⁻¹ pour la totalité des aflatoxines (B1+B2+G1+G2) et cela au niveau des arachides, des fruits secs, et des céréales (LOPEZ *et al*, 2003 ; VAN EGMOND et JONKER, 2004 ; DAOHONG ZHANG *et al*, 2009). Toute dose dépassant ce seuil peut engendrer des effets néfastes sur la santé humaine et animale.

L'effet toxique des aflatoxines sur la santé animale varient suivant l'espèce, l'âge, le sexe, l'état physiologique de l'animal, le mode d'administration, la composition de l'alimentation. L'AFB₁ est la plus toxique suivie, par ordre décroissant de toxicité, par l'AFM₁, l'AFG₁, l'AFB₂ et l'AFG₂. La toxicité des aflatoxines G₁, B₂ et G₂ est respectivement de 50, 80 et 90 % moindre que celle de l'AFB₁ (COLE et COX, 1981). Ainsi la DL₅₀ par voie orale varie de 0,3mg/kg de poids corporel chez le caneton et 9mg/kg de poids corporel chez la souris. Ingérée en grande quantité, l'aflatoxine peut être responsable de toxicités aiguës. Elle se caractérise généralement par la mort rapide des animaux. Ils présentent alors un foie décoloré et augmenté de volume (hépatotoxicité) ; les reins présentent des signes de glomérulonéphrite et les poumons sont congestionnés (GERALDINE *et al*, 2008 ; BROCHARD et LE BACLE, 2009).

Les aflatoxines sont tératogènes et mutagènes (LIANG ZHI-HONG *et al.*, 2008). L'effet tératogène est bien décrit chez les embryons de poulet pour lesquels on note un retard de

développement, une microcéphalie, une anophtalmie, un palais fendu (bec de lièvre) et une déformation des maxillaires (VESELY *et al*, 1983 ; SUNG-HYE CHO *et al*, 2008).

Toutefois, la propriété toxique majeure de l'AFB1 est son pouvoir cancérigène (BAIRD *et al.*, 2006 ; LIANG ZHI-HONG *et al.*, 2008 ; DAOHONG ZHANG *et al.*, 2009). En effet, cette molécule est responsable de l'apparition d'hépatocarcinomes chez les hommes et les animaux (VINOD *et al*, 2008 ; SHERIF *et al*, 2009 ; CURTIS *et al*, 2009). Pour cette raison, elle est classée dans le groupe I des molécules cancérigènes chez l'homme par l'IARC (ANONYME 7, 1993; REDDY *et al*, 2009).

1.3.4. Métabolisme et mécanisme d'action des aflatoxines :

Lors de l'exposition orale chez les mammifères, les aflatoxines sont adsorbées au niveau du duodénum. Les aflatoxines sont véhiculées dans l'organisme à partir d'une fixation sur les protéines plasmatiques (CASTEGNARO *et al*, 1999, BROCHARD et LE BACLE, 2009). Elles subissent un métabolisme hépatique intense principalement réalisé par l'intervention des cytochromes P450 hépatiques (figure2). Les autres voies de métabolisme de l'AF B1 comprennent la voie de la prostaglandine H-synthétase et la voie de la lypo-oxygénase. Deux enzymes présentes à des concentrations élevés dans le tissu pulmonaire.

Sous contrôle des cytochromes P450, l'AFB1 est transformée dans l'organisme en plusieurs métabolites dont un dérivé époxyde (AFB1-8,9- époxyde), principal responsable de l'effet mutagène et cancérigène de l'AFB1 et AFM1, communément appelé «Milk Aflatoxin1 » (BADEA *et al*, 2009 ; LI JUAN-JUAN *et al*, 2010). Les autres métabolites comprennent notamment l'AFQ1, l'AFP1, l'Aflatoxicol. La détoxification de l'AFB1-8,9- époxyde se fait essentiellement via la conjugaison au glutathion assurée par la glutathion-S-transférase (GST). Une partie de l'AFB1 est éliminée dans la bile sous forme conjuguée au glutathion ou de glucuro-conjugué. L'AFB1 est aussi éliminé par voie urinaire sous forme inchangée ou sous forme métabolisée, notamment AFM1, ou sous forme de dérivés conjugués ou adduits à l'ADN (SHENG WANG-JIA *et al*, 1999 ; BROCHARD et LE BACLE, 2009). L'AFM1 peut être retrouvé dans le lait maternel.

Les effets toxiques aigus ainsi que les effets cancérigènes et mutagènes de l'AFB1, implique une liaison covalente de l'AFB1-8,9- époxyde avec l'ADN, l'ARN et les protéines. Cela se répercute au niveau de la synthèse d'enzymes clés impliquées dans des réactions métaboliques essentielles (STARK, 2001). L'AFB1-8,9- époxyde a une affinité très marquée pour l'ADN avec lequel il produit des adduits préférentiellement avec la guanine en position N7 (figure 2). L'AFB1 est époxydé soit en dérivé exo, soit en dérivé endo. Seule la forme exo se fixe sur la guanine pour donner un adduit. La présence des adduits à l'ADN est à l'origine de mutation. Il s'agit essentiellement de transversions G et T où la guanine est remplacée par la thymine. Approximativement 55% des hépatocarcinomes présentent une mutation de type AGG →AGT dans le codon 249 du gène p53 suppresseur des tumeurs.

C'est ainsi que l'on observe un effet immunosuppresseur, des troubles de la coagulation, une diminution de la digestion de graisses et de la cellulose ainsi que de la nécrose et de la stéatose hépatique (LEBLANC et SAINT-HILAIRE, 2002 ; PFOHL-LESZKOWICZ *et al.*, 2002 ; PFOHL-LESZKOWICZ, 2009).

Il existe des preuves suffisantes de la cancérogénicité de ses molécules chez l'homme et l'animal. Certains scientifiques considèrent que chez l'homme, les aflatoxines n'agiraient pas comme cancérogènes primaires, mais plutôt comme suppresseur des réactions immunitaires à médiation cellulaire favorisant le nombre de porteurs de VHB. Les effets immunotoxiques semble être due à l'altération de la synthèse des acides nucléiques et de protéines accompagnée d'une diminution de la prolifération et de la production de cytokines. Parmi d'autres multiples effets néfastes des aflatoxines, on retrouve un découplage de la phosphorylation oxydative dans les mitochondries (BROCHARD et LE BACLE, 2009 ; PFOHL-LESZKOWICZ, 2009).

De nombreuses études épidémiologiques et les tests de génotoxicité ont confirmé le rôle déterminant des aflatoxines, en particulier AFB1 et dans une moindre mesure AFM1, dans l'induction du cancer hépatique. Des études plus poussées sont en cours pour en déterminer plus précisément les mécanismes d'action (PFOHL-LESZKOWICZ, 2009). Le risque de cancer lié aux aflatoxines peut être accru jusqu'à 60 fois en présence du virus de l'hépatite B et en cas de malnutrition (HERMAN, 1999 ; LEBLANC et SAINT-HILAIRE, 2002). Cela laisse supposer une sensibilité particulière des couches les plus pauvres des populations (PERAICA *et al.*, 1999). En effet plusieurs mécanismes moléculaires contribuent à expliquer le risque élevé de développement de carcinomes hépatocellulaire lors de l'exposition simultanée au virus de l'hépatite B (VHB) et aux aflatoxines (FERNANDEZ *et al.*, 1997 ; CURTIS *et al.*, 2009). D'après WILD *et al.* (1992) une ingestion de 1,4µg d'AFB1 associée au virus d'hépatite B constitue un risque de développement de cancer.

L'infection par le VHB peut augmentée le métabolisme des aflatoxines, chez la souris, des lésions du foie sont associées à l'expression augmentée des enzymes du cytochrome P450, l'activité de la glutathion-S-transférase est réduite en cas d'infection par le VHB.

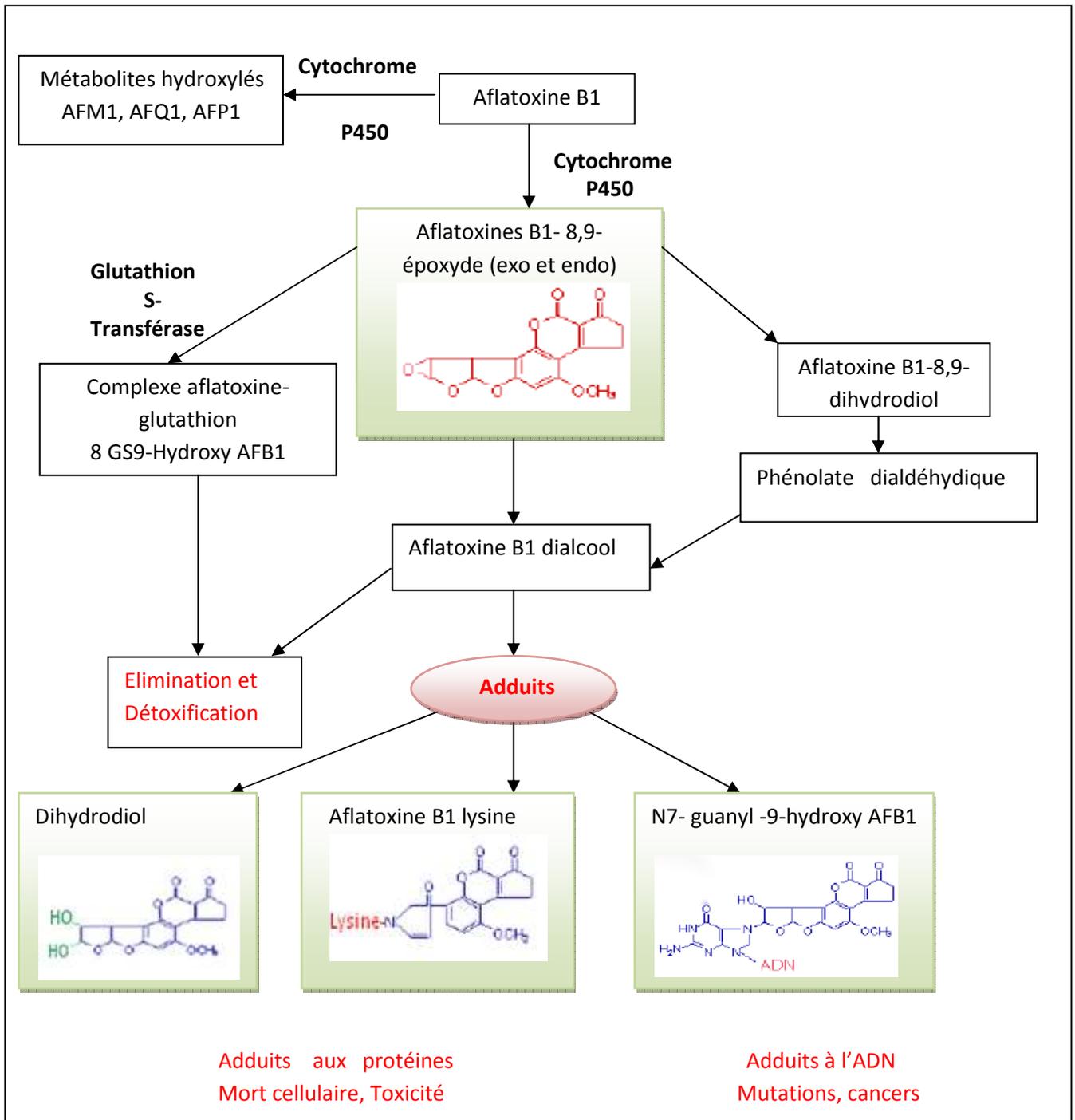


Figure 2: Métabolisme et mécanisme d'action de l'aflatoxine B1
(PFOHL-LESZKOWICZ, 2009)

1.4. Méthodes d'extraction et de caractérisation des aflatoxines :

Les mycotoxines spécifiquement les aflatoxines se retrouvent dans de nombreux aliments, ce qui en terme d'analyse correspond à une multitude de matrices complexes. Les protocoles destinés à la quantification des aflatoxines renferment systématiquement des étapes préliminaires de préparation des échantillons (broyage, centrifugation, extraction en milieu organique). Souvent longues et manuelles, ces étapes doivent être optimisées pour chaque type de matrice (échantillon). Dans les aliments les aflatoxines sont souvent sous forme de traces, c'est-à-dire en quantité minime (ppm), soit inférieure au $\mu\text{g}/\text{kg}$. Ainsi il existe toute une panoplie de méthodes d'analyses ; on peut citer la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie liquide à haute performance (CLHP). Cette dernière peut être couplée à différentes méthodes de détection qui permettent aussi bien l'identification que la quantification des aflatoxines. Ces dernières années, l'analyse par spectrométrie de masse s'est accrue avec le développement de techniques d'ionisation dites « douces » : l'électrospray (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) qui ont en outre permettent l'analyse de très faibles quantités d'échantillons. Ces techniques sensibles sont excessivement coûteuses et elles nécessitent un personnel qualifié (SAQER, 2009 ; MONBALIU, 2009). D'autres méthodes plus récentes utilisent le principe de l'immunoanalyse type ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) autorisent suivant leur configuration soit une détection de type présence ou absence (résultat qualitatif), soit une détection semi-quantitative ou quantitative de la mycotoxine (LEMING LIN *et al*, 1998 ; SUNG-HYE CHO *et al*, 2008 ; NICHOLAS *et al*, 2009 ; YUN TAN *et al*, 2009).

1.5. Procédés de lutte contre la production de mycotoxines:

Un procédé de décontamination des aliments destinés à l'alimentation humaine ou animale doit être efficace sans les rendre impropres à la consommation. Il doit être simple d'utilisation et peu coûteux car la décontamination peut concerner des quantités importantes. Le processus est d'autant plus difficile à appliquer que la contamination est souvent très hétérogène. Il n'existe pas de méthode universelle qui puisse convenir pour traiter l'ensemble des mycotoxines. En effet les procédés de conservation (stérilisation, pasteurisation, lyophilisation, congélation, etc.) ne détruisent pas ou peu les mycotoxines (HARRIS et STAPLES, 1992). Les méthodes de détoxification connues à ce jour sont d'ordre :

- **Physique** : lavage, séchage, tri et séparation des poussières, des coques ou des peaux qui sont le lieu essentiel de la contamination (YIANNIKOURIS et JOUANY, 2002) ;
- **chimique** : traitement à l'ammoniaque sous pression, addition de propionate, de formaldéhyde, d'hydrure de calcium, d'hydroxyde de sodium, de chlorure de sodium, hypochlorite de sodium, peroxyde d'hydrogène ou de tout autre inhibiteur de moisissures (YIANNIKOURIS et JOUANY, 2002 ; REDDY *et al*, 2008) ;
- **microbiologique** : par le biais d'agents biologiques qui consiste en l'ajout de certaines bactéries comme exemple *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma virens* et *Bacillus subtilis* (REDDY *et al.*, 2009) et certaines souches de bactéries lactiques (bifidobactéries) sont capables de se lier et de détoxifier les mycotoxines (biodégradation) et réduire leur production, ces agents ont aussi un effet sur la croissance des espèces productrices

(HASKARD *et al*, 2000 ; OATLEY *et al*, 2000 ; PIERIDES *et al*, 2002 ; D'SOUZA et BRACKETT, 2002 ; EL-NEZAMI *et al*, 2004 ; LIANG ZHI-HONG *et al*, 2008 ; CHINAPHUTI et AUKKASARAKUL, 2008). En effet les espèces citées ci-dessus ont démontré respectivement 93%, 80% et 68% de réduction de la croissance d'*A. flavus* et de 83,7%, 72,2% et 58% de réduction d'AFB1 (REDDY *et al*, 2009). Des recherches sont actuellement effectuées afin de développer de nouvelles classes de ligands naturels des mycotoxines. Ainsi, les glucomannanes issus de la partie externe des parois de la levure *Saccharomyces cerevisiae* sont capables de lier *in vitro* certaines mycotoxines (LI JUAN-JUAN *et al.*, 2010).

La combinaison de plusieurs traitements renforce l'efficacité de chacun des procédés mais ne permet pas la décontamination totale du produit (WHITLOW, 2002). Le meilleur moyen d'éviter la contamination de l'aliment reste la prévention et le contrôle des ingrédients composant la ration (YIANNIKOURIS et JOUANY, 2002). Certaines pratiques culturales et une meilleure gestion des stocks d'aliments permettent de réduire le risque de prolifération des mycotoxines (HARRIS et STAPLES, 1992), comme par exemple :

- pratiquer la rotation des cultures pour réduire la persistance des moisissures d'une année à l'autre ;
- prévenir les dommages causés par les insectes car les moisissures envahissent plus facilement les végétaux endommagés;
- entreposer les récoltes dans des endroits secs et veiller à une bonne ventilation des stocks ;
- éliminer les particules fines et les poussières des ingrédients composant la ration du bétail destinés à l'alimentation animal car les mycotoxines sont souvent concentrées à ce niveau.

II. LES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES :

2.1. Caractéristiques physicochimiques des composés phénoliques :

Les composés phénoliques (CP) appelés souvent les polyphénols (pp), sont des métabolites secondaires des végétaux. Ils constituent un des groupes le plus nombreux et largement distribué des substances dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connues (BRAVO *et al.*, 1994; GUIGNARD, 2002 ; MARTIN et ANDRIANTSITOHAINA, 2002 ; HENNEBELLE *et al.*, 2004).

Il existe en réalité une extrême diversité de répartition de ces composés selon les espèces et en fonction des différents organes et tissus d'une plante (ROBARDS *et al.*, 1999) . L'élément structurel fondamental qui les caractérisent est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle libre ou engagé (BRAVO *et al.*, 1994 ; LUGAZI *et al.*, 2003 ; GARY *et al.*, 2003 ; VISIOLI et HAGEN, 2007).

Selon BRUNETON (2001), une définition purement chimique semble être insuffisante, d'où la nécessité de faire intervenir un critère biosynthétique, pour mieux cerner les limites du groupe. Il propose « dérivé non azoté dont le ou les cycles aromatiques sont principalement issus du métabolisme de l'acide shikimique et ou /de celui d'un polyacétate (BRAVO *et al.*, 1994 ; MARTIN et ANDRIANTSITOHAINA, 2002 ; GARY *et al.*, 2003).

La voie du shikimate présente de nombreux points de branchements constitués des métabolites intermédiaires de la voie principale pouvant conduire à la production d'autres composés (WILDERMUTH *et al.*, 2001). Les profils d'expression des gènes de cette voie varient, d'un tissu à l'autre, au cours du développement et en réponse à des stimuli environnementaux. La production de composés phénoliques via l'induction simultanée des enzymes de la voie du shikimate et celles du métabolisme des phénylpropanoïdes constitue une réponse générale aux stress (GÖRLACH *et al.*, 1995).

Les composées phénoliques (acide phénoliques, flavonoïdes simples et proanthocyanidines) forment les groupes des composés phytochimiques le plus important des plantes (BETA *et al.*, 2005). Il est par ailleurs toujours difficile d'utiliser une nomenclature simple et homogène pour désigner les différents composés phénoliques (SARNI-MANCHADO *et al.*, 2006).

2.2. Structure et classification des composés phénoliques :

Compte tenu de la diversité et de la complexité et de la diversité des CP, RIBUREAU-GAYON (1968) a adapté un mode de présentation des polyphénols selon leur répartition dans la nature en trois familles : famille des CP largement répandue (acides phénoliques, flavonoïdes et anthocyanes), famille peu répandue (Composés en C₆, C₆-C₁, C₆-C₂, C₆-C₃, C₆-C₁-C₆, C₆-C₂-C₆, benzoquinones, naphthoquinones et antraquinones, biflavonyles, β-cyanine et bétaxanthine) et enfin, famille des CP présents dans la nature sous formes de polymères (lignines et tanins) (Tableau III).

Selon HARBORNE (1989) et MACHEIX *et al* (1990), les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes qui se différencient d'abord par la complexité de leur squelette de base allant de simple C6 à des formes très polymérisées), ensuite par leur degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation , d'hydroxylation de méthylation), enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autre molécules (glucides, lipides, protéines, autres métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénoliques.

Tableau III: Les principales classes de composés phénoliques d'après HARBORNE (1980) ; MACHEIX (1990) ; ROBARDS (1999) ; FERGUSON (2001).

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine
C6 C6-C1 C6-C3	Phénols simples Acides hydroxybenzoïques Acides hydroxycinnamiques Coumarines	Catéchol <i>p</i> -Hydroxybenzoïque Acide caféïque, férulique Scopolétine, esculétine	Epices, fraise Pomme de terre, pomme Citrus
C6-C4 C6-C2-C6 C6-C3-C6	Naphtoquinones Stilbènes Flavonoïdes <ul style="list-style-type: none"> • Flavonols • Anthocyanes • Flavanols • Flavanones Isoflavonoïdes	Juglone Resvératrol Kaempférol, quercétine Cyanidine, pélargonidine Catéchine, épicatechine Naringénine Daidzéine	Noix Vigne Fruit, légumes, fleurs Fleurs, fruits rouges Pomme, raisin Citrus Soja, pois
(C6-C3) ₂ (C6-C3) _n (C15) _n	Lignanes Lignines Tannins	Pinorésinol	Pin Bois, noyau des fruits Raisin rouge, kaki

2.2.1. Formes les plus simples :

- **Acides phénoliques:**

Les acides phénoliques sont contenus dans un certains nombre de plantes agricoles et médicinales (PSOTOVA *et al.*, 2003). Ces substances sont présentes sous formes solubles dans la vacuole (SARNI-MANCHADO *et al.*, 2006). Comme exemple d'acide phénolique on cite : acide chlorogénique, acide caféïque, acide protocatéchique, acide vanillique, acide férulique ; acide cinnamique et acide gallique (HALE, 2003). Ils sont habituellement divisés en deux groupes principaux: acides benzoïques, contenant sept atomes carbone (C6 –C1) et acides cinnamiques, comportant neuf atomes de carbone (C6 –C3) (figure 4). Ces composés existent principalement sous la forme hydroxylée, d'acides hydroxybenzoïques et d'acides hydroxycinnamiques, respectivement. Plusieurs types d'acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques (phénylpropanoïdes) ont été identifiés dans le régime humain (FRESCO *et al.*, 2006).

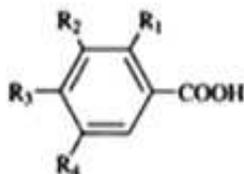
Les acides phénoliques sont considérés comme des substances phytochimiques avec des effets prébiotiques, antioxydants, chélateurs et anti inflammatoires. Leur toxicité étant faible, ils sont considérés non toxiques. Pharmacologiquement le mieux caractérisé est l'acide caféique (PSOTOVA *et al.*, 2003), celui-ci ainsi que l'acide férulique empêchent la formation du cancer des poumons chez les souris, l'acide gallique inhibe la formation du cancer œsophagien chez les rats (HALE, 2003).

Parmi les acides hydroxycinnamiques, l'acide caféique a une répartition quasi universelle chez les végétaux. Il est souvent présent sous forme d'ester dont l'acide chlorogénique (acide 5-caféoylquinique). Dérivées des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale, les hydroxycoumarines sont également très nombreux chez les végétaux, soit sous forme libre (esculétine, escpolétine....), soit sous forme plus complexe (formes glycosylées, prénylées....). Ils ont fréquemment un rôle écologique ou biologique mais certains d'entre eux, les aflatoxines, peuvent être des contaminants très dangereux de denrées alimentaires (MACHEIX *et al.*, 2005) .

Un autre groupe de composés phénoliques, les stilbènes, dérivent aussi des acides hydroxycinnamiques ont une structure C6-C2-C6, deux noyaux benzéniques reliés par un pont méthylène., Ils sont produits par les plantes en réponse à des attaques fongiques, bactériennes ou virales, ce qui a été démontré pour le trans- resvératrol (MACHEIX *et al.*, 2005; CHIRA *et al.*, 2008)

En raison de leur similitude structurale, plusieurs autres polyphénols sont considérés en tant qu'analogues acides. Par exemple, les dérivés de phényléthanol, avec huit atomes de carbones (C6 -C2), qui comportent le 3,4 dihydroxyphényléthanol (hydroxytyrosol) et le 4 -hydroxyphényléthanol (tyrosol) (figure 4), ils sont également considérés en tant que composants chemopreventive du régime alimentaire (FRESCO *et al.*, 2006).

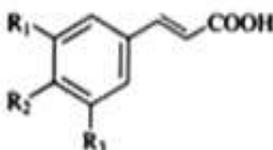
Acides hydroxybenzoïques



$R_1=R_2=R_3=R_4=H$
 $R_1=R_2=R_4=H, R_3=OH$
 $R_1=R_4=H, R_2=R_3=OH$
 $R_1=R_4=H, R_2=OCH_3, R_3=OH$
 $R_1=H, R_2=R_3=R_4=OH$
 $R_1=H, R_2=R_4=OCH_3, R_3=OH$
 $R_1=OH, R_2=R_3=R_4=H$
 $R_1=R_4=OH, R_2=R_3=H$

acide benzoïque (non phénolique)
 acide *p*-hydroxybenzoïque
 acide protocatéchique
 acide vanillique
 acide gallique
 acide syringique
 acide salicylique
 acide gentisique

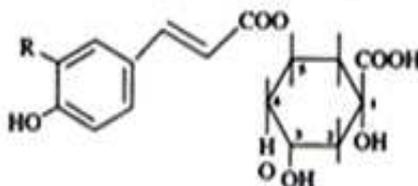
Acides hydroxycinnamiques ("phénylpropanoïdes")



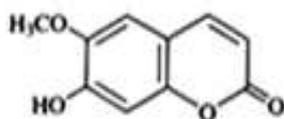
$R_1=R_2=R_3=H$
 $R_1=R_3=H, R_2=OH$
 $R_1=R_2=OH, R_3=H$
 $R_1=OCH_3, R_2=OH, R_3=H$
 $R_1=R_3=OCH_3, R_2=OH$

acide cinnamique (non phénolique)
 acide *p*-coumarique
 acide caféique
 acide férulique
 acide sinapique

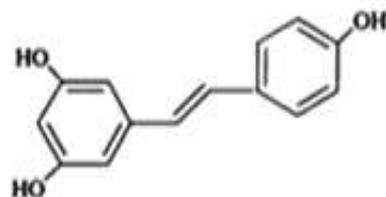
Principaux acides phénoliques



Acide chlorogénique (= 5-caféoylquinique)



Un exemple de coumarine simple :
la scopolétine



Un exemple de stilbène :
le resvératrol

Figure 3 : Les principaux acides phénoliques et quelques-uns de leurs dérivés simples (SARNI-MANCHADO *et al*, 2006 ; FRESCO *et al*, 2006 ; HABAUZIT *et al*, 2008).

- **Les flavonoïdes :**

De structure générale en C₁₅ (C₆-C₃-C₆) (figure 4), l'ensemble des flavonoïdes comprend à lui seul plusieurs milliers de molécules regroupées en plus de dix classes dans certaines ont une très grande importance biologique et technologique comme les anthocyanes, les flavonols et flavanes qui sont à l'origine des tanins condensés et les isoflavanes qui jouent un rôle dans la santé humaine (Tableau IV) (DEPEINT *et al*, 2002 ; WENYING REN *et al*, 2003 ; SARNI-MANCHADO *et al*, 2006 ; HABAUZIT *et al*, 2008).

Les flavonoïdes et dérivés sont stockés sous forme libre ou conjuguée mais leur localisation cellulaire est encore incertaine, bien que certains résultats favorisent le stockage dans la vacuole et/ou dans le réticulum endoplasmique (DAKORA et PHILLIPS, 1996 ; COOPER *et al*, 2004 ; LILLO *et al*, 2008).

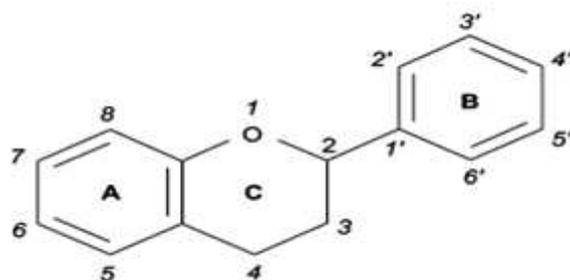


Figure 4: La structure générale des flavonoïdes
(COOPER *et al*, 2004 ; LILLO *et al*, 2008).

Les trois anneaux phénoliques (pyrane) désigné sous le nom de A, B et C et les systèmes de numérotation sont employés pour permettre une identification plus facile de la position des substitutions dans les anneaux (COOPER *et al*, 2004 ; LILLO *et al*, 2008).

Les anthocyanidines sont des dérivés du flavylum ou 2-phényl-benzopyrylium, ils portent des fonctions phénols libres, éther ou glycosides (HADI, 2004).

Tableau IV : Principales classes de flavonoïdes (DEPEINT *et al*, 2002 ; STIPCEVIC *et al*, 2006 ; LOPEZ-POSADAS *et al*, 2008).

Flavonones		Flavones		Flavonols				
FLAVONOÏDES				SUBSTITUTIONS				
				3'	4'	3	5	7
Flavonones	4'-hydroxyflavanone			-	OH	-	-	-
	Naringénine (4',5,7- trihydroxyflavanone)			-	OH	-	OH	OH
Flavones	7-hydroxyflavone			-	-	-	-	OH
	Chrysin (5,7-dihydroxyflavone)			-	-	-	OH	OH
	Apigénine			-	OH	-	OH	OH
	lutéoline			OH	OH	-	OH	OH
Flavonols	Kaempférol			-	OH	OH	OH	OH
	Quercétine (3, 3',4, 5,7-pentahydroxyflavones)			OH	OH	OH	OH	OH
Isoflavone	Génistéine			-	OH	-	OH	OH
Flavanol	(+)- Catéchine			OH	OH	OH	OH	OH
	(-)- Epicatechine			-	OH	OH	OH	OH
Anthocyanidine	Epigénidine			-	OH	-	OH	OH
	Cyanidine			-	OH	OH	OH	OH

2.2. Formes condensées :

- **Les tanins:**

Les tannins sont des polyphénols polaires d'origine végétale (BERTHODE *et al.*, 1999). Ils existent dans presque chaque partie de la plante : écorce, bois, feuille, fruit et racines, leurs poids moléculaires s'étendent de 500 à 3000 (MANGAN, 1988 ; COWAN, 1999).

Sur le plan structural, les tanins sont divisés en deux groupes : les tanins condensés (tanins catéchiques = proanthocyanidols) qui sont des polymères d'unités de flavan-3-ols [(+)-catéchine ou (-)-épicatéchine]; et les tanins hydrolysables. Ces derniers sont des esters d'un sucre (généralement le glucose) ou d'un polyol et d'un acide phénol, pouvant être l'acide gallique dans le cas des tanins galliques, ou l'acide hexahydroxydiphénique (HHDp) (acide ellagique) et ses dérivés d'oxydation dans le cas des tanins ellagiques ou ellagitannins (DERBEL et GHEDIRA, 2005).

- **Les lignines :**

La lignine est un polymère très complexe que l'on retrouve dans toutes les plantes vasculaires (Ptéridophytes, Angiospermes et Gymnospermes). Elle assure rigidité aux parois cellulaires végétales et imperméabilité aux tissus conducteurs. Ce polymère tridimensionnel est synthétisé au niveau de la paroi. Il résulte de la polymérisation oxydative, par des liaisons diverses, de trois unités monomériques ou monolignols: Les alcools coumarylique, coniférylique et sinapylique dérivant respectivement des acides coumarique, férulique, sinapique (ZHAO YAPINGA *et al.*, 2003 ; FRESCO *et al.*, 2006 ; SARNI-MANCHADO *et al.*, 2006).

2.2.3. Formes liées à des macromolécules non phénoliques :

Certains acides hydroxycinnamiques peuvent être liés à des macromolécules non phénoliques dans ce cas, le caractère chimique relève principalement de la macromolécule concernée mais ses propriétés biologiques peuvent être modifiées par la présence d'une petite proportion de composés phénoliques (SARNI-MANCHADO *et al.*, 2006).

2.3. Les grandes lignes de la biosynthèse des polyphénols :

Les deux voies d'aromagenèse qui permettent au végétal de construire le noyau aromatique sont d'après BRUNETON (1999), la voie de l'acide shikimique et la voie acétate :

- **La voie du shikimate** est présente uniquement chez les bactéries, les champignons et les plantes. Les animaux ne possèdent pas cette voie métabolique, ceci ayant pour conséquence que les acides aminés aromatiques doivent faire partie intégrante de leur alimentation (HERRMANN et WEAVER, 1999). La voie du shikimate est une voie multi-branches qui peut être divisée en trois parties. La voie qui part de Phosphoénol Pyruvate (PEP) et Erythrose 4-Phosphate (E4P) pour arriver au chorismate est appelée voie préchorismate, celle-ci est à l'origine de la synthèse de l'acide quinique et de l'acide gallique, via l'isochorismate, ce métabolisme conduit également à l'acide salicylique dont l'implication dans les réponses de défense en tant que molécule signal a été démontrée (CHONG *et al.*, 2001 ; WILDERMUTH *et al.*, 2001 ; LIM *et al.*, 2002) (figure 5). Puis la

voie du shikimate se sépare en deux branches : l'une conduit à la Phénylalanine et la Tyrosine et l'autre au Tryptophane (SCHMID et AMRHEIN, 1995) ;

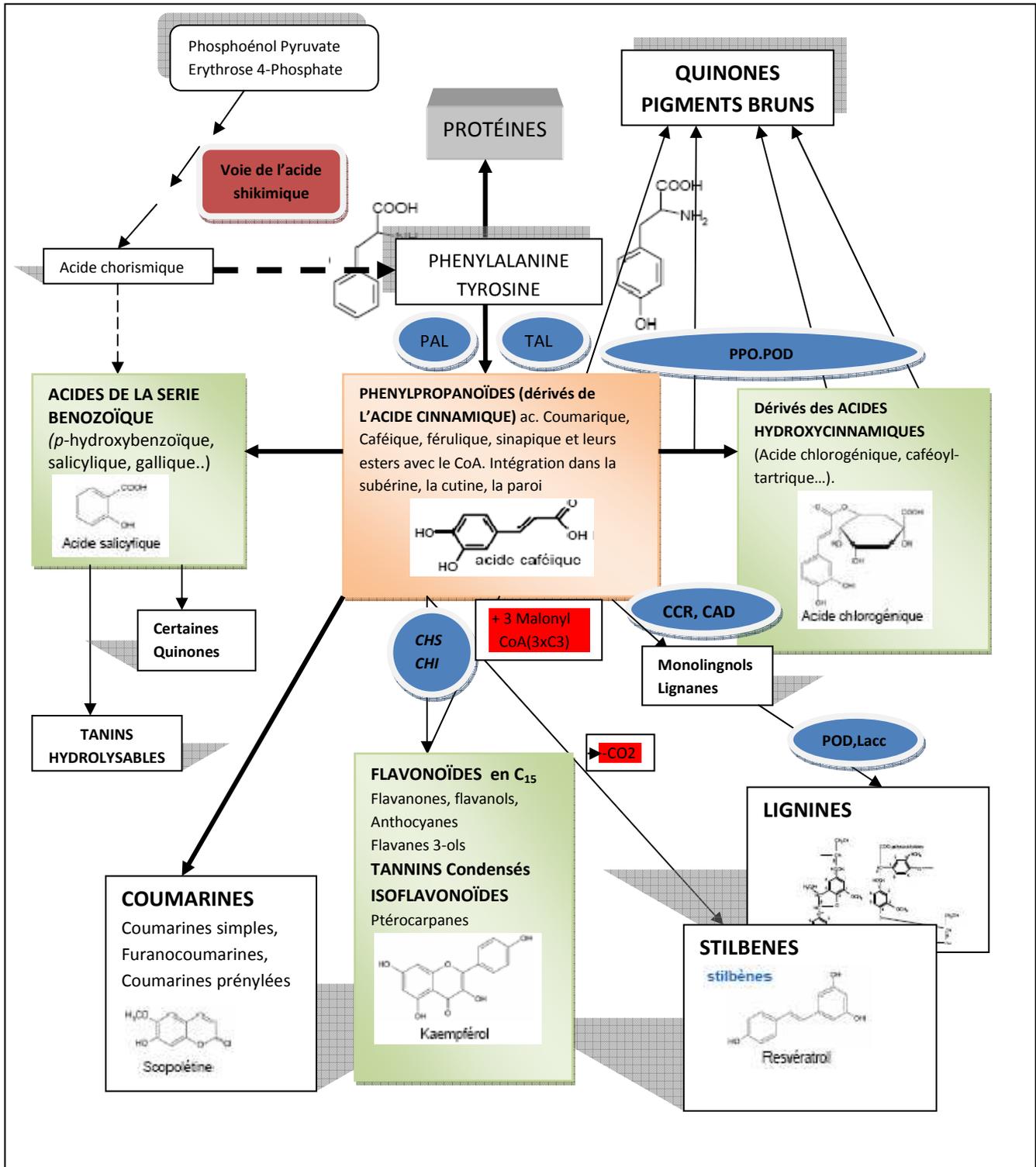
- **La voie d'acétate** qui conduit par cyclisation d'un polyacétate aux chromones et autres quinones ; la participation simultanée de ces deux précurseurs conduit par sa part aux stilbènes, flavonoïdes, anthocyanosides et autres proanthocyanidols.

Ainsi, à côté de son rôle majeur dans le métabolisme primaire, la voie du shikimate constitue un lien essentiel avec le métabolisme secondaire (SAKIHAMA *et al.*, 2002). En plus de la Phénylalanine, tous les intermédiaires de la voie peuvent être considérés comme des points de branchements vers d'autres voies métaboliques (SCHMID et AMRHEIN, 1995). Cette voie conduit aux acides cinnamiques et leurs dérivés, acides benzoïques, lignanes, lignines et les coumarines.

Deux acides aminés aromatiques, phénylalanine et tyrosine, sont à l'origine de la formation de l'immense majorité des molécules phénoliques. En effet, les formes métaboliquement actives des acides hydroxycinnamiques formés par une désamination, permettent d'accéder aux principales classes de composés phénoliques : vers les acides benzoïques par β -oxydation, vers les esters hydroxycinnamiques par estérification, vers les coumarines par cyclisation interne ; vers les lignines par deux réductions successives et enfin vers les flavonoïdes (Figure 5) (BRUNETON, 1999).

La synthèse de la majorité de ces composés nécessite un apport énergétique. Au sein du métabolisme des phénylpropanoïdes, les esters de coenzyme A (CoA) jouent ce rôle grâce à la liaison thiol ester riche en énergie. Ainsi, les thiols esters d'acides *p*-coumarique, caféique, férulique et sinapique constituent des plaques tournantes vers des composés plus complexes.

Une grande diversité caractérise ces phénylpropanoïdes spécifiques du règne végétal. Le squelette carboné subit, de manière régio-spécifique, des réactions d'hydroxylation, de méthylation, de glycosylation, d'acylation, de prénylation ou encore de sulfatation. Ces réactions biochimiques sont catalysées par des enzymes spécialisées appartenant à des familles multigéniques telles que les mono-oxygénases à cytochrome P450, les méthyltransférases, les glucosyltransférases ou encore les acyltransférases. Cette variabilité structurale reflète la multitude des activités et des fonctions biologiques de ces composés (DOUGLAS, 1996 ; KUMAR et ELLIS, 2001).



PAL : phénylalanine ammonialyase ; **TAL** : tyrosine ammonialyase ; **CCR** : cinnamate CoA réductase ; **CAD** : cinnamyl alcool déshydrogénase ; **CHS** : chalcone synthase ; **CHI** : chalcone flavone isomérase ; **PPO** : polyphénoloxydases ; **POD** : peroxydase ; **Lacc** : laccases.

Figure 5: Les grandes lignes de la biosynthèse des principaux groupes de composés phénoliques (MACHIEX *et al*, 2005 modifié par SARNI-MANCHADO *et al*, 2006).

2.4. Sources des composés phénoliques :

Les composés phénoliques sont des produits largement distribués dans le règne végétal et sont consommés quotidiennement (DWYER et PETERSON, 2002). Ils sont présents dans la plupart des organes végétaux consommés par l'homme : graine (soja, café, riz...), fruits (raisin, citrus, olive...), feuilles (thé, nombreuses épices, romarin, thym...) ou autres organes (oignon, jeunes germinations de blé ou d'avoine, patate douce...). Ils se retrouvent également, plus ou moins transformés dans les produits industriels issus de ces mêmes végétaux : jus de fruits, vin, bière, thé, café, huiles, dérivés de céréales) (MACHEIX *et al.*, 2005 ; BLASUNDRAM *et al.*, 2006 ; DIMITRIOS, 2006).

2.5. Rôle des composés phénoliques :

Les phénols sont importants pour la physiologie de la plante, ils sont impliqués dans des fonctions diverses telles que la fertilité, la pigmentation, la lignification, la protection contre des agents biotiques ou abiotiques, ou encore la signalisation (HAHLBROCK et SCHEEL, 1989 ; SHIRLEY, 1996 ; WEISSHAAR et JENKINS, 1998).

Des travaux plus anciens (NITSCH et NITSCH, 1961 ; ALIBERT *et al.*, 1977) ont montré que les phénols sont associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation, organogénèse, dormance des bourgeons, floraison et tubérisation. L'intervention des composés phénoliques dans de nombreux autres domaines de la physiologie de la plante a également été suggérée. En fait ces composés peuvent être facilement oxydés, quelquefois de manière réversible et ils participent à ce titre à l'équilibre redox des cellules (SARNI-MANCHADO *et al.*, 2006). Pour cette raison les polyphénols sont considérés comme des marqueurs chimiotaxonomiques et quelques uns sont caractéristiques de certaines espèces ou variétés (ABAD GARCIA *et al.*, 2007).

Les composés phénoliques jouent un rôle important dans les qualités sensorielles et nutritionnelles des produits végétaux consommés par l'homme. En effet, en plus de leur contribution à la couleur et à l'arôme, ils jouent un rôle déterminant sur le plan gustatif, et tout particulièrement sur les sensations d'astringence et d'amertume (SARNI-MANCHADO *et al.*, 2006). L'astringence est due aux tannins catéchétiques qui précipitent les protéines salivaires entraînant avec elles leur "cortège" de molécules d'eau qui lubrifiaient alors la muqueuse buccale (HABAUZIT *et al.*, 2008 ; VERGE *et al.*, 1999). Les tannins sont à l'origine de la sensation d'astringence des fruits non mûrs, les flavonones sont responsables de l'amertume des Citrus et peuvent donner naissance, par transformation chimique, à des dihydrochalcones à saveur sucrée (DUBOIS *et al.*, 1977). L'astringence et l'amertume des nourritures et des boissons dépendent de la teneur des polyphénols (LUGASI *et al.*, 2003).

Les dérivés d'acides hydroxycinnamiques constituent des composés importants dans la Physiologie de la plante de par leur large distribution et de par leur rôle biologique. Ils sont impliqués dans les processus de lignification, de la division cellulaire, de la signalisation ou encore des propriétés physico-chimiques des parois cellulaires végétales (KROON et WILLIAMSON, 1999). La structure complexe des lignines est en relation avec la rigidité des parois cellulaires (MACHEIX *et al.*, 2005).

Tous les composés phénoliques absorbent les rayonnements UV et participent donc à la protection des végétaux contre le rayonnement solaire, en raison de leur localisation superficielle dans les tissus. C'est grâce à l'étude de mutants accumulant ou non certains composés phénoliques, que l'on a apporté une véritable démonstration du rôle des esters hydroxycinnamiques et de certains flavonols dans la protection vis-à-vis du rayonnement UV (BIEZA et LOIS, 2001). En effet les flavonoïdes protègent les tissus végétaux contre les rayonnements U.V. comme l'indique la sensibilité aux U.V de mutants d'*Arabidopsis* (la plante modèle des biologistes moléculaires!) et de maïs déficients en flavonoïdes (SHIRLEY, 1996).

L'intervention des composés phénoliques dans les interactions entre plantes et microorganismes est également un autre domaine où les connaissances ont progressé de manière spectaculaire. Il a été classiquement montré que beaucoup de phénols ou quinones qui en dérivent par oxydation sont des inhibiteurs du développement de certains microorganismes saprophytes (dans les litières végétales) ou parasites, champignons ou bactéries (SARNI-MANCHADO *et al.*, 2006).

L'attaque des microbes pathogènes tels que virus, bactéries ou les mycètes induit une cascade de réactions qui peuvent menées à la résistance étant exprimée à l'emplacement de l'infection ou dans d'autres parties non infectées de la plante. Par conséquent ils contribuent à la protection contre les agressions par ces agents pathogènes (MISIRLI *et al.*, 2001 ; VISIOLI et HAGEN, 2007). Cette résistance systémique implique l'existence d'un signal endogène transféré dans l'emplacement d'infection à d'autre partie de la plante. On pense que la première étape du mécanisme de défense comporte une accumulation rapide des phénols à l'emplacement d'infection, qui fonctionnent pour ralentir la croissance du microbe pathogène (MISIRLI *et al.*, 2001).

Les chercheurs s'intéressent de plus en plus à l'identification des principes actifs dans les extraits phénoliques avec l'étude complémentaire intensive de leurs mécanismes d'action (SUN *et al.*, 2002). Elle a été mise en évidence soit par expérimentation *in vitro* portant sur la réduction de la croissance des champignons filamenteux (y compris quelque fois un blocage ou un ralentissement de la germination des spores) ou des colonies bactériennes, par des approches biochimiques (action sur la respiration, l'activité de certaines enzymes....) (MACHIEUX *et al.*, 2005)

Les flavonoïdes et les isoflavonoïdes interviennent également comme signaux dans les interactions plante-microorganisme. Lors des réactions de défense, la synthèse *de novo* de flavonoïdes aux propriétés antifongiques est stimulée. Au cours de la symbiose avec *Rhizobium*, les flavonoïdes interviennent notamment dans le chimiotactisme et la nodulation des légumineuses (SHIRLEY, 1996).

Les anthocyanes, une classe de flavonoïdes, sont des pigments non photosynthétiques responsables par exemple de la coloration des fleurs, des fruits et des graines (DONG *et al.*, 2001; WINKEL-SHIRLEY, 2002 ; JAAKOLA *et al.*, 2002). Leur synthèse est également activée lors du stress lié à la lumière ou aux températures extrêmes (CHRISTIE *et al.*, 1994).

2.6. Les composés phénoliques des olives et produits dérivés :

2.6.1. Les feuilles d'olivier :

Les feuilles de l'olivier sont très riches en polyphénols. On trouve spécialement l'oleuropéine, l'hydroxytyrosol, rutine, vanilline, acide vanillique, le verbascoside, l'apigénine-7-gucoside et le luteoline-7-gucoside. Leur concentration dépend de la qualité, l'origine et de la variété des oliviers (PEREIRA *et al*, 2007 ; ALUOK *et al*, 2008 ; GHEDIRA, 2008 ; LEE et LEE, 2010). Les CP des feuilles d'olivier ont montrés des activités antibactérienne et antifongique très marquées (PEREIRA *et al*, 2007 ; LEE et LEE, 2010).

2.6.2. Les drupes d'olives :

La concentration des polyphénols varie selon le degré de maturation des olives (SONI *et al*, 2006 ; OWEN *et al*, 2003). Les principales classes des CP présentes dans les olives sont les acides phénoliques, les alcools phénoliques, les flavonoïdes et les secoïridoïdes (SILVA *et al.*, 2006). Les olives vertes contiennent des concentrations importantes de CP, allant jusqu'à 150mg/g de l'extrait sec (MCDONALD *et al.*, 2001). Dans cette fraction les plus importants sont des glucosides phénoliques, principalement les dérivées des hexoses des alcools phénoliques, flavonoïdes et secoïridoïdes (SAVARESE *et al.*, 2007). L'oleuropéine le majeur phénol des olives vertes (SERVILI et MONTEDERO, 2002 ; SAVARESE *et al*, 2007), le deméthyloleuropeine, ligstroside et nüzhenide sont les plus abondants secoïridoïdes glucosidiques de l'olive (SERVILI *et al.*, 2004). Les alcools phénoliques les plus prédominants dans le fruit d'olive sont le (3,4-dihydroxyphényl) éthanol (3,4 -DHPEA) ou hydroxytyrosol et le (*p*-Hydroxyphenyl) éthanol (*p*-HPEA) ou tyrosol. Les flavonoïdes contiennent : les flavonoles glycosides (luteoline-7-gucoside, rutine) et en particulier l'anthocyanine et la cyanidine (SERVILI et MONTEDERO, 2002 ; SERVILI *et al*, 2004).

2.6.3. L'huile d'olive :

Les phénols de l'huile d'olive constituent comme dans le fruit un mélange complexe, certaines différences dans la composition chimique entre les deux sont attribuées aux séries d'altération chimiques et enzymatiques de quelques phénols durant l'extraction de l'huile. Ces modifications incluent l'hydrolyse des glucosides par les glucosidases, l'oxydation des CP par les phénolsoxydases et la polymérisation des phénols libres (RYAN *et al*, 1999 ; BENDINI *et al*, 2007). Ainsi l'huile contient les formes aglyconiques des phénols, qui sont plus liposolubles (VISIOLI et GALLI, 2002). Les phénols hydrophiles sont les plus abondants des antioxydants de l'huile d'olive vierge (SERVILI et MONTEDERO, 2002). S'étendant sur une centaine de CP, ils sont répartis en plusieurs classes, on retrouve les acides phénoliques (gallique, protocatechique, *p*-hydroxybenzoïque, vanillique, caffeique, Syringique, *p*-coumarique, ferulique et cinnamique), les flavonoïdes, les phényle éthyle alcool (tyrosol (*p*-HPEA) et hydroxytyrosol (3,4-DHPEA)), les secoïridoïdes aglycone et leurs dérivés dont l'oleuropeine (3,4-DHPEA-EA), le pinorésinol et le 1-acétoxy-pinorésinol sont deux lignanes identifiés pour la première fois dans l'huile lors de l'étude de BRENES *et al.* (2000). Les secoïridoïdes et lignanes en sont les plus concentrés dans l'huile (SERVILI *et al.*, 2004). Leurs structures sont consignées dans les figures 6 et 8 (BENDINI *et al*, 2007 ; SERVILI *et al*, 2009).

2.6.4. Les olives de table :

Les olives de tables sont une excellente source de CP, l'analyse par CPG /MS a permis d'identifier treize composés phénoliques différents pour chaque types d'olive de table parmi cinq variétés grecques étudiées issus de différentes espèces (BOSKOU *et al.*, 2006). Des échantillons des olives de table commercialisés ont été analysés par RP-HPLC et les résultats de cette analyse ont montré la prédominance de l'hydroxytyrosol (DIMITRIOS, 2006). Certaines études réalisées sur ce matériel végétal ont décrit l'isolement, la purification tout en proposant des structures à ces composés ainsi que l'estimation de leur potentiel antioxydant (OWEN *et al.*, 2003 ; SERVILI *et al.*, 2009). D'autres travaux apportent en plus du potentiel antioxydant, l'activité antimicrobienne des CP des olives de table à l'encontre des Gram+ et Gram- et des champignons (OWEN *et al.*, 2003 ; PEREIRA, 2006) .

2.6.5. Les margines :

Les margines ou eaux de végétation constituent un sous produit représentent un milieu complexe contenant principalement les polyphénols dont le tyrosol et l'hydroxytyrosol, ce dernier est le plus abondant des monomères phénoliques (FKI *et al.*, 2005 ; DE MARCO *et al.*, 2007 ; AMARAL *et al.*, 2008). La composition phénolique des margines varie en fonction de la composition des olives (FKI *et al.*, 2005). Plus de 20 CP ont été identifiés. Le profil de l'extrait phénolique des margines par HPLC montre: Les acides phénoliques (vanillique, gallique, caféique, p-Coumarique, Ferulique), les alcools phényles (tyrosol, hydroxytyrosol), les dérivés de secoiridoïdes (la forme dialdéhyde de décarboxyméthyloléuropéine aglycone, ligstroside, verbascoside) et les flavonoïdes (luteoline, luteoline -7-glucoside) (FKI *et al.*, 2005 ; DE MARCO *et al.*, 2007 ; AIT BADDI *et al.*, 2008).

2.6.6. Les grignons:

Une petite partie de la fraction phénolique est retenue dans ce sous produit. Certains acides phénoliques sont identifiés, notamment les acides galliques, protocatéchiques, p-hydroxybenzoïques, vanilliques, caféiques et féruliques (ÜNAL, 1994).

Il est à noter que les noyaux ne contiennent que de faibles concentrations en oleuropéine, ils sont dépourvus de flavonoïdes. Le (+)-1-pinorésinol est le prédominant lignane dans le noyau (SERVILI *et al.*, 2007) et le nüzhenide est le principal CP caractérisé par HPLC couplé à la spectroscopie de masse en utilisant la technique dite d'ionisation electrospray (SILVA *et al.*, 2010).

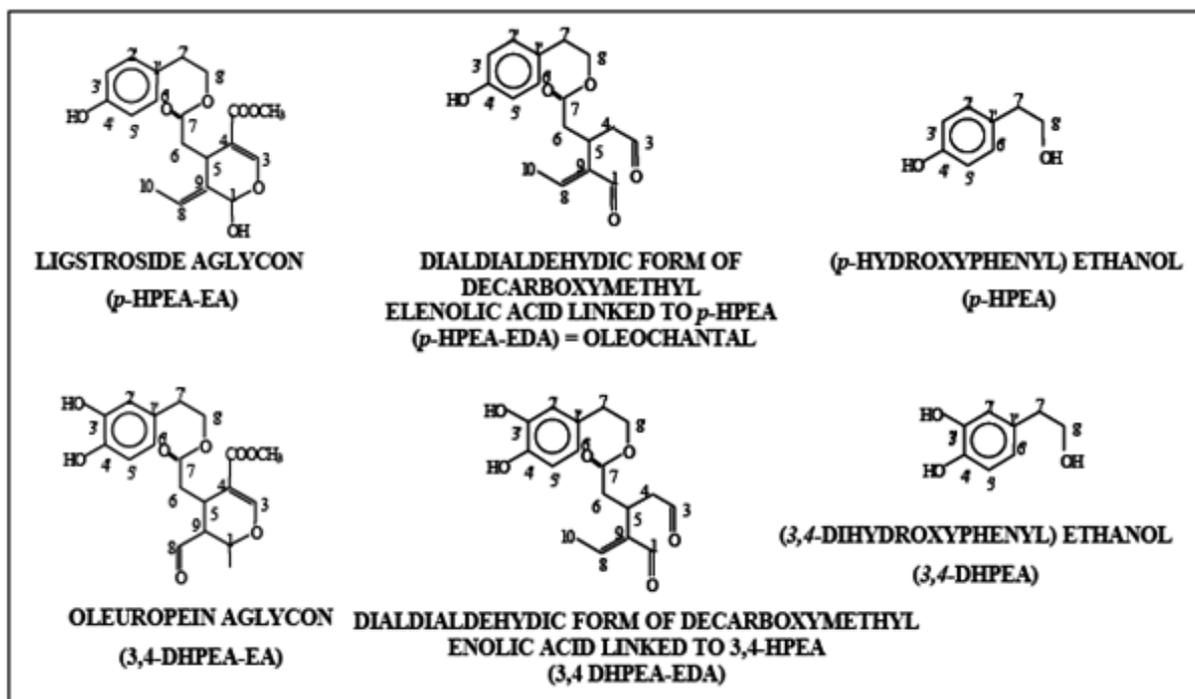


Figure 6: Structure chimique des dérivés secoïridoïdes et des alcools phénoliques de l'huile d'olive vierge (SERVILI *et al.*, 2009).

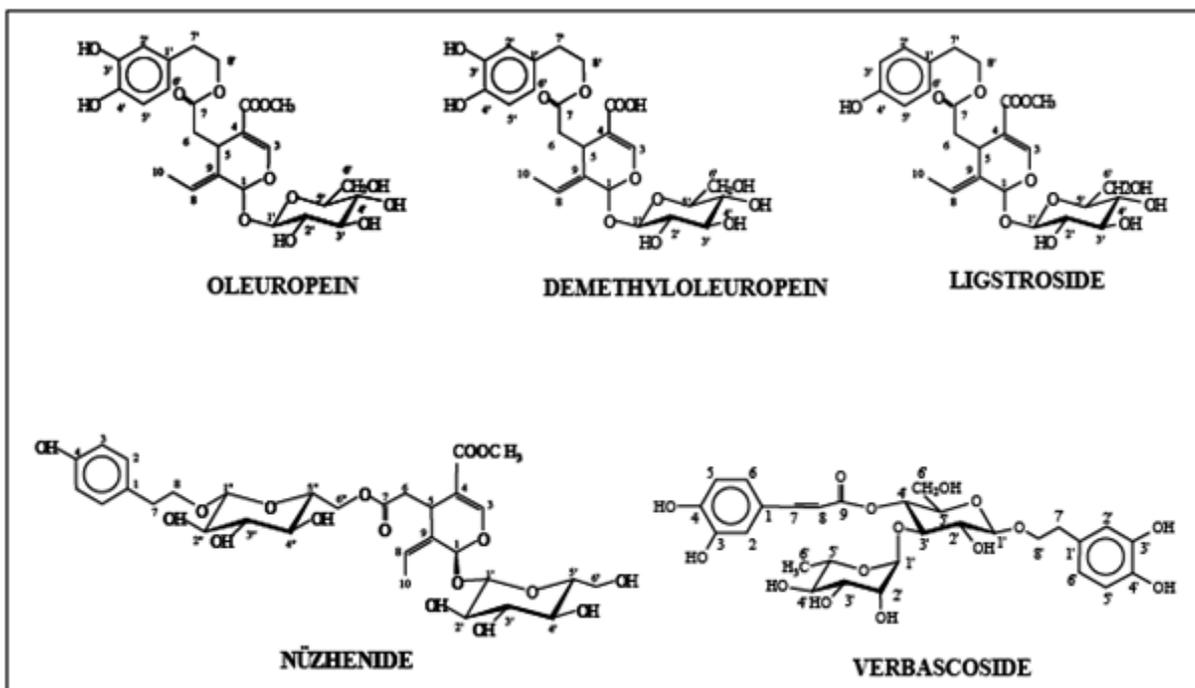


Figure 7 : Structure chimique des dérivés secoïridoïdes des alcools phénoliques de l'olive (SERVILI *et al.*, 2009).

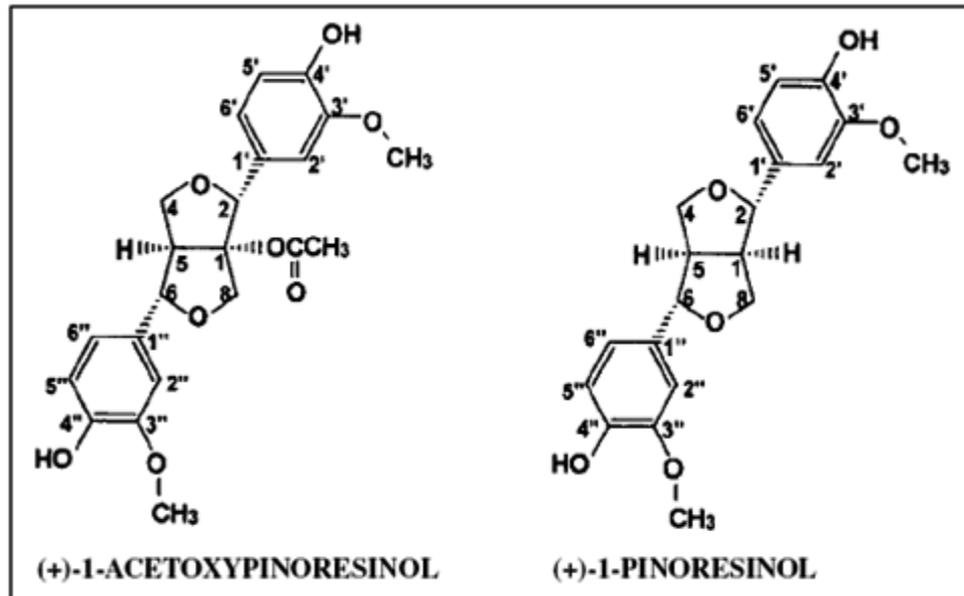
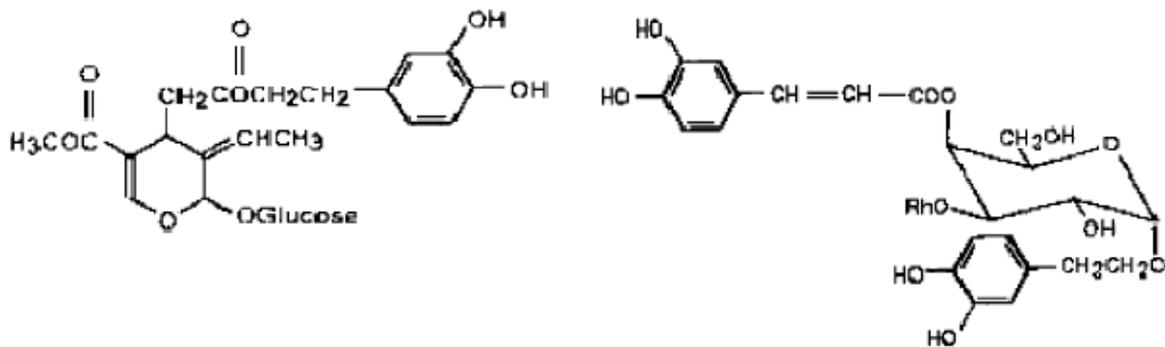
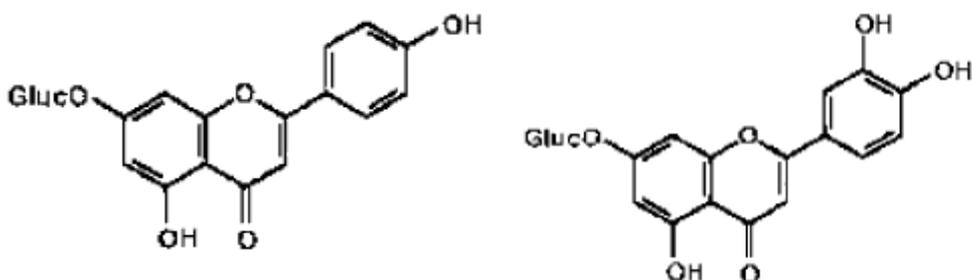


Figure 8: Structure chimique des lignanes présents dans l'olive et l'huile d'olive vierge (TRIPOLI *et al*, 2005 ; SERVILI *et al*, 2009).



oleuropeine

verbascoside



apigénine-7-glucoside

lutéoline-7-glucoside

Figure 9: Les structures chimiques des composés phénoliques les plus abondants des feuilles d'olivier (JAPON-LUJAN *et al*, 2006 ; ALUOK *et al*, 2008).

2.7. Modes d'action des composés phénoliques :

Ces dernières années une importance particulière a été accordée aux propriétés anti oxydantes des CP, en effet l'homme n'est pas capable d'assurer la biosynthèse de la plupart des antioxydants, en particulier ceux de nature phénolique à forte activité antioxydante. Il doit donc les trouver dans son alimentation et l'ingestion de CP dans la ration journalière est alors un facteur nutritionnel considéré comme positif par les nutritionnistes et bénéfique à la santé, selon les habitudes alimentaire, nous pouvons en ingérer de 100 mg à plusieurs grammes par jour. Cela est particulièrement vrai dans les régimes dits « méditerranéens » où la consommation de fruits, de légumes et d'huile d'olive est importante (MACHEIX *et al*, 2005 ; BALASUNDRAM *et al*, 2006 ; PFAENDTNER et BROADBELT, 2007)

En règle générale, les mécanismes d'action d'un antioxydant peuvent comprendre :

- Le piégeage direct des ERO (espèces oxygénées réactives) ou l'effet « scavenger »
- La protection des systèmes de défense antioxydants (en majorité des systèmes enzymatiques)
- L'inhibition ou activation d'enzymes et la chélation des traces métalliques responsables de la production d'ERO (HALLIWELL, 1994).

2.8. Relation structure-activité antioxydante :

La structure des CP est la clef déterminante de leurs activités. Dans le cas des acides phénoliques, l'activité antioxydante dépend du nombre et la position des groupements hydroxyles présents dans leur structure (RICES-EVANS, 2001 ; ROBARDS *et al*, 1999). En effet l'activité anti oxydante augmente avec l'augmentation du degré d'hydroxylation c'est le cas de l'acide gallique tri hydroxylé qui a démontré une remarquable activité antioxydante alors que la substitution des groupement hydroxyles en position 3 et 5 de l'acide syringique par des groupements méthoxyyles réduit son activité (BALASUNDRAM *et al.*, 2006). Des recherches ont démontré que les substituants en position ortho- et para- sont plus stables que ceux en position méta- (BALASUNDRAM *et al.*, 2006). BENDINI *et al.* (2006) ont démontré que les ortho diphénols assurent une activité antioxydante la plus significative.

Les acides hydroxycinnamiques montrent une activité antioxydante plus élevée que les acides hydroxybenzoïques (ANDREASEN *et al.*, 2001). Cette activité est peut être due au groupement CH=CH-COOH qui cède plus facilement l'hydrogène que le groupe carboxylique des acides hydrobenzoïques (RICE-EVANS *et al.*, 1996).

Pour les flavonoïdes la relation structure- activité est beaucoup plus complexe et ceci est en relation directe avec la complexité de leur structure. La disposition des structures et la nature des substitutions sur le cycle B et C déterminent l'activité antioxydante des ces derniers (BALASUNDRAM *et al.*, 2006). De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques et leur pouvoir piégeur (scavenger) des radicaux libres (JOVANOVIC, 1994 ; RICE-EVANS *et al*, 1996 ; VAN ACKER, 1996 ; COTELLE, 1996 ; COS, 1998 ; PIETTA, 2000 ; SEYOUM *et al*, 2006). Ces travaux ont pu conclure que les composées les plus actifs sont ceux qui combinent les critères suivants :

- La structure ortho-dihydroxy du cycle B (groupement catéchol) qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons (la substitution de ces groupements hydroxyyles sur le cycle B par des groupements méthoxyyles altère le potentiel redox et donc la capacité radical scavenger des flavonoïdes) (HENDRICH, 2006 ; BALASUNDRAM *et al.*, 2006) ;
- la double liaison entre C2 et C3 conjugués à la fonction 4-oxo sur le cycle C augmente la capacité radical scavenger des flavonoïdes (BALASUNDRAM *et al.*, 2006) ;
- la présence du groupement 3-OH combinée à une double liaison entre C2 et C3 augmente également la capacité radical scavenger des flavonoïdes (la substitution du groupement 3-OH conduit à l'augmentation de l'angle de torsion et une perte de la coplanarité conduisant ainsi à la réduction de l'activité antioxydante (BALASUNDRAM *et al.*, 2006).

2.9. Intérêt biologique des composés phénoliques :

Les composés phénoliques tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques et les tannins ont montré des activités anti oxydantes, anti-inflammatoires, anti-carcinogènes, inhibitrices d'enzymes, et préventives des maladies cardiovasculaires (HUA-BIN LI *et al.*, 2007 ; WANG et MAZZA, 2002).

Ils ont montré *in vivo* comme *in vitro* un certain nombre d'activités (Tableau V). Les flavonoïdes montrent plusieurs effets biologiques tels que des effets anti-ulcéreux, anti-inflammatoire et anti-hépatotoxique. Ils sont également inhibiteurs d'enzymes telles que l'aldose réductase et la xanthine oxydase. Ce sont des antioxydants efficaces, ayant la capacité de piéger les radicaux libres. Beaucoup ont des actions antiallergiques et antivirales et certains fournissent une protection contre les maladies cardiovasculaires. *In vitro* chez les animaux de laboratoires, ils ont montré une inhibition de la croissance de diverses variétés de lignées de cellules cancéreuses (NARAYANA *et al.*, 2001 ; DE RIJKE *et al.*, 2006).

En raison de leur abondance dans les plantes consommées par l'homme et de leurs bénéfices potentiels pour la santé humaine, les flavonoïdes sont l'objet d'une attention croissante. Que ce soit pour l'étude des relations structure-activité, le contrôle de la qualité alimentaire ou le suivi de l'absorption et de la métabolisation de ces composés phénoliques naturels. Il a également été montré, *in vitro*, que les acides hydroxycinnamiques et leurs conjugués ont des pouvoirs antioxydants importants. En effet, l'ingestion de ces molécules, à travers la consommation de café par exemple ou de fruits, semble constituer un moyen de lutte important contre les méfaits des radicaux libres sur la santé (KROON et WILLIAMSON, 1999).

Tableau V: Activité biologique des composés phénoliques

Phénols	activités	Auteurs
Acides phénoliques (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériens Antifongiques antioxydants	DIDRY <i>et al</i> (1982) ; RAVN <i>et al</i> (1984) ; HAYASE et KATO (1984) ; MACHEIX <i>et al</i> (2005).
Coumarines	Vasoprotectrices Antioœdémateuses	MABRY et ULUBELEN (1980)
Flavonoïdes	Antitumorales Anticarcinogène anti-inflammatoires hypotenseurs et diurétiques antioxydants	BIDET <i>et al</i> (1987) ; STAVRIC et MATULA (1992) ; KRAVCHENKO <i>et al</i> (2003) ; STIPCEVIC <i>et al</i> (2006) ; DJERIDANE <i>et al</i> (2007) ; SANCHEZ DE MEDINA <i>et al</i> (2008) ; TEISSEBRE (2008).
anthocyanes	Protection des veines et capillaire	BRUNETONE (1993)
Proanthocyanidines	Effet stabilisant sur le collagène. Antitumorales Antifongiques Antioxydants Anti-inflammatoire	DE OLIVEIRA <i>et al</i> (1972) ; MASQUELIER <i>et al</i> (1979); BROWNLEE <i>et al</i> (1992) ; KREOFISKY <i>et al</i> (1992) ; BAHORUN <i>et al</i> (1996).
Tannins galliques (hydrolysable) et catéchiques (condensés)	Antioxydants	OKUDA <i>et al</i> (1983) ; OKAMURA <i>et al</i> (1993) ; HABAUZIT <i>et al</i> (2008).

2.10. Les méthodes d'extraction et techniques analytiques des composés phénoliques :

Les méthodes utilisées pour isoler les composés phénoliques dépendent de leur nature chimique et de la nature du matériel végétal (fruit, graines, feuilles, huile, sous-produits), la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques hydroxylés chez tous les composés phénoliques est responsable de certaines propriétés communes utilisées pour les extraire à partir du matériel végétal, les caractériser chimiquement et les doser (SARNI-MANCHADO et CHEYNIER, 2006). Ainsi bien que le schéma général des différentes étapes d'extraction, de caractérisation et de dosage soit valable pour la majorité des CP, il devra quelquefois être modifié pour être mieux adapté à leur nature chimique, leur solubilité et leur degré de liaison avec d'autres constituants végétaux (MACHEIX *et al.*, 2005). Il n'existe aucune méthode permettant d'extraire de manière satisfaisante et simultanée l'ensemble des composés phénoliques ou une classe bien spécifique (NACZK *et al.*, 2004).

Les polyphénols des olives sont extraits généralement à partir de la poudre d'olive obtenue par lyophilisation et le traitement avec l'azote liquide (RYAN *et al.*, 2002). Ensuite une extraction liquide-liquide (LLE), celle-ci a démontré une efficacité d'extraction des CP très marquée (BENDINI *et al.*, 2003). Un solvant polaire est choisi, le plus souvent avec le méthanol/eau et avec des concentrations (80-20%) (v/v) respectivement. En effet le dosage des CP et les fractions spécifiques comme les acides phénoliques, les flavonoïdes, les anthocyanes démontrent l'efficacité du méthanol comme solvant d'extraction (NACZK *et al.*, 2004). Durant cette étape la macération de la matrice est avérée utile pour en extraire le maximum de CP (NACZK *et al.*, 2004 ; LI *et al.*, 2007). Un même effet est obtenu par le traitement acide ou basique (NACZK *et al.*, 2004). L'extraction par solvant assistée par micro-ondes ou des ultrasons a été décrite par JAPON-LIJAN *et al.* (2006). Cette dernière a été proposée afin d'accélérer l'extraction des CP des feuilles d'olivier.

Diverses techniques ont été mises en œuvre pour l'analyse quantitative des composés phénoliques. La méthode classique pour la quantification des CP totaux est colorimétrique utilisant le réactif de Folin-ciocalteau. Avant l'introduction de l'HPLC, les séparations chromatographiques sur papier, sur couche mince ou sur colonne sont utilisées (MACHEIX *et al.*, 2005). L'HPLC est de très loin, la technique la plus appliquée pour la séparation et la quantification des CP comme en témoignent les excellentes séparations déjà obtenues depuis plus de 20 ans (NACZK *et al.*, 2004 ; MACHEIX *et al.*, 2005). Parmi les méthodes analytiques, la spectrométrie de masse (MS) occupe une place privilégiée grâce à ses caractéristiques : méthode hautement sensible (détection de composés à l'état de traces en quantité inférieure au milligramme), spécifique, applicable à des mélanges complexes, combinable à de nombreuses techniques chromatographiques et possédant une grande variété d'applications (analyses chimiques qualitatives et quantitatives, interaction entre molécules, biomédecine, entre autres) (PRASAIN *et al.*, 2004). L'identification des CP individuels est facilitée par la mise en œuvre de ces techniques à haute résolution notamment la spectroscopie de masse couplée à l'HPLC (HPLC-MS tandem) qui donne accès au temps de rétention, aux spectres UV-visible et aux données spectrales de masse (NACZK *et al.*, 2004 ; DE MARCO *et al.* 2007).

Ces dernières années, l'analyse par spectrométrie de masse s'est accrue avec le développement de techniques d'ionisation dites « douces » : l'électrospray (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) qui ont en outre permis l'analyse de très faibles quantités d'échantillons bruts. L'ESI et l'APCI sont des techniques qui génèrent principalement des ions moléculaires pour des métabolites relativement petits tels que les flavonoïdes (WOLFENDER *et al*, 2000 ; NACZK *et al*, 2004). Le développement des sources d'ionisation à pression atmosphérique (APCI, ESI), le couplage de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse (LC-MS) est devenue la technique la plus efficace et de ce fait la plus utilisée pour l'analyse des CP dans des mélanges complexes. Pour de nombreux auteurs, ce sont les techniques les plus adéquates pour l'étude des flavonoïdes (DE RIJKE *et al*, 2003 ; PRASAIN *et al*, 2004). D'autres techniques préformantes sont aussi utilisées on peut citer, La résonance magnétique nucléaire (RMN) qui permet d'accéder qualitativement aux structures des molécules et à leur environnement physico chimique sans dégrader l'échantillon étudié. Celle-ci est basée sur la possibilité de faire résonner différents noyaux dans un champ magnétique, donc sur leurs propriétés magnétiques et cinétiques (ALONSO-SALCES *et al.*, 2010), la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC, MS) donnent aussi des résultats très satisfaisants. Enfin l'électrophorèse capillaire (EC), une méthode analytique récente, sensible, rapide de haute résolution. Utilise de très faibles quantités d'échantillons mais aussi des volumes de solvants réduits (BENDINI *et al*, 2003 ; CARRASCO-PANCORBO *et al*, 2006).

PARTIE II
Partie expérimentale

Matériel et méthodes

I. Matériel et méthodes :

1.1. Matériel :

1.1.1. Matériel végétal :

La variété *chamlal* retenue pour notre étude appartient à la série *Sativa* de la sous espèce *euromediterranea*

Embranchement : *spermaphytes*

Sous embranchement : *angiospermes*

Classe : *Dicotylédones*

Sous classe : *gamopétales tétracycliques superovariées*

Ordre : *ligustrales*

Famille : *oléacées*

Sous-famille : *oléoïdées*

Genre : *olea*

Espèce : *europa*

Sous espèce : *oléa-euromediterranea*

Série : *sativa*

Variété : *chamlal*



Figure 10 : Photo des olives et feuilles d'olivier. Variété *chamlal* de la région de Tadmaït

Nous avons utilisé le produit et sous produits suivant :

- **Olives vertes :**

Des olives vertes de la variété *chamlal* ont été recueillies le 27/10/2009, dans un verger situé dans la région de Tadmaït (Wilaya de Tizi-ouzou). Les olives prélevées sont immédiatement triées, réparties en petites quantités de 200g dans des sacs en plastiques, puis congelées à -18°C.

- **Feuilles :**

Les feuilles vertes de la variété *Chamlal* ont été recueillies le 30/10/2009 dans un verger situé dans la région de Tadmaït. Les feuilles recueillies sont ensuite débarrassées de la poussière avec un chiffon propre. Puis sécher à l'étuve à 37°C pour subir à l'aide d'un broyeur électrique. La poudre est conservée à l'abri de la lumière dans un flacon sombre bien sec borosilicaté.

- **Margines :**

Les margines proviennent d'une huilerie moderne car la presse des olives se fait avec des procédés mécaniques de la région de Tadmaït conservées dans des bouteilles en plastique d'une contenance d'un litre à -18°C.

1.1.2. Les souches fongiques testées :

Les souches utilisées dans les tests font partis d'un seul groupe de microorganismes appartenant au genre *Aspergillus* qui sont des pathogènes et des contaminants. Il s'agit d'*Aspergillus flavus* NRRL 3251^T et *Aspergillus parasiticus* CBC 100926^T. Ces souches ont en commun une croissance rapide aux températures de 25°C et 37°C, et la couleur de leurs conidies est vert-jaune clair. Il semble que les deux espèces *A. flavus* et *A. parasiticus* soient physiologiquement très semblables. Ces souches ont été fournies au niveau du Laboratoire de Recherche sur les Produits Bioactifs et la Valorisation de la Biomasse de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger, dirigé par le professeur SABAOU.

Les souches ont été conservées à +4°C dans des tubes contenant 10 ml de milieu de culture incliné stériles (PDA acidifié pour les moisissures).

1.1.3. Appareillages :

Les différents appareils utilisés sont :

Appareils	Firmes
Agitateur magnétique	STUART
Agitateur magnétiques plaque chauffante.	LABINCO
Bain-marie thermostaté	MEMMERT
Broyeur mécanique	MOULINEX
Centrifugeuse	SIGMA 3-16 PK
Etuve	MEMMERT
centrifugeuse à eppendorf	SANYO (MSE)
Rotavapeur	IKA-WERK
Spectrophotomètre UV-Visible	SHIMADSU
Balance de précision	OHAUS (0,001g - 210g) g:gramme
Vortex	BIOBLOCK SCIENTIFIC
Lampe UV (366nm)	DESAGA
Hôte UV à flux laminaire vertical	TEL STAR MINI-V/PCR

1.1.4. Réactifs et produits chimiques :

Les produits chimiques et les réactifs utilisés sont :

-Acides phénoliques : acide caféique, vanilline, oleuropeine, acide gallique, tannins. (FLUKA ANALYTICAL, SIGMA ALDRICH, LABOSI France, MERCK SCHUCHARDT respectivement).

-Solvants : acétate d'éthyle, chloroforme, Hexane, méthanol, acétone (PANREAC, LABOSI). Folin-ciocalteu, carbonate de sodium, 1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH), Diméthyl sulfoxyde (DMSO) (PROLABO)

-Autres produits :

*Tween 80(PROLABO).

*Milieux de cultures : (CAM : Coconut Agar Medium, PDA : Pomme de terre, Dextrose Agar) préparés au laboratoire de biochimie appliquée et biotechnologie (LABAB) (Annexe 2).

* Plaques de CCM : plaque d'aluminium de CCM (20x20cm, 0,25mm d'épaisseur), gel de silice-60 254F (Merck).

1.2. Méthodes :

1.2.1. Méthodes d'extraction des polyphénols de divers produits de l'olivier :

1.2.1.1. Extraction des polyphénols de la pulpe des olives vertes :

Le protocole d'extraction des composées phénoliques à partir des pulpes d'olives est basé sur la méthode décrite par BRENES *et al.* (1995) dont les principales étapes sont résumées dans la figure 11.

- La première est une extraction dans un mélange méthanol/eau (80/20, v/v) pour obtenir initialement l'extrait des polyphénols totaux (PPT).
- La deuxième étape de l'extraction à été réalisée avec d'autres solvants à polarité croissante ; l'hexane puis l'acétate d'éthyle, permettant ainsi de séparer les composés de l'extrait brut selon leur degré de solubilité dans ces solvants (NACZK et SHAHIDI, 2004). L'hexane a pour but d'éliminer la fraction lipidique (délipidation) alors que les composés phénoliques sont extraits avec l'acétate d'éthyle, ce dernier est souvent utilisé pour l'extraction des composés phénoliques. En effet ce dernier a montré une meilleure efficacité par rapport aux autres solvants. (OBIED *et al.*, 2005 ; SAVARESE *et al.*, 2007).

1.2.1.2. Extraction des polyphénols à partir des feuilles d'olivier :

Le protocole d'extraction des composées phénoliques à partir des feuilles d'olivier est basé sur la méthode décrite par GARIBOLDI *et al.* (1986) dont les principales étapes sont résumées dans la figure 12.

- la première est une extraction dans un mélange méthanol/eau (80/20, v/v) pour obtenir initialement l'extrait brut contenant les polyphénols totaux ainsi que d'autre composés.
- La deuxième étape de l'extraction à été réalisée avec d'autres solvants à polarité croissante (Hexane → chloroforme → Acétate d'éthyle) permettant ainsi de séparer les composés de l'extrait brute selon leur degré de leurs solubilités dans ces solvants d'extraction (NACZK et SHAHIDI, 2004).

La méthode d'extraction appliquée doit tenir compte de la qualité de l'extrait, autrement dit de la bio activité de ces principes actifs. Dans la présente étude, la méthode de macération sous agitation permet d'accélérer le processus d'extraction tout en préservant la bioactivité des constituants de l'extrait. De même le déroulement de cette extraction à température ambiante ainsi que l'épuisement du solvant à pression réduite permet d'obtenir le maximum de composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable due aux températures élevées, utilisées dans d'autres méthodes d'extraction (NACZK et SHAHIDI, 2004).

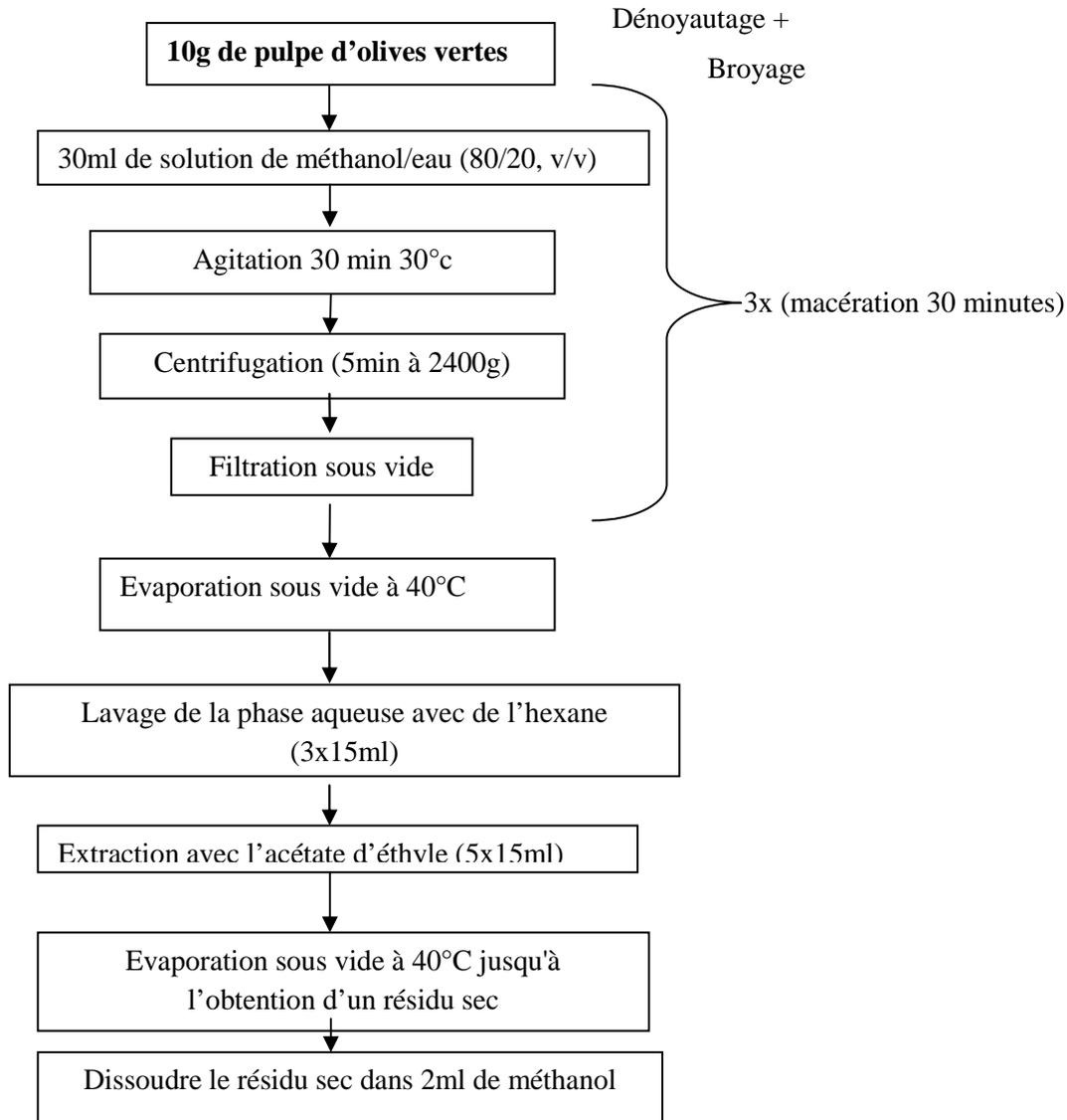


Figure 11: Diagramme d'extraction des composés phénoliques à partir de la pulpe d'olives vertes selon BRENES *et al.* (1995).

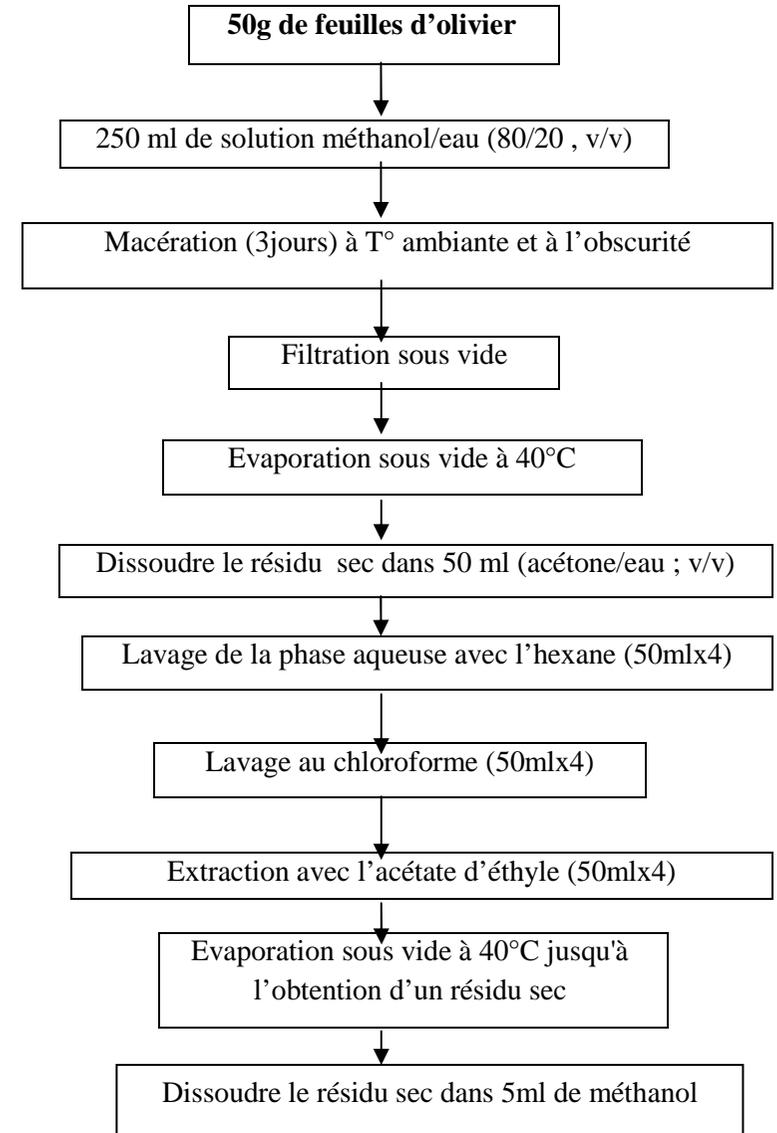


Figure 12 : Diagramme d'extraction des composés phénoliques à partir des feuilles d'olivier (GARIBOLDI *et al.*, 1986)

1.2.2.3. Extraction des polyphénols à partir des margines:

Le protocole d'extraction des composés phénoliques à partir des margines est basé sur la méthode décrite par DE MARCO *et al.* (2007) dont les principales étapes sont résumées dans la figure 13. Il s'agit d'une extraction liquide-liquide avec l'acétate d'éthyle celui-ci est souvent utilisé pour ce type d'extraction (DELLA GRECA *et al.*, 2004; LESAGE-MEESSEN *et al.*, 2001). En effet ALLOUCHE, FKI et SAYADI (2004) ont démontré que l'acétate d'éthyle est plus efficace que les autres solvants d'extraction avec un taux d'extraction élevé. Celle-ci est précédée d'une étape d'acidification à pH 2 avec l'HCl cette étape est très importante. En effet le milieu acide favorise la précipitation des protéines et la rupture des liaisons établies entre les composés phénoliques aux composants des parois cellulaires ainsi que l'hydrolyse des phénols complexes en phénols simples cela a été confirmé par dosage spectrophotométrique que la quantité de polyphénols dans les margines acidifiées est plus élevée que la quantité de polyphénols dans les margines brutes. (OBIED *et al.*, 2005 ; De MARCO *et al.*, 2007). Une étape de délipidation a été effectuée dans le but d'éliminer la matière grasse présente dans les margines.

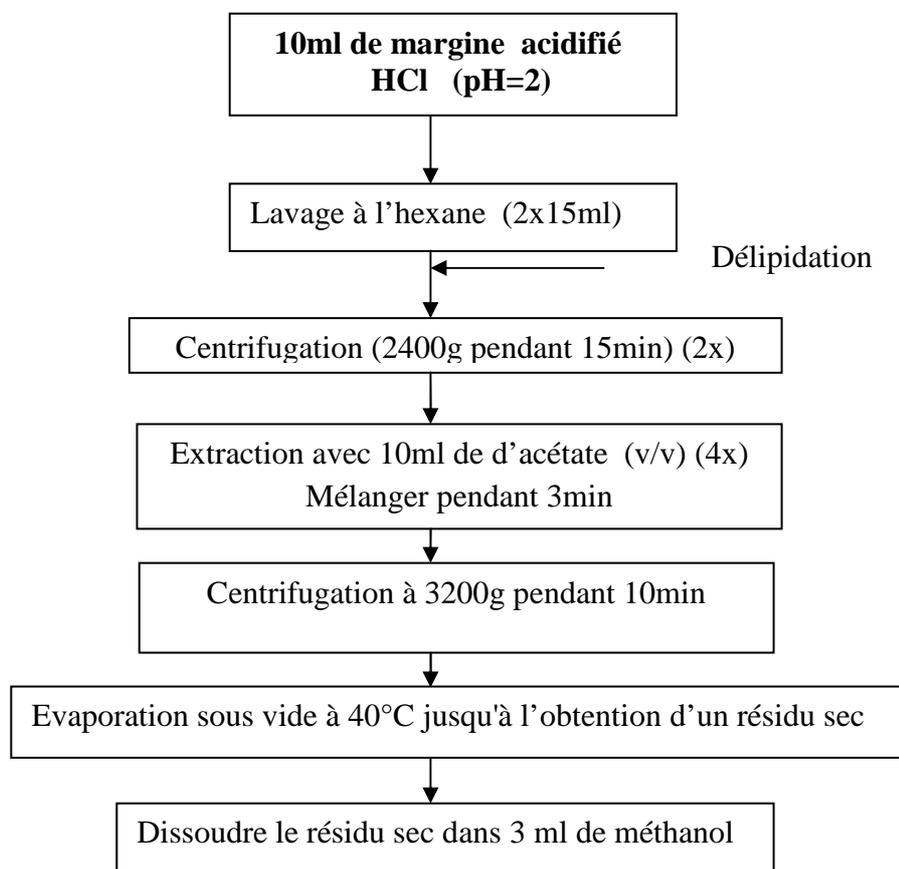


Figure 13 : Diagramme d'extraction des composés phénoliques à partir des margines (DE MARCO *et al.*, 2007).

1.3. Analyse des extraits phénoliques d'olivier:

1.3.1. Dosage des composés phénoliques :

La teneur en composés phénoliques des différents extraits d'olivier a été estimée par la méthode de Folin-ciocalteu selon SINGLETON et ROSSI (1965) qui est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique (WO_4^{2-}) et phosphomolybdique (MoO_4^{2-}) du réactif de Folin par les groupements réducteurs des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 760nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (SINGLETON *et al.*, 1999 ; NUNZIA *et al.*, 2009).

Les solutions des différents échantillons à doser et la gamme étalon sont préparées de la même manière et dans les mêmes conditions.

Nous mesurons 125 μ l de chaque échantillon ou dilution, aux quels nous rajoutons 500 μ l d'eau distillée ; ensuite nous ajoutant 125 μ l du réactif Folin –Ciocalteu, six minutes plus tard, 1,25 ml de la solution aqueuse de carbonate de sodium ($Na_2 CO_3$) à 7% sont additionnés au milieu réactionnel (Annexe 1) que nous complétons à 3 ml avec de l'eau distillée après avoir bien mélangé.

Après 60 minutes d'incubation à température ambiante l'absorbance à été mesurée à 760nm au spectrophotomètre contre un blanc sans extrait.

La quantification des composés phénoliques à été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire de la forme $y = ax$ réalisée en utilisant l'acide gallique comme référence. Les résultats seront donc exprimés en équivalents d'acide gallique. La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-100 μ g/ml).

1.3.2. Test in vitro de l'activité antioxydante des extraits phénoliques brutes:

Pour étudier l'activité anti radicalaire des différents extraits, nous avons opté pour la méthode utilisant le DPPH (diphényl picryl-hydrazyl) comme un radical libre relativement stable, selon le protocole décrit par BRIGHENTE *et al.* (2007). Dans ce test les anti oxydants réduisent le DPPH ayant une couleur violette en un composé jaune en DPPH-H (diphényl picryl-hydrazine) (figure 14), dont l'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des anti oxydants à donner des protons (SANCHEZ - MORENO, 2002 ; PISOSCHI *et al.*, 2009). La lecture se fait à 517 nm. Le contrôle positif est représenté par une solution d'acide gallique comme un anti oxydant standard.

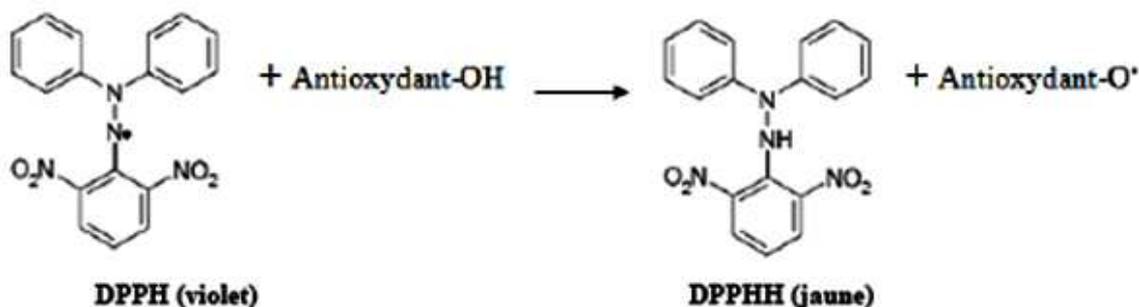


Figure 14: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.

Brièvement la solution du DPPH est préparée par solubilisation de 4mg de DPPH dans 100ml de méthanol. 50µl des solutions d'extraits phénoliques ou standards sont ajoutés à 2ml de DPPH. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 1heure et la décoloration par rapport au contrôle négatif est qui contient uniquement la solution de DPPH qu'on mesure à 517nm. Dans notre test le contrôle positif est représenté par une solution d'acide gallique synthétique comme un antioxydant standard.

Les concentrations des extraits phénoliques de l'olivier (pulpes, feuilles et margines) dans le milieu réactionnel, ainsi que celle de l'acide gallique utilisé comme témoin dans plusieurs tests, sont comprises dans une gamme de 10 à 100µg/ml.

La diminution de l'absorbance est évaluée par l'IC50 (quantité équivalente en extrait qui neutralise 50% du DPPH.). Une IC50 faible correspond à une activité antioxydante ou anti radicalaire élevée de l'extrait. Le pourcentage de l'activité anti radicalaire est estimé par la formule suivante :

% d'activité anti radicalaire (IC50)= [(Absorbance à 517nm du contrôle - Absorbance à 517nm de l'échantillon) / Absorbance à 517nm du contrôle] x100.

Pour mieux caractériser le pouvoir antiradicalaire, deux autres paramètres sont introduits :

- **Calcul de l'EC50** qui prend en considération la concentration de DPPH dans le milieu réactionnel [concentration effective à 50%, EC50= (IC50/mg de DPPH/ml)].

La valeur de chaque EC50 exprime la concentration des extraits phénoliques adéquate pour réduire 50% de DPPH en solution (LOZIENE, 2007).

Ce paramètre a été introduit par BRAND-WILLIAMS et ses collaborateurs et a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats, il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (BRAND-WILLIAMS *et al*, 1995 ; LOŽIENE *et al*, 2007).

- **Calcul du pouvoir antiradicalaire APR** qui est inversement proportionnel à l'IC50 (APR=1/EC50) (PRAKASH *et al*, 2007).

1.4. Tests microbiologiques :

1.4.1. Les milieux de cultures utilisés et préparation des pré-cultures:

- **Les milieux de cultures de base :**

Les milieux utilisés sont le milieu CAM (Coconut Agar Medium) milieu de choix pour l'étude à la fois de la croissance et la production d'aflatoxines et le milieu PDA (Pomme de terre, dextrose, Agar) milieu de repiquage des deux souches permettant la longue durée de conservation des souches. Les protocoles de préparation des milieux sont donnés dans l'annexe 2.

- **Préparation des pré-cultures (spores) :**

Pour la standardisation de l'inoculum de départ, une méthode photométrique (ATWAL, 2003 ; ANONYME 2, 2008) est employée.

A partir d'une culture de moisissure pure sur milieu PDA, les spores sont raclées à l'aide d'une ancre, l'ancre est déchargée dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9% additionnée de 0,1 % de tween 80 stérile selon la méthode de LOPEZ-MALO *et al*. (2002).

La suspension de spores est homogénéisée ; l'opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland ou à une densité optique comprise entre 0,08 à 0,1 lue à 625nm. La densité mesurée à 625nm est équivalente à 1×10^8 spores/ml. L'inoculum peut être ajusté s'il est trop dense avec de l'eau physiologique stérile. A partir de la on effectue une série de dilutions afin d'obtenir la charge de spores voulue pour les essais.

La densité de spores peut être aussi confirmée par comptage sur cellule de Malassez (ANONYME 2, 2008).

1.5. Etude de l'influence des composés et des extraits phénoliques sur la croissance et la production d'Aflatoxines par *A. flavus* et *A. parasiticus*:

1.5.1. Tests antifongiques :

- **Test préliminaire :**

Les extraits phénoliques sont obtenus dans du méthanol, la toxicité de ce dernier a été testé vis-à-vis de ces deux souches. Un contrôle sans solvant (méthanol) a été effectué en parallèle. Le diméthylsulfoxyde (DMSO) est utilisé comme milieu non toxique en remplacement du méthanol.

- **Préparation des composés phénoliques:**

Des quantités appropriées des polyphénols (les acides vanillique, caféique (Acide 3,4 dihydroxy benzoïque), gallique, l'oleuropéine et les tannins) sont testées dans les mêmes conditions que les extraits phénoliques, c'est à dire diluées préalablement dans du méthanol pour la méthode des disques, dans du DMSO pour la méthode de contact direct.

Des solutions phénolique de 0,01%, 0,1%, et 1% ont été préparées pour les composés phénoliques choisis comme polyphénols individuels alors que pour les extraits phénoliques obtenus à partir des feuilles, des pulpes et des margines, les concentrations utilisées sont celles des polyphénols contenus dans les extraits et sont respectivement 16,78 mg/ml, 7,49 mg/ml et 2,62 mg/ml.

A partir des solutions mères de composés phénoliques et d'extrait phénolique de feuilles, pulpes et margines diluées au milieu CAM, une gamme de concentrations a été testée, celle -ci comprend les concentrations de 0,1%, 1% et 2,5% pour la méthode de contact direct.

- **Tests du pouvoir anti fongique des composés phénoliques et des extraits phénoliques:**

Pour l'étude de l'activité antifongique des CP et des extraits phénoliques, deux méthodes ont été utilisées :

-La méthode de diffusions sur gélose ou méthode des disques est la plus utilisée pour faire des tests d'antibiogrammes (ANONYME 2, 2008). Des disques de papier Whatman n°3 de 6 mm de diamètre sont imprégnés de CP standards individuellement ou d'extrait phénolique jusqu'à saturation (50µl). Les disques sont séchés jusqu'à évaporation du solvant (méthanol) puis stérilisés sous UV à 254 nm pendant 45 min et déposés aseptiquement à la surface du milieu test CAM semi solide pré-ensemencé avec 10^4 spores/ml des souches cibles (*Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*) et coulés en boîtes de Pétri.

Les boîtes sont mises à incuber à 28°C, pendant 72 heures. L'activité antifongique est appréciée par la mesure du diamètre des zones d'inhibition autour des disques (KORUKLUOGLU *et al*, 2007). Les zones d'inhibitions circulaires correspondent à une absence de culture (REMIC, 1999 ; ANONYME 2, 2008 ; ARCHAMBAUD, 2009).

-La deuxième méthode est celle de contact direct (MISHRA et DUBEY, 1994 ; BELGHAZI *et al*, 2002). Les CP et extraits phénoliques ont été solubilisés dans du DMSO (LAHLOU, 2004 ; ALAM et MOSTAHAR, 2005).

Des quantités appropriées des composés phénoliques et des extraits phénoliques (feuilles, pulpes, margines) ont été ajoutées au milieu de culture sélectionné CAM stérile encore liquide pour obtenir les concentrations de 0,1%, 1% et 2,5%.

Le volume du milieu de culture est de 20 ml/boîte, les CP ainsi que les extraits phénoliques sont ajoutés au milieu de culture à la température de 56°C (SUBRAHMANYAM *et al*, 2001).

Les souches testées sont incubées pendant 7 jours à 28°C ±02°C.

Des boîtes sont préparées en parallèle avec des milieux dépourvus d'extrait phénolique, il s'agit des milieux témoins.

Après solidification, 10µl d'une suspension de spores de 10⁶ spores/ml de souches testées est déposée au centre à l'aide d'une micropipette dans un puits de 5 mm de diamètre creusé à l'aide d'un capillaire en verre au centre du milieu de culture.

Le suivi de la croissance se fait en mesurant chaque jour le diamètre des cultures formées en mm, jusqu'à l'observation d'un début de sporulation ou envahissement total de la boîte.

Pour évaluer l'effet des composés et des extraits phénoliques sur la croissance des souches tests, la mesure du diamètre des cultures est effectuée ainsi que l'estimation du pourcentage d'inhibition par rapport un témoin sans CP ou extraits phénoliques selon la formule suivante décrite par de VIVEK *et al*, (2008) :

$$\% \text{ d'inhibition} = \{1 - \text{DP (mm)} / \text{DT (mm)}\} \times 100$$

DP : Diamètre des cultures traitées par les composés et les extraits phénoliques.

DT : Diamètre des cultures témoins non traitées par les composés et les extraits phénoliques.

- **Détection et confirmation de la production d'aflatoxines des souches tests après traitement avec les composés et les extraits phénoliques par UV et par CCM :**

-Screening par UV :

Les aflatoxines possèdent une fluorescence propre qui permet de les détecter généralement dans l'UV lointain à 365nm. A cette longueur d'onde, elles sont fluorescentes : couleur bleue pour les Aflatoxines B (Blue), verte pour les aflatoxines G (Green). Le screening témoin est réalisé à partir des souches tests *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* producteurs d'aflatoxines. Ces souches ont été ensemencées au niveau central du milieu gélosé à base d'extrait de noix de coco déchiqueté (CAM), favorable à la production d'aflatoxines (DAVIES *et al*, 1987 ; PAULA *et al*, 2009).

La détection de la fluorescence sur le milieu de culture à base de noix de coco CAM, est réalisée selon la technique décrite par DAVIS *et al.* (1987) et FENTE *et al.* (2001).

De même le screening de la production d'aflatoxines des deux souches *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* dans le milieu CAM contenant les composés et extraits phénoliques est effectué. En effet après 7 jours d'incubation sur milieu CAM, les cultures obtenues par la méthode du test par contact direct des extraits phénoliques et composés phénoliques sont soumises au rayonnement UV à 366nm pour le screening de la production d'aflatoxines. Les couleurs verte et bleue permettent de distinguer la production d'aflatoxines G et B respectivement.

-Screening par chromatographie sur couche mince (CCM) :

- **Extraction des aflatoxines du milieu de culture :**

La confirmation de la production des Aflatoxines est réalisée par chromatographie sur couche mince (CCM). Les cultures des isolats sur milieu CAM à différentes concentrations de CP et d'extraits phénoliques obtenu par la méthode de contact direct ont subi une extraction au méthanol selon la méthode décrite par CALVO *et al.* (2004) avec quelques modifications. Six disques de 6mm de diamètre (environ 0,5g) de milieu colonisé par le mycélium sont découpés à l'aide d'une pipette pasteur stérilisée, pesés puis écrasés à l'aide d'une spatule. Les aflatoxines sont extraites avec 1ml de méthanol dans des eppendorfs. La macération dure 1 à 2 heures, les extraits sont obtenus après centrifugation des échantillons à 12 000 tours pendant 15 minutes. Les surnageants (extraits) sont récupérés puis conservés à +4°C dans des eppendorfs préalablement stérilisés. Ces étapes sont effectuées à l'abri de la lumière.

- **Détection par CCM :**

La chromatographie sur couche mince est une technique de séparation des constituants d'un mélange complexe par entraînement à l'aide d'une phase mobile (solvant) le long d'une phase stationnaire (Gel de silice), en se basant sur le phénomène d'adsorption et de partage. La méthode utilisée pour la détection des aflatoxines par CCM est celle décrite par l'A.O.A.C (Official Methods of Analysis) (2000). Des plaques (20 x 20cm, 0,20mm d'épaisseur) de gel de silice-60 254F ont été utilisées. Le solvant de développement est un mélange de chloroforme /acétone (90/10, v/v) (CALVO *et al.*, 2004 ; ROMINA *et al.*, 2008 ; ROCHA VILELA *et al.*, 2009).

Des fractions de 15 à 25 µl sont appliquées soigneusement sous une lumière tamisée en évitant d'abimer la surface de chaque plaque. Ces précautions sont importantes pour l'obtention d'une bonne qualité de séparation des Aflatoxines. Un volume de 15µl d'extrait d'aflatoxine G, fourni par l'ENS a été utilisé comme témoin est appliqué en même temps que les extraits à analyser. Le développement des chromatogrammes est effectué dans une cuve (25x25x10cm) préalablement saturée avec le système de solvant de développement. Après migration, les plaques sont retirées et séchées. Les aflatoxines sont détectées en plaçant les plaques sous lumière UV (366nm).

Les Aflatoxines B et G apparaissent sous forme de tache bleue et verte respectivement. Une comparaison des rapports frontaux (R_f) des extraits avec ceux des témoins et de l'intensité de la fluorescence des taches permet de confirmer la présence d'aflatoxines et d'apprécier les quantités produites.

Résultats et Discussion

2.1. Analyse des extraits phénoliques :

2.1.1. Résultats du dosage des polyphénols totaux :

Le dosage spectrophotométrique par le réactif de Folin–Ciocalteu a permis de déterminer la teneur totale des polyphénols dans les pulpes d'olive, feuilles et margines. Les résultats obtenus du dosage des PP sont représentés dans le tableau VI et par la figure 15. Ces résultats ont été quantifiés par référence à l'acide gallique pris comme le polyphénol standard ou de référence. Le nombre d'essai effectué est de 3.

Tableau VI: Résultats du dosage des polyphénols totaux (PPT) des extraits d'olivier à partir de la pulpe d'olives, des feuilles et des margines d'*Olea europea* L variété *chamlal* exprimés en équivalent en acide gallique (mgEAG/g) et (gEAG/100g), les valeurs sont la moyenne de 3 essais.

Extraits	PPT (mgEAG/g)	PPT (gEAG/100g)
Feuilles	[16,78 ± 1,02]	[1,678 ± 0,102]
Pulpe	[7,49 ± 0,31]	[0,749 ± 0,031]
marginé	[2,62 ± 0,30]	[0,262 ± 0,030]

Les teneurs en PP enregistrées montrent des proportions allant de 0,1 à 1 % (figure16). Les teneurs enregistrées en équivalent d'acide gallique sont de : [1,678 ± 0,102] g, [0,749 ± 0,031] g et [0,262 ± 0,030] / 100g de matériel végétal, respectivement avec les extraits de feuilles, pulpes et enfin des margines. L'extrait des feuilles constitue la fraction phénolique la plus importante avec [1,678 ± 0,102] / 100g de feuilles suivie de celle de la pulpe avec [0,749 ± 0,031] / 100g de pulpes. Les teneurs les plus basses ont été obtenues avec les margines avec [0,262 ± 0,030]/100g.

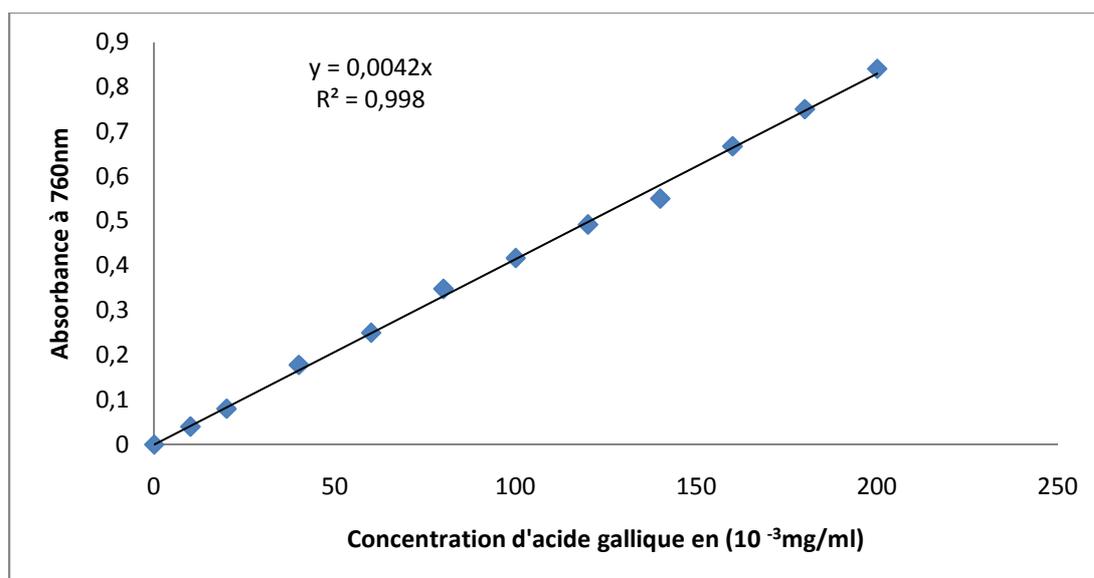


Figure 15: Courbe étalon obtenue en fonction de la concentration de l'acide gallique et des densités optiques à 760nm.

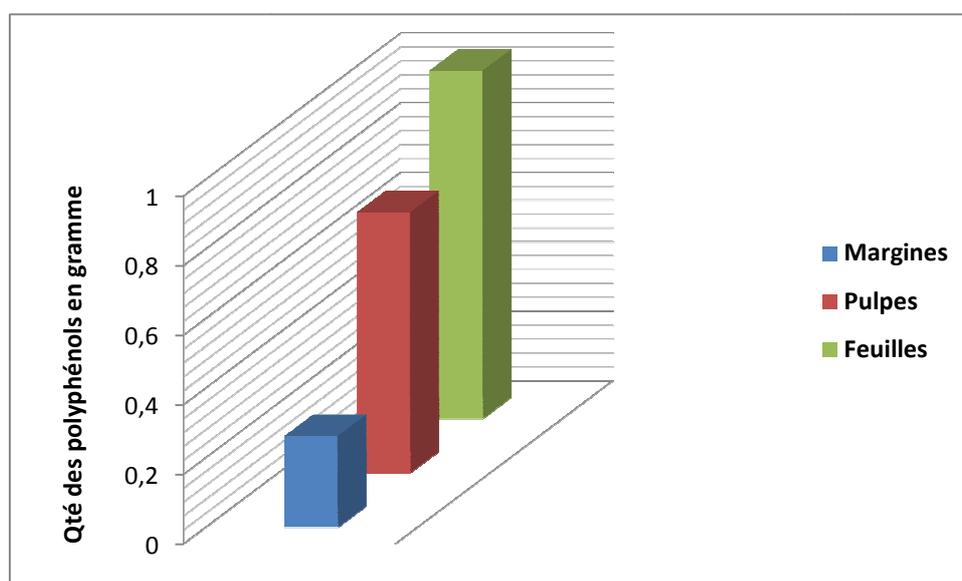


Figure 16 : Teneur en polyphénols totaux (g/100g de matière végétale)

La teneur en polyphénols des feuilles de *chamlal* est supérieur à celles des variétés *Chemlali* et *Chemchali* de Tunisie qui est de l'ordre de 1,40 g/100 g de poudre de feuilles rapportées par BOUDHRIOUA *et al.* (2009). La même teneur est trouvée par MOLINA ALCAIDE ET NEFZAOU (1996) rapporté par BOUDHRIOUA *et al.* (2009) pour la variété *Picual* d'Espagne. Alors que les feuilles d'olivier des variétés *Chetoui* et *Zarrazi* de Tunisie présentent une teneur bien supérieur en PP représenté par $2,32 \pm 0,11$ et $2,01 \pm 2,01$ g /100 g de poudre de feuilles respectivement. Toutefois, la concentration trouvée reste dans la gamme rapportée par SILVA *et al.* (2006) qui est de 1,17- 4,01g/100g de poudre de feuilles.

La teneur en polyphénols des margines de la variété *chamlal* [$2,62 \pm 0,30$] g/l obtenue est presque équivalente à celle trouvée dans les margines de la province de Benevento (Italie) qui est de 2,5g/l (DE MARCO *et al.*, 2007) utilisant le même protocole d'extraction.

La teneur en PP des pulpes de la variété de *chamlal* qui est de [$7,49 \pm 0,31$] mg EAG/g de pulpe est plus importante que celles des espèces d'oliviers cités dans les données bibliographiques. Ainsi pour les variétés d'Italie et Espagne on note $2,5 \pm 0,11$ à $4,3 \pm 0,25$ mg EAG/g de pulpe (VASILEIOS ZIOGAS *et al.*, 2010). Tandis que des taux élevés de PP ont été trouvés dans les olives vertes de la variété *chemlali* de Tunisie (BOUAZIZ *et al.*, 2004 cité par VASILEIOS ZIOGAS *et al.*, 2010).

La variation de la teneur en PPT est souvent considérable elle est dépendante de plusieurs facteurs : des conditions climatiques et géographiques (MYLONAKI *et al.*, 2008 ; VASILEIOS ZIOGAS *et al.*, 2010), des variétés d'olivier, des conditions de culture et du degré de maturation (BOUDHRIOUA *et al.*, 2009 ; VASILEIOS ZIOGAS *et al.*, 2010), de l'état physiologique et l'âge de la plante (DE LEONARDIS *et al.*, 2008).

Plusieurs études ont montré la contribution considérable de ces facteurs liés à l'altitude sur la voie de biosynthèse des composés phénoliques sur divers variétés d'oliviers. (VASILEIOS ZIOGAS *et al.*, 2010). Comme exemple avec la variété *Amfissis* (Konservolia) de Grèce, cultivée à 10 et 300mètres d'altitude, la teneur en composés phénoliques au stade des olives vertes est de $2,5 \pm 0,11$ mg (EAG/g d'olives) à 10 et 300 mètres d'altitudes, cette teneur diminue au stade des olives pourpres avec une teneur de $1,9 \pm 0,05$ mg/g. Alors qu'elle augmente au stade des olives noirs à 300 mètres d'altitudes avec une teneur de $2,9 \pm 0,16$ mg/g en comparaison à celle obtenue à 10 mètres d'altitudes qui est de $2,3 \pm 0,15$ mg/g. BOUAZIZ *et al.* (2004) ont noté une augmentation des composés phénoliques dans l'olive de la variété *Chemlali* de Tunisie au dernier stade de maturation à 10 et 300 mètres d'altitude.

De plus, le rendement d'extraction dépend de la polarité du solvant utilisé, qui détermine la quantité, la qualité des composés phénoliques extraits et de la classe des phénols dans le matériel végétal (NACZK et SHAHIDI, 2004 ; SINEIRO *et al.*, 2008).

Des études ont rapportés que les hauts rendements sont habituellement obtenus avec l'éthanol et le méthanol et leurs mélanges avec l'eau. En effet l'eau joue un rôle important dans le processus d'extraction des PP en augmentant leur diffusion des tissus végétaux (ALUOK *et al.*, 2008). D'après, SAVARESE *et al.* (2007), CHEW *et al.* (2009), le méthanol est le solvant de choix pour l'extraction des PPT à partir des fruits, végétaux et huiles. Grâce à sa polarité et sa capacité à réduire l'activité des polyphénol-oxydases, ce solvant a prouvé son efficacité d'extraire les PPT simples (RYAN *et al.*, 2001 ; ABAD-GARCIA *et al.*, 2007).

Quand à l'acétate d'éthyle, c'est un solvant très sélectif pour les molécules de bas (180 Da) et moyen (13KDa) poids moléculaire (OBEID *et al.*, 2005).

De plus, AIT BADDI *et al.* (2008) ont démontré que l'acétate d'éthyle exerce lui aussi un haut pouvoir d'extraction. Il contribue aussi à l'élimination des fractions protéiques, glucidiques et acides organique qui peuvent interférer avec l'extrait phénolique

L'utilisation de l'hexane ou le chloroforme n'augmente pas la concentration des PPT dans l'extrait mais elle permet d'éliminer la fraction lipidique du matériel végétal (MICHAÏLOF *et al.*, 2008).

Le facteur temps d'extraction est considérablement important. En effet un temps long augmente la possibilité d'oxydation des CP, à moins que des agents réducteurs sont ajoutés dans le système d'extraction comme l'acide ascorbique et bisulfite à raison de 2% (NACZK et SHAHIDI, 2004 ; OBEID *et al.*, 2005).

La méthode de Folin-Ciocalteu a été choisie pour doser les polyphénols pour les raisons suivantes :

C'est une méthode qui satisfait aux critères de faisabilité et de reproductibilité, la disponibilité du réactif de Folin et la méthode est bien standardisée, la grande longueur d'onde (760nm) d'absorption du chromophore permet de minimiser les interférences avec la matrice d'échantillon qui est souvent colorée, c'est un test largement pratiqué dans les laboratoires de recherche à travers le monde (Huang *et al.*, 2005).

Les teneurs des PPT déterminées ne sont pas des mesures absolues des quantités des phénols du matériel de départ, elles sont en fait, basées sur la capacité réductrice relative à une capacité réductrice équivalente à l'acide gallique (EAG). Les valeurs obtenues par la méthode colorimétrique fournissent des informations directes sur la quantité des groupes phénoliques antioxydants de l'extrait qui dépend essentiellement du nombre des groupes hydroxyles de ces derniers (BALASUNDRAM *et al.*, 2006).

2.2.Résultat du test in vitro de l'activité antioxydante :

2.2.1.Effet scavenger du radical DPPH :

L'activité anti oxydante des différents extraits d'oliviers (feuilles, pulpes et margines) est évaluée en suivant la réduction du radical DPPH qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517nm.

Les profils d'activité anti radicalaire obtenus (figure 17) révèlent que les l'extraits d'oliviers (feuilles, pulpes, margines) possèdent une activité anti radicalaire dose dépendante. Les valeurs des IC50 des différents extraits ont été déterminées et confinées dans le tableau VII.

LOZIENE *et al.*(2007) ont rapporté que la concentration en polyphénols totaux est corrélée significativement avec la capacité antioxydante évaluée généralement par le test de DPPH.

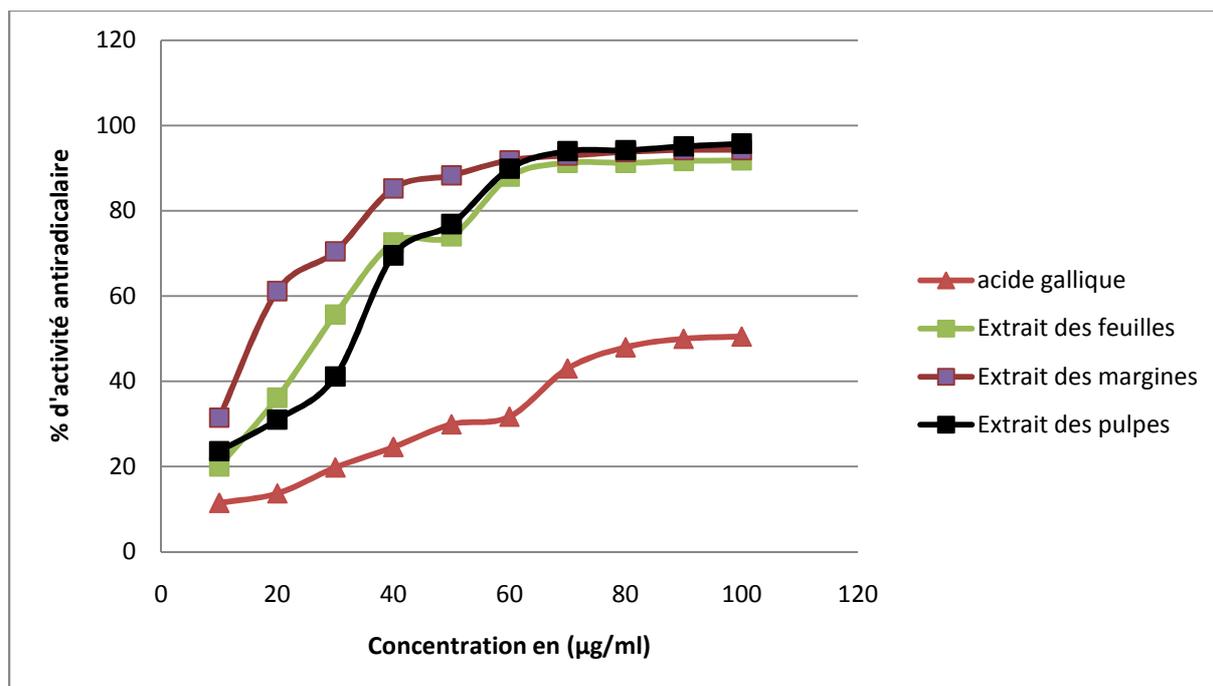


Figure 17: Activité antiradicalaire des extraits d'oliviers et de l'acide gallique

(chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD)

Pour mieux caractériser le pouvoir antiradicalaire, deux paramètres sont introduits et présentés dans le tableau VII:

- **Calcul de l'EC50** qui prend en considération la concentration de DPPH dans le milieu réactionnel [concentration effective à 50%, $EC50 = (IC50/mg \text{ de DPPH/ml})$]. La valeur de chaque EC50 exprime la concentration des extraits phénoliques adéquate pour réduire 50% de DPPH en solution (LOZIENE *et al.*, 2007).
- **Calcul du pouvoir antiradicalaire APR** qui est inversement proportionnel à l'IC50 ($APR = 1/EC50$).

Tableau VII: L'activité antiradicalaire des extraits phénoliques et de l'acide gallique.

L'extrait	IC50 (µg/ml)	EC50(µg/ml)	ARP
Feuilles	26,85 \pm 0,21	0,67 \pm 0,005	1,49 \pm 0,014
Pulpes	28,75 \pm 0,22	0,72 \pm 0,005	1,38 \pm 0,152
Margines	16,33 \pm 0,47	0,41 \pm 0,012	2,44 \pm 0,070
Acide gallique	99 \pm 11,57	2,47 \pm 0,29	0,43 \pm 0,047

Les valeurs représentent la moyenne de trois mesures \pm SD.

Parmi les trois extraits d'oliviers, l'extrait des margines représente l'extrait le plus actif avec une IC50 de l'ordre de $16,33 \pm 0,47 \mu\text{g/ml}$ et une APR de $2,44 \pm 0,070$, cette activité est deux fois plus importante que l'acide gallique utilisé comme témoin, suivie par les feuilles avec une IC50 de $26,85 \pm 0,21 \mu\text{g/ml}$ et une APR de $1,49 \pm 0,014$ et enfin l'extrait des pulpes d'olives avec une IC50 de l'ordre de $28,75 \pm 0,22$ et une APR de $1,38 \pm 0,152$ (figure 18).

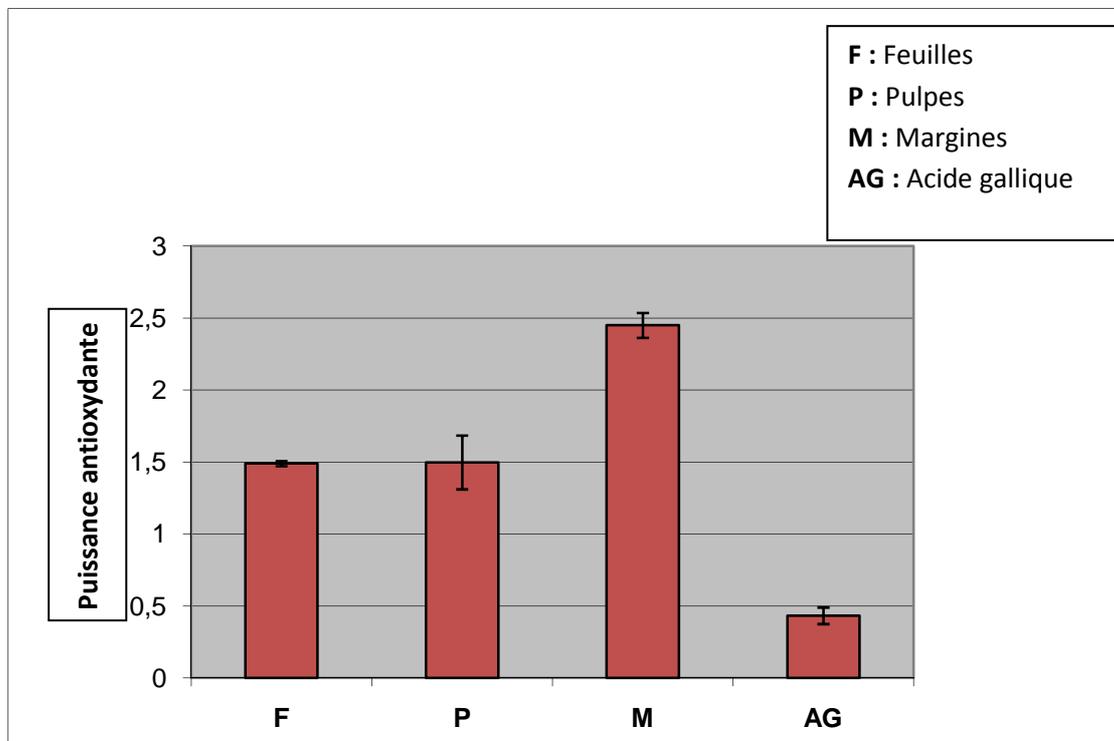


Figure 18 : Histogramme des APR des extraits phénoliques et de l'acide gallique.

L'acide gallique a été utilisé comme référence, son activité anti radicalaire a été longuement étudiée, en raison de sa large répartition dans les espèces végétales, beaucoup d'études ont montré son efficacité anti radicalaire d'où son utilisation comme modèle dans les tests antioxydants, en effet l'acide gallique a montré une activité anti radicalaire envers plusieurs radicaux tels l'anion superoxide, les radicaux hydroxyles, l'oxygène singulet et les radicaux peroxydes et protège les cellules des dommages induits par les UVB ou les irradiations ionisantes (RICHARDS et ADAMS, 1987; MASAKI *et al*, 1994, 1995a, 1995 b ; SAWA *et al*, 1999). Selon YOU-CHENG HSEU *et al*. (2008), l'activité anti radicalaire en utilisant des concentrations de 25 à 100 $\mu\text{g/ml}$ diminue selon l'ordre suivant vitamine C > acide gallique > Trolox. Le Trolox étant la référence la plus utilisée pour l'étude de l'activité antioxydante de diverses substances biologiques (BENAVENTE-GARCIA *et al*, 2000 ; SILVA *et al*, 2006).

Ces résultats de l'activité antioxydante des extraits phénoliques peuvent s'expliquer par la différence de la composition phénolique de ces extraits. En effet la capacité de réduction des radicaux libres est largement influencée par la composition phénolique de l'échantillon (CHEUNG *et al*, 2003 ; YOU-CHENG HSEU *et al*, 2008) .

RODI *et al.* (2002) ont rapportés qu'après extraction de l'huile d'olive, moins de 2% des composés phénoliques de fruit se retrouvent dans celle-ci et plus de 98% passent dans les margines appelé aussi eaux de végétation, par conséquent, ce résidu peut être considéré comme une source importante de ces composés. La qualité et la quantité des polyphénols contenue dans les margines dépendent de plusieurs facteurs qui sont en général d'ordre géographique, variétal, saisonnier et le mode d'extraction.

Parmi les composés phénoliques des margines, selon DE MARCO *et al.* (2007), le plus abondant et très intéressant de point de vue nutritionnel est l'hydroxytyrosol [2-(3, 4-dihydroxyphényl) éthanol : HT], largement étudié et ses propriétés antioxydantes et pharmacologiques ont été démontrées. Dans les margines, le HT se présente à l'état libre (monomère), sous forme lié (oleuropéine, verbascoside) et sous forme glycosylée (OBEID *et al.*, 2007). Un autre composé phénolique simple identifié dans les margines est le 3, 4-dihydroxyphénylglycol (DHPG), de structure similaire à celle de HT mais avec présence d'un groupe hydroxyle supplémentaire et doué des propriétés antioxydantes (LIMIROLI *et al.*, 1996).

Les composés phénoliques des fruits et des feuilles de la famille de l'*Olea europea* varient quantitativement et qualitativement durant les processus de développement et de maturation (BOUDHRIOUA *et al.*, 2009). Les feuilles constituent un autre sous produit de l'industrie oléicole, qui a été exploré comme source de composés phénoliques. Selon DE LEONARDIS *et al.* (2008), la composition phénolique des feuilles est similaire à celle des olives, l'oleuropéine et autres sécoiridoïdes sont les principaux composés. La concentration de l'oleuropéine dans les feuilles est significativement plus élevée que dans le fruit ou dans l'huile (SCHEFFLER *et al.*, 2008).

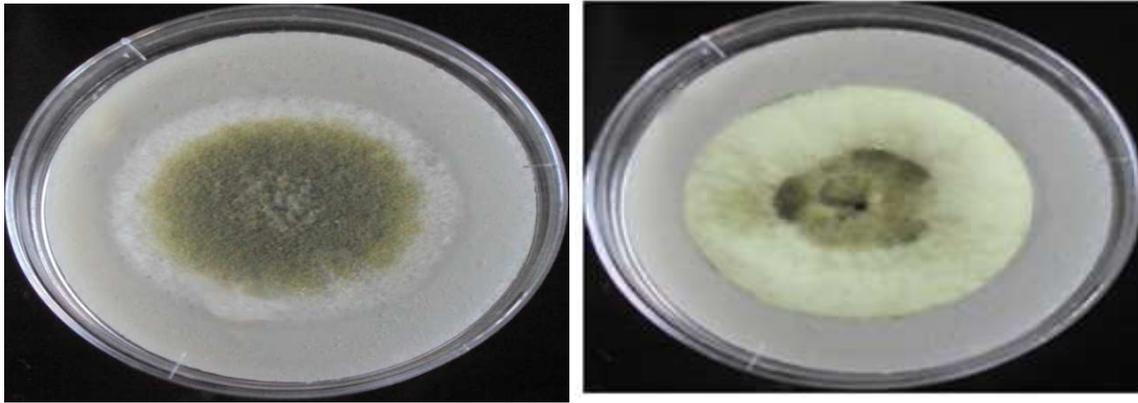
Il existe donc des différences quantitatives et qualitatives en composition phénolique des feuilles, de fruits (olives) et les sous produits issus de l'industrie oléicole ce qui peut expliquer la différence de l'activité antioxydante des extraits obtenus.

2.3. Tests microbiologiques :

2.3.1. Les résultats des tests préliminaires :

- **Détection de la fluorescence sur milieu CAM des souches tests :**

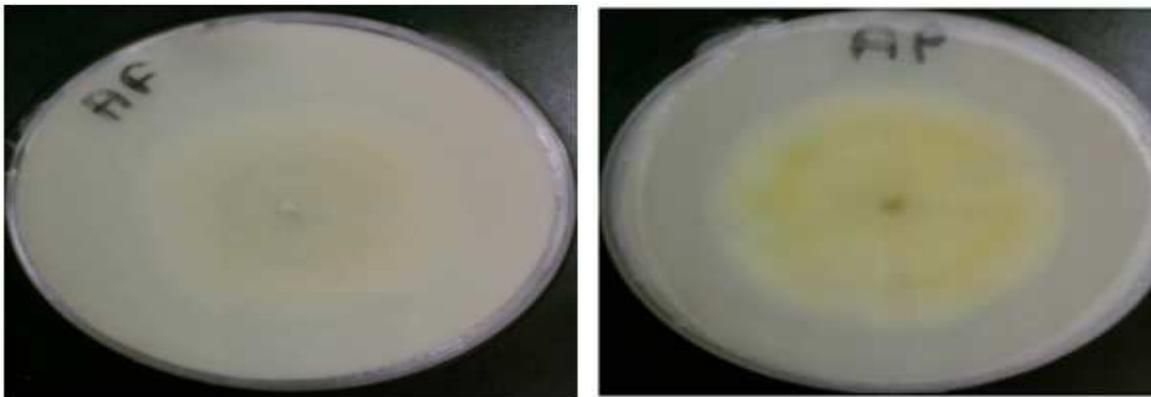
Dans le milieu CAM, les Aflatoxines, combinées aux matières grasses de noix de coco, donnent une fluorescence visible sous UV (366nm) surtout sur le revers du mycélium. En effet, après 72 heures d'incubation à 28°C, les souches tests productrices d'aflatoxines B et G développent autour du mycélium une fluorescence bleue et verte respectivement, visibles sous lumière UV à 366nm et un revers de la colonie jaune orangé visible à la lumière du jour. Après 7 jours d'incubation les résultats obtenus sont consignés dans la figure 19.



a)

b)

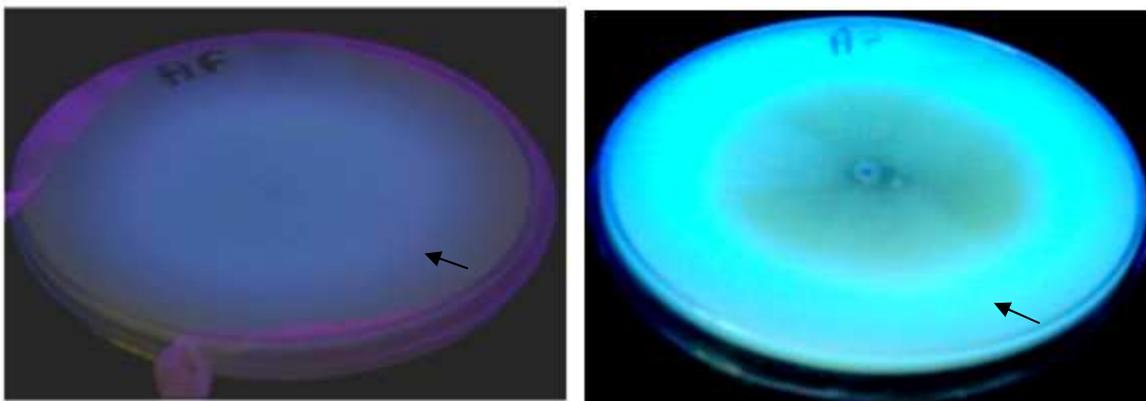
Culture d'*Aspergillus flavus* (a) et *Aspergillus parasiticus* (b) après 7 jours d'incubation sur milieu CAM à 28 °C.



c)

d)

Revers jaune orangé (observé à l'œil nu). Culture d'*Aspergillus flavus* (c) et *Aspergillus parasiticus* (d) après 7 jours d'incubation sur milieu CAM à 28 °C.



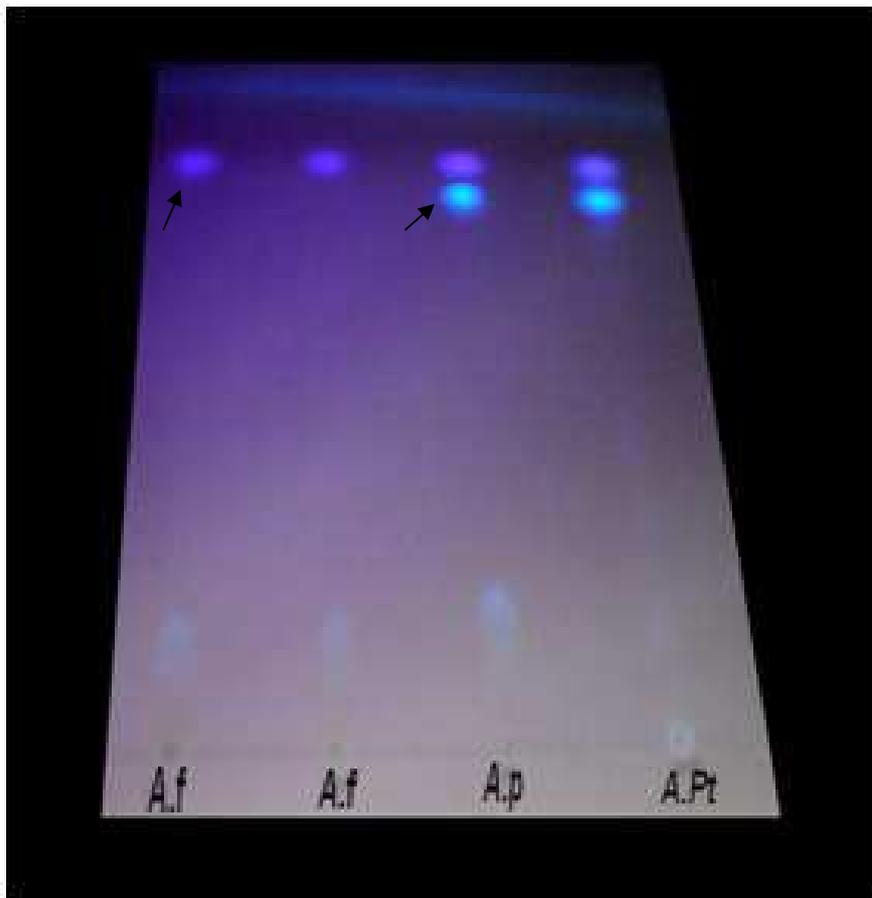
e) fluorescence bleue à (366nm)

f) fluorescence bleu vert à (366nm)

Figure 19: Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV à 366nm de la production des aflatoxines des souches tests d'*Aspergillus flavus* et d'*Aspergillus parasiticus* sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à 28° ± 02C.

- **Etude du pouvoir producteur d'aflatoxines par les deux souches tests *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* par CCM :**

Une extraction des aflatoxines a été effectuée afin de confirmer la production de celles-ci par ces deux souches après 7 jours d'incubation. Observée par UV sur milieu CAM à 366nm cette fois la confirmation ce fera par CCM (figure 20).



Af : *A. flavus* test
Ap : *A. parasiticus* test
APt : *A. parasiticus*
témoin

Figure 20 : photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extraits d'aflatoxines des deux souches tests *A. flavus* et *A. parasiticus*. Par chromatographie sur gel de silice (révélation à l'UV)

Le chromatogramme photographié sous lampe UV à 366 nm montre des spots de couleurs différentes, qui sont séparés après développement de la plaque par le biais du système de solvant (Chloroforme / Acétone : 90/10, v/v)

Les taches bleues correspondent aux aflatoxines B (B1 et B2), alors que les taches vertes correspondent aux aflatoxines G (G1 et G2). Rappelons que *Aspergillus flavus* produit les aflatoxines B (B1 et B2) et que *Aspergillus parasiticus* produit les quatre aflatoxines B (B1 et B2 ; G1 et G2).

- **Résultat du test de toxicité du méthanol avec la méthode de contact direct :**

Si les extraits doivent être soumis aux essais biologiques, la toxicité du solvant peut également être critique car même en traces, le solvant ne doit pas interférer dans l'activité biologique. L'attention devrait également être prêtée aux interactions possibles entre le solvant et les corps dissous pendant que le solvant peut réagir avec certains composés pour produire des complexes ou pour causer la décomposition, la déshydratation ou l'isomérisation de ces composés (YRJÖNEN, 2004).

Le test préliminaire avec les solvants (méthanol et DMSO) a été réalisé dans le but de choisir le solvant approprié qui ne présente aucun effet sur la croissance normale des souches à tester.

Les résultats de la toxicité du méthanol avec la méthode des disques sont regroupés dans le Tableau VIII. L'effet du méthanol par la méthode de contact direct sur les deux souches est représenté dans la figure 21.

Tableau VIII: Influence du solvant sur la croissance d'*Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* avec la méthode de contact direct.

Solvant	Souche sur CAM sans solvant (Témoin)	Souche sur CAM avec DMSO		Souche sur CAM avec méthanol	
		0,1ml	1ml	0,1ml	1ml
Concentration du solvant/20ml de CAM	0	0,1ml	1ml	0,1ml	1ml
Diamètre et Sporulation d' <i>Aspergillus flavus</i>	60mm (+++)	60mm (+++)	60mm (+++)	20mm (0)	4mm (0)
Sporulation d' <i>Aspergillus parasiticus</i>	60mm (+++)	60mm (+++)	60mm (+++)	15mm (0)	5mm (0)

Durée d'incubation 7 jours

(+++): Forte sporulation.

(0): Absence de sporulation visible.

Au vu des résultats obtenus, le méthanol exerce une certaine répression sur la croissance et la sporulation des deux souches tests avec une concentration de 0,1ml /20ml de CAM, il ya influence sur le développement normal des deux souches mais aussi sur l'apparition des spores. L'inhibition de la croissance ainsi que de la sporulation est presque de 100% pour une concentration de 1ml /20ml de CAM (figure21). Avec le DMSO la souche croit normalement par rapport au témoin sans solvant avec les mêmes diamètres mesurés durant la croissance avec une sporulation abondante jusqu'à l'envahissement de toute la boite en dépassant la durée d'incubation (plus de 7 jours).

D'après ces résultats, il convient d'utiliser la méthode qui consiste à additionner directement les composés et extraits phénoliques dans le milieu de culture. Les composés phénoliques nécessitant un solvant de récupération et de dissolution, le DMSO a été sélectionné comme solvant de choix vu les résultats satisfaisant du test préliminaire avec ce dernier (figure 22).

Le **diméthylsulfoxyde** (DMSO) est un solvant organique de formule brute C_2H_6OS . C'est un liquide incolore qui est utilisé en chimie et en pharmacutique pour sa capacité à solubiliser de nombreux solvants organiques, mais également des sels du fait de sa forte polarité. Il présente également des propriétés anesthésiques et anti-bactériennes (PAUL *et al*, 2000).

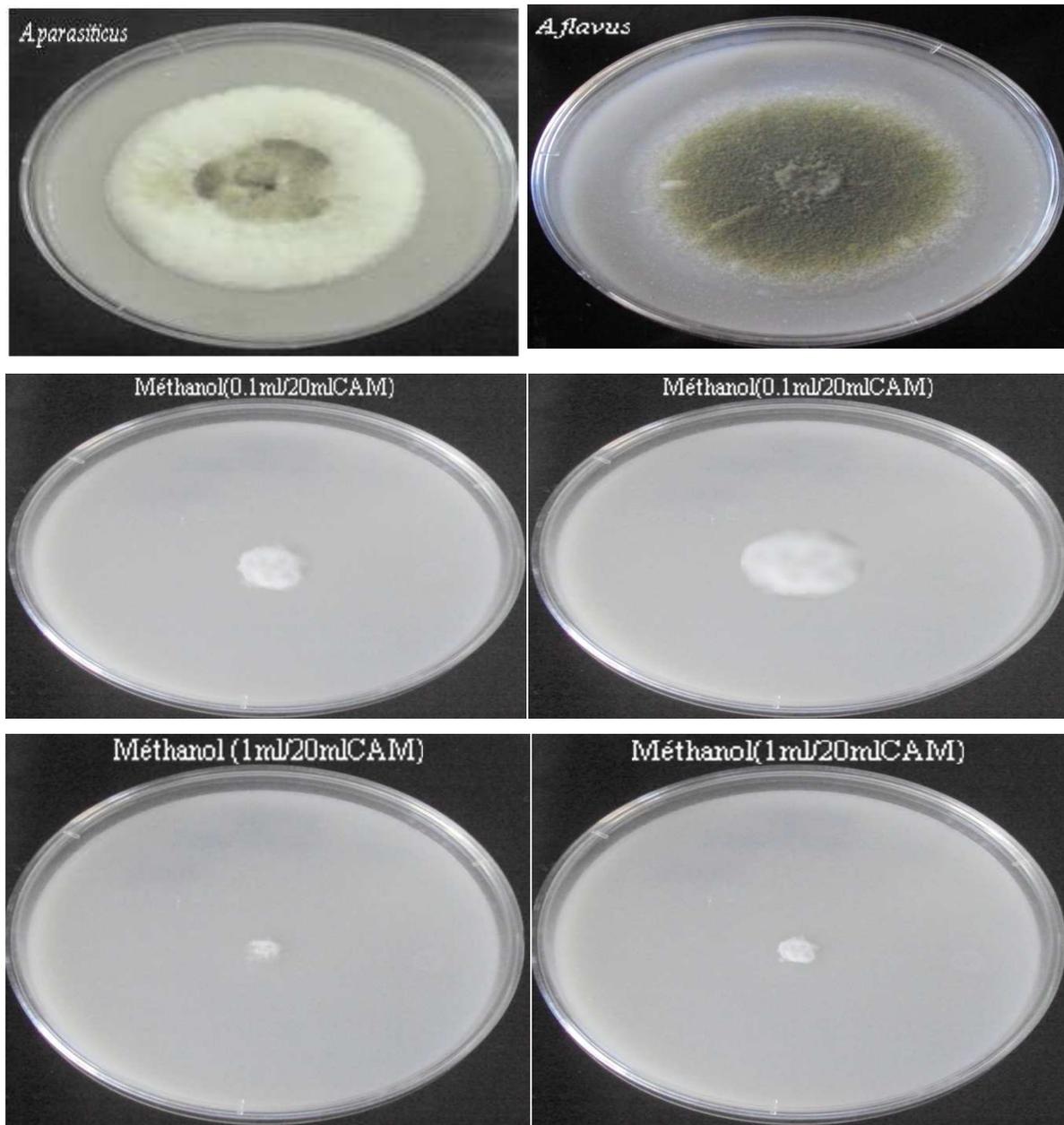


Figure 21: Aspect des deux souches tests *A. flavus* et *A. parasiticus* après traitement avec le méthanol sur milieu CAM Après 7 jours d'incubation à $28 \pm 02^\circ C$.

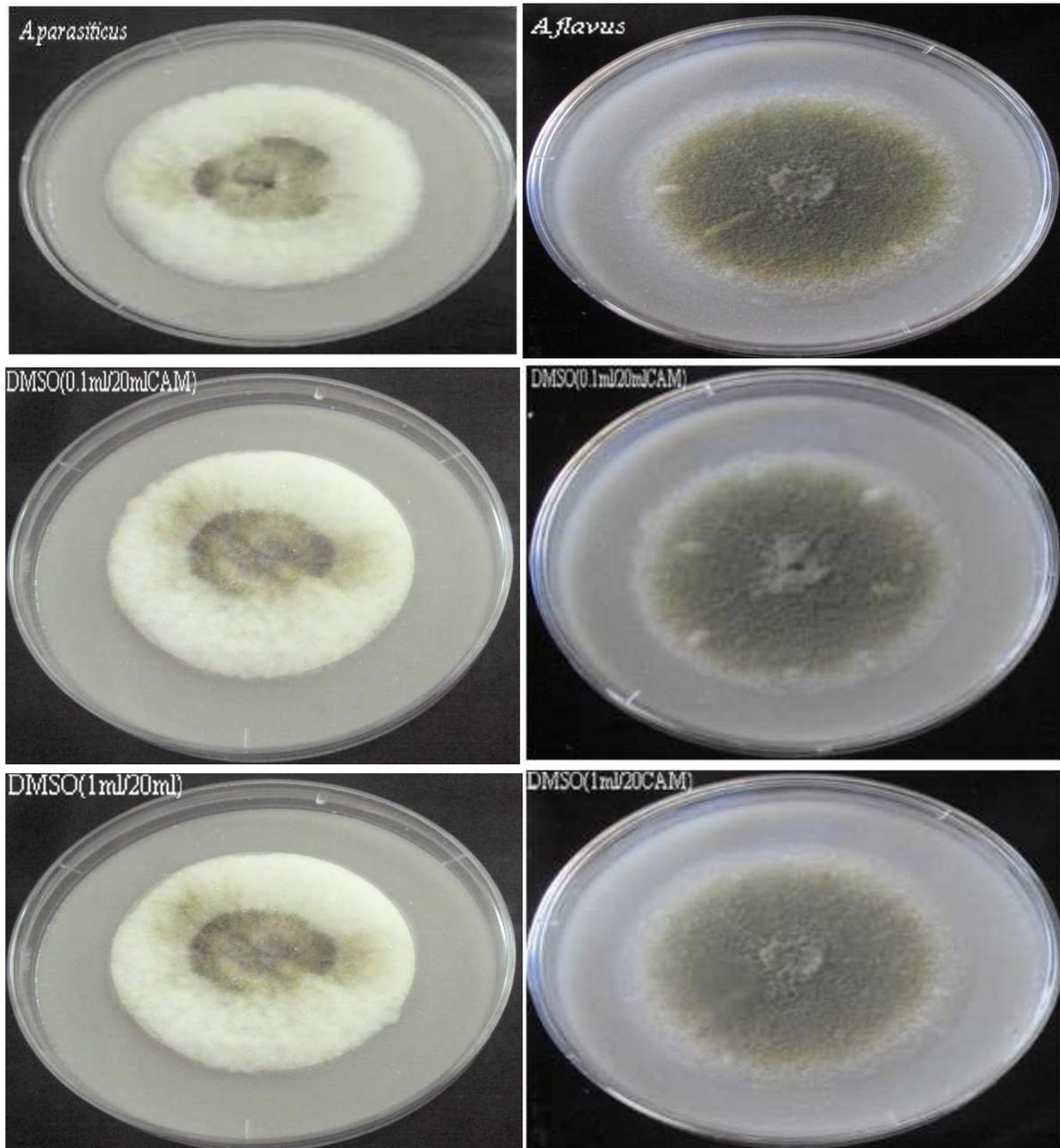


Figure 22: Aspect des deux souches tests *A. flavus* et *A. parasiticus* après traitement avec le DMSO sur milieu CAM Après 7 jours d'incubation à $28 \pm 0.2^\circ\text{C}$.

2.3.2. Résultats du test antifongique des extraits et composés phénoliques avec la méthode des disques :

La figure 23 et le tableau IX donne les résultats obtenus sur la capacité antifongique des composés et des extraits phénoliques utilisés dans le milieu de culture CAM. En effet les composés ainsi que les extraits phénoliques testés sur milieu CAM semi solide après 3 jours d'incubation ont montré une activité antifongique vis-à-vis des deux souches testées *A. flavus* et *A. parasiticus* à une concentration de 1% pour les composés phénoliques et aux concentrations obtenues lors du dosage de Folin-Ciocalteu pour les extraits phénoliques d'olivier (feuilles, pulpes, margines) et qui sont de $[16,78 \pm 1,02]$ mg/ml, $[7,49 \pm 0,31]$ mg/ml et $[2,62 \pm 0,30]$ mg/ml respectivement.

Après 7 jours d'incubation un envahissement total des boites par les spores a été observé.

Aux concentrations inférieures à 1%, il n'y a pas d'activité antifongique observée et les résultats obtenus sont inférieurs à celles obtenus par KORUKLUOGLU *et al.* (2007) avec l'acide caféique et l'oleuropéine sur un autre milieu qui est le milieu PDA.

En effet avec l'acide caféique les diamètres d'inhibitions obtenus par KORUKLUOGLU *et al.* (2007) sont de $12 \pm 1,7$ mm et $11 \pm 1,6$ mm avec deux souches d'*A. flavus*, l'une est issue d'olives en conserve et l'autre des noisettes respectivement et $12 \pm 1,5$ mm avec une souche d'*A. parasiticus* issue d'olives en conserve. Avec l'oleuropéine les diamètres des zones d'inhibitions sont de $12 \pm 1,3$ mm et $16 \pm 0,9$ mm avec les deux souches d'*A. flavus* respectivement et $16 \pm 2,4$ mm avec la souche d'*A. parasiticus*. Aucune zone inhibition n'a été observée avec l'acide caféique pour la souche d'*A. flavus* issue d'une variété de fromage et la souche d'*A. parasiticus* issue du pain. Aucune zone inhibition n'a été observée avec l'oleuropéine pour la souche *A. flavus* issue du fromage et la souche d'*A. parasiticus* issus du pain.

Avec une concentration de 30mg/ml l'extrait méthanolique de feuilles d'olivier d'*Olea europea* L. de Turquie, les zones d'inhibitions obtenues sont de $13 \pm 1,4$ mm avec la souche d'*A. flavus* issue d'olives en conserve. Aucune zone d'inhibition n'a été observée pour les souches d'*A. parasiticus* testées issues d'olive en conserve et du pain KORUKLUOGLU *et al.* (2007). Alors que la concentration de $[16,78 \pm 1,02]$ mg/ml de l'extrait méthanolique des feuilles d'olivier de la variété *chamlal* à montré une efficacité avec une zone d'inhibition de $12 \pm 1,2$ mm et cela pour les deux souches testées.

Ces différences peuvent s'expliquer par l'origine des souches testées, les différences des milieux de cultures utilisés et enfin les concentrations des composés inhibiteurs utilisés (ROBERT *et al.*, 2008).

Tableau IX: Zones d'inhibitions en (mm, moyenne \pm SD) des extraits phénoliques d'olivier (feuilles, pulpes, margines) et composés phénoliques testés sur les deux souches fongiques *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* sur CAM après 3 jours d'incubation (n=3)

Souches	Extraits phénoliques d'olivier Zone d'inhibition (mm)*			Vanilline en (%) Zone d'inhibition (mm)*			Acide caféique en (%) Zone d'inhibition (mm)*		
	P	F	M	0,01%	0,1%	1%	0,01%	0,1%	1%
<i>A. flavus</i>	13 \pm 2,4 (-)	12 \pm 1,2 (-)	NM (+/-)	N (+)	N (+)	9 \pm 0,9 (-)	N (+)	N (+)	10 \pm 1,2 (-)
<i>A. parasiticus</i>	13 \pm 2,4 (-)	12 \pm 1,2 (-)	NM (+/-)	N (+)	N (+)	10 \pm 1,2 (-)	N (+)	N (+)	10 \pm 1,2 (-)

Suite :

Acide gallique en (%) Zone d'inhibition (mm)*			Oleuropéine en (%) Zone d'inhibition (mm)*			Tannins en (%) Zone d'inhibition (mm)*		
0,01%	0,1%	1%	0,01%	0,1%	1%	0,01%	0,1%	1%
N (+)	N (+)	9 \pm 0,8 (-)	N (+)	N (+)	08 \pm 0,1 (-)	N (+)	N (+)	08 \pm 0,1 (-)
N (+)	N (+)	9 \pm 0,8 (-)	N (+)	N (+)	08 \pm 0,1 (-)	N (+)	N (+)	10 \pm 0,9 (-)

* : moyenne de 3 essais

P : extrait de pulpes, **F** : extrait de feuilles, **M** : extrait de margines, **NM** : zone d'inhibition non mesurable, **N** : pas d'inhibition, **(-)** : pas de sporulation, **(+)** sporulation.

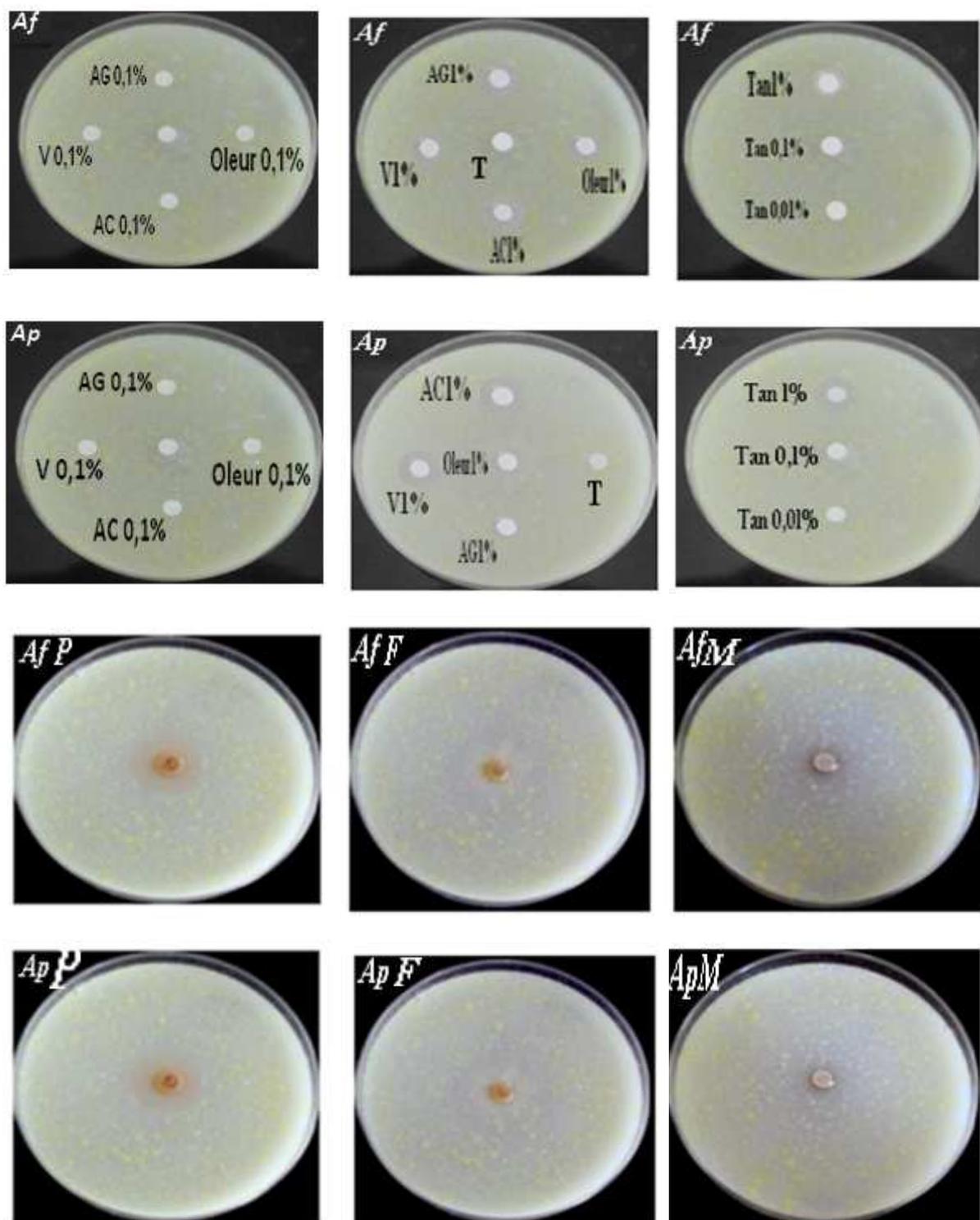


Figure 23 : Aspect de l'activité antifongique des extraits phénoliques synthétiques testés avec la méthode des disques sur milieu CAM semi solide après 3 jours d'incubation.

(*Af* : *A. flavus* , *Ap* : *A. parasiticus* , *T* : témoin sans extrait , *AC* : acide caféique , *V* : vanilline , *AG* : acide gallique , *Oleur* : oleuropéine , *Tan* : tannins , *F* : feuilles , *P* : pulpes, *M* : margines).

Au vu des résultats obtenus, le milieu CAM a été réservé pour le test de contact direct et la concentration choisie pour cette méthode est donc de 1% pour les composés phénoliques concentration qui a prouvée son efficacité antifongique alors que pour les extraits phénoliques d'oliviers (feuilles, pulpes et margines) nous conservant les mêmes concentrations obtenues lors du dosage de Folin-Ciocalteu.

2.3.3. Résultats du test de Mesure de l'activité des extraits et composés phénoliques sur les deux souches fongiques *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* par la méthode de contact direct sur milieu CAM :

2.3.3.1. Les composés phénoliques:

La figure (24,25) et le tableau X consignes les résultats obtenus sur l'effet des composés phénoliques pris individuellement sur la croissance des deux souches.

Les cinq polyphénols testés ; vanilline, acide caféique, acide gallique, oleuropéine et tannins sur milieu CAM ont exercés une action inhibitrice sur la croissance des deux souches de moisissures *A. flavus* et *A. parasiticus*. Cette activité antifongique est augmentée avec l'augmentation de la concentration, elle est dose dépendante.

La vanilline a un effet inhibiteur sur la croissance des deux souches et cela pour toutes les concentrations étudiées. Pour la concentration de 1% le pourcentage d'inhibition est de $16,66 \pm 2,88\%$ par rapport au témoin, celui ci augmente en augmentant les concentrations de la vanilline dans le milieu. En effet les concentrations de 1% et 2,5% semblent avoir un effet marqué sur l'inhibition de la croissance de ces deux souches avec des pourcentages de $32,77 \pm 0,78 \%$ et $66,10 \pm 0,95 \%$ pour *A. flavus*, $41,66 \pm 2,88 \%$ et $69,44 \pm 0,96 \%$ pour *A. parasiticus* respectivement par rapport aux témoins jusqu'à l'inhibition totale à des doses plus élevées. *Aspergillus parasiticus* semble être plus sensible à la vanilline qu'*Aspergillus flavus*. La figure 25 montre l'absence de sporulation chez *A. parasiticus* aux concentrations de 1% et de 2,5% de vanilline.

L'acide caféique semble aussi avoir un effet sur la croissance des deux souches (figure 26 et 27), cet effet augmente à des doses élevées de ce dernier dans le milieu. *A. parasiticus* semble avoir une sensibilité plus élevée vis-à-vis de l'acide caféique avec une absence de sporulation à la concentration de 2,5% avec un pourcentage d'inhibition de $79,99 \pm 2,88 \%$ et $66,10 \pm 0,95 \%$ chez *A. flavus*. Ces données sont consignées dans le tableau XI.

Selon les données illustrées dans les figures 28 et 29, l'acide gallique possède aussi une activité sur la croissance et la sporulation des deux souches pour toutes les concentrations étudiées, la concentration de 2,5% est celle qui donne les meilleurs résultats avec l'absence totale de sporulation chez les deux souches, donnant un aspect d'un mycélium en forme d'une petite motte de coton. Le pourcentage d'inhibition est de $66,10 \pm 0,95 \%$ pour *A. flavus*, alors qu'il est de $67,77 \pm 0,96 \%$ pour *A. parasiticus*. Ces données sont consignées dans le tableau XII.

Les figures 30 et 31 révèlent l'action de l'oleuropéine sur les deux souches. L'effet inhibiteur est donné par les trois concentrations étudiées 0,1%, 1% et 2,5%. En effet l'oleuropéine exerce un effet inhibiteur sur la croissance des deux souches qui est plus important à de 2,5% avec un taux d'inhibition de $66,66 \pm 2,88\%$. Une diminution de la sporulation à 0,1% est observée puis une absence totale aux concentrations de 1% et 2,5% pour les deux souches. Ces données sont consignées dans le tableau XIII.

Une évaluation de l'effet des tannins sur les deux souches a été effectuée. La toxicité des tannins vis-à-vis des microorganismes est un fait bien établi expérimentalement et qui concerne de nombreux domaines ; la pathologie végétale, les sciences du bois, des aliments du sol, la pharmacologie, la nutrition humaine et animale...elle a été mise en évidence soit par des expérimentations *in vitro* portant sur la réduction de la croissance des champignons filamenteux (y compris quelque fois un blocage ou ralentissement de la germination des spores) ou des colonies bactériennes, soit par approches biochimiques (action sur la respiration, l'activité de certaines enzymes...). Soit encore par corrélation entre résistance des espèces végétales et leur teneur en tannins (MACHEIX *et al.*, 2005).

En effet dans cette étude, les tannins ont montré un effet inhibiteur (figures 32 et 33) sur la croissance des deux souches, cet effet inhibiteur est plus marqué à des concentrations élevés en tannins le pourcentage d'inhibition est de $76,10 \pm 0,95\%$ pour *A. flavus* à la concentration de 2,5% alors qu'il est de $74,99 \pm 2,88\%$ pour *A. parasiticus*. Ces données sont consignées dans le tableau XIV. L'absence de sporulation a été aussi observée et ce pour toutes les concentrations étudiées (0,1%, 1% et 2,5%).

Un histogramme récapitulatif des pourcentages d'inhibitions des composés phénoliques (vanilline, acide caféique, acide gallique, oleuropéine et tannins) après 7 jours d'incubation est donné par la figure 34.

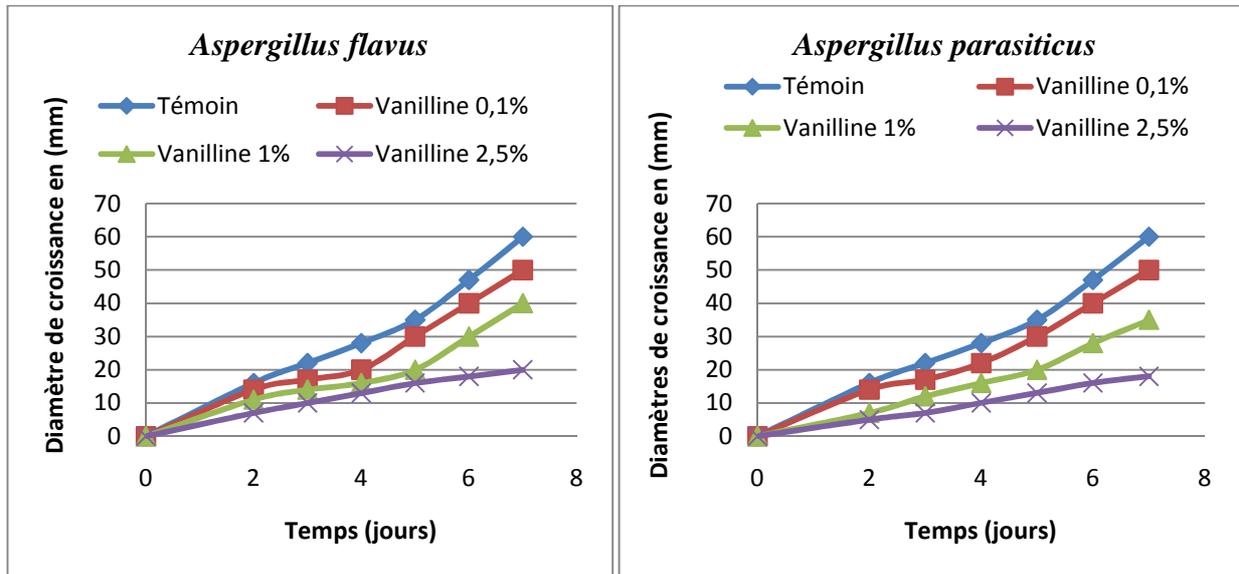
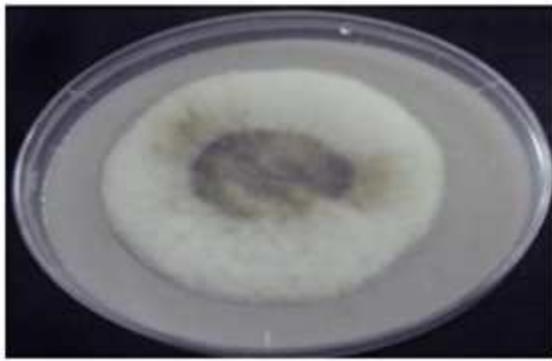


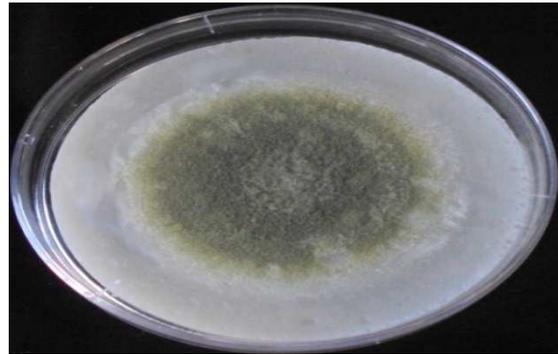
Figure 24 : Effet de la vanilline sur la croissance des deux souches *A. flavus* et *A. parasiticus* sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à $28 \pm 02^\circ\text{C}$.

Tableau X: Pourcentages (%) d'inhibition de la vanilline sur les deux souches *A. flavus* et *A. parasiticus*

Extrait/jours	1	2	3	4	5	6	7
Souche d'<i>A. flavus</i>							
Vanilline 0,1%	NM	10,41 ± 3,60	19,69 ± 5,24	28,57 ± 6,18	14,28 ± 4,94	13,77 ± 0,87	16,66 ± 2,88
Vanilline 1%	NM	31,25 ± 8,83	34,84 ± 2,14	42,85 ± 5,05	41,09 ± 1,34	35,45 ± 4,01	32,77 ± 0,78
Vanilline 2,5%	NM	54,16 ± 3,60	54,54 ± 7,87	52,38 ± 2,06	53,32 ± 3,30	60,99 ± 1,22	66,10 ± 0,95
Souche d'<i>A. parasiticus</i>							
Vanilline 0,1%	NM	10,41 ± 3,60	19,69 ± 5,24	22,61 ± 2,06	14,28 ± 4,94	14,18 ± 1,22	16,66 ± 2,88
Vanilline 1%	NM	54,16 ± 3,60	43,93 ± 2,62	41,66 ± 2,06	41,90 ± 3,29	39,71 ± 1,22	41,66 ± 2,88
Vanilline 2,5%	NM	66,66 ± 3,60	66,66 ± 5,24	64,28 ± 6,18	61,9 ± 1,64	65,24 ± 2,45	69,44 ± 0,96



**Témoin *A. p*
*parasiticus***



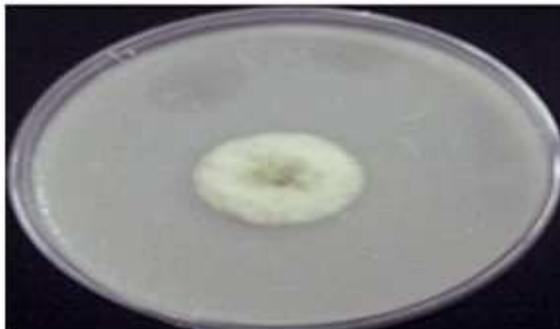
Témoin *A. flavus*



Vanilline 0,1%



Vanilline 0,1%



Vanilline 1%



Vanilline 1%



Vanilline 2,5%



Vanilline 2,5%

Figure 25: Aspect des deux souches tests en présence de la vanilline à différentes concentrations sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à 28°C.

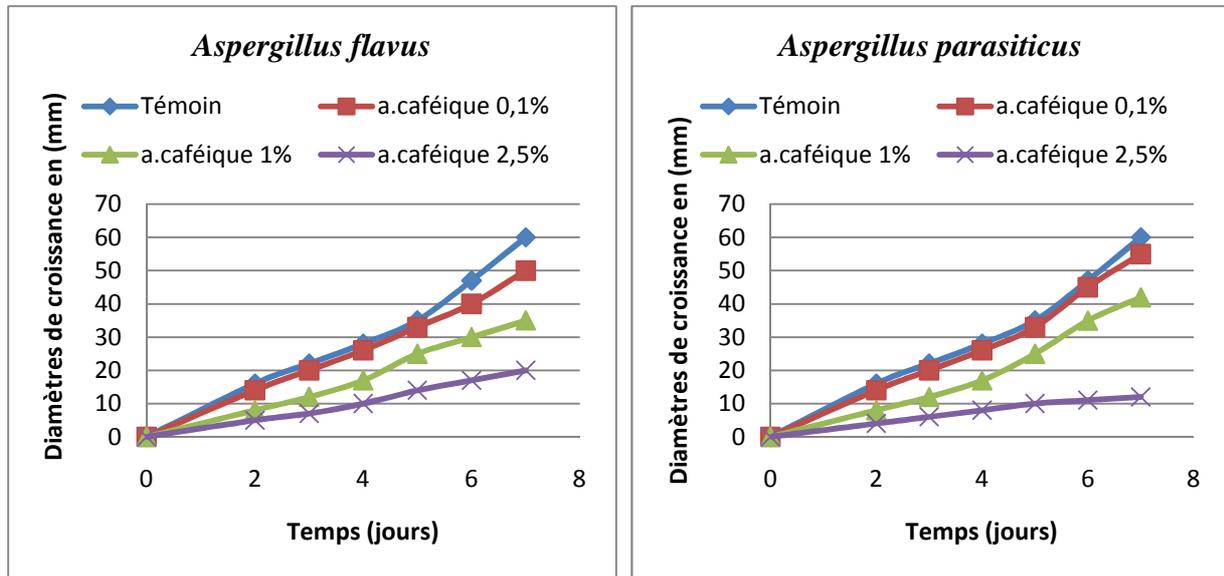
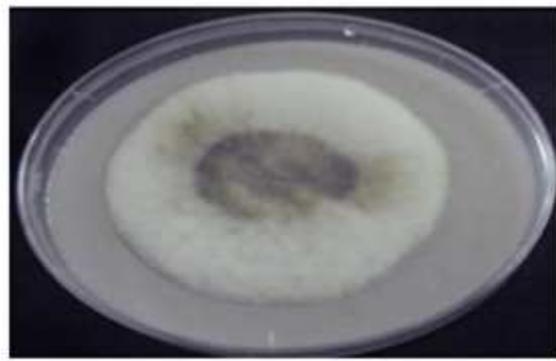


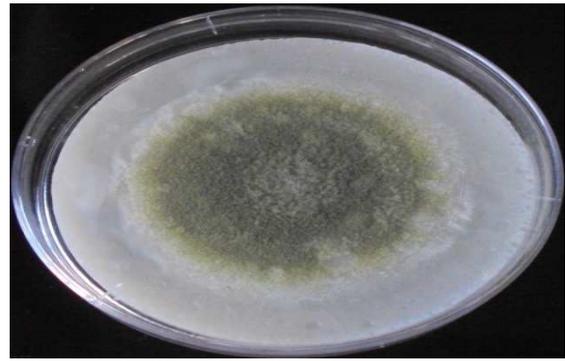
Figure 26: Effet de l'acide caféique sur la croissance des deux souches *A. flavus* et *A. parasiticus* sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à $28 \pm 02^\circ\text{C}$.

Tableau XI: Pourcentages (%) d'inhibition de l'acide caféique sur les deux souches *A. flavus* et *A. parasiticus*

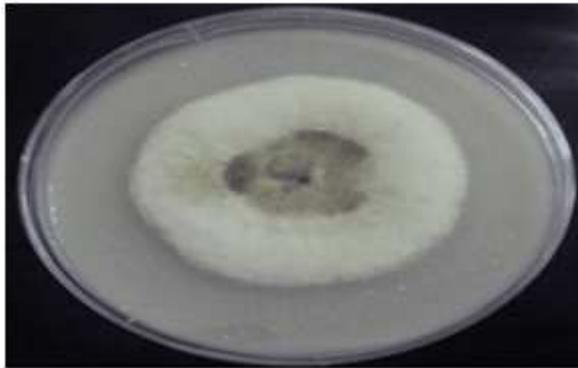
Extrait/jours	1	2	3	4	5	6	7
Souche d'<i>A. flavus</i>							
a.caféique 0,1%	NM	10,41±7,21	9,09± 00	7,14±6,18	5,71±4,94	14,18 ± 1,22	16,10 ± 0,95
a.caféique 1%	NM	47,91±3,60	43,93±2,62	39,28±6,18	27,61±1,65	35,46 ± 1,22	41,10 ± 0,95
a.caféique 2,5%	NM	66,66±3,60	66,66±2,62	63,09±2,06	59,04±1,65	63,11 ± 1,22	66,10 ± 0,95
Souche d'<i>A. parasiticus</i>							
a.caféique 0,1%	NM	10,41±7,21	9,09±00	7,14± 6,18	4,75± 3,30	3,54 ± 1,22	7,77 ± 0,96
a.caféique 1%	NM	47,91±3,60	43,93±2,62	39,28±6,18	27,61± 1,65	24,82 ± 1,22	29,44 ± 0,96
a.caféique 2,5%	NM	72,91±3,60	71,20±2,62	70,23±2,06	70,47± 1,64	75,91 ± 1,17	79,99 ± 2,88



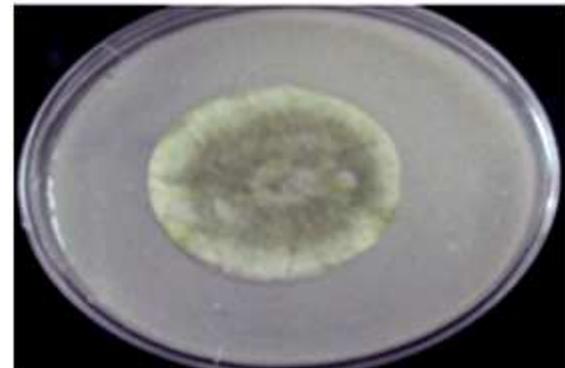
Témoin *A. parasiticus*



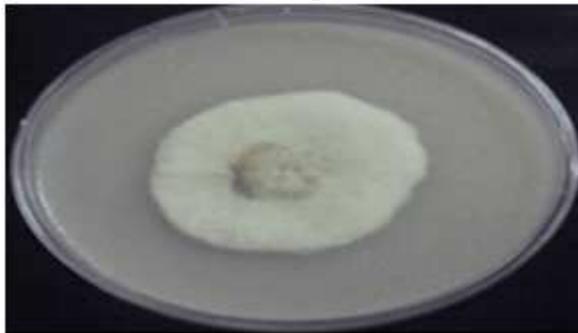
Témoin *A. flavus*



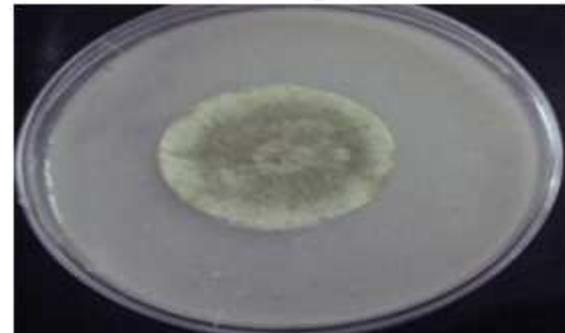
Acide caféique 0,1%



Acide caféique 0,1%



Acide caféique 1%



Acide caféique 1%



Acide caféique 2,5%



Acide caféique 2,5%

Figure 27: Aspect des deux souches tests en présence de l'acide caféique à différentes concentrations sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à 28°C.

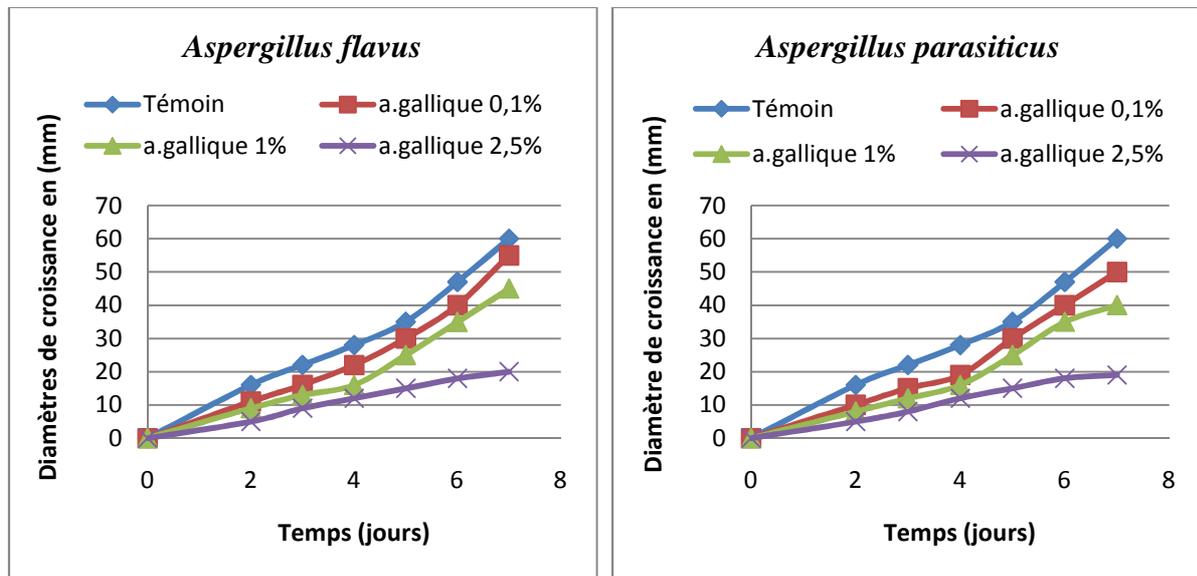


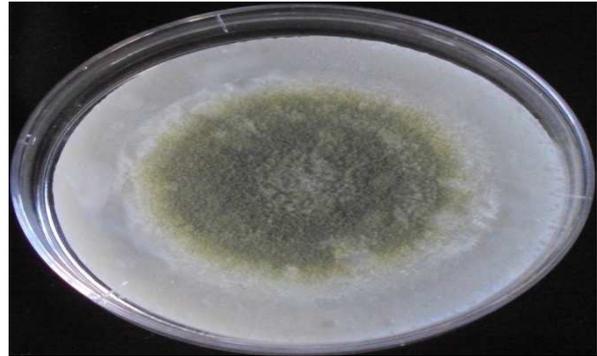
Figure 28 : Effet de l'acide gallique sur la croissance des deux souches *A. flavus* et *A. parasiticus* sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à $28 \pm 02^\circ\text{C}$.

Tableau XII: Pourcentages (%) d'inhibition de l'acide gallique sur les deux souches *A. flavus* et *A. parasiticus*

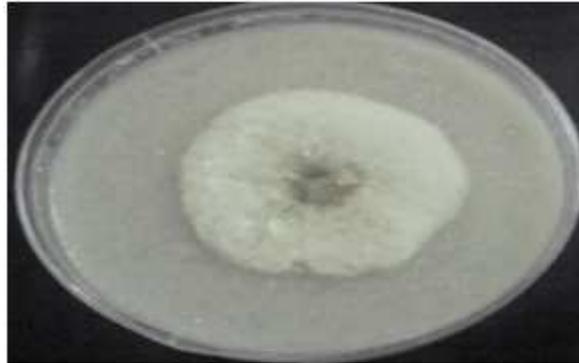
Extrait/jours	1	2	3	4	5	6	7
Souche d'<i>A. flavus</i>							
a.gallique 0,1%	NM	29,16±3,60	25,75±2,62	20,23±2,06	15,47±2,06	14,18±1,22	8,33±2,88
a.gallique 1%	NM	41,66±3,60	39,26±2,82	41,66±2,06	27,61±1,65	24,82±1,22	24,99±2,88
a.gallique 2,5%	NM	66,66±3,60	57,57±2,62	55,95±2,06	56,18±1,65	60,99±1,22	66,10±0,95
Souche d'<i>A. parasiticus</i>							
a.gallique 0,1%	NM	35,41±3,60	30,29±2,62	30,95±2,06	27,61±1,65	24,82±1,22	16,10±0,95
a.gallique 1%	NM	47,91±3,60	43,93±2,62	41,66±2,06	41,9±1,64	35,46±1,22	32,77±0,96
a.gallique 2,5%	NM	66,66±3,60	62,11±2,62	55,95±2,06	56,18±1,65	60,99±1,22	67,77±0,96



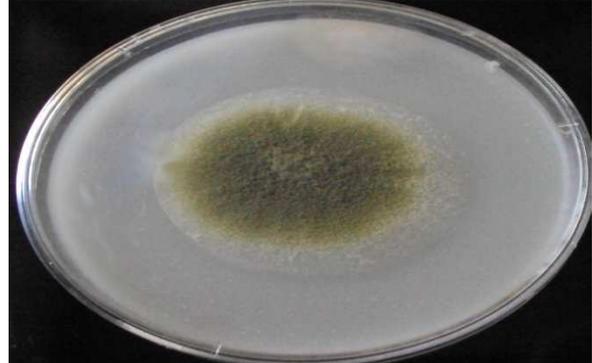
Témoin *A. parasiticus*



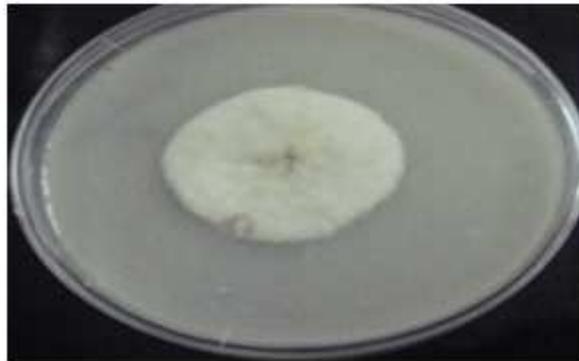
Témoin *A. flavus*



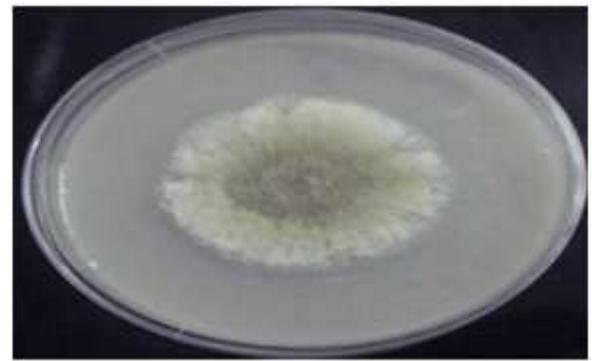
Acide gallique 0,1%



Acide gallique 0,1%



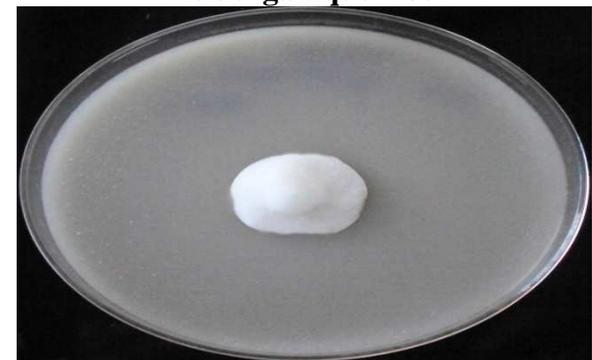
Acide gallique 1%



Acide gallique 1%



Acide gallique 2,5%



Acide gallique 2,5%

Figure 29: Aspect des deux souches tests en présence de l'acide gallique à différentes concentrations sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à 28°C.

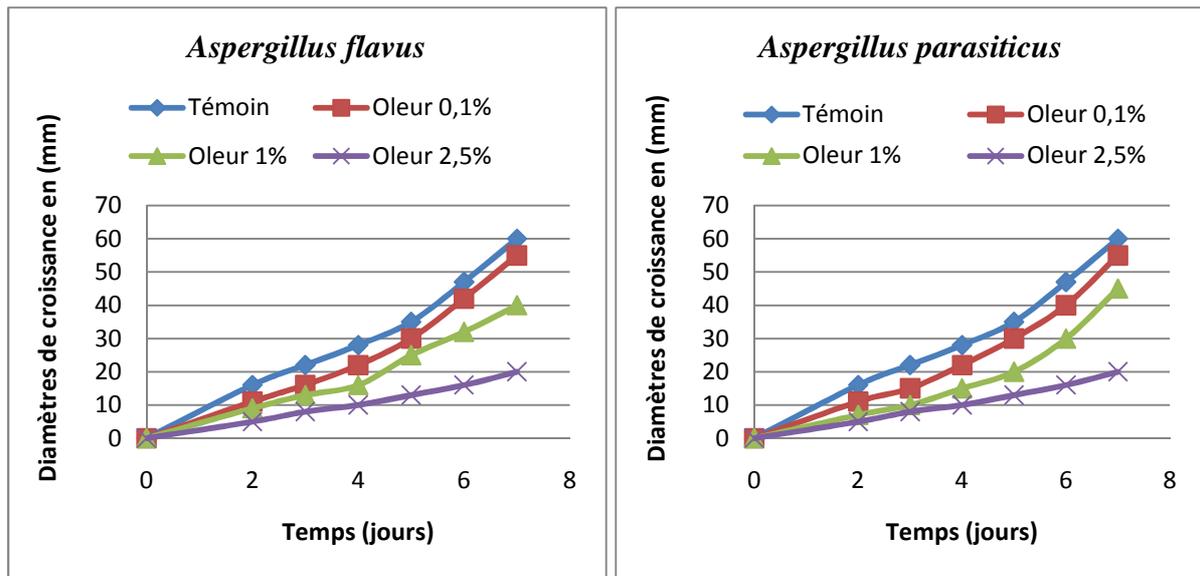


Figure 30: Effet de l'oleuropéine sur la croissance des deux souches *A. flavus* et *A. parasiticus* sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à $28 \pm 02^\circ\text{C}$.

Tableau XIII: Pourcentages (%) d'inhibition de l'oleuropéine sur les des deux souches *A. flavus* et *A. parasiticus*

Extrait/jours	1	2	3	4	5	6	7
Souche d'<i>A. flavus</i>							
Oleuropéine 0,1%	NM	29,16±3,60	25,75±2,62	22,61±2,06	13,32±1,65	9,92±1,22	8,83±2,88
Oleuropéine 1%	NM	41,66±3,60	39,38±2,62	41,66±2,06	27,61±1,61	31,2±1,22	33,33±2,88
Oleuropéine 2,5%	NM	66,66±3,60	62,11±2,62	64,28±6,18	61,9±1,64	65,24±1,22	66,66±2,88
Souche d'<i>A. parasiticus</i>							
Oleuropéine 0,1%	NM	29,16±3,60	30,29±2,62	20,23±2,06	13,32±1,65	14,04±1,13	8,33±2,88
Oleuropéine 1%	NM	54,16±3,60	53,02±2,62	45,23±2,06	41,9±1,64	35,46±1,22	33,33±2,88
Oleuropéine 2,5%	NM	66,66±3,60	62,11±2,62	63,09±2,06	61,9±1,64	65,24±1,22	66,66±2,88

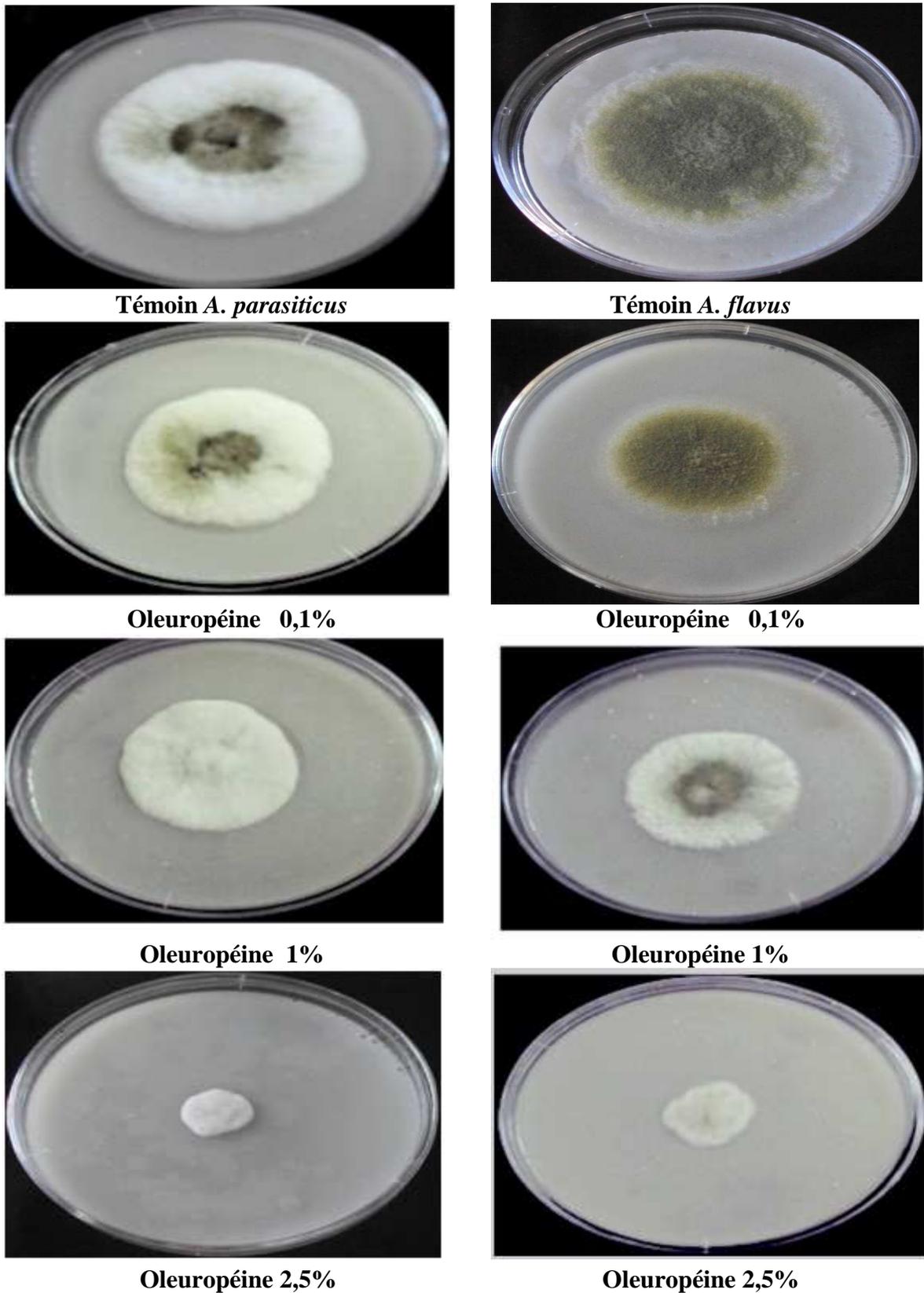


Figure 31: Aspect des deux souches tests en présence de l'Oleuropéine à différentes concentrations sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à 28°C.

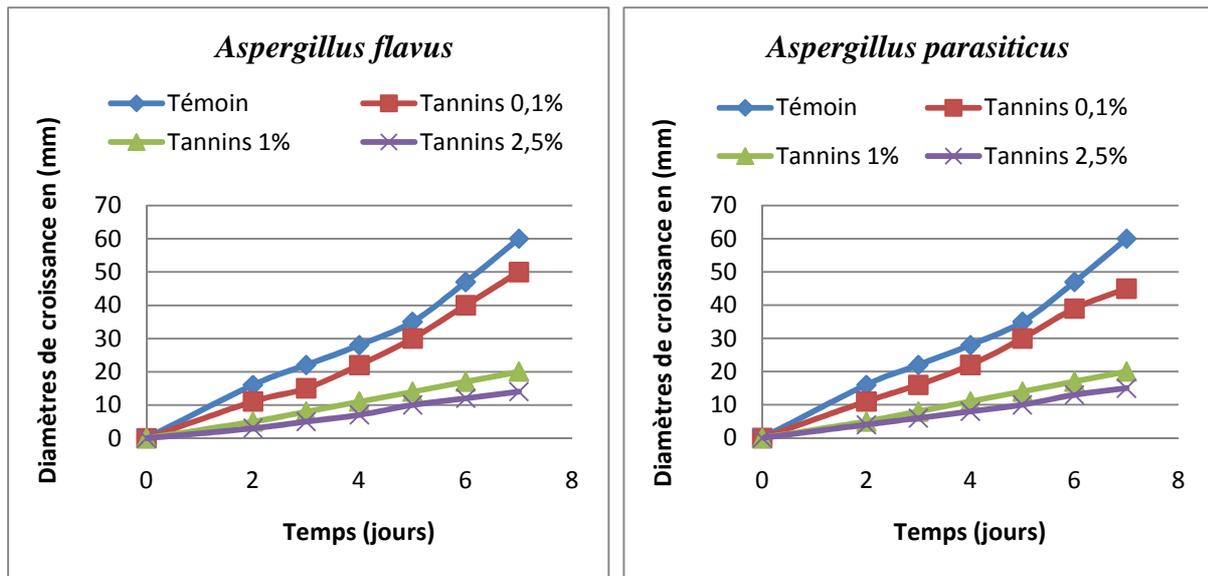


Figure 32: Effet des tannins sur la croissance des deux souches *A. flavus* et *A. parasiticus* sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à $28 \pm 02^\circ\text{C}$.

Tableau XIV: Pourcentages (%) d'inhibition des tannins sur les deux souches *A. flavus* et *A. parasiticus*

Extrait/jours	1	2	3	4	5	6	7
Souche d'<i>A. flavus</i>							
Tannins 0,1%	NM	29,16±3,60	30,29±2,62	20,23±2,06	13,32±1,65	14,18±1,22	16,10±0,95
Tannins 1%	NM	66,66±3,60	62,11±2,62	59,52±2,06	59,04±1,65	63,11±1,22	66,10±0,95
Tannins 2,5%	NM	81,25±00	77,27±00	73,80±2,06	70,47±1,64	73,75±1,22	76,10±0,95
Souche d'<i>A. parasiticus</i>							
Tannins 0,1%	NM	29,16±3,60	25,75±2,62	20,23±2,06	13,32±1,65	16,31±1,22	24,44±0,96
Tannins 1%	NM	66,66±3,60	63,63±00	59,52±2,06	59,04±1,65	63,11±1,22	66,10±0,95
Tannins 2,5%	NM	72,91±3,60	71,20±2,62	70,23±2,06	70,47±1,64	71,63±1,22	74,99±2,88

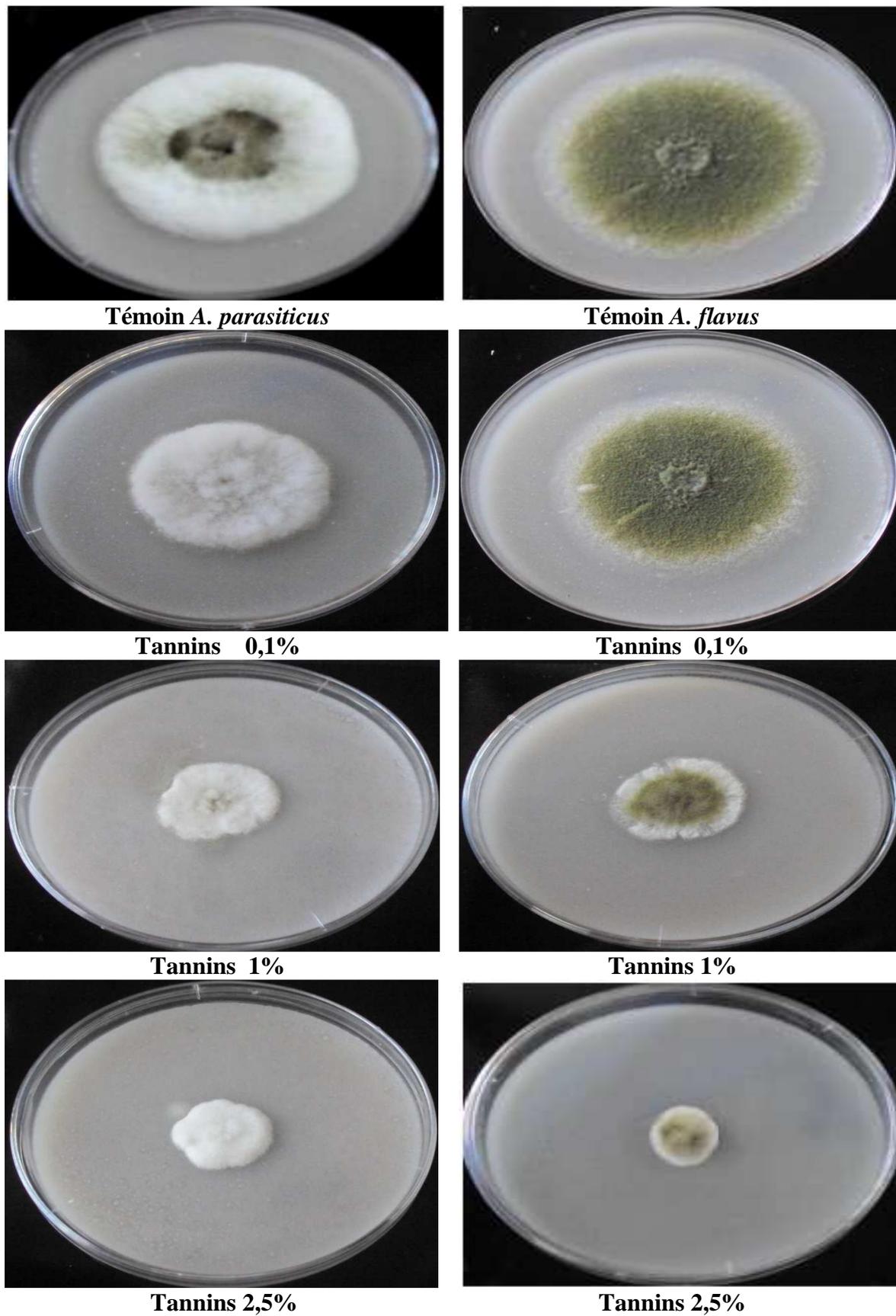
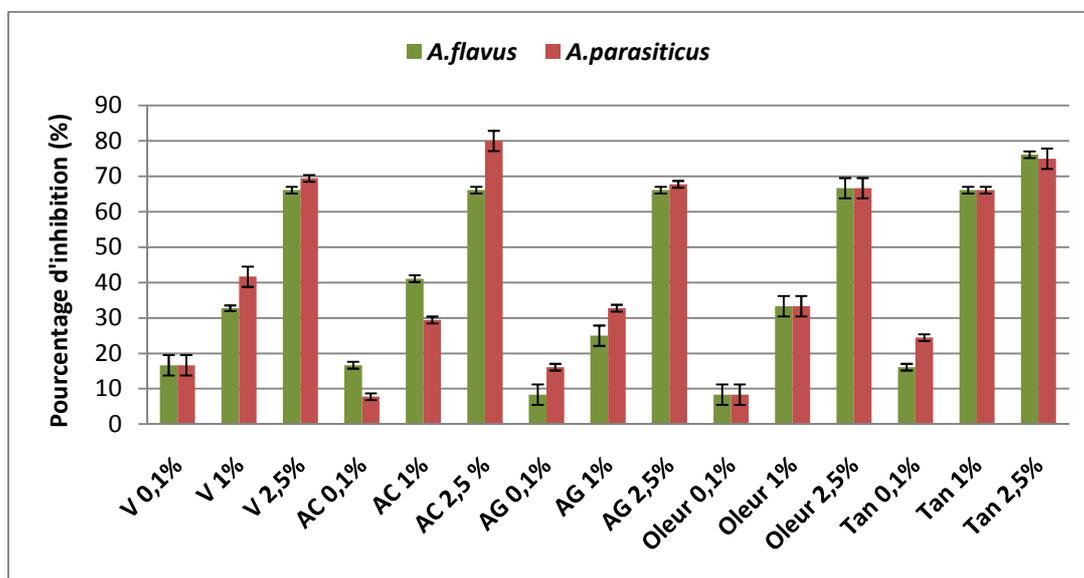


Figure 33: Aspect des deux souches tests en présence des tannins à différentes concentrations sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à 28°C.



(Résultats exprimés en moyenne \pm SD, n=3)

Figure 34: Récapitulatif des pourcentages d'inhibition des composés phénoliques sur les deux souches tests *A. flavus* et *A. parasiticus* sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à $28 \pm 02^\circ\text{C}$. (V : vanilline ; AC : Acide caféique ; AG : acide gallique ; Oleur : Oleuropéine ; Tan : Tannins).

2.3.3.2. Résultats obtenus en présence des extraits phénoliques :

Les extraits phénoliques à partir de pulpes, feuilles et margines bruts ont montré une action inhibitrice sur la croissance des deux souches.

Ainsi la figure 35 et 36 consignes les résultats obtenus sur l'inhibition de la croissance des deux souches en présence de l'extrait phénolique provenant des feuilles. En effet les pourcentages d'inhibition de l'extrait de feuilles avec *A. parasiticus* pour les concentrations étudiées sont plus importants que pour celle d'*A. flavus*. Le pourcentage d'inhibition après 7 jours d'incubation pour *A. parasiticus* est de $57,77 \pm 0,96$ % alors qu'il est de $41,10 \pm 0,95$ % pour *A. flavus*. Ces données sont consignées dans le tableau XV.

L'extrait de pulpes a aussi montré une activité inhibitrice sur la croissance des deux souches (figure 37 et 38), le pourcentage d'inhibition après 7 jours d'incubation étant plus important avec la concentration de 2,5%. Ainsi il est $66,66 \pm 00$ % pour *A. parasiticus* et de $49,44 \pm 0,96$ % pour *A. flavus*. Ces données sont consignées dans le tableau XVI.

L'extrait de margines a aussi montré un effet inhibiteur sur la croissance des deux souches (figure 39 et 40). Le pourcentage d'inhibition après 7 jours d'incubation étant plus important avec la concentration de 2,5% ; il est de $66,66 \pm 00$ % pour *A. parasiticus* et de $49,44 \pm 0,96$ % pour *A. flavus*. Ces données sont consignées dans le tableau XVII.

Les figures 37, 38 et 40 montrent aussi l'effet des extraits phénoliques sur la sporulation des souches par les extraits phénoliques. La sporulation étant un paramètre à ne pas négliger. En effet les extraits de feuilles, pulpes et margines ont montrés un effet sur la sporulation des deux souches cet effet est plus marqué avec *A. parasiticus* et cela pour toutes les concentrations étudiées.

Un histogramme récapitulatif des pourcentages d'inhibitions des extraits phénoliques (feuilles, pulpes, margines) après 7 jours d'incubation est donné par la figure 41.

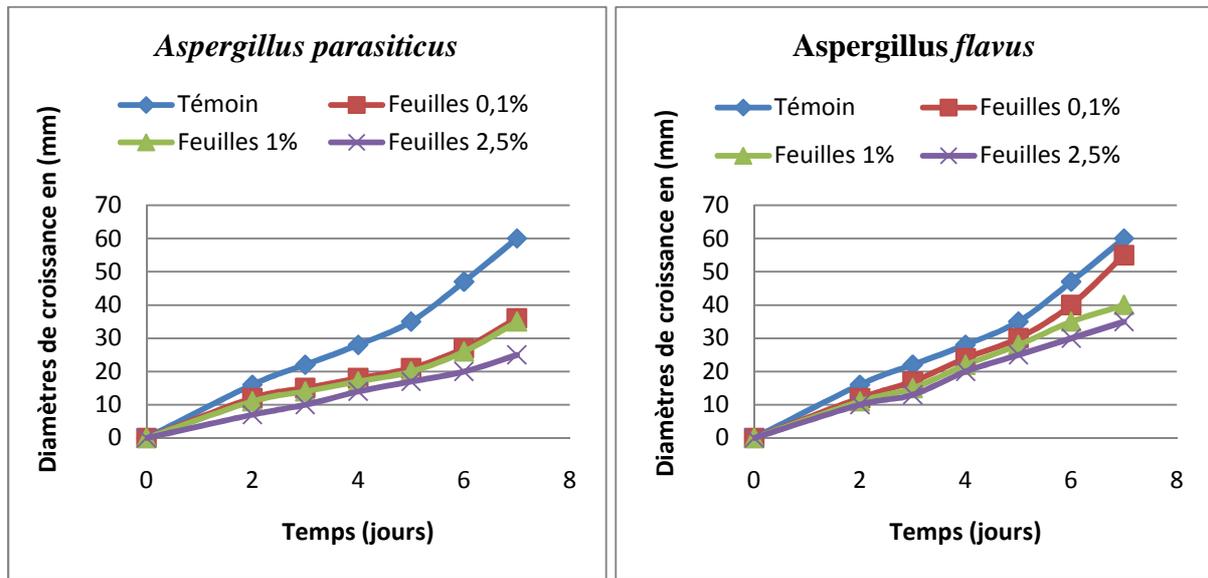


Figure 35: Effet de l'extrait de feuilles sur la croissance des deux souches *A. flavus* et *A. parasiticus* sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à $28 \pm 02^\circ\text{C}$.

Tableau XV : Pourcentages (%) d'inhibition de l'extrait de feuilles sur les des deux souches *A. flavus* et *A. parasiticus*

Extrait/jours	1	2	3	4	5	6	7
Souche d'<i>A. flavus</i>							
Feuilles 0,1%	NM	22,91±3,60	22,72±7,87	13,09±2,06	13,32±1,65	14,89±3,68	7,77±3,85
Feuilles 1%	NM	29,16±3,60	30,29±2,62	20,23±2,06	19,04±1,65	24,81±2,45	33,33±2,88
Feuilles 2,5%	NM	35,41±3,60	39,38±2,62	27,38±2,06	27,61±1,65	35,46±1,22	41,10±0,95
Souche d'<i>A. parasiticus</i>							
Feuilles 0,1%	NM	22,91±3,60	30,29±2,62	34,52±2,06	39,04±1,65	41,84±1,22	39,44±0,96
Feuilles 1%	NM	29,16±3,60	34,84±2,62	38,09±2,06	41,9±1,64	43,97±1,22	41,10±0,95
Feuilles 2,5%	NM	54,16±3,60	53,02±2,62	48,80±2,06	50,47±1,64	56,73±1,22	57,77±0,96

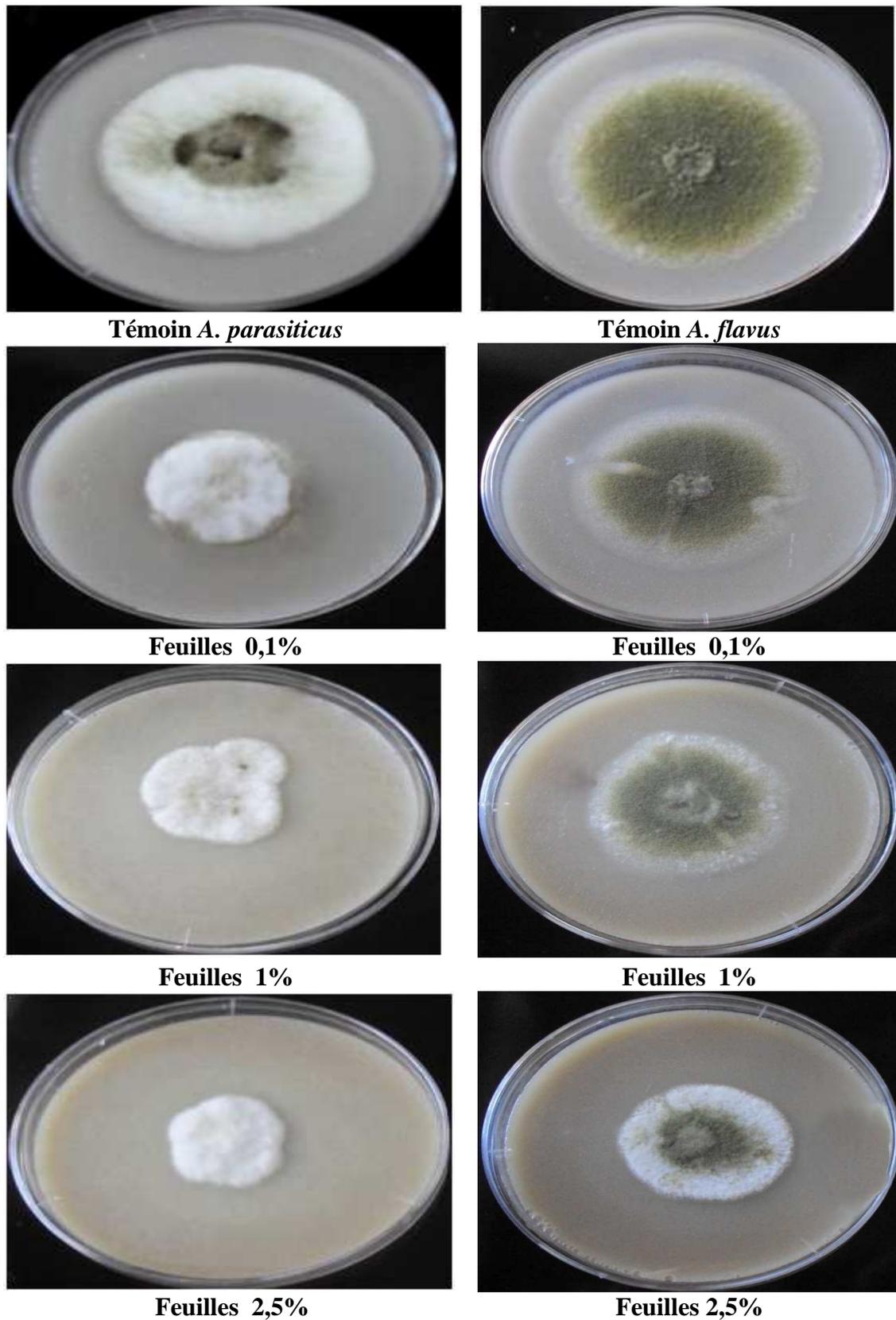


Figure 36: Aspect des deux souches en présence de l'extrait phénolique de feuilles à différentes concentrations sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à 28°C.

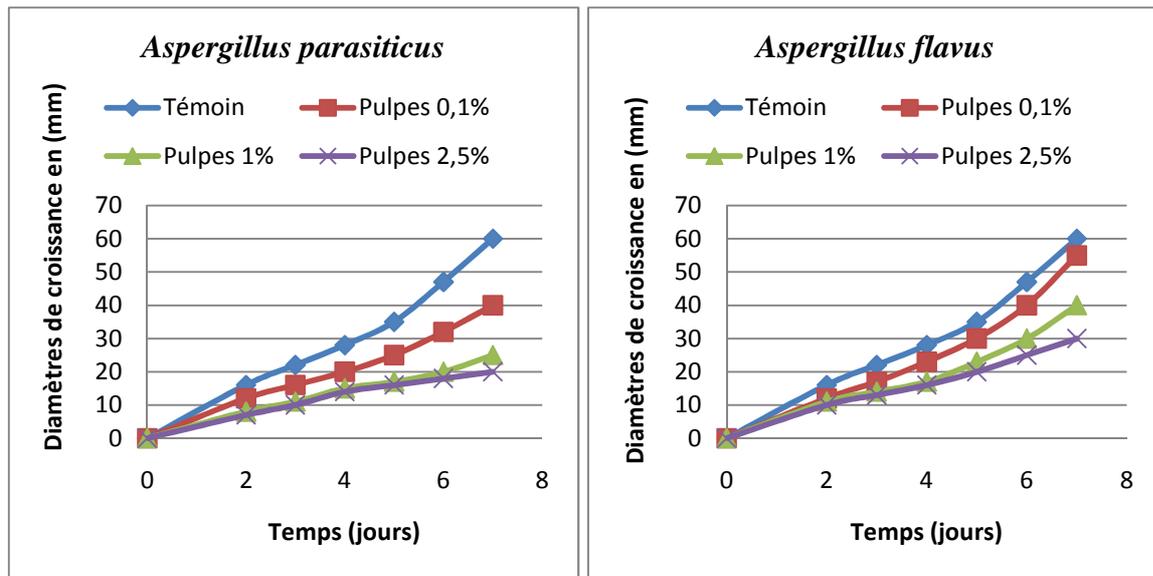


Figure 37: Effet de l'extrait de pulpes d'olives sur la croissance des deux souches *A. flavus* et *A. parasiticus* sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à $28 \pm 02^\circ\text{C}$.

Tableau XVI: Pourcentages (%) d'inhibition de l'extrait de pulpes sur les des deux souches *A. flavus* et *A. parasiticus*

Extrait/jours	1	2	3	4	5	6	7
Souche d'<i>A. flavus</i>							
Pulpes 0,1%	NM	22,91±3,60	21,20±2,62	20,23±4,12	13,32±1,65	14,18±1,22	8,33±2,88
Pulpes 1%	NM	29,16±3,60	34,84±2,62	41,66±4,12	34,2±0,13	35,46±1,22	32,77±0,96
Pulpes 2,5%	NM	35,41±3,60	39,38±2,62	42,85±6,18	41,9±1,64	46,09±1,22	49,44±0,96
Souche d'<i>A. parasiticus</i>							
Pulpes 0,1%	NM	22,91±3,60	30,3±5,24	27,38±2,06	27,61±1,65	31,20±1,22	32,77±0,96
Pulpes 1%	NM	47,91±3,60	48,48±2,62	45,23±2,06	50,47±1,64	56,73±1,22	57,77±0,96
Pulpes 2,5%	NM	54,16±3,60	53,02±2,62	48,80±2,06	53,32±1,65	60,99±1,22	66,66±00

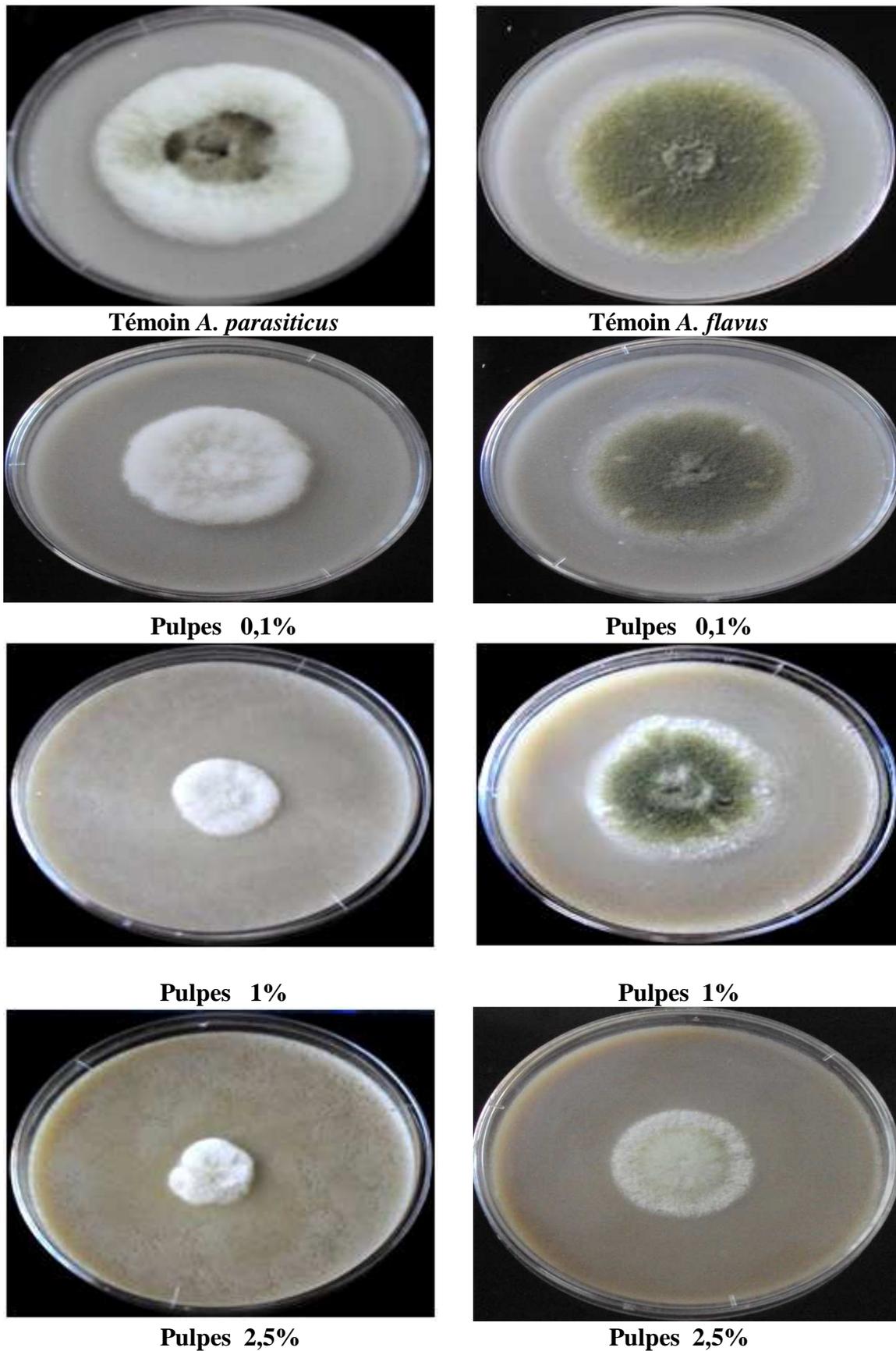


Figure 38 : Aspect des deux souches en présence de l'extrait de pulpes à différentes concentrations sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à 28 °C.

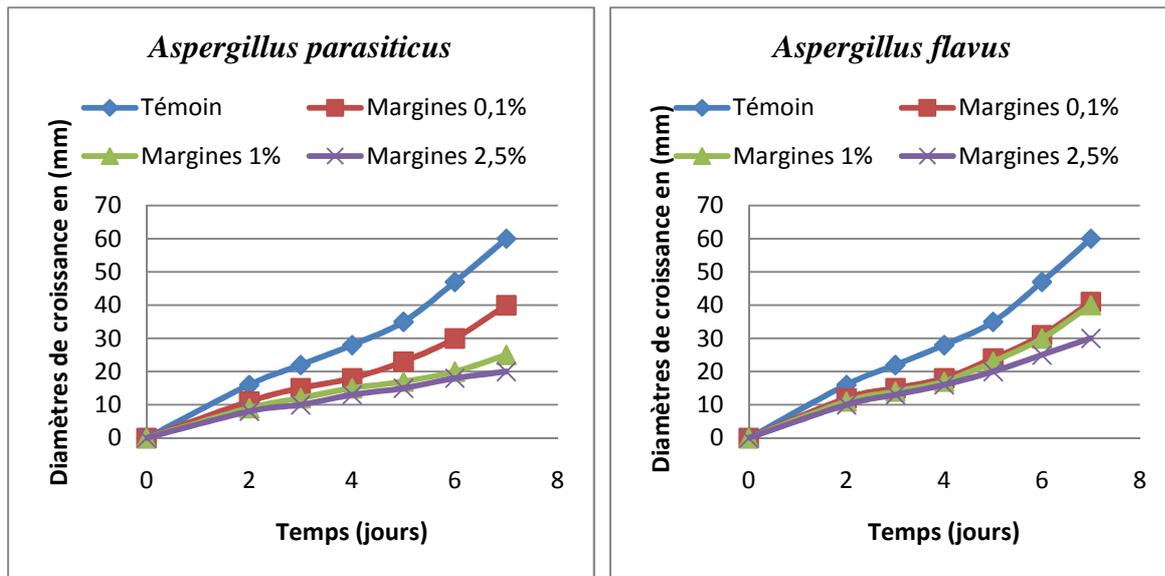


Figure 39 : Effet de l'extrait de margines d'olive sur la croissance des deux souches *A. flavus* et *A. parasiticus* sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à $28 \pm 02^\circ\text{C}$.

Tableau XVII: Pourcentages (%) d'inhibition des margines sur les deux souches *A. flavus* et *A. parasiticus*

Extrait/jours	1	2	3	4	5	6	7
Souche d'<i>A. flavus</i>							
Margines 0,1%	NM	22,91±3,60	30,29±2,62	34,52±2,06	33,32±3,30	33,33±1,22	31,10±0,95
Margines 1%	NM	29,16±3,60	34,84±2,62	38,09±2,06	33,32±1,65	35,46±1,22	32,77±0,96
Margines 2,5%	NM	35,41±3,60	33,32±2,62	41,66±2,06	41,9±1,64	46,09±1,22	49,44±0,96
Souche d'<i>A. parasiticus</i>							
Margines 0,1%	NM	33,33±3,60	30,29±2,62	34,52±2,06	33,44±3,51	35,46±1,22	33,33±2,88
Margines 1%	NM	41,66±3,60	43,93±2,62	45,23±2,06	50,47±1,64	56,73±1,22	57,77±0,96
Margines 2,5%	NM	47,91±3,60	53,02±2,62	52,38±2,06	57,95±1,40	60,99±1,22	66,66±00

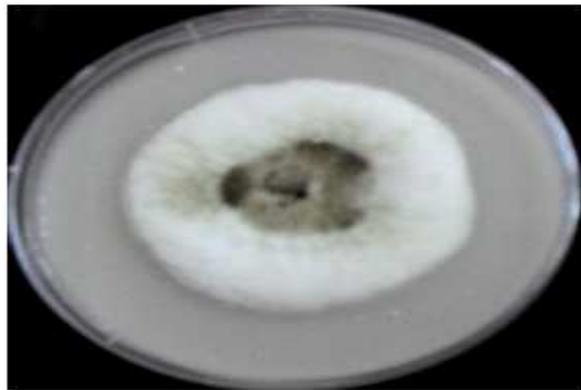
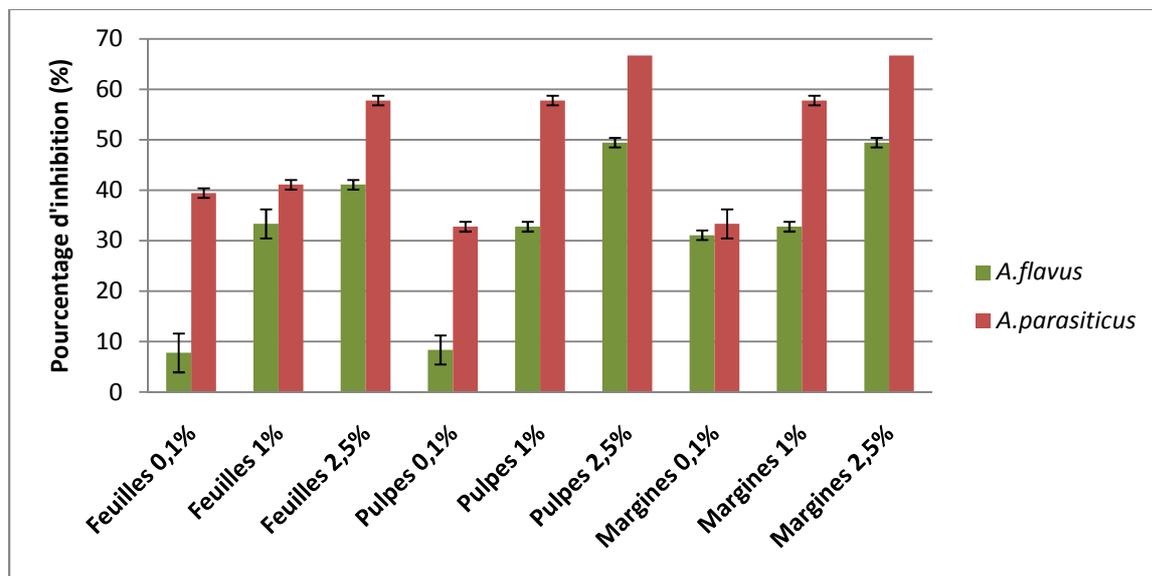
**Témoin *A. parasiticus*****Témoin *A. flavus*****Margines 0,1%****Margines 0,1%****Margines 1%****Margines 1%****Margines 2,5%****Margines 2,5%**

Figure 40 : Aspect des deux souches tests après traitement avec l'extrait de pulpes à différentes concentrations sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à 28°C.



(Résultats exprimés en moyenne \pm SD, n=3)

Figure 41 : Récapitulatif des pourcentages d'inhibition des extraits phénoliques sur les deux souches *A. flavus* et *A. parasiticus* sur milieu CAM après 7 jours d'incubation à $28 \pm 02^\circ\text{C}$.

2.3.4. Résultats obtenus sur la production d'aflatoxines des souches en présence des extraits et composés phénoliques par identification à l'UV :

La fluorescence des aflatoxines observée à 366nm est un paramètre qui est utilisé pour détecter leur production par les souches en présence des extraits et composés phénoliques.

2.3.4.1. En présence des composés phénoliques :

Les figures 42 et 43 consignent les résultats de fluorescence obtenus en présence de la vanilline. Pour *A. parasiticus*, la fluorescence est visible en présence de vanilline pour toutes les concentrations étudiées cependant son intensité varie en fonction des concentrations. Alors qu'avec *A. flavus*, une diminution progressive de cette fluorescence est observée jusqu'à l'absence totale de celle-ci pour la concentration de 2,5%.

Les figures 44 et 45 consignent les résultats obtenus en présence de l'acide caféique. La fluorescence est observée pour *A. parasiticus* et *A. flavus* pour les concentrations de 0,1% et 1% alors qu'elle est totalement absente pour la concentration de 2,5%.

Les figures 46 et 47 consignent les résultats obtenus en présence de l'acide gallique. Pour *A. parasiticus*, la fluorescence est observée en présence de toutes les concentrations étudiées (0,1%, 1% et 2,5%). Alors qu'elle est absente chez *A. flavus* pour les concentrations de 1% et 2,5%.

Les figures 48 et 49 renseignent sur l'absence totale de la fluorescence en présence de l'oleuropéine à la concentration de 2,5% pour *A. parasiticus* par contre la fluorescence a été observée avec *A. flavus* pour toutes les concentrations étudiées (0,1%, 1% et 2,5%).

Les figures 50 et 51 renseignent sur la fluorescence en présence des tannins. La fluorescence est observée pour *A. parasiticus* pour toutes les concentrations étudiées (0,1%, 1% et 2,5%). Alors qu'elle est absente avec *A. flavus* pour les concentrations de 1% et 2,5%.

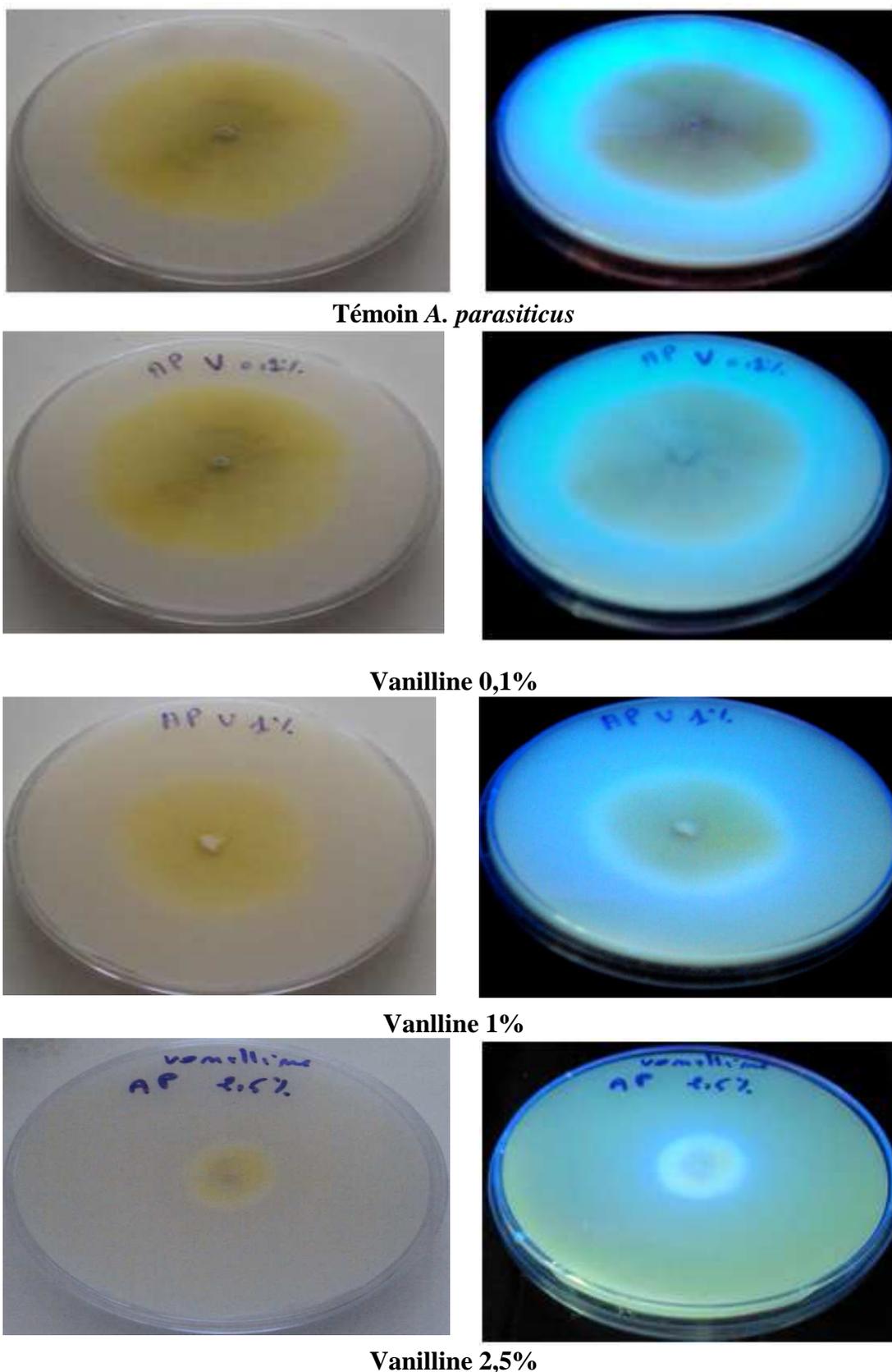


Figure 42: Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (366nm) de la production d'aflatoxines par *Aspergillus parasiticus* sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et à différentes concentrations de la vanilline après 7 jours d'incubation à 28°C.

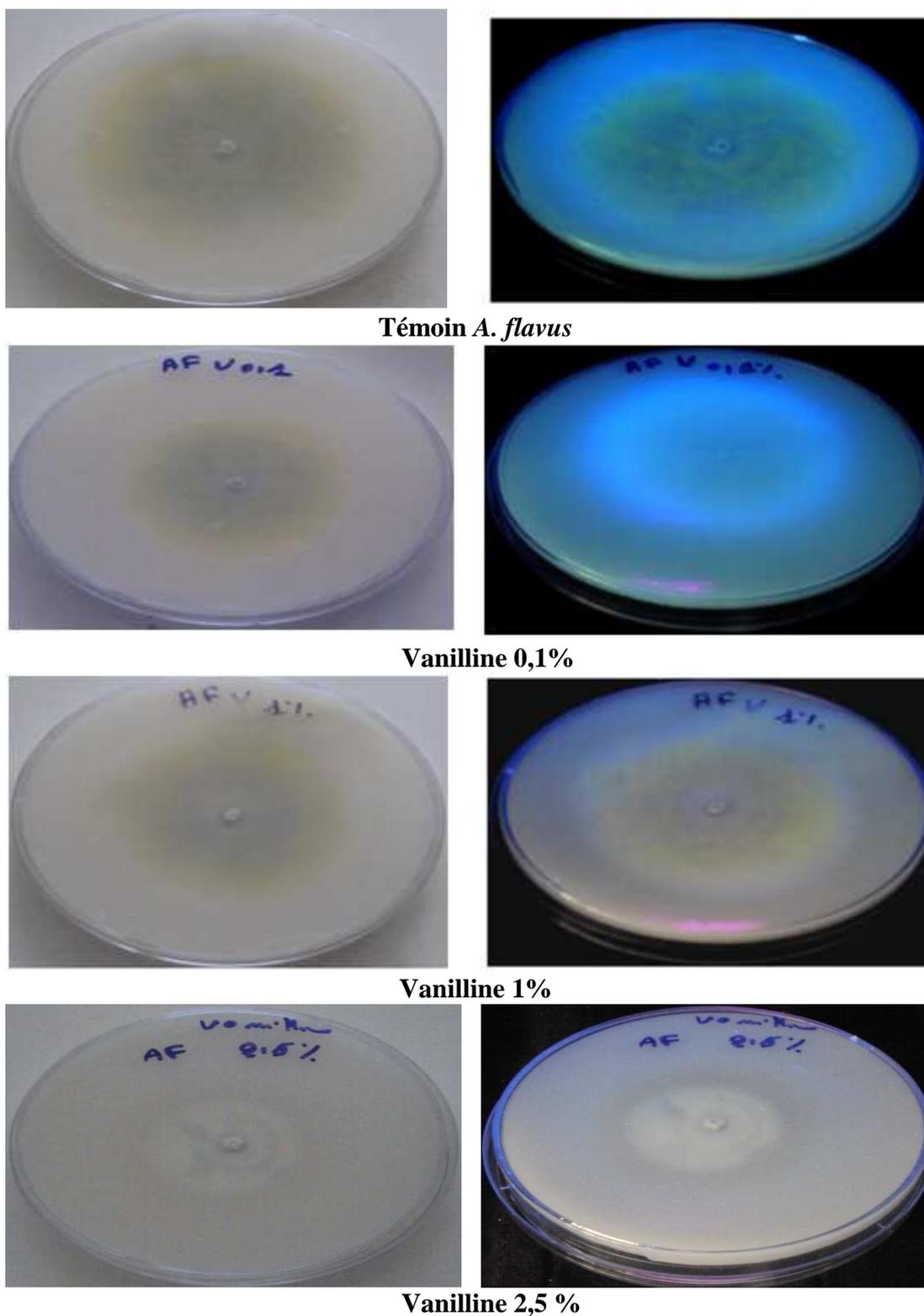
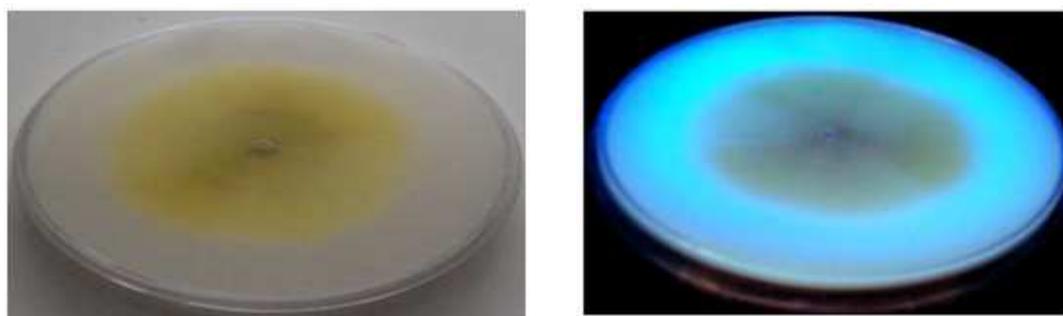
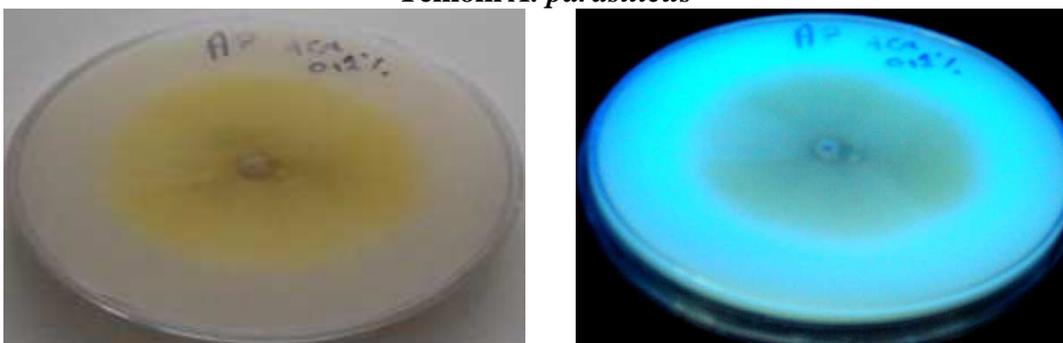
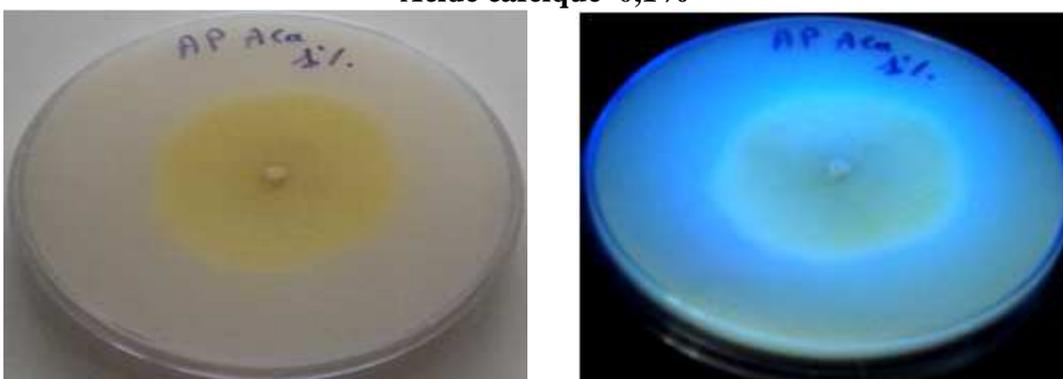


Figure 43: Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (366nm) de la production d'aflatoxines par *Aspergillus flavus* sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et à différentes concentrations de la vanilline après 7 jours d'incubation à 28°C.

Témoin *A. parasiticus*

Acide caféique 0,1%

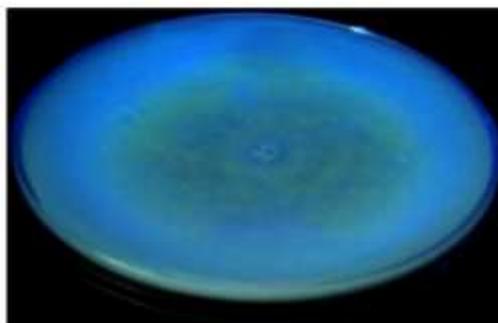
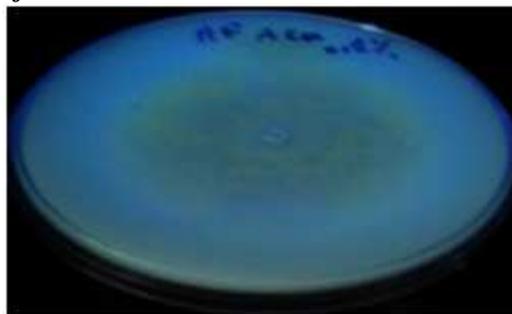


Acide caféique 1%



Acide caféique 2,5%

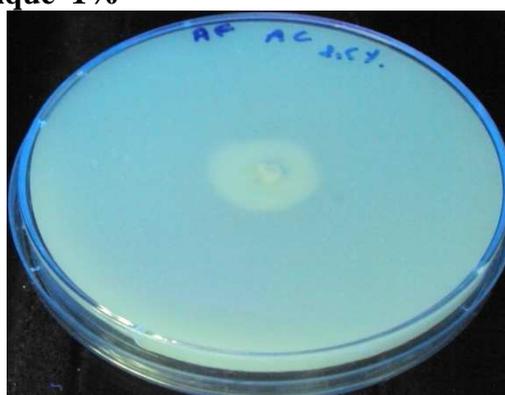
Figure 44: Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (366nm) de la production d'aflatoxines par *Aspergillus parasiticus* sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et à différentes concentrations d'acide caféique après 7 jours d'incubation à 28°C.

Témoïn *A. flavus*

Acide caféique 0,1%

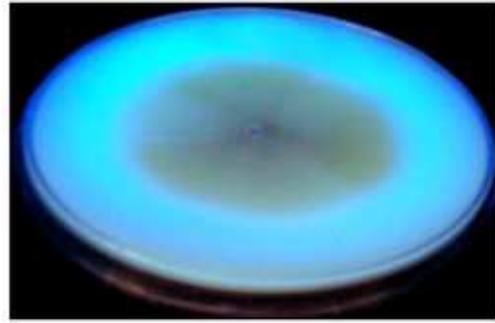
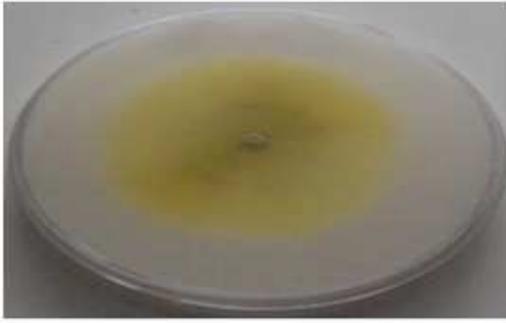
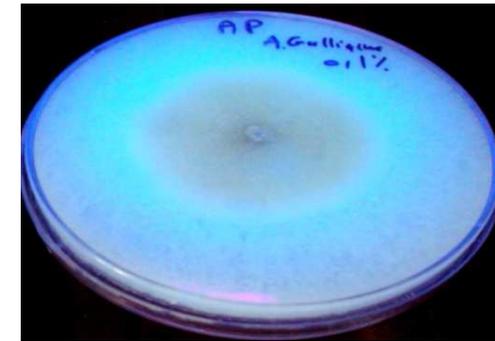


Acide caféique 1%



Acide caféique 2,5%

Figure 45: Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (366nm) de la production d'aflatoxines par *Aspergillus flavus* sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et à différentes concentrations d'acide caféique après 7 jours d'incubation à 28°C.

Témoin *A. parasiticus*

Acide gallique 0,1%

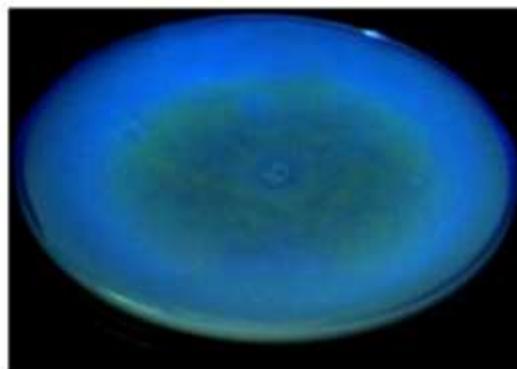
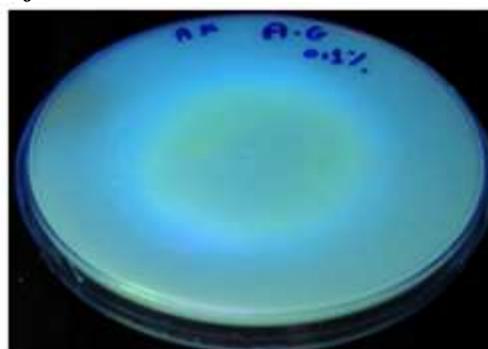


Acide gallique 1%

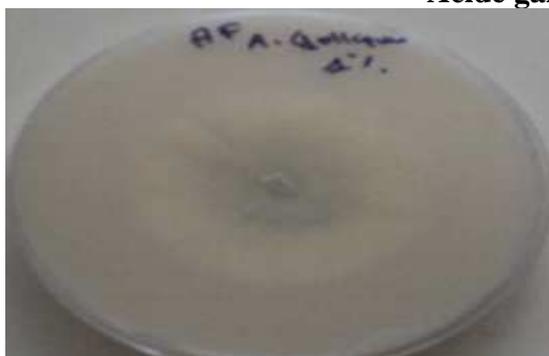


Acide gallique 2,5%

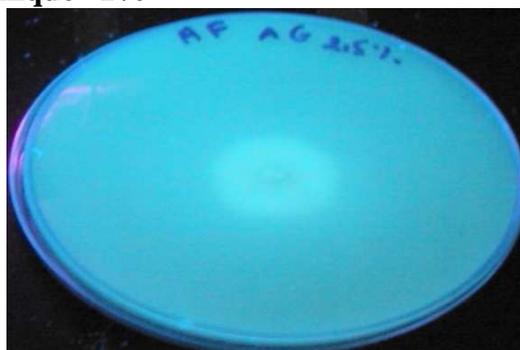
Figure 46: Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (366nm) de la production d'aflatoxines par *Aspergillus parasiticus* sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et à différentes concentrations d'acide gallique après 7 jours d'incubation à 28°C.

Témoins *A. flavus*

Acide gallique 0,1%

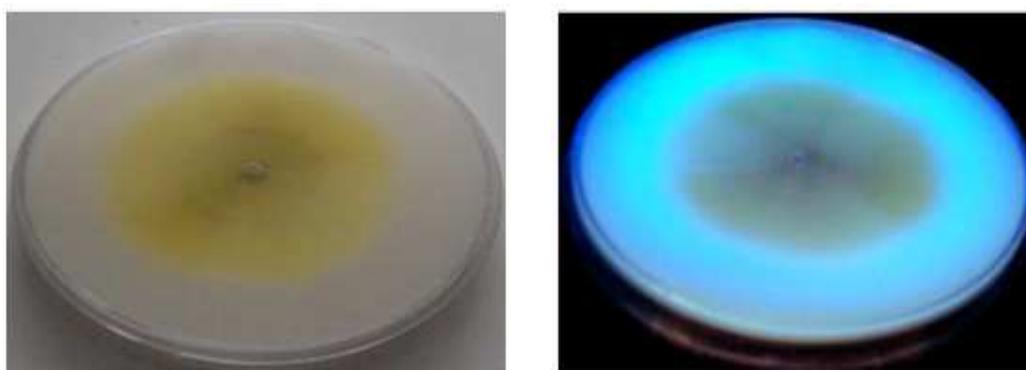


Acide gallique 1%

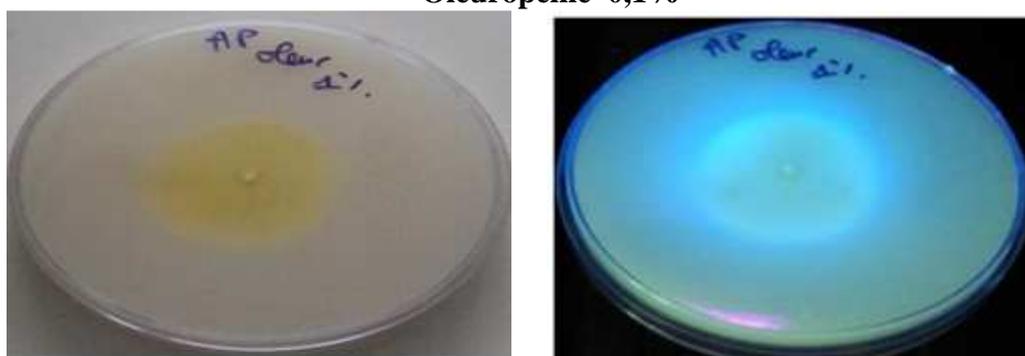


Acide gallique 2,5%

Figure 47: Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (366nm) de la production d'aflatoxines par *Aspergillus flavus* sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et à différentes concentrations d'acide gallique après 7 jours d'incubation à 28°C.

Témoïn *A. parasiticus*

Oleuropéine 0,1%

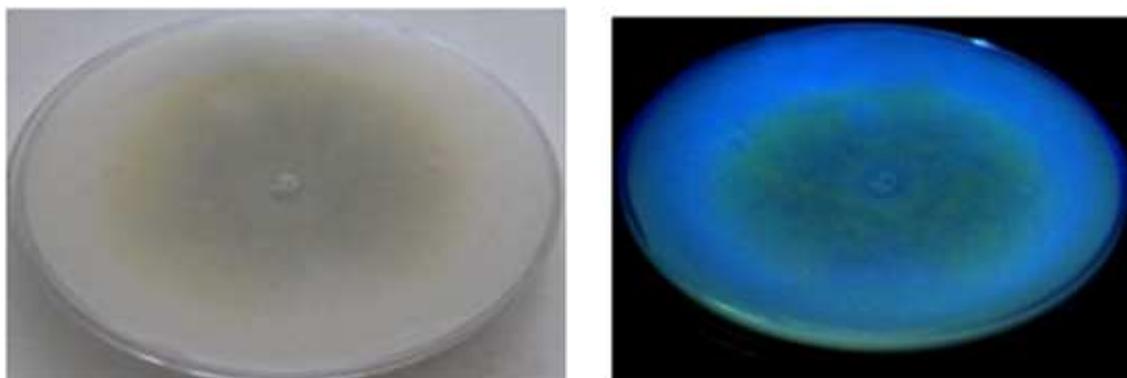
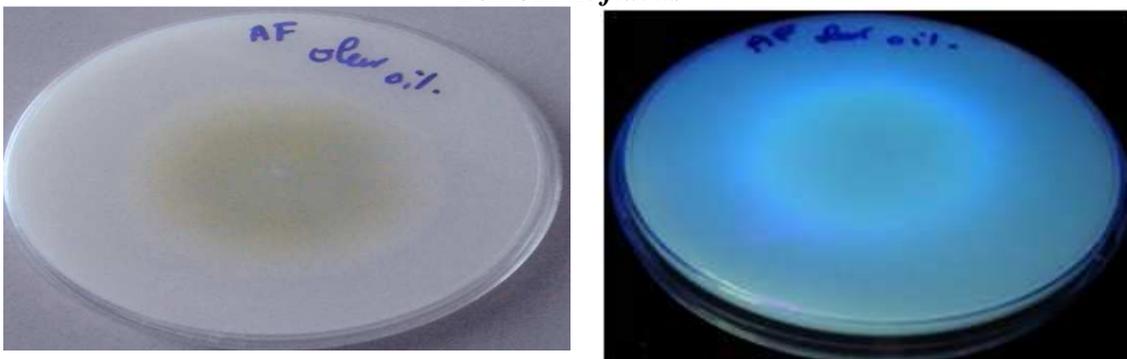


Oleuropéine 1%



Oleuropéine 2,5%

Figure 48 : Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (366nm) de la production d'aflatoxines par *Aspergillus parasiticus* sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et à différentes concentrations d'oleuropéine après 7 jours d'incubation à 28°C.

Témoïn *A. flavus*

Oleuropéine 0,1%

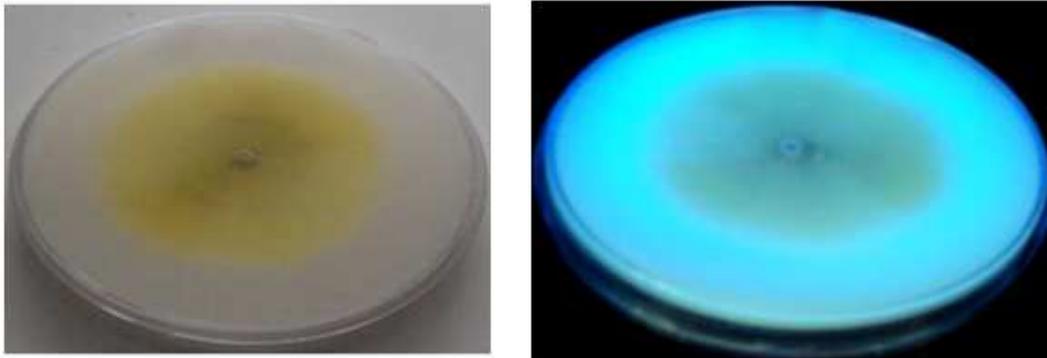
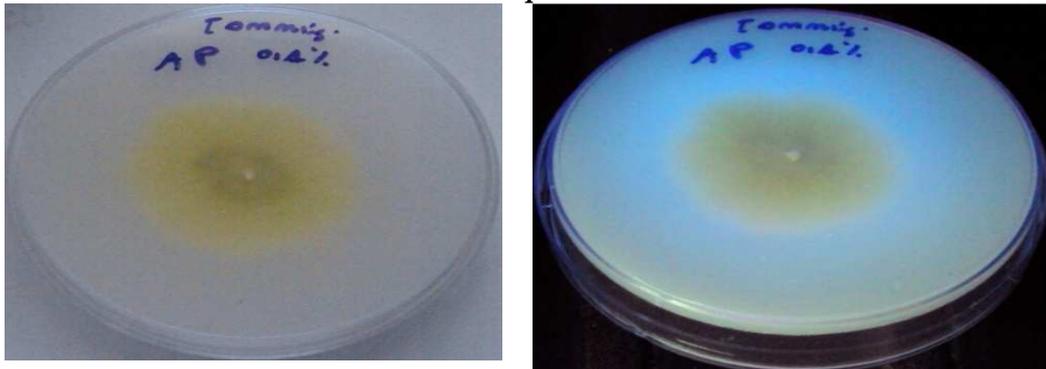


Oleuropéine 1%



Oleuropéine 2,5%

Figure 49 : Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (366nm) de la production d'aflatoxines par *Aspergillus flavus* sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et à différentes concentrations d'oleuropéine après 7 jours d'incubation à 28°C.

Témoin *A. parasiticus*

Tannins 0,1%



Tannins 1%



Tannins 2,5%

Figure 50: Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (366nm) de la production d'aflatoxines par *Aspergillus parasiticus* sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et à différentes concentrations de tannins après 7 jours d'incubation à 28°C.

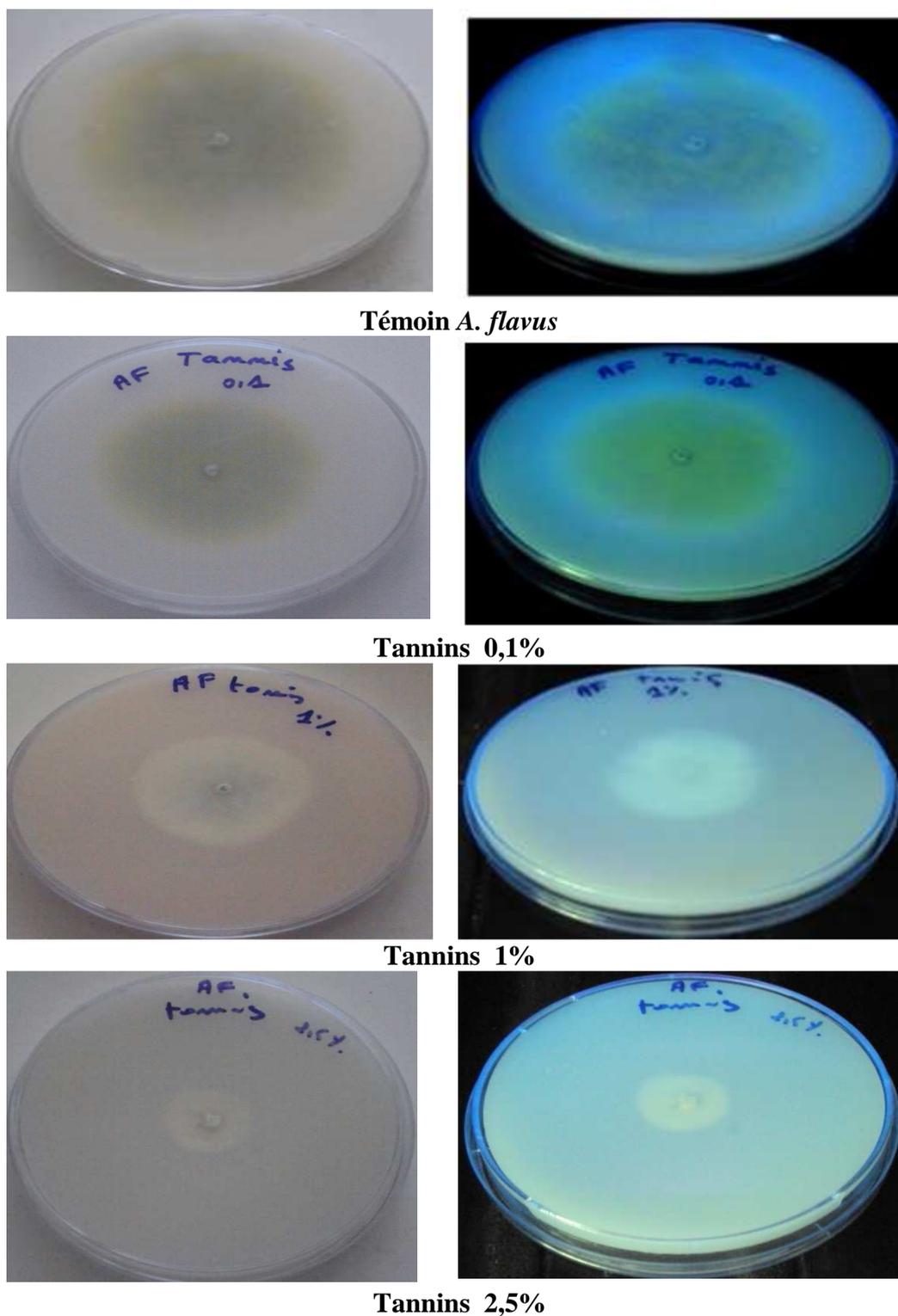


Figure 51: Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (366nm) de la production d'aflatoxines par *Aspergillus flavus* sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et à différentes concentrations de tannins après 7 jours d'incubation à 28°C.

2.3.4.2. En présence des extraits phénoliques:

Les extraits phénoliques d'oliviers (feuilles, pulpes, margines) ont montré un effet sur la production d'aflatoxines via le screening par l'UV à 366nm. Les résultats sont les suivants:

Les figures 52 et 53 illustrent les résultats obtenus en présence de l'extrait de feuilles. Une diminution progressive de la fluorescence a été observée jusqu'à son absence totale pour la concertation de 2,5% aussi bien avec *A. parasiticus* qu'avec *A. flavus*.

Les figures 54 et 55 illustrent les résultats obtenus en présence de l'extrait pulpe. Une diminution de la fluorescence est observée à la concentration de 0,1% par rapport au témoin et une absence totale de la fluorescence aux concentrations de 1% et 2,5% avec les deux souches *A. parasiticus* et *A. flavus*.

Les figures 56 et 57 illustrent les résultats obtenus en présence de l'extrait de margines. Une activité anti-aflatoxinogène est observée chez les deux souches *A. flavus* et *A. parasiticus* aux concentrations de 1 et 2,5%.

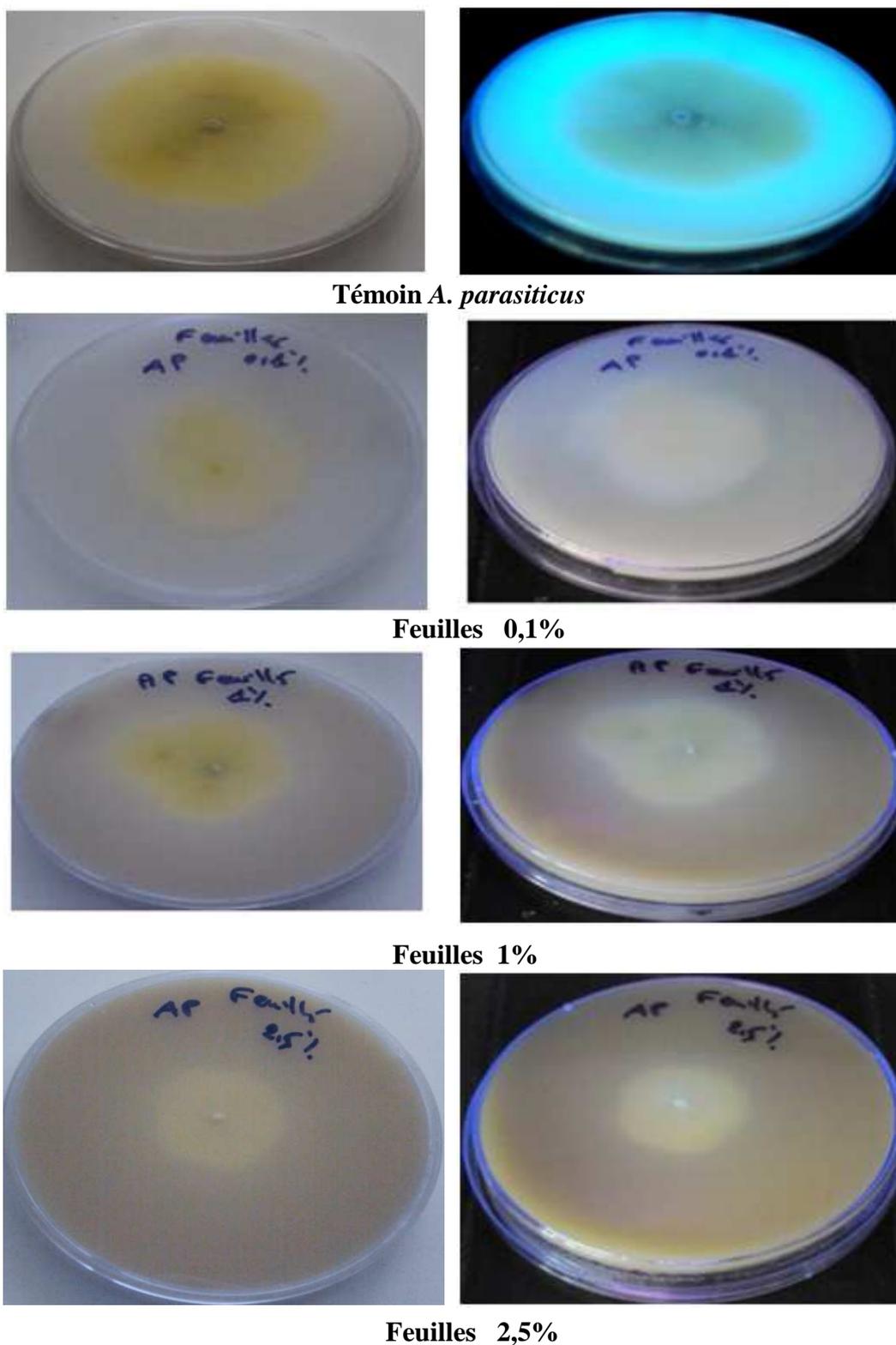


Figure 52: Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (366nm) de la production d'aflatoxines par *Aspergillus parasiticus* sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et à différentes concentrations d'extrait des feuilles après 7 jours d'incubation à 28°C.

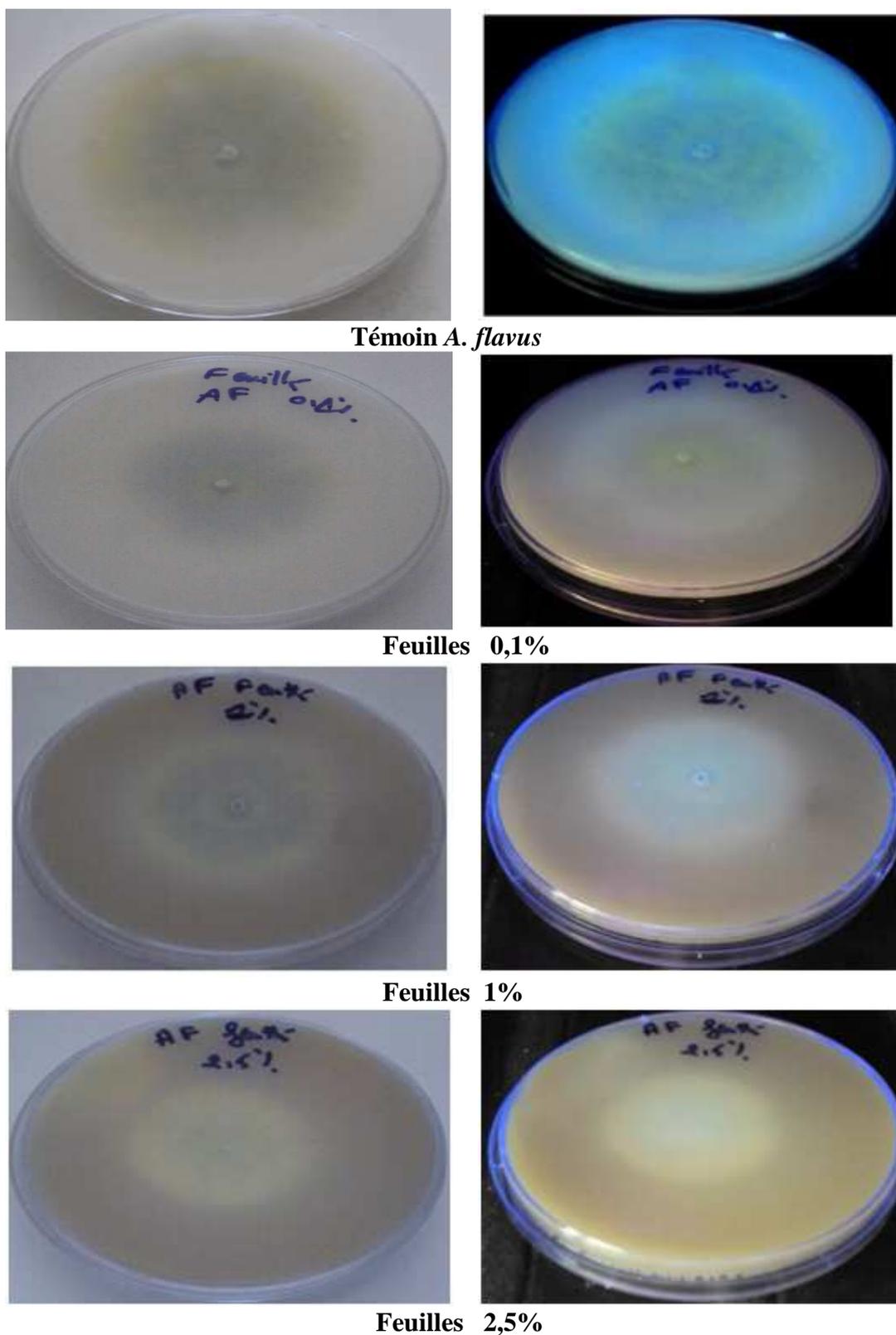


Figure 53: Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (366nm) de la production d'aflatoxines par *Aspergillus flavus* sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et à différentes concentrations d'extrait des feuilles après 7 jours d'incubation à 28°C.

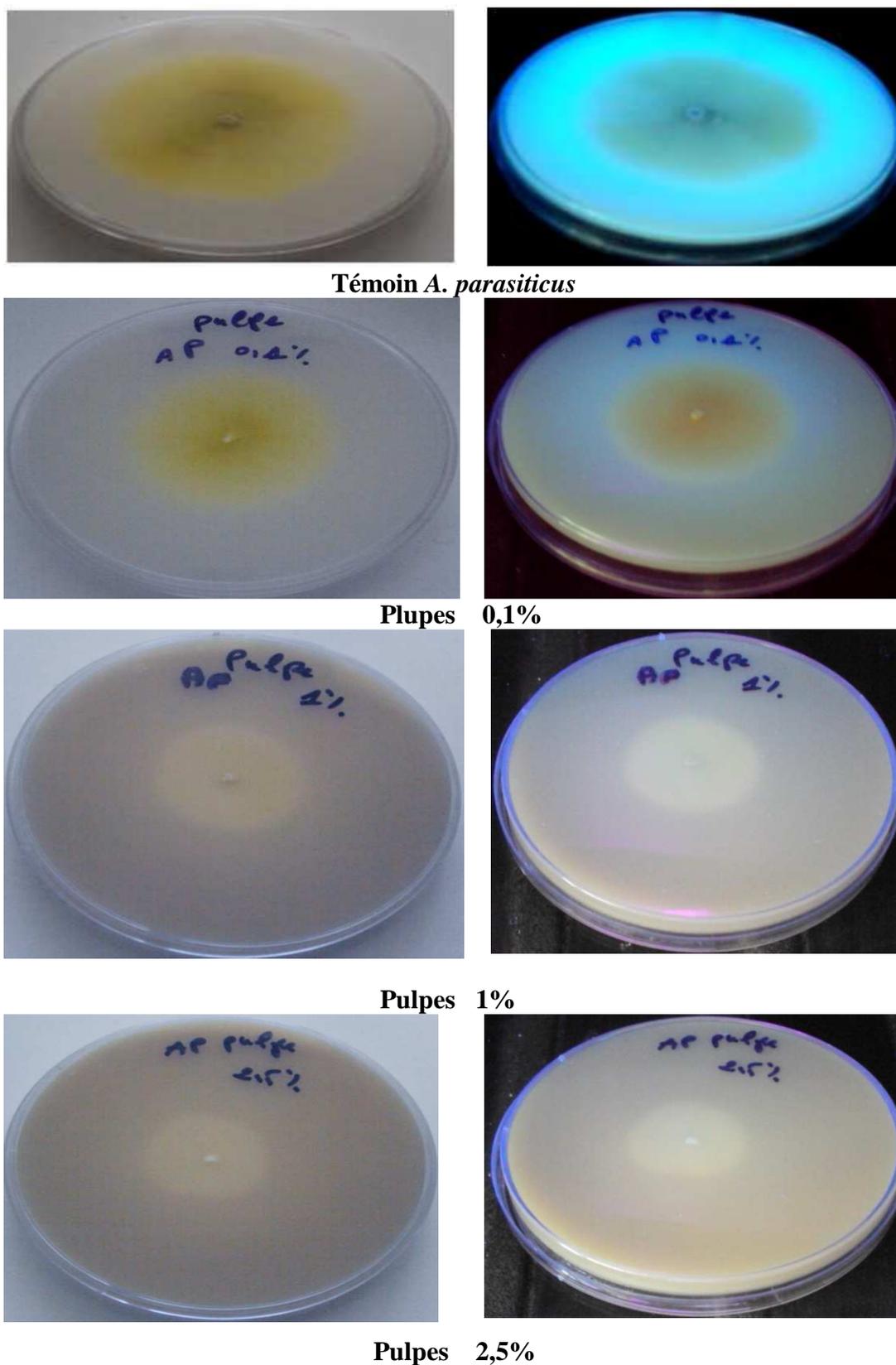


Figure 54: Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (366nm) de la production d'aflatoxines par *Aspergillus parasiticus* sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et à différentes concentrations d'extrait de pulpes après 7 jours d'incubation à 28°C.

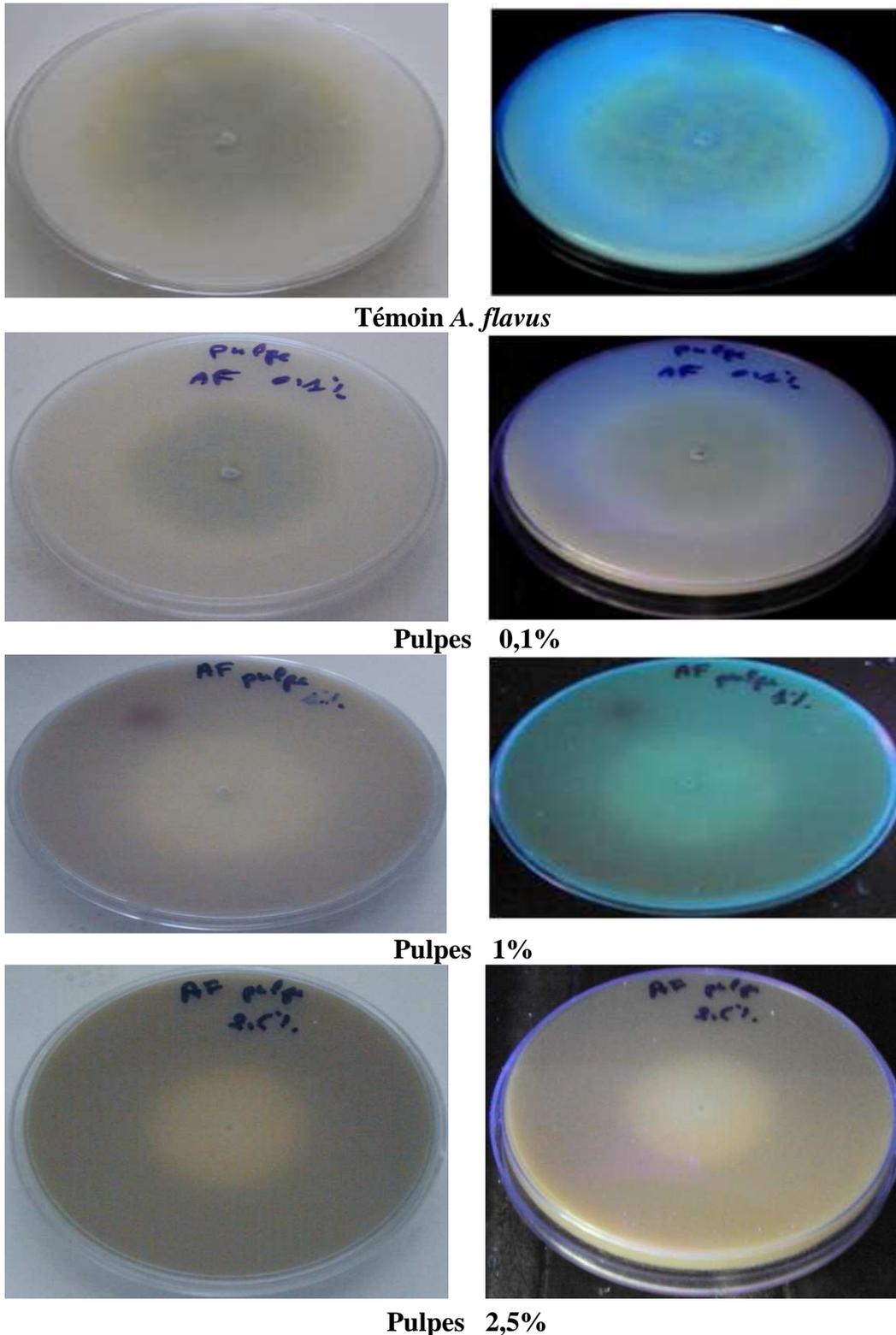


Figure 55 : Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (366nm) de la production d'aflatoxines par *Aspergillus flavus* sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et à différentes concentrations d'extrait de pulpes après 7 jours d'incubation à 28°C.

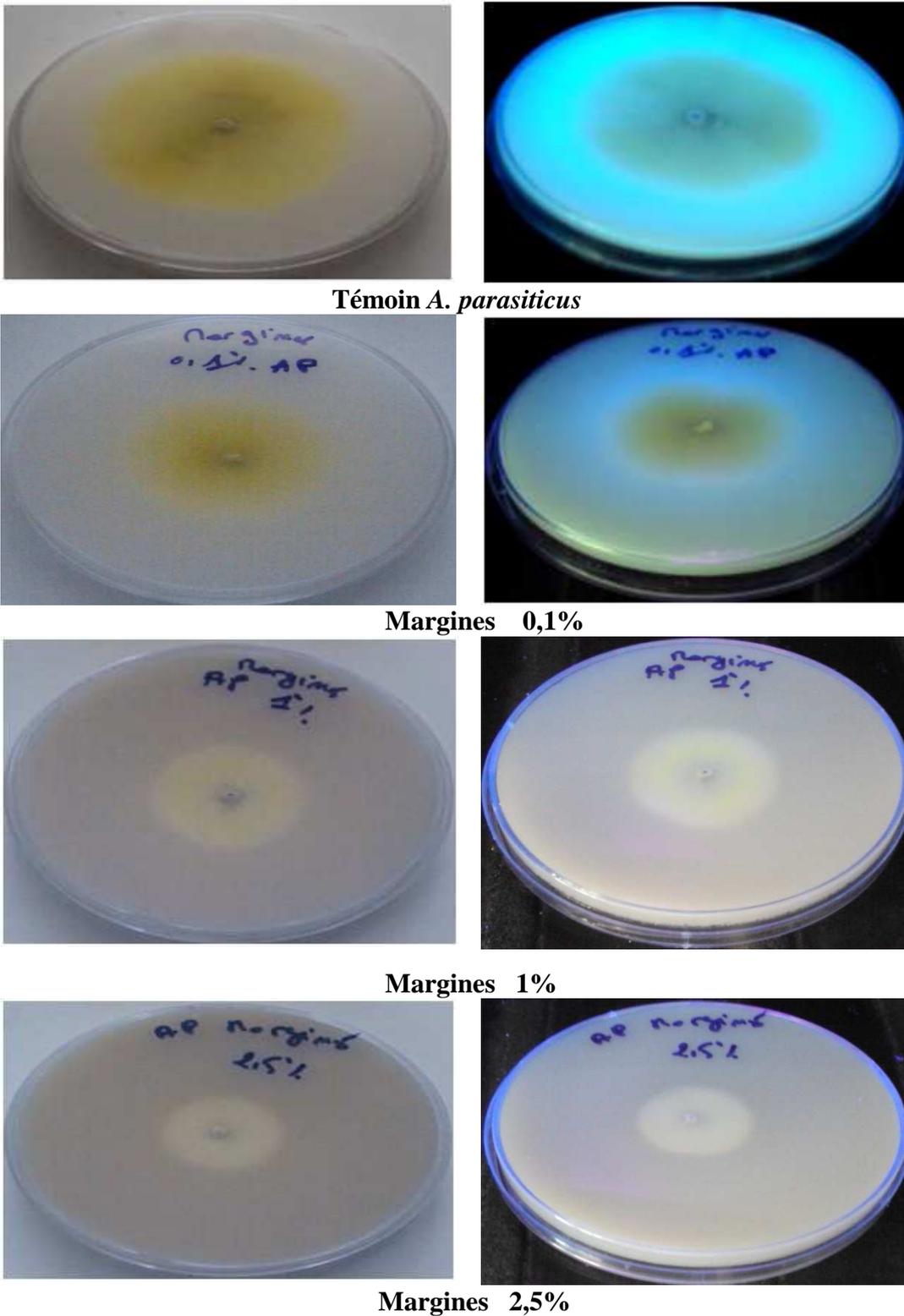
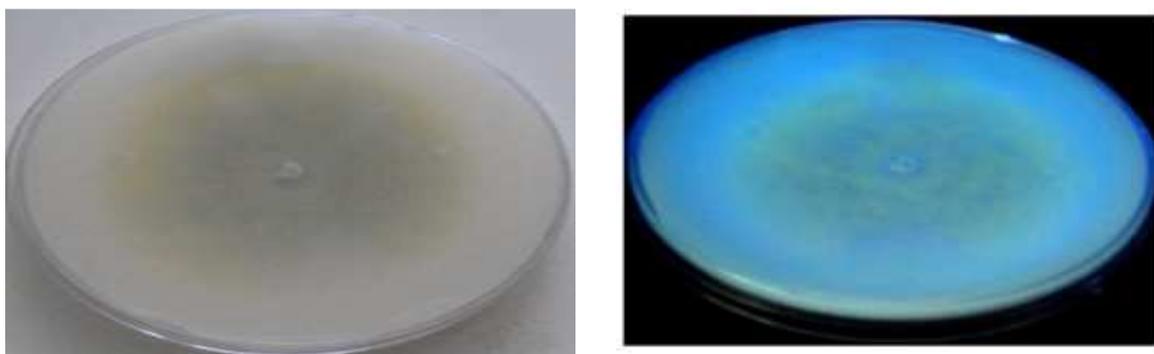
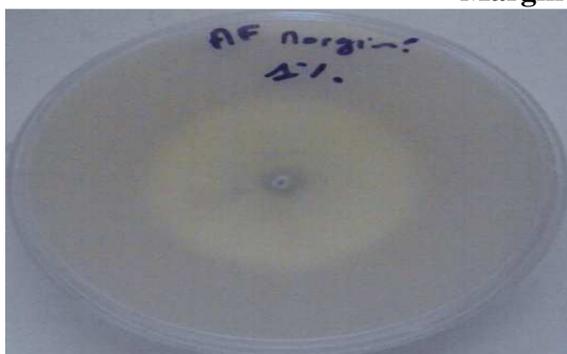


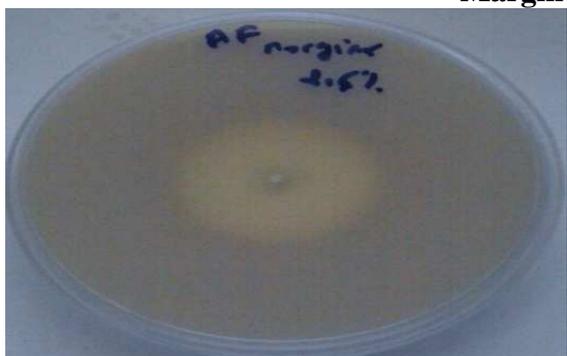
Figure 56: Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (366nm) de la production d'aflatoxines par *Aspergillus parasiticus* sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et à différentes concentrations d'extrait de margines après 7 jours d'incubation à 28°C.

Témoins *A. flavus*

Margines 0,1%



Margines 1%



Margines 2,5%

Figure 57 : Mise en évidence par fluorescence sous lumière UV (366nm) de la production d'aflatoxines par *Aspergillus flavus* sur milieu à base d'extrait de noix de coco (CAM) et à différentes concentrations d'extrait de margines après 7 jours d'incubation à 28°C.

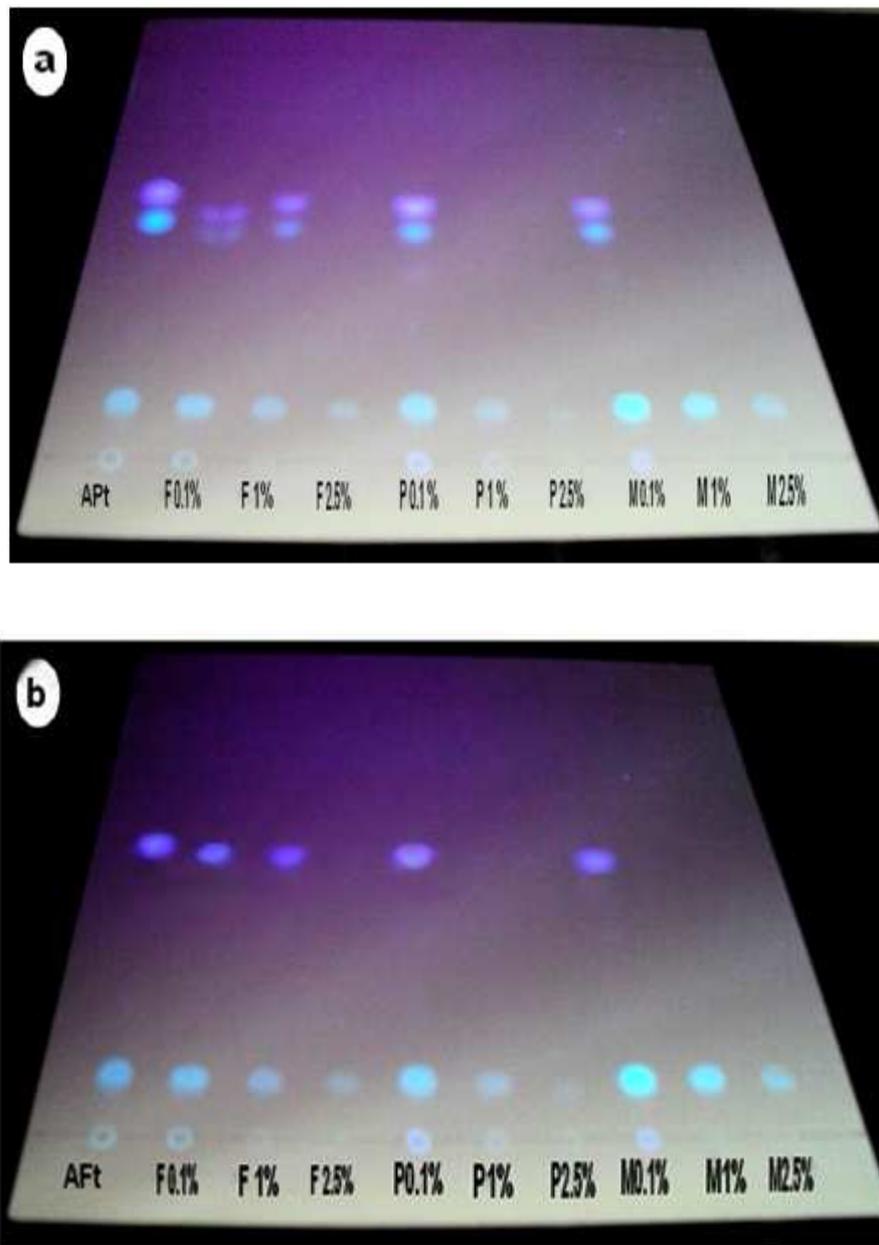
2.3.5. Résultats obtenus sur l'identification de la production d'aflatoxines des souches testées en présence des extraits et composés phénoliques par CCM :

Le screening de la production des aflatoxines est basé sur la comparaison des R_f ou rapports frontaux et des couleurs caractéristiques des aflatoxines produites par les deux souches tests observés sous lampe UV à 366nm.

Sur les chromatogrammes (a) et (b) de la figure 58, la présence de la production d'aflatoxines est confirmée ainsi que l'appréciation quantitative. L'action inhibitrice des extraits et composés phénoliques est révélée par la diminution de la taille des spots ou la disparition des taches par rapport aux témoins.

L'extrait de feuilles a révélé une action inhibitrice totale sur la production d'aflatoxines sur les deux souches tests à 2,5%. Une diminution de la taille des taches a été également observée à 0,1% et 1%. Ces résultats confirment les résultats obtenus via le screening de production d'aflatoxines par l'UV à 366nm.

L'extrait de pulpe et de margines ont également une action inhibitrice totale sur la production des aflatoxines aux concentrations de 1% et 2,5%, avec diminution de la taille de la tache et de l'intensité de la couleur à la concentration de 0,1%. Ces résultats aussi confirment les résultats obtenus via le screening de production d'aflatoxines par l'UV à 366nm.



APt: *A. parasiticus* témoin ; **AFt :** *A. flavus* témoin ; **F:** extrait phénolique de feuilles ; **P :** extrait phénolique de pulpes ; **M :** extrait phénolique de margines.

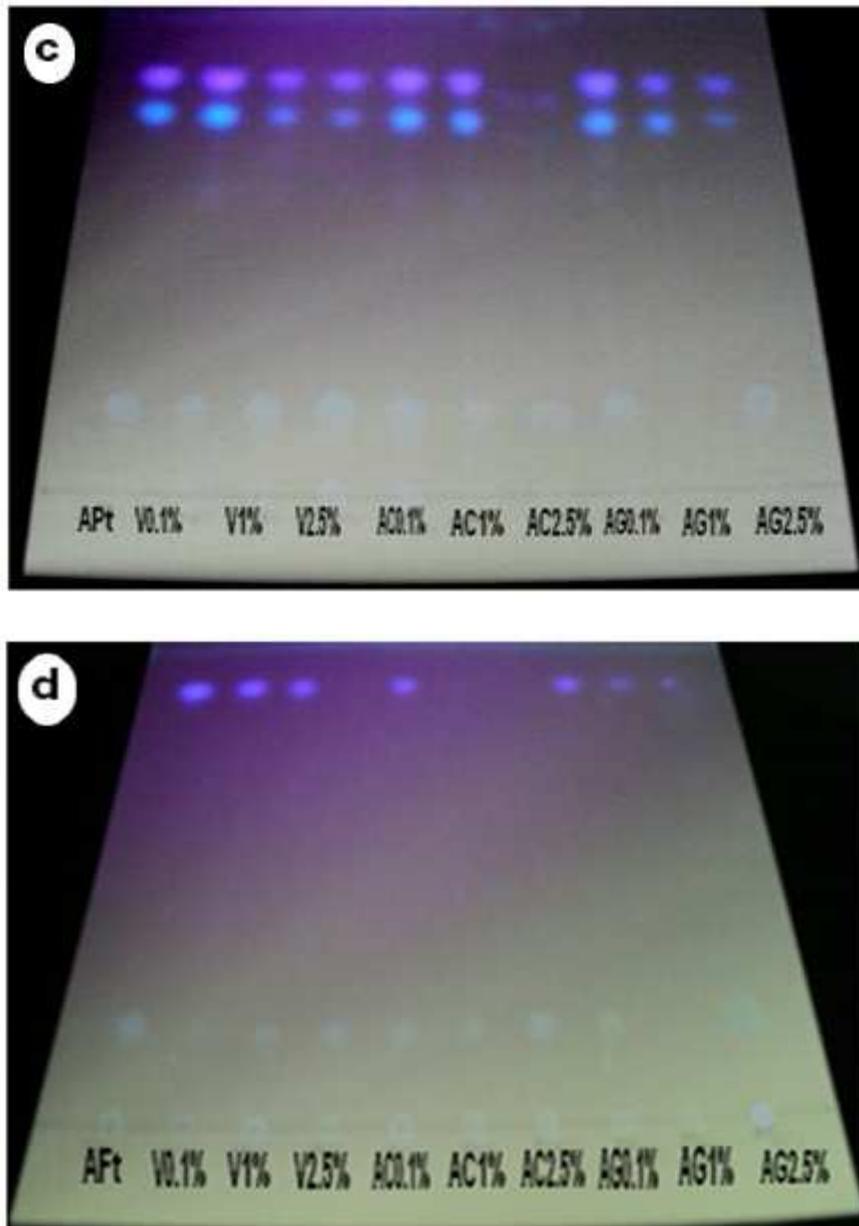
Figure 58: Photographies des chromatogrammes obtenus sur les extraits d'aflatoxines des deux souches tests *A. parasiticus* (a) et *A. flavus* (b). Ces extraits d'aflatoxines sont obtenus en présence des extraits phénoliques issus de feuilles, pulpes et margines, respectivement. La chromatographie est effectuée sur gel de silice, le développement est fait dans un système de solvants (chloroforme/acétone ; 90/10, v/v). La révélation des spots des aflatoxines G (lumière verte) et B (B1 et B2) (lumière bleue) est faite à 366nm.

Les spots obtenus sur les chromatogrammes (c) et (d) de la figure 59 confirment la présence de production d'aflatoxines aussi bien qualitativement que quantitativement. L'action inhibitrice des composés phénoliques est révélée par la diminution de la taille ou la disparition des taches ou spots par rapport aux témoins.

Avec la Vanilline, une diminution de la taille des taches est observée aux concentrations de 1% et de 2,5% avec *A. parasiticus*. Chez *A. flavus* par contre, il y a absence totale de production d'aflatoxines pour la concentration 2,5%. Une diminution de la taille des taches est observée aux concentrations de 0,1% et 1%.

Avec l'acide caféique une diminution de production d'aflatoxines à 1 % jusqu'à son absence à 2,5% pour *A. parasiticus*. Alors qu'une absence totale de production d'aflatoxines est observée aux concentrations de 1% et 2,5%.

La concentration de 0,1% d'acide gallique par rapport au témoin ne semble pas avoir un effet sur la production d'aflatoxines alors qu'une diminution des taches est observée aux concentrations de 1 et 2,5% chez *A. parasiticus*. Avec *A. flavus* une diminution des taches a été observée et cela pour toutes les concentrations étudiées.



APt : *A. parasiticus* témoin ; **AFt** : *A. flavus* témoin ; **V** : Vanilline ; **AC** : Acide caféique ; **AG** : acide gallique.

Figure 59: Photographies des chromatogrammes obtenus des extraits d'aflatoxines des deux souches tests *A.parasiticus* (c) et *A.flavus* (d).

Ces extraits d'aflatoxines sont obtenus en présence des composés phénoliques (vanilline, acide caféique ; acide gallique).

La chromatographie est effectuée sur gel de silice, le développement est fait dans un système de solvants (chloroforme/acétone ; 90/10, v/v). La révélation des spots des aflatoxines G (lumière verte) et B (B1 et B2) (lumière bleue) est faite à 366nm.

Sur le chromatogramme (e) de la figure 60 nous avons observé l'effet de l'oleuropéine sur et des tannins sur la production d'aflatoxines. En effet une diminution progressive des tailles des taches pour 0,1%, 1% et 2,5% d'oleuropéine avec *A. flavus*. Chez *A. parasiticus* une diminution des taches à 1% et absence totale de production d'aflatoxines à 2,5%. Avec les tannins une diminution de la taille de la tache à 0,1% et absence totale de production d'aflatoxines à 1 et 2,5% pour *A. flavus*. Pour *A. parasiticus* une diminution progressive des taches ont été observé cette diminution est plus marquée à 2,5% (v de tannins /v CAM).

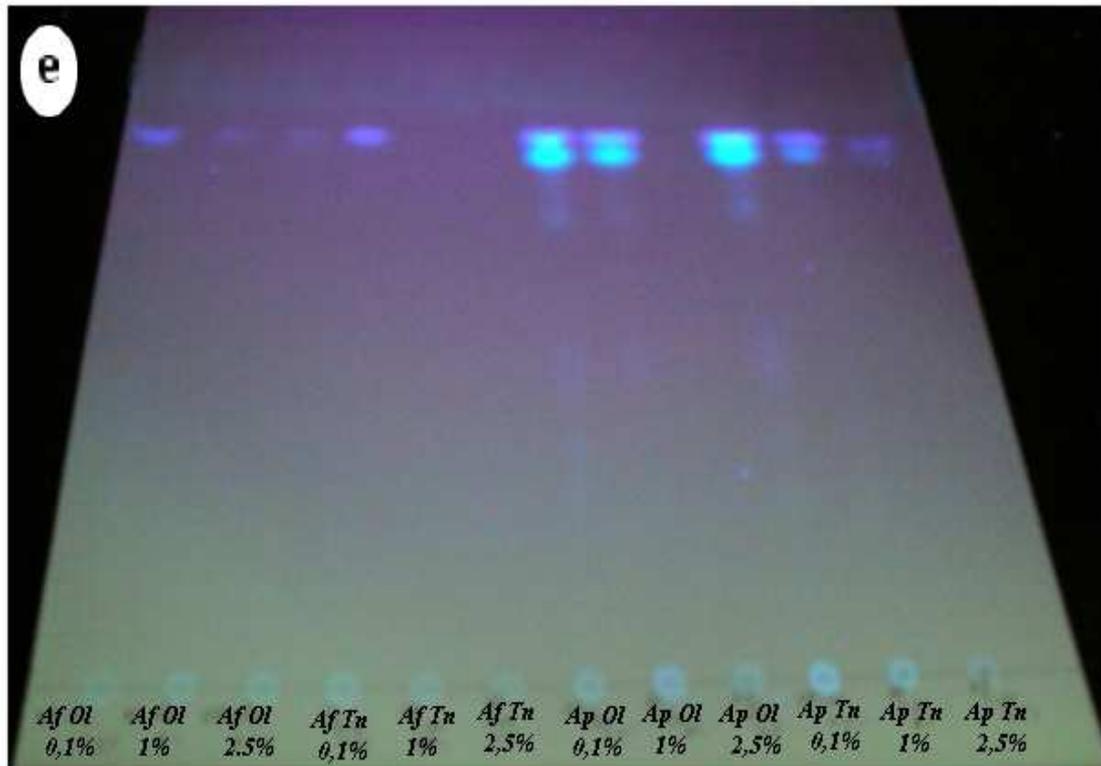


Figure 60: photo du chromatogramme résultant de l'analyse d'extraits d'aflatoxines des deux souches tests *A. flavus* (Af) et *A. parasiticus* (Ap) après traitement avec les polyphénols (Ol : oleuropéine, Tn : tannins) respectivement. Chromatographie effectuée sur gel de silice (révélation à l'UV à 366nm).

Discussion générale :

Cette discussion est orientée selon trois axes ou niveaux : Par rapport à l'utilisation de substances ayant des capacités antifongiques, il s'agit d'abord de donner un aperçu sur l'efficacité des molécules naturelles telles les polyphénols que nous avons utilisées dans ce travail, par rapport aux molécules synthétiques et autres molécules comme les minéraux ou même des microorganismes et qui peuvent présenter parfois certains avantages ou inconvénients et enfin le troisième volet est consacré à la compréhension d'une manière générale des mécanismes d'action de ces molécules qui provoquent parfois l'inhibition de croissance mais sans effet sur la production des toxines et vice-versa et parfois heureusement provoquer l'arrêt de croissance des moisissures et l'arrêt de production de leur toxines.

Ayant conscience du danger réel de la présence des produits chimiques ou fongicides dans les aliments à destination humaine et animale (propriétés carcinogéniques), les agriculteurs ainsi que les consommateurs se tournent de plus en plus vers des pratiques biologiques en utilisant et consommant des produits naturels et sains.

A notre connaissance, les polyphénols, molécules naturelles issues de l'olivier ne sont pas toxiques puisque nous consommons plus de 1g/jour et qu'ils seraient plutôt bénéfiques à notre santé. Ils n'ont pas été utilisés comme moyens de lutte antifongique, nous avons donc opté de comparer leur effet à d'autres molécules ou même parfois aux mêmes molécules issues d'autres plantes. Nous rappelons que les extraits phénoliques de margines, feuilles et pulpes ont eu des actions antifongiques à des taux parfois inférieurs à 2% sur les moisissures étudiées, il en est de même pour les polyphénols pris individuellement.

Parmi les molécules naturelles utilisées dans la lutte antifongique, un grand intérêt a été apporté aux phénylpropanoïdes. Les phénylpropanoïdes englobent plusieurs composés (acides phénoliques, les flavonoïdes comme les flavones, les flavonols, coumarines, chromones.....etc.) ayant des propriétés anti oxydantes et provenant de diverses plantes. En effet l'effet antibactérien et antifongique de ces molécules a été longtemps corrélé avec leur activité anti-oxydante (HAHLBROCK et SCHEEL, 1989 ; SHIRLEY, 1996 ; WEISSHAAR et JENKINS, 1998 ; TAMIL SELVI *et al*, 2003 ; OK-HWAN et BOO-YONG, 2010).

Ainsi l'eugénol, composant phénolique majeur des huiles essentielles des clous de girofle, cannelle, et noix de muscade a été testé. Des études expérimentales ont prouvé que les concentrations testées des extraits produits à partir de ces épices sont inhibitrices de la biosynthèse d'AF et cela en utilisant divers milieux de cultures (HITOKOTO *et al*, 1980; BILGRAMI *et al*, 1992 ; JAYASHREE et SUBRAMANYAM, 1999). Cependant, ces résultats sont en conflit avec d'autres études montrant la stimulation de la biosynthèse d'AF par l'eugénol (BULLERMAN *et al*, 1977 ; KARAPINAR, 1990 ; MAHMOUD, 1994). La durée d'incubation peut être un facteur important dans l'interprétation de cette différence. Par exemple, après 10 jours de culture 0,5 mM d'eugénol sur milieu « yeast extract agar » à base d'extrait de levure ont réduit la production d'AF de 29% par rapport au témoin, tandis qu'après 21 jours, la production d'AF a été réduite de 160% (BULLERMAN *et al*, 1977). Cela suggère que le temps d'incubation des cultures traitées par des composés inhibiteurs peut être un facteur limitant ou favorisant leur l'activité sur la croissance des moisissures et sur la production d'aflatoxines.

CHIPLEY et URAIH (1980) ont observé une inhibition de production d'aflatoxines de 50 % chez *A. flavus* en utilisant 0,2mg/ml (1mM) d'acide férulique ; un acide phénolique abondant dans les parois des cellules végétales. Cette inhibition est accompagnée d'une réduction de 30% de la croissance. FAJARDO *et al.* (1995) ont observé une inhibition complète de la production d'aflatoxines avec la même concentration après 7 jours d'incubation. NORTON et DOWD (1996) ont trouvé une stimulation de la production d'AF à 0,33 et 1mg/ml. Ces différences dans les résultats obtenus peuvent s'expliquer par les conditions de cultures différentes. Le premier essai a été effectué en milieu liquide sous agitation tandis que l'autre a été réalisée sur milieu solide par dépôt d'un disque mycélien central.

La vanilline, autre phénol simple que nous avons également testée et qui a présenté une faible action, a été testée par KIM *et al.* (2004) sur milieu PDA. Cette substance a montré une activité inhibitrice d'AF par *A. flavus* de 11% à une concentration de 5Mm par rapport au témoin avec une légère réduction de la croissance, tandis que des concentrations plus élevées étaient plus efficaces sur la croissance (KIM *et al.*, 2004).

Les coumarines inhibent la production d'AF au dessous de 0,1Mm, cette inhibition est accompagnée d'une réduction modérée de la croissance. Par exemple le pourcentage d'inhibition de l'acide *p*-coumarique à cette concentration sur milieu « glucose yeast extract salts » est de 23% (AZIZ *et al.*, 1998). Le mécanisme d'action des coumarines reste inconnu. Les auteurs suggèrent que les similitudes structurales entre les coumarines et l'AF peuvent avoir comme conséquence l'inhibition compétitive des enzymes biosynthétiques de cette dernière (FAJARDO *et al.*, 1995).

Les flavonoïdes sont considérés comme étant des inhibiteurs de la production d'AF bien que la plupart d'entre eux soient actifs à de fortes concentrations (ROBERT *et al.*, 2008). NORTON (1999) a testé l'activité de plusieurs flavonoïdes contre la production d'AF par *A. flavus*. Ces flavonoïdes incluent la cyanidine, péonidine, delphinidine, pélargonidine, kaempférol, et lutéoline. Les IC50 vont de 0,5mM à 0,6Mm. Les formes glycosylées des cyanidines et pélargonidines inhibent la production d'AF alors que les formes non glycosylées ont moins d'effet sur celle-ci. La lutéoline a montré une importante activité vis-à-vis d'*A. parasiticus* avec une IC50 <0,35Mm contre une IC50 de 6mM pour *A. flavus*. Le kaempférol inhibe la production d'AF par *A. flavus* mais non sur *A. parasiticus*.

MOHAMMEDI (2006) a montré que les flavonoïdes extraits de (fleurs, feuilles et tiges) de 4 espèces de plantes médicinales (*Lavandula stoechas* L, *Cistus ladaniferus* L, *Crataegus oxyacantha* L, *Smyrniium olusatrum* L) récoltées au niveau de 3 régions de Tlemcen testées par la méthode de contact direct que la souche d'*Aspergillus flavus* est remarquablement la plus résistante de toutes les moisissures testées, non seulement la colonie croit identiquement au témoin en présence de n'importe quel extrait flavonoïdique. Mais aussi il semblerait que certains extraits favorisent la prolifération et l'envahissement du mycélium avec les extraits flavonoïdiques de *Crataegus oxyacantha* L, *Smyrniium olusatrum* L.

Les tannins résultant de la condensation de formes phénoliques simples sont les composants abondants des coquilles de graine de la noix et de l'arachide. Les extraits de tannin des coquilles d'arachides ont montré une activité inhibitrice vis-à-vis de la production

d'AF chez *A. parasiticus* (AZAIZEH *et al.*, 1990). L'acide gallique issu des tannins hydrolysables a montré aussi un effet inhibiteur que nous avons également mis en évidence. En effet cette fraction hydrolysable des tannins des écales du grain de noix de la variété résistante de *Tulare* a inhibé complètement la production d'AF par *A. flavus*. Bien qu'il y ait eu une certaine inhibition de croissance au début, au cours du temps une croissance normale a été observée. Des essais ont prouvé que l'acide gallique ajouté *in vitro* à des noix contaminées par *A. flavus* inhibe totalement la production d'AFB 1 avec une IC50 de 1mM, tandis que l'acide ellagique appartenant aussi à la famille des tannins hydrolysables a montré une stimulation de celle-ci (MAHONEY et MOLYNEUX, 2004). Le mécanisme d'inhibition de la production d'AF serait du aux propriétés anti-oxydantes de l'acide gallique (ROBERT *et al.*, 2008 ; YOU-CHENG HSEU *et al.*, 2008).

D'autres molécules ont été aussi testées pour l'inhibition des aflatoxines on peut citer ceux appartenant aux familles des terpénoïdes et des alcaloïdes.

Les terpénoïdes sont une classe de composés naturels synthétisés au niveau des plantes par la voie de l'acide mévalonique. En effet il a été reporté, à l'exception du limonène 11 terpénoïdes qu'ils inhibent la biosynthèse des aflatoxines. Testé en milieu solide et liquide avec une IC50 de 0,5Mm, l' α -carotène bloque totalement la synthèse du premier précurseur stable des aflatoxines (NOR) chez un mutant d'*A. parasiticus*.

Parmi les alcaloïdes le café est le plus étudié comme inhibiteur de la production d'aflatoxines. En effet en utilisant le café comme milieu de remplacement de la culture d'*Aspergillus flavus* celui-ci inhibe la production d'aflatoxines (BUCHANAN et LEWIS, 1984). Ces observations confirment l'étude démontrant que les graines et poudre de café décaféinées comportent un taux élevé d'aflatoxines. L'incorporation du café dans le milieu Czapek's à des concentrations de 1% et 3% réduit la production d'aflatoxines de 25% et 52% respectivement sans aucune inhibition de croissance significative (HASAN, 1999). Le mode d'action proposé pour la caféine est son interférence avec le glucose du milieu. La caféine inhibe la prise du glucose d'une manière dose dépendante ainsi la prise du glucose est réduite de 50% à 10Mm de caféine.

L'addition de l'acide phytique composant abondant dans les graines végétales comme le maïs et le soja, sur milieu à forte concentration en sucrose à 10 mM (~6,6 mg/ml) inhibe la production d'AF de 87%, bien que la croissance fongique n'ait pas été rapportée par GUPTA et VENKITASUBRAMANIAN (1975). L'AF B est plus sensible à l'inhibition que l'AF G le pourcentage d'inhibition est de 46% et 8% respectivement.

EHRlich et CIEGLER (1984) ont constaté des variations de l'effet de l'acide phytique sur la production d'AF par *A. parasiticus*, en utilisant divers milieux de cultures à des pH différents. Exemple ; une concentration de 14,3Mm d'acide phytique à un pH de 6,6 a un effet inhibiteur plus important qu'à pH 4,5 (250% et 115% respectivement). Bien que l'effet sur la production d'AF par l'acide phytique soit attribué à la chélation du zinc et d'autres cations polyvalents indispensables à la synthèse d'aflatoxines. L'acide phytique est un antioxydant naturel, cette activité anti-oxydante peut expliquer ses propriétés anti-toxigéniques (GRAF *et al.*, 1987).

Ainsi l'utilisation d'agents anti-fongiques peut apporter une garantie complémentaire lorsqu'un risque prévisible existe (PAUL *et al.*, 2008), en effet divers produits chimiques ont été testés contre la croissance et la production d'aflatoxines sur plusieurs espèces d'*Aspergillus spp.* Parmi les 10 fongicides testés par REDDY *et al.* (2009) sur le riz, à des concentrations de 3 et 4 g /kg de grains de riz sur milieu PDA, le bitertinol et le propineb ont complètement empêché la croissance d'*Aspergillus parasiticus* avec 100% d'inhibition après 6 jours d'incubation, alors qu'il est de 28% et 30% respectivement chez *Aspergillus flavus*. Alors qu'avec le Carbendazim, Hexaconazole, Folicur, Propiconazole, Saaf, le pourcentage d'inhibition de croissance d'*Aspergillus flavus* est de 100% et cela pour toutes les concentrations étudiées (1, 2, 3 et 4 g / kg de graines de riz). L'étude de la production d'aflatoxine B1 chez *Aspergillus flavus* a été testée en parallèle et évaluée par la méthode immunologique (ELISA). Les résultats montrent que la concentration de 4g/kg de grains de riz, des antifongiques suivants : protega, bitertinol, indofil, propineb, tricyclazole réduisent la production d'aflatoxines de 66%, 83%, 94%, 95% , 99% respectivement.

Cinq autres produits chimiques ont été aussi testés en plus de ces 10 antifongiques (l'acide acétique, l'acide benzoïque, l'acide propionique, le chlorure de Sodium et la vanilline) sur la croissance et la production d'AF. Concernant la croissance, les pourcentages d'inhibition les plus élevés ont été observés avec l'acide acétique, l'acide benzoïque et l'acide propionique avec 63%, 72%, 65% d'inhibition respectivement avec la concentration de 4g/kg de grains de riz. Les plus faibles pourcentages ont été observés avec le chlorure de sodium et la vanilline avec 13 et 17 % d'inhibition respectivement.

La production d'AF a été aussi évaluée par ELISA, la vanilline inhibe complètement la production d'AF à 4g/kg de grains de riz suivie par le chlorure de sodium avec 77% d'inhibition. L'acide acétique, l'acide benzoïque et l'acide propionique avec 48,4%, 48,7% et 44,4% d'inhibition respectivement.

D'autres substances ont aussi été testées comme le formaldéhyde, l'hydroxyde de calcium, l'hydroxyde de sodium, le chlorure de sodium, l'hypochlorite de sodium, peroxyde d'hydrogène et l'ammoniaque (REDDY *et al.*, 2009).

L'hydroxytoluène butylé (BHT), Hydroxyanisole butylé (BHA) et le propyl paraben (pp) antioxydants synthétiques sont utilisés dans l'industrie agroalimentaire et en cosmétique. Ils sont utilisés comme agents conservateurs, empêchant le développement des champignons et des bactéries. Ils ne présentent aucun danger pour l'homme à un seuil maximal de 200µg/g de graisse ou d'huile (ANONYME 4, 2006). Considérant que la teneur en huile des arachides s'étend de 40 à 50%, donc une dose de 100µg/g de poids total des graines d'arachides peuvent être appliquées. PASSONE *et al.* (2008) ont montré que les concentrations testées de 10 à 20mM de ces antioxydants pris individuellement avec une activité d'eau (a_w) de 4, aident à contrôler la croissance et la production d'aflatoxines chez *A. flavus* et *A. parasiticus*.

Une autre façon d'augmenter la qualité sanitaire des aliments est l'utilisation de ligands minéraux et organiques ou de micro-organismes détoxifiant les mycotoxines afin de limiter l'absorption des mycotoxines dans l'organisme de l'animal. Ceci permettrait de contrecarrer les effets néfastes des mycotoxines. De nombreuses études ont été effectuées

dans ces domaines mais peu d'entre elles ont des applications faisables techniquement et économiquement (JARD, 2009).

Parmi les adsorbants ou ligands minéraux utilisés dans ce contexte, on trouve, le charbon activé, les argiles (aluminosilicates, aluminosilicates de sodium calcium hydratés, zéolithes) en qualité d'adsorbant biologiques (DECKER et CORBY, 1980 ; PHILLIPS *et al*, 1988 ; DAKOVIC *et al*, 2005 ; DAKOVIC *et al*, 2008).

Les propriétés de l'adsorbant et des mycotoxines jouent un très grand rôle dans leur capacité à s'adsorber entre eux. En effet, la structure physique de l'adsorbant soit la charge totale et sa distribution, la taille des pores et l'accessibilité de la surface ont une importance primordiale dans l'efficacité de l'adsorption. Les caractéristiques des mycotoxines telles que leur polarité, leur solubilité, leur taille, leur forme et, dans le cas de composés ionisés, leur distribution de charge et leur constantes de dissociation sont également importantes.

L'ajout d'adsorbants dans la ration alimentaire d'animaux est la méthode la plus utilisée pour centrer l'effet néfaste des mycotoxines. Ces adsorbants ne sont efficaces que si le complexe formé est stable dans le système digestif afin que les mycotoxines ne se retrouvent que dans l'urine et les matières fécales.

En effet l'utilisation du charbon permet *in vitro* l'adsorption de 1mg AFB1/100 mg de la ration alimentaire d'animaux. Du fait de l'interchangeabilité des cations positionnés sur les différentes couches, les montmorillonites et bentonites appartenant à la famille des aluminosilicates semblent efficaces contre l'AFB1, l'OTA (ochratoxines) *in vitro* elles adsorbent plus de 93% de l'AFB1, 100% de l'AFB1 adsorbée dans du liquide de rumen bovin est adsorbée *in vitro* sur des zéolithes non modifiées.

Des polymères peuvent être utilisés : La cholestyramine est une résine échangeuse d'anions utilisée pour fixer les acides biliaires dans le tractus intestinal. Ce composé est capable d'adsorber la zéaralénone (ZEA) et la FB1. Ce composé semble être efficace *in vitro* et *in vivo* (JARD, 2009).

Les acides humiques sont des substances organiques complexes, constituantes de l'humus, provenant de la décomposition des débris végétaux. Ces acides humiques ont la capacité d'adsorber les mycotoxines, notamment l'AFB1 (JANSEN VAN RENSBURG *et al*, 2006) et la ZEA mais très peu le Déoxynivalénol (DON) (SABATER-VILAR *et al*, 2007).

Les adsorbants minéraux sont en général efficaces pour adsorber l'AFB1 et éviter des aflatoxicoses mais l'efficacité varie contre les autres mycotoxines. De plus, dans certains cas, l'ajout d'argile augmente les effets de mycotoxicoses (MAYURA *et al*, 1998 ; LEMKE *et al*, 2001a). Par ailleurs, ces adsorbants ne sont pas spécifiques des mycotoxines et ils peuvent adsorber tous types de molécules de mêmes caractéristiques physico-chimiques, celles-ci étant parfois indispensables pour l'animal ou pouvant être impliquées dans la lutte contre les mycotoxicoses (MAYURA *et al*, 1998).

L'utilisation de fibres végétales insolubles a aussi été envisagée pour adsorber les mycotoxines présentes dans des aliments et en particulier l'OTA (TANGNI *et al*, 2006).

Les limites des adsorbants minéraux ont poussé les scientifiques à se tourner vers d'autres méthodes. De nombreuses études se sont portées ces dernières années sur les adsorbants de nature biologique, cherchant à obtenir une bonne efficacité et une meilleure

spécificité d'adsorption tout en diminuant l'impact sur la qualité nutritionnelle des aliments par rapport aux adsorbants minéraux.

En effet des souches entières de levures, *Saccharomyces cerevisiae* ou d'autres types de levures oenologiques ont la capacité d'adsorber les mycotoxines avec une efficacité très variable. Les éléments responsables de cette adsorption, des glucomannanes extraits de parois de levures, ont été testés séparément *in vitro* et *in vivo*. En effet 40% de l'AFB1 est adsorbée par la paroi de *Saccharomyces cerevisiae*, *in vivo* une baisse des effets génotoxiques de l'AFB1 après ajout de *S. cerevisiae* chez le rat est observée (SHETTY et JESPERSEN, 2006).

Certaines souches de bactéries lactiques, de propionibactéries et de bifidobactéries possèdent des structures pariétales capables de se lier aux mycotoxines. L'efficacité d'adsorption dépend beaucoup des souches étudiées (PELTONEN *et al.*, 2001). L'adsorption entre les mycotoxines et les bactéries lactiques semble être due à des polycarbonates, provoquant des liaisons hydrophobes (HASKARD *et al.*, 2000 et EL-NEZAMI *et al.*, 2004). En effet *L. acidophilus*, *L. lactis* *L. fermentum* ont montrés *in vitro* une adsorption de 40 à 70% de l'AFB1 par des ces bactéries vivantes ou mortes.

Un nombre important d'organismes (bactéries, moisissures, champignons...) ont aussi montré une capacité à métaboliser des mycotoxines. CIEGLER *et al.* (1966) ont montré qu'une bactérie, *Flavobacterium aurantiacum* (également nommée *Nocardia corynebacterioides*), est capable d'éliminer complètement cette mycotoxine. Des études ultérieures ont permis de prouver que la transformation ne conduit pas à un produit toxique (LILLEHOJ *et al.*, 1967) et qu'une enzyme intracellulaire est impliquée (SMILEY et DRAUGHON, 2000).

Peu d'études ont été menées jusqu'à l'identification de produits formés. Seules des suppositions ont été formulées concernant des enzymes d'*A. tabescens* qui ouvriraient le cycle difurane (LIU *et al.*, 1998), ou de *Pleurotus ostreatus* qui ouvriraient quant à elles le cycle lactone de l'AFB1.

Actuellement, l'information sur le mécanisme d'action des antioxydants phénoliques sur les cellules fongiques est limitée. Il a été suggéré que le BHA affecte la membrane des cellules en changeant le pH du milieu ce qui affecte le transport des nutriments (PASSONE *et al.*, 2009). En ce qui concerne les parabènes divers mécanismes ont été proposés pour leur action antimicrobienne. Ils peuvent empêcher des fonctions de plusieurs enzymes, altérer des protéines, la synthèse d'ARN et d'ADN et la destruction du potentiel membranaire. Des études ont montré que le mélange du BHA, phénylpropanoïdes et le BHT étaient plus efficace que pris individuellement dans le contrôle la croissance et l'accumulation d'AFB1 par *Aspergillus* de la section *Flavi* dans les graines d'arachides (PASSONE *et al.*, 2007 ; PASSONE *et al.*, 2008 ; PASSONE *et al.*, 2009).

Des études ont montré que la biosynthèse d'AF est calcium-dépendante. L'utilisation de la trifluopérazine (TFP), un antagoniste de la calmoduline, empêche la croissance fongique à des concentrations > 0,10 mM, et la production d'AF a été réduite à 18,4% par rapport aux témoins après 3 jours d'incubation en présence de 0,14 mM TFP. L'addition de 1 mM TFP aux cultures après 7 jours d'incubation a donné une inhibition complète de production d'AF sans réduction de croissance a été observée chez *A. parasiticus* (RAO *et al.*, 1998). Un autre

mode d'action a été attribué pour la TFP peut être son interférence avec de l'acétyl CoA qui conduit à la production de malonyl-CoA précurseur de la biosynthèse d'AF (RAO et SUBRAMANYAM, 2000).

L'altération du transport du calcium peut également affecter négativement la production d'AF. Le Traitement de *A. parasiticus* par des bloqueurs de canaux de calcium (vérapamil et diltiazem) inhibent fortement l'accumulation d'AF avec seulement une diminution négligeable de la croissance. La synthèse d'AFG est plus sensible aux bloqueurs de canaux de calcium que n'est la synthèse des AFB (RAO et SUBRAMANYAM, 1999).

D'après ces études, il est évident que les composés inhibiteurs interagissent différemment avec les espèces *Aspergillus spp* testés et avec les milieux de cultures utilisés qu'ils soient liquide ou solide, naturel ou synthétique, cultures statique ou sous agitation et à différentes teneurs d'eau dans le substrat facteur appelé activité d'eau (a_w) et encore d'autres facteurs. Ces différences accentuent la difficulté inhérente de comparer les différentes études sur les inhibiteurs de production d'AF et d'extrapoler les résultats obtenus *in vitro* dans des conditions *in vivo* (ROBERT *et al.*, 2008).

L'agriculture biologique est souvent controversée pour une présence supposée de moisissures plus importante que dans l'agriculture conventionnelle. Or, l'ajout de ces pesticides ne semble pas influencer sur le taux de mycotoxines (CHAMPEIL *et al.*, 2004). Au contraire, de façon globale, certaines études montrent que l'agriculture conventionnelle comporte plus de risques mycotoxiques que l'agriculture biologique (FINAMORE *et al.*, 2004 ; SCHNEWEIS *et al.*, 2005).

Néanmoins l'activité anti-oxydante n'est pas toujours positivement corrélée avec l'inhibition de la biosynthèse d'aflatoxines. Si l'activité anti-oxydante est importante pour le mode d'action de ces composés, probablement d'autres facteurs additionnels semble peut être exigés pour l'inhibition. Ils peuvent inclure leur biodisponibilité, leur mobilité intracellulaire, leur interaction avec des enzymes spécifiques, l'ensemble des métabolites ou des voies de signalisation (ROBERT *et al.*, 2008). La compréhension du phénomène d'inhibition de production d'Aflatoxines (AF) et de la croissance des espèces productrices est un fait très complexe. Toutefois les outils de la biologie moléculaire, la biochimie et la microbiologie ont permis grâce à l'utilisation de diverses molécules d'origine synthétique et naturelles de mieux comprendre leur mode d'action. Tandis que le mode d'action de la plupart des composés inhibiteurs est inconnu, des études utilisant l'acide norsolorinique (NOR) précurseur de la voie de biosynthèse des aflatoxines dans des moisissures mutantes ne produisant pas ou peu d'aflatoxines, suggère que la plupart des inhibiteurs agissent avant la première étape consacrée dans la voie biosynthétique des aflatoxines. Il y a peu d'évidence pour les composés décrits ayant un effet sur la transcription de gène ou l'activité enzymatique des différentes étapes dans la voie biosynthétique. Plus probablement, les composés inhibiteurs connus affectent les modulateurs environnementaux et physiologiques de la biosynthèse d'AF (par exemple par piégeage direct des ERO (espèces oxygénées réactives), ou en altérant les signaux des voies de transduction en amont du réseau de régulation de cette dernière (ROBERT *et al.*, 2008).

En résumé les inhibiteurs de la biosynthèse d'AF peuvent agir à trois niveaux:

- En modulant les facteurs environnementaux et physiologiques affectant la biosynthèse d'aflatoxines (pH, température, calcium, azote....etc.);
- en inhibant les voies de signalisation en amont de la voie biosynthétique des AF ;
- en inhibant directement l'expression des gènes ou l'activité enzymatique dans la voie biosynthétique des AF.

Les conditions de croissance des moisissures et la production d'aflatoxines dépendent de plusieurs facteurs, comme les conditions de culture (sous agitation ou statique), la composition des milieux de cultures utilisés, température, l'âge de la culture et la concentration des composés testés (ROBERT *et al*, 2008 ; REDDY *et al*, 2009).

Conclusion

CONCLUSION :

Dans le but de rechercher de nouvelles molécules capables de réduire ou d'inhiber la production d'aflatoxines et également dans le but de valoriser des produits et sous produits des industries oléicoles qui posent des problèmes de pollution comme les margines nous avons tenté d'étudier leurs effets antifongiques. Des extraits phénoliques des produits et des sous produits de l'olivier (Feuilles, pulpes, margines) ainsi que l'effet des polyphénols pris individuellement (vanilline, acide gallique, acide caféique, oleuropéine, tannins) sur deux souches potentiellement productrices de ces substances ont été étudiées. Il s'agit de deux souches de moisissures appartenant à la section *Flavi*. *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*.

Pour l'étude quantitative des composés phénoliques présents dans les feuilles, pulpes et margines, nous avons opté pour des méthodes d'extractions simples décrite par (GARIBOLDI *et al.* (1986) ; BRENES *et al.* (1995) et DE MARCO *et al.* (2007) respectivement. Il ressort des résultats obtenus que les matières premières de l'olivier utilisées sont riches en composés phénoliques. La teneur la plus élevée est obtenue avec les feuilles d'olivier soit une teneur de $[16,78 \pm 1,02]$ mg en équivalent d'acide gallique/g de poudre de feuille.

La teneur en polyphénols des pulpes d'olives est de $[7,49 \pm 0,31]$ mg EAG/g de pulpe. Cette teneur est plus importante que celles des espèces d'oliviers cités dans les données bibliographiques.

L'étude du pouvoir antioxydant par le DPPH a confirmé les propriétés puissantes que possèdent les extraits phénoliques à piéger les radicaux libres par rapport au standard utilisé dans ce test (acide gallique). Les résultats obtenus sur leur action antifongique est peut être due a cette activité anti-oxydante. Parmi les trois extraits d'oliviers, l'extrait des margines représente l'extrait le plus actif avec une IC50 de l'ordre de $16,33 \pm 0,47 \mu\text{g/ml}$ et une APR de $2,44 \pm 0,070$ suivie par les feuilles avec une IC50 de $26,85 \pm 0,21 \mu\text{g/ml}$ et une ARP de $1,49 \pm 0,014$ et enfin l'extrait des pulpes d'olives avec une IC50 de l'ordre de $28,75 \pm 0,22$ et une ARP de $1,38 \pm 0,152$. Le meilleur pouvoir antioxydant est donné par les extraits phénoliques des margines.

Les extraits polyphénoliques ont montré un effet inhibiteur sur la croissance des deux souches. Cependant l'extrait de feuilles a montré un effet inhibiteur plus important pour toutes les concentrations étudiées. Cet effet est plus important sur *A. parasiticus*. Le pourcentage d'inhibition après 7 jours d'incubation est de $57,77 \pm 0,96 \%$ alors qu'il est de $41,10 \pm 0,95\%$ pour *A. flavus* à 2,5%.

Tous les composés phénoliques testés individuellement ont un effet sur l'inhibition de la croissance des deux souches ; l'acide caféique semble avoir un meilleur pouvoir inhibiteur qui est plus marqué à 2,5% avec $79,99 \pm 2,88 \%$ d'inhibition sur *A. parasiticus*, alors qu'il est de $66,10 \pm 0,95 \%$ sur *A. flavus* pour la même concentration.

Les tannins ont aussi un effet inhibiteur non négligeable sur la croissance de *A. flavus* avec un pourcentage d'inhibition qui est de l'ordre de $76,10 \pm 0,95\%$.

Un effet sur la sporulation a été observé et ce paramètre n'est pas à négliger sachant que ce dernier constitue la forme de résistance et de dissémination de ces espèces pathogènes. En effet les extraits de feuilles, pulpes et margines ont montré un effet sur la sporulation des deux souches cet effet est plus marqué sur *A. parasiticus* et cela pour toutes les concentrations étudiées.

L'effet sur la sporulation a été aussi observé avec les autres composés phénoliques (vanilline, acide gallique, oleuropéine, tannins) pour les deux souches à 1 et 2,5%. L'acide caféique est le phénol qui présente la plus forte activité.

Les composés et les extraits phénoliques ont montré aussi une efficacité vis-à-vis de la production des aflatoxines par les deux souches tests via le Screening de la fluorescence caractéristique des ces dernières bleue (bleu) pour les aflatoxines B et verte (green) pour les aflatoxines G et cela par UV à 366nm qui est ensuite confirmée par CCM.

L'extrait de feuilles a révélé une action inhibitrice totale sur la production d'aflatoxines sur les deux souches tests à la concentration de 2,5%. L'extrait de pulpe et de margines ont également une action inhibitrice sur la production d'aflatoxines aux concentrations de 1% et 2,5%.

L'efficacité des extraits phénoliques sur la production des aflatoxines a été prouvée et peut être classée comme suit selon l'ordre croissant de leur activité: Acide caféique > oleuropéine > tannins > acide gallique > vanilline.

Les résultats issus de l'étude microbiologique ont montré que les trois extraits phénoliques ainsi que les composés phénoliques pris individuellement exercent une importante activité antifongique vis-à-vis des deux souches tests *A. flavus* et *A. parasiticus*. En effet de très faibles doses ont conduits à l'inhibition de leurs croissances et même à l'absence de sporulation.

Cette inhibition semble étroitement corrélée au potentiel antioxydant que possèdent ces molécules. Selon la bibliographie, les acides phénoliques bloqueraient la synthèse de toxines en réduisant l'expression des principaux gènes codant les enzymes des voies de biosynthèse. Cette inhibition de la croissance par les extraits et les composés phénoliques suggère que ces dernières peuvent aussi interférer avec les enzymes vitales de ces souches.

En tant qu'additifs alimentaires naturels préservateurs, les polyphénols promettent un large champ d'utilisation. Etant donné que les aflatoxines posent un problème sanitaire sérieux par leur capacité à contaminer une large gamme de denrées alimentaires, des matières premières aux produits transformés. L'emploi de ces molécules constitue une alternative qui permet aux industriels du secteur agroalimentaire de s'affranchir de l'étiquetage systématique relatif aux ingrédients synthétiques (antioxydants et antifongiques synthétiques...) qui suscitent la suspicion du consommateur.

Ces résultats sont prometteurs et suggèrent la possibilité d'utiliser les composés phénoliques comme moyens de lutte biologique contre la croissance et la production des aflatoxines voir même des autres classes de mycotoxines.

Ces résultats obtenus *in vitro* ne constituent qu'une première étape préliminaire. Des essais complémentaires seront nécessaires et devront confirmer les performances mises en évidence. Il serait donc intéressant de mener dans l'avenir :

- des études détaillées sur les fractions des extraits naturels démontrant une activité antifongiques et anti-aflatoxinogène *in vitro*. En vue d'identifier les composés responsables de cette activité par des techniques plus performantes chromatographiques ou électrophorétiques;

- de faire des combinaisons de polyphénols dans le but d'optimiser leur effet antifongique et valoriser ainsi les composés phénoliques des feuilles d'olivier et des fruits qui sont très riches en oleuropéine et autres phénols ;
- valoriser les composés phénoliques des margines, considérées comme source importante d'antioxydants naturels, et peut être contribué de cette manière à diminuer leur effet polluant sur l'environnement;
- proposer des méthodes d'extraction et de préservation des extraits phénoliques ;
- dans le cas d'un usage à des fin alimentaires, des études toxicologiques poussées devraient être entreprises dans la mesure où le label « produit naturel » n'est pas suffisant pour garantir la totale innocuité de ces composés car ces extraits sont obtenus par des solvants dont les résidus peuvent être toxiques.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

ABAD-GARCIA B., BERRUETA L A., LOPEZ-MARQUEZ D.M., CRESPO-FERRER I., & GALLO B VICENTE F. (2007). Optimization and validation of a methodology based on solvent extraction and liquid chromatography for the simultaneous determination of several polyphenolic families in fruit juices. *Journal of chromatography*, 1154 (1-2), 87-96.

ANONYME 1. (2009). Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport final, Agence française de sécurité sanitaire des aliments. **A.F.S.S.A.**

ANONYME 2. (2008). Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale. 5^{ème} édition. Ministère de la santé, de la population et de la réforme hospitalière. Algérie. **OMS.** 1-106p.

ANONYME 3. (2006). Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport synthétique, Agence française de sécurité sanitaire des aliments. **A.F.S.S.A.**

ANONYME 4. (2006). Food additive details. Update up to the twenty-ninth session of the codex alimentarius commission. The Joint FAO/WHO Committee on food additives.

ANONYME 5. (2006). Rapport d'activité : (MICA - Axe B - CT2). Les acides phénoliques, de puissants effecteurs de la biosynthèse des trichothécènes : Champ thématique CT2 (MICA) : risque microbiologique en santé animale et alimentation humaine..Pôle sécurité des aliments. *Mycologie et Sécurité des Aliments - MycSA / Upr 1264 – INRA (MICA - Axe B - CT2).*

ANONYME 6. (1997). Agriculture food and nutrition for Africa: a resource book for teachers of agriculture. *Food and Agricultural Organization of the United Nation.* **FAO.**

ANONYME 7. (1993). Aflatoxins *In: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemical to humans. Some naturally-occurring substances: Food Items and Constituents. Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins.* **IARC (International Agency for Research on Cancer)** . Lyon, France, 56, 359-362.

AIT BADDI G., CEGARRA J., MERLINA G., REVEL J.C., HAFIDI M. (2008). Qualitative and quantitative evolution of polyphenolic compounds during composting of an olive-mill waste–wheat straw mixture. *Journal of Hazardous Materials.* Article in press.

ALAM S & MOSTAHAR S. (2005). Studies of Antimicrobial Activity of two synthetic 2',4',6'-trioxygentaed Flavones. *Journal of Applied Sciences*, 5 (2), 327-333.

ALIBERT G., RANJEVA R., BOUDET M.A. (1977). Organisation subcellulaire des voies de synthèse des composés phénoliques. *Physiologie Végétale*, 15, 279- 301.

ALI N., HASHIM N. H., SAAD B., SAFAN K., NAKAJIMA M. & YOSHIZAWA T. (2005). Evaluation of a method to determine the natural occurrence of aflatoxins in commercial traditional herbal medicines from Malaysia and Indonesia. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 1763–1772.

ALLOUCHE N., FKI I., & SAYADI S. (2004). Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 267–273.

ALTIOK EVREN., DENIZ BAYCINLI., OGUZ BAYRAKTAR., SEMRA ÜLKÜ .(2008). Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. *Separation and Purification Technology*, 62, 342–348.

ALONSO-SALCES R.M., HEBERGER K., HOLLAND M.V., MORENO-ROJAS J.M., MARIANI C., BELLAN G., RENIERO F., GUILLOU C. (2010). Multivariate analysis of NMR fingerprint of the unsaponifiable fraction of virgin olive oils for authentication purposes. *Food Chemistry*, 118, 956–965.

AMARAL CARLA., MARCO S. LUCAS., JOA˜O COUTINHO., ANTONIO L. CRESPIˆ., MARIA DO ROSA ˆRIO ANJOS A., CELYIA PAIS B. (2008). Microbiological and physicochemical characterization of olive mill wastewaters from a continuous olive mill in Northeastern Portugal. *Bioresource Technology*, 99, 7215–7223.

ANDREASEN M. F., LANDBO A.K., CHRISTENSEN L. P., HANSEN A., ET MEYER A. S. (2001). Antioxydant effects of phenolic rye (*Secale cereale* L.) extracts, monomeric hydroxycinnamates, and ferulic acid dehdrodimers on human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4090-4096.

ARCHAMBAUD .M. (2009). Méthodes d'évaluation de l'activité des antibiotiques *in vitro* Laboratoire Bactériologie-Hygiène CHU Rangueil Toulouse. *Revue générale*, 2 (1), 1-8.

ATOUI ALI KHALIL. (2006). Approche de la mycotoxinogenese chez *Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus carbonarius*, études moléculaire et physiologique. Thèse de Doctorat en Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries. Spécialité: Microbiologie & Biocatalyse Industrielles. Institut national polytechnique de toulouse.199p.

ATWAL R. (2003). In vitro Antimicrobial Activity Assessment of zymox otic solution Against a Broad Range of Microbial Organisms. *Journal of Applied Research in Veterinary Medecine*, 1 (3), 240-252.

AYERST G. (1969). The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. *Journal of Stored Products Research*, 5, 127-141.

AZAIZEH HA, PETTTIT RE, SARR BA, PHILLIPS TD. (1990). Effect of peanut tannin extracts on growth of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin production. *Mycopathologia*, 110, 125–132.

BACULARD A. & TOURNIER G. (1995). Aspergilloses broncho-pulmonaires et mucoviscidose, *Revue de Pneumologie Clinique*, 51, 159-162.

BADEA MIHAELA., TAUS NICOLETA., POTROVITA MONICA., MOARCAS MONICA.(2009). Toxicological studies of mycotoxins using enzymatic and histochemical methods. *Water Air Soil Pollution*, 9, 261–269.

BADILLET G., DE BRIEVE C., GUEHO E. (1987). Champignons Contaminants des Cultures, Champignons Opportunistes, *Atlas clinique et biologique*, vol II, Ed VARIA, Paris. 216p

BAHORUN T., GRESSIER B., TROTIN F., BRUNET C., DINE T., LUYCKX M., VASSEUR J., CAZIN M., CAZIN J.C. & PINKAS M.(1996). Oxygene species scavenging. Activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung/ Drug Research*, 46II (11), 1086-1089.

BAIRD R.E., TRIGIANO R.N., WINDHAM G., & al. (2006). Comparison of aflatoxigenic and nonaflatoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* using DNA amplification fingerprinting techniques. *Mycopathologia*, 161, 93–9.

BELGHAZI L., LAHLOU M., ALAOUI ISMAILI M., ABOUSAOURIA T., HABTI.N., TANTOU IIRAKI A., TALBI M., BLAGHEN M & FELLAT - ZARROUCK K. (2002). Extraction et analyse par chromatographie en phase gazeuse de l'huile essentielle de la Menthe pouliot. Test antifongique. *Biochimie et santé*, 38-40.

BENAVENTE-GARCIA O., CASTILLO J., LORENTE J., ORTUNÄ A., DEL RIO J.A.(2000).Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*, 68, 457-462.

BENDINI ALESSANDRA., CERRETANI LORENZO., CARRASCO-PANCORBO ALEGRIA., GÓMEZ- CARAVACA ANA MARIA., SEGURA-CARRETERO ANTONIO., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ ALBERTO AND LERCKER GIOVANNI. (2007). Phenolic Molecules in Virgin Olive Oils: a Survey of Their Sensory Properties, Health Effects, Antioxidant Activity and Analytical Methods. An Overview of the Last Decade. *Molecules*, 12, 1679-1719.

BENDINI A., CERRETANI L., VECCHI S., CARRASCO-PANCORBO.A & LERCKER G. (2006). Protective effects of extra virgin olive oil phenolics on oxidative stability in the presence or absence of copper ion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4880-4887.

BENDINI A., BONOLI M., CERRETANI L., BIGUZZI B., LERCKER G., GALLINA-TOSCHI T. (2003). Liquid-liquid and solid-phase extractions of phenols from virgin olive oil and their separation by chromatographic and electrophoretic methods. *Journal. Chromatography, (A)*, 985, 425-433.

BERTHODE A., BILLARDELLO B. & GEOFFROY S. (1999). Polyphénols in countercurrent chromatography. An example of large scale separation. *Analysis*, 27, 750-757.

BETA T., NAM S., DEXTER J.E. & SAPIRSTEIN H.D. (2005). Phenolic content and antioxydant activity of Pearled Wheat and Roller –Milled Fractions. *Cereal Chemistry*, 82 (4), 390-393.

BIDET D., GAIGNAULT J.C., GIRARD P & TROTIN F. (1987). Inflammation, allergie, douleur et acide arachidonique : Les flavonoïdes. *L'actualité chimique*, 89-97.

BIEZA K., LOIS R. (2001). An Arabidopsis mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics, *Plant Physiology*, 126, 1105-1115.

BINDER. EVA M. (2007). Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal Feed Science and Technology*, 133, 149–166.

BLASUNDRAM., N. SUNDRAM .K & SAMMAN S. (2006). Phenolic compounds in plant and agric-industrial by-product. Activity, occurrence and potential uses. *Food chemistry*, 99, 191-203.

BLUMA R.V., ETCHEVERRY M.G. (2008). Application of essential oils in maize grain: Impact on *Aspergillus section Flavi* growth parameters and aflatoxin accumulation. *Food Microbiology*, 25, 324–334.

BOSKOU GEORGE., SALTA. FOTINI N., CHRYSOSTOMOU STAVROULA., MYLONA ANASTASIA., CHIOU ANTONIA., ANDRIKOPOULOS NIKOLAOS K. (2006). Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market. *Food Chemistry*, 94, 558–564.

BOTTON B., BRETON A., FEVRE M., GAUTHIER S., GUY P., LARPENT J.P., REYMOND P., SANGLIER J.J., VAYSSIER Y., VEAU P. (1990). Moisissures Utiles et Nuisibles, Importance Industrielle, *Ed. Masson*, Paris, 512p

BOUAZIZ M., CHAMKHA M & SAYADI S. (2004). Comparative study on phenolic content and antioxidant activity during maturation of the olive cultivar Chemlali from Tunisia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5476–5481.

BOUDHRIOUA NOURHÈNE., BAHLOUL NEILA., BEN SLIMEN IMEN., KECHAOU NABIL. (2009). Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Industrial crops and products. Article in Press*.

BOUTIGNY AL., RICHARD-FORGET F., BARREAU C. (2008). Natural mechanisms for cereal resistance to *Fusarium* mycotoxins accumulation. *European Journal of Plant Pathology*, 121(4), 411-423.

BRAND-WILLIAMS W., CULIVIER, M. E & BERSET C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, 28 (1), 25–30.

BRENES M., HIDALGO F., GARCIA A., RIOS J., GARCIA P., ZAMORA R. & GARRIDO A. (2000). Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77 (7), 710-716.

BRENES M., REJANO L., GARCIA P., SANCHEZ H. A & GARRIDO A. (1995). Biochemical changes in phenolic compounds during Spanish-style green olive processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2702–2706.

BRIANTE R., FEBBRAIO F., NUCCI R. (2003). Antioxidant properties of low molecular weight phenols present in the mediterranean diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6975–6981.

BRIGHENTE I.M.C., M DIAS., VERDI L.G & PIZZOLATTI M.G. (2007). Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Some Brazilian Species. *Pharmaceutical Biology*, 45 (2), 156–161. Informa Healthcare.

BROCHARD G. & LE BACLE C. (2009). Mycotoxines en milieu de travail
Origine et propriétés toxiques des principales mycotoxines. Dossier médico-technique. INRS. TC128 N° 119, 299-323.

BROWNLEE H.E., HEDGER J & SCOTT I .M .(1992). Effect of a range of procyanidins on the cocoa pathogen *Crinipallis perniciosa*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 40, 227-232.

BRUNETON J. (1999). Pharmacognosie : Phytochimie Plantes Médicinales. Techniques et Documentation, 3^{ème} Ed, Lavoisier, Paris. 1120 p.

BRUNETON J. (2001). Plantes toxiques, Végétaux Dangereux pour l’homme et les animaux. Technique & Documentation, 2^{ème} Ed, Lavoisier, Paris. 564p

BY LAURA BRAVO., ROC ABIA., MARTIN A. EASTWOOD & FULGENCIO SAURA-CALIXTO.(1994). Degradation of polyphenols (catechin and tannic acid) in the rat intestinal tract. Effect on colonic fermentation and faecal output. *British Journal of Nutrition*, 71, 933-946.

CALVO A.M., BOK J., BROOK W & KELLER N.P.(2004). veA is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4733-4739.

CARRASCO-PANCORBO ALEGRIA., GOÄMEZ-CARAVACA ANAMARIA., LORENZO CERRETANI., ALESSANDRA BENDINI., ANTONIO SEGURA-CARRETERO., & ALBERTO FERNAÄNDEZ-GUTIEÄRREZ. (2006). Rapid Quantification of the Phenolic Fraction of Spanish Virgin Olive Oils by Capillary Electrophoresis with UV Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7984-7991.

CASTEGNARO M., PFOHL-LESZKOWICZ A. (2002). Les Mycotoxines : Contaminants Omniprésents dans l’alimentation animale et humaine, dans *La sécurité alimentaire du consommateur*, Technique & Documentation, 2^{ème} Ed, Lavoisier, Paris. 127-179.

CASTEGNARO M. (1999). Risques Cancérogènes - Les Aflatoxine. Dans“ Les Mycotoxines dans l’alimentation: évaluation et gestion du risque” de conseil supérieur d’hygiène publique de France. Technique & Documentation, Lavoisier, Paris, 199-247.

CEVALLOS-CASALS BOLIVAR A., LUIS CISNEROS-ZEVALLOS. (2010). Impact of germination on phenolic content and antioxidant activity of 13 edible seed species. *Food Chemistry*, 119, 1485–1490.

CHAMPEIL A., FOURBET J.F., DORE T., ROSSIGNOL L. (2004). Influence of cropping system on Fusarium head blight and mycotoxin levels in winter wheat. *Crop Protection*, 23, 531-537.

CHINAPHUTI AMARA., AUKKASARAKUL SUPARA. (2008). Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production using herbal extracts. *Journal of Biotechnology*, 136S, S751–S759.

CHIRA. K., SUH. J.-H., SAUCIER. C., TEISSEDE P.L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytonutrition fondamentale. Article de synthèse. Phytothérapie*, 6, 75–82.

CHRISTIE P. J., ALFENITO M. R. & WALBOT V. (1994). Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta*, 194, 541-549.

CHONG J., PIERREL M. A., ATANASSOVA R., WERCK-REICHHART D., FRITIG B. & SAINDRENAN P. (2001). Free and conjugated benzoic acid in tobacco plants and cell cultures. induced accumulation upon elicitation of defense responses and role as salicylic acid precursors. *Plant Physiology*, 125, 318-328.

CIEGLER A., LILLEHOJ E.B., PETERSON R.E., HALL H.H. (1966). Microbial detoxification of aflatoxin. *Journal of Applied Microbiology*, 14, 934-939.

COLE R.J., COX R.H. (1981). Handbook of Toxic Fungal Metabolites, (New York), *Academic Press*. 1-66.

COLE R.J, SCHWEIKERT M.A. (2003). Handbook of secondary fungal metabolites. *Academic Press (Elsevier Science)*, USA, Volume I, 547- 569.

COOPER .KAREN A., MRIDULA CHOPRA & DAVID I. THURNHAM. (2004). Wine polyphenols and promotion of cardiac health. *Nutrition Research Reviews*, 17, 111–129.

COS P., YING L., CALOMME M., HU J.P., CIMANGA K., VAN POEL B., PIETERS L., VLIENTINCK A.V., BERGHE D.K. (1998). Structure –activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavenger. *Journal of natural products*, 61, 71-76.

COTELLE N. (2001). Role of flavonoids in oxidative stress . *Current topic in medicinal chemistry*,1, 569- 590.

COWAN M.(1999). Plant Product as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (4) , 564-582.

CURTIS M. JOLLYA., BUDRY BAYARDA., RICHARD T. AWUAHB., SIMON C. FIALOR B., JOHNATHAN T. WILLIAMSC .(2009). Examining the structure of awareness and perceptions of groundnut aflatoxin among Ghanaian health and agricultural professionals and its influence on their actions. *The Journal of Socio-Economics*, 38, 280–287.

DAKORA F. D & PHILLIPS D. A. (1996). Diverse functions of isoflavonoides in legumes transcend anti-microbial definitions of phytoalexines. *Physiological and Molecular .Plant Pathology*, 49, 1-20.

DAKOVIĆ A., TOMASEVIC-CANOVIC M., DONDUR V., ROTTINGHAUS G.E., MEDAKOVIC V., ZARIC, S. (2005). Adsorption of mycotoxins by organozeolites. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **46**, 20-25.

DAKOVIĆ A., MATIJASEVIC S., ROTTINGHAUS G.E., LEDOUX D.R., BUTKERAITIS P., SEKULIC Z. (2008). Aflatoxin B1 adsorption by natural and copper modified montmorillonite. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **66**, 20-25.

DAOHONG ZHANG., PEIWU LI., QI ZHANG., WEN ZHANGA., YANLING HUANG., XIAOXIA DING., JUN JIANG. (2009). Production of ultrasensitive generic monoclonal antibodies against major aflatoxins using a modified two-step screening procedure. *Analytica Chimica Acta*, **636**, 63–69.

DAVIES N D., IYER S K., DIENER U L. (1987). Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. *Applied and Environmental Microbiology*, **53**, 1593–1595.

DELLA GRECA M., PREVITERA L., TEMESSI F., & CARRELLI A. (2004). Lowmolecular- weight components of olive oil mill waste-waters. *Phytochemical Analysis*, **15**, 184–188.

DEL RÍO J.A., BÁIDEZ A.G., BOTÍA J.M., ORTUÑO A. (2003). Enhancement of phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea* L.) and their influence on resistance against *Phytophthora* sp. *Food Chemistry*, **83**, 75–78.

DE MARCO ELENA., MARIA SAVARESE., ANTONELLO PADUANO., RAFFAELE SACCHI. (2007). Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chemistry*, **104**, 858–867.

DE OLIVEIRA M. M., SAMPAIO M. R. P., SIMON F., GIBERT B & MORS W. B. (1972). Antitumor activity of condensed flavenols. *An. Acad. Brazil.* **44** (1), 41-44.

DEPEINT F., GEE J. M., WILLIAMSON G., & JOHNSON I. T. (2002). Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. Postgraduate Symposium. *Proceedings of the Nutrition Society*, **61**, 97–103.

DERBEL.S. & GHEDIRA K. (2005). Les phytonutriments et leur impact sur la santé *Phytothérapie et nutrition*, **1**, 28-34.

DE RIJKE E., OUT P., NIESSEN W.M., ARIESE F., GOOIJER C., & BRINKMAN U.A. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, **1112**, 31-63.

DE RIJKE E., ZAPPEY H., ARIESE F., GOOIJER C. & BRINKMAN U.A.T. (2003). Liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization mass spectrometry of flavonoids with triple-quadrupole and ion-trap instruments. *Journal of Chromatography (A)*, **984** (1), 45-58.

DIDRY N., PINKA M. & TORCK M. (1982). Sur la composition chimique et l'activité antibactérienne des feuilles de diverses espèces de *grindelia*. *Plant Medecine Phytotherapy*, **XVI**, 7-15.

DIMITRIOS.B. (2006) .Sources of natural Phenolic antioxidants. *Trend in food Science & technology*, 17, 505-512.

DJERIDANE A., YOUSFI M., NADJEMI B., VIDAL N., LESGARDS JF., STOCKER .P.(2007). Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. review article. *European Food Research and Technology*, 224, 801–809.

D’MELLO J.P.F. & MACDONALD,A.M.C.(1997). Mycotoxins. *Animal Feed Science Technology*, 69, 155-166.

DOMSCH K.H., GAMS W., ANDERSON T.H. (1980). "Compendium of Soil Fungi". Vol 1, *Academic Press*, London, UK,859p.

DONG X., BRAUN E. L. & GROTEWOLD E. (2001). Functional conservation of plant secondary metabolic enzymes revealed by complementation of Arabidopsis flavonoid mutants with maize genes. *Plant Physiology*, 127, 46-57.

DORIANE GOUAS., HONG SHI & PIERRE HAINAUT. (2009). The aflatoxin-induced TP53 mutation at codon 249 (R249S): Biomarker of exposure, early detection and target for therapy .Mini-review. *Cancer Letters, Article in press*.

DORNER J.W., COLE R.J. & DIENER U.L. (1984). The relationship of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* with reference to production of aflatoxins and cyclopiazonic acid, *Mycopathologica*, 87, 13-15.

DOUGLAS C. J. (1996). Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees. *Trends in Plant Science*, 1, 171-178.

DOWD P.F. (1998). Involvement of arthropods in the establishment of mycotoxigenic fungi under field conditions, *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*, 19, 307-350.

DRAGACCI S., GROSSO F., & FREMY J. (2005). Analyse et détection des mycotoxines. Technique de l’ingénieur, Paris, P 3330.

D’SOUZA D.H., & BRACKETT R.E. (2002). The influence of divalent cations and chelators on aflatoxin B1 : degradation by *Flavobacterium aurantiacum*. *Journal of Food Protection*, 63, 102–105.

DUBOIS G.E., GROSBY G.A & SAFFRON P. (1977). Non nutritive Sweeteners: taste structure relationships with for some new simple dihydrochalcones. *Science*, 195, 397-399.

DWYER, J. T. & PETERSON. J. J. (2002). «Measuring flavonoid intake: need for advanced tools». *PubLic Heath in the Northen territory* 5 (6A), 925-930.

EHRlich K, CIEGLER A. (1984). Effect of phytate on aflatoxin formation by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* in synthetic media. *Mycopathologia*, 87, 99–103.

EL KHOURY. ANDRE. (2007). Champignons Mycotoxinogènes et Ochratoxine A (OTA) et Aflatoxine B1 (AFB1) dans les vignobles libanais: Occurrence et Origine. Thèse de Doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse. École doctorale Transferts, Dynamique des Fluides, Énergétiques et Procédés. Spécialité : Génie des procédés et de l'environnement.

EL-NEZAMI H., KANKAANPÄÄ P., SALMINEN S., AHOKAS J. (1998). Physicochemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media. *Journal of Food Protection*, 61, 466-468.

FALLEH HANEN., KSOURI RIADH., KAMEL CHAIEB., NAJOUA KARRAY-BOURAOUL., NAJLA TRABELSI., MONDHER BOULAABA., CHEDLY ABDELLY.(2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. C. R. Biologies. *Pharmacology, toxicology*, 331, 372–379.

FENTE C.A., ORDAZ J.J., VASQUEZ B.I., FRANCO C. M. & CEPEDA A. (2001). New additive for culture media for rapid identification of aflatoxine –producing *Aspergillus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (48), 58-62.

FERGUSON. LYNNETTE R. (2001).Role of plant polyphenols in genomic stability Review *Mutation Research* , 475, 89–111.

FERNANDEZ ANTONIO., BELO RAUL., JOSERAMOS JUAN., M CARMEN SANZ & TEOFILLO SAEZ. (1997). Aflatoxins and their Metabolites in the Tissues, Faeces and Urine from Lambs Feeding on an Aflatoxin-Contaminated Diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74, 161-168.

FERREIRA I.C.F.R., BARROS L., SOARES M.E., BASTOS M.L., PEREIRA J.A. (2007). Antioxidant activity and total phenolic contents of *Olea europaea* L. leaves sprayed with different copper formulations. *Food Chemistry*, 103, 188–195.

FINAMORE, A., BRITTI, M.S., ROSELLI, M., BELLOVINO, D., GAETANI, S., MENGHERI, E. (2004). Novel approach for food safety evaluation. Results of a pilot experiment to evaluate organic and conventional foods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* , 52, 7425-7431.

FISCHER G., MULLER T., SCHWALBE R., OSTROWSKI R., DOTT W. (2000). Species-specific profiles of mycotoxins produced in cultures and associated with conidia of airborne fungi derived from biowaste. *International journal of Hygiene and Environmental Health*, 203,105–116.

FKI INES., ALLOUCHE NOUREDDINE., SAYADI SAMI. (2005). The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants. *Food Chemistry*, 93, 197–204.

FRESCO P., BORGES F., DINIZ C., MARQUES M.P.M. (2006). New Insights on the Anticancer.Properties of Dietary Polyphenols. *Medicinal Research Reviews*, 26 (6), 747-766.

- GABAL M.A., HEGAZI S.A., HASSANIN N. (1994).** Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* field isolates. *Veterinary and Human Toxicology*, 36, 519-521.
- GARIBOLDI P., JOMMI G. & VEROTTA L. (1986).** Sercoiridoïds from *Olea Europaea*, *Phytochemistry*, 25 (4), 865-896.
- GARY P. HUBBARD., SIEGFRIED WOLFFRAM., JULIE A. LOVEGROVE & JONATHAN M. GIBBINS. (2003).** The role of polyphenolic compounds in the diet as inhibitors of platelet fonction. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62, 469-478.
- GEISER DAVID M., PITT JOHN I., & JOHN W. TAYLOR.(1998).** Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus* *Population Biology. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 388–393.
- GEORGIANNA D. RYAN., PAYNE GARY A. (2008).** Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: From gene to genome. *Fungal Genetics and Biology*. Review. *Article in press*.
- GERALDINE P., SARASWATHI M., LEEMA G., THOMAS P.A. (2008).** Aflatoxin B1 Production in Tissues in Experimental Invasive Aspergillosis Due to *Aspergillus flavus* .13th *International Congress on Infectious Diseases Abstracts, Poster Presentations*.
- GHEDIRA .K. (2008).** L'olivier article de synthèse .Pharmacognosie. *Phytothérapie*, 6, 83–89.
- GORLACH J., RAESECKE H. R., RENTSCH D., REGENASS M., ROY P., ZALA M., KEEL C., BOLLER T., AMRHEIN N. & SCHMID J. (1995).** Temporally distinct accumulation of transcripts encoding enzymes of the prechorismate pathway in elicitor-treated, cultured tomato cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 3166-70.
- GRAF E, EMPSON KL, EATON JW .(1987).** Phytic acid. A natural antioxidant. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 11647–11650.
- GUIGNARD. (2002)** .Biochimie Végétal. 2^{ème} Ed., DUNOD, Paris.
- GUPTA SK, VENKITASUBRAMANIAN TA. (1975).** Production of aflatoxin on soybeans. *Applied and Environmental Microbiology*, 29, 834–836.
- GURIB-FAKIM A. (2006).** Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 1-93.
- HABAUZIT VERONIQUE & HORCAJADA MARIE-NOËLLE.(2008).** Phenolic phytochemicals and bone. *Phytochemistry Reviews*, 7, 313–344.
- HADI. M (2004).** La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteur de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat en Sciences. Spécialite: Pharmacochimie. Université de Louis Pasteur Domaine.155p.
- HAGGBLOM P. (1987).** De novo synthesis of alternariol in conidia of *Alternaria alternata*. *Journal of General Microbiology*, 133, 3527–3529.

HAHLBROCK K. & SCHEEL D. (1989). Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40, 347-369.

HALE A. L. (2003). Screening potatoes genotypes for antioxidant activity, identification of the responsible compounds differentiating russet nrkotah strains using Aflp and microsatellite marker analysis. *Office of graduate Studies of Texas A & M University*. Genetics. 260p.

HALLIWELL B. (1994). Free radicals and antioxidants : a personal view. *Nutritional Review*, 52, 253-265.

HARBORNE J. B. (1989). General procedures and measurement of total phenolics. In J. B. Harborne (Ed.). *Methods in plant biochemistry: London: Academic Press*. Volume 1 Plant Phenolics (1–28).

HARRIS B., STAPLES C.R. (1992). The Problems of Mycotoxins in Dairy Cattle Rations. DS31 University of Florida. IFAS. Extension.

HERMAN J.L. (1999). Analyse des risques liés aux mycotoxines effectuée par le comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires. In : Troisième conférence internationale mixte FAO/OMS/PNUE sur les mycotoxines, Tunis, Tunisie. *Food and Agricultural Organization of the United Nation*, Rome, 8 p.

HASKARD C., BINNION C., AHOKAS J. (2000). Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chemistry and Biology Interaction*, 128, 39-49.

HAYASE F. ET KATO M. (1984). Antioxydante compounds of sweet potatoes. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* , 30, 37-46.

HENDRICH A.B. (2006). Flavonoids- Membrane interactions : possible consequence for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27, 27-40.

HENNEBELLE T., SAHPAZ S & BAILLEUL F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisation et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1.

HERRMANN K. M. & WEAVER L. M. (1999). *The shikimate pathway*, Russell L. Jones, University of California, Berkeley edn.

HUA-BIN LI, YUE JIANG., CHI-CHUN WONG., KA-WING CHENG & FENG CHEN. (2007). Evaluation of two methods for the extraction of antioxidants from medicinal plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388, 483–488.

ILHAMIG ULCIN. (2006). Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology* , 217, 213–220.

JAAKOLA L., MAATTA K., PIRTTILA A. M., TORRONEN R., KARENLAMPI S. & HOHTOLA A. (2002). Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development. *Plant Physiology*, 130, 729-39.

JANSEN VAN RENSBURG C., VAN RENSBURG C.E., VAN RYSSSEN J.B., CASEY N.H., ROTTINGHAUS G.E. (2006). *In vitro* and *in vivo* assessment of humic acid as an aflatoxin binder in broiler chickens. *Poultry Science*, 85, 1576-1583.

JARD GWENAËLLE. (2009). Etude de différents modes d'élimination biologique de la zéaralénone, mycotoxine présente dans les céréales: Adsorption et Biotransformation. Thèse de doctorat en *Microbiologie et Biocatalyse industrielles*. Université De Toulouse. *l'Institut National Polytechnique de Toulouse*.

JARVIS BB & MILLER J.D. (2005). Mycotoxins as harmful indoor air contaminants. *Applied. Microbiology and Biotechnology*, 66, 67–372.

JAPON-LUJAN R., LUQUE-RODRIGUEZ J.M., LUQUE DE CASTRO M. D. (2006a). Multivariate optimisation of the microwave-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves . *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385, 753–759.

JAPON-L UJAN R., LUQUE-RODRIGUEZ J.M., LUQUE DE CASTRO M.D.(2006b). Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves .*Journal of Chromatography A*, 1108. 76–82.

JOVANOVIC S.V., STEENKEN S., TOSIC M., MARJANOVIC B., SIMIC M.J. (1994). Flavonoids as antioxidants .*Journal of American Chemical Society*, 116, 4846-4851.

JUN KUMAGAIA., TOMOKO KAWAURA., TETSUO MIYAZAKI., MICHEL PROST., EMMANUELLE PROSTB., MASAMI WATANABEC., JOELLE QUETIN-LECLERCQD. (2003). Test for antioxidant ability by scavenging long-lived mutagenic radicals in mammalian cells and by blood test with intentional radicals: an application of gallic acid. *Radiation Physics and Chemistry*, 66, 17–25.

KAAN TEKINSEN K & SEMIH EKEN H. (2008). Aflatoxin M1 levels in UHT milk and kashar cheese consumed in Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 3287–3289.

KELLER N P., TURNER G., BENNETT J.W. (2005). Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics. *Nature Review Microbiology*, 3, 937–947.

KHAN ZU KORTOM M., MAROUF R., JAMAL W., CHANDY R. (1999). Fatal pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*, *Journal de Mycologie Medicale*, 9, 166-169.

KIM JH., CAMPBELL BC., MAHONEY N., CHAN KL., MAY GS.(2006). Targeting antioxidative signal transduction and stress response system: control of pathogenic *Aspergillus* with phenolics that inhibit mitochondrial function. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 181–189.

KORUKLUOGLU M., SAHAN Y & YIGIT A. (2007). Antifungal properties of olive leaf extract and their phenolic compounds. *Journal of food safety*, 28, 76-87.

KRAVCHENKO L.V., MOROZOV S.V. & TUTEL'YAN V. A. (2003). Effects of Flavonoids on the Resistance of Microsomes to Lipid Peroxidation In Vitro and Ex Vivo. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 136 (6), 572-5.

KREOFISKY T., SCHLAGER J.W., VUK-PAVLOVIC Z., ABRAHAM R.T. & ROHRBACH M.S. (1992). Condensed tannins promotes the release of arachidonic acid from rabbit resident alveolar macrophage. *American Journal Respiratory Cell and Molecular Biology*, 7, 172-181.

KROON P.A. & WILLIAMSON G. (1999). Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 355-361.

KUMAR A & ELLIS B.E. (2001). The phenylalanine ammonia-lyase gene family in raspberry. Structure, expression, and evolution. *Plant Physiology*, 127, 230-9.

LAHLOU M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of Essential Oils. *Phototherapy. Research*, 18, 435- 448.

LAND C.J., RASK-ANDERSEN A., LUNDSTROM H., WERNER S., BARDAGE S. (1994). Tremorgenic mycotoxins and gliotoxin in conidia of *Aspergillus fumigatus*. In *Health Implications of Fungi in Indoor Environments*. ed Samson, R.A. and Flannigan B., 317-324.

LEBLANC M-C & SAINT-HILAIRE M. (2002). Doit-on s'inquiéter du pouvoir cancérigène des mycotoxines chez l'humain ? Projet d'intégration en microbiologie BIO600. Université de Sherbrooke : Sherbrooke, 67 p.

LEE OK-HWAN, LEE BOO-YONG. (2010). Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. Short Communication *Bioresource Technology*, 101, 3751–3754.

LEMING LIN., JUN ZHANG., PING WANG., YUESONG WANG., JIPING CHEN. (1998). Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods. Review . *Journal of Chromatography A*, 815, 3–20.

LEMKE S.L., MAYURA K., REEVES W.R., WANG N., FICKEY C., PHILLIPS T.D. (2001). Investigation of organophilic montmorillonite clay inclusion in zearalenone-contaminated diets using the mouse uterine weight bioassay. *Journal of Toxicology and Environment Health, (A)*, 62, 243-258.

LIANG ZHI-HONG., LI JUN-XIA., HE YUN-LONG., GUAN SHU., WANG NIN., JI CHENG & NIU TIAN-GUI. (2008). AFB1 Bio-Degradation by a New Strain - *Stenotrophomonas*. *Sp. Agricultural Sciences in China*, 7(12), 1433-1437.

LI JUAN-JUAN., SUO DE-CHENG & SU XIAO-OU. (2010). Binding Capacity for Aflatoxin B1 by Different Adsorbents. *Agricultural Sciences in China*, 9(3), 449-456.

LI H. B., CHENG K.W., WONG C. C., FAN K.W., CHEN F., JIANG Y.(2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemistry*, 102, 771-776.

LILLEHOJ E.B., CIEGLER A., HALL H.H. (1967). Aflatoxin B1 Uptake by *Flavobacterium Aurantiacum* and Resulting Toxic Effects. *Journal of Bacteriology*, **93**, 464-471.

LILLO CATHRINE., UNNI S LEA & PETER RUOFF.(2008). Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant, Cell and Environment*, 31, 587–601.

LIM E. K., DOUCET C. J., LI Y., ELIAS L., WORRALL D., SPENCER S. P., ROSS J. & BOWLES D. J. (2002). The activity of Arabidopsis glycosyltransferases toward salicylic acid, 4-hydroxybenzoic acid, and other benzoates. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 586-92.

LIU D.L., YAO D.S., LIANG R., MA L., CHENG W.Q., GU L.Q. (1998). Detoxification of aflatoxin B1 by enzymes isolated from *Armillariella tabescens*. *Food and Chemical Toxicology*, 36, 563-574.

LOPEZ C. E., RAMOS L. L., RAMADAN S. S. & BULACIO L. C. (2003). Presence of aflatoxins M1 in milk for human consumption in Argentina. *Food Control*, 14, 31–34.

LOPEZ-MALO AURELIO., STELLA MARIS ALZAMORA., ENRIQUE PALOU. (2005). Aspergillus flavus growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 99, 119–128.

LÓPEZ-POSADAS ROCÍO., BALLESTER ISABEL., ABADÍA-MOLINA ANA CLARA., DOLORES SUÁREZ MARÍA., ZARZUELO ANTONIO., OLGA MARTÍNEZ-AUGUSTIN., FERMÍN SÁNCHEZ DE MEDINA. (2008). Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure–activity relationship study. *biochemical pharmacology*, 76, 495–506.

LOŽIENE KRISTINA., VENSKUTONIS PETRAS R., AUSRA SIPAILIENE ., JUOZAS LABOKAS RADICAL. (2007). scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. *Food Chemistry*, 103, 546–559.
LUCHESE R.H., HARRIGAN W.F.(1993). Biosynthesis of aflatoxin – the role of nutritional factors, *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 5-14.

LUGASI A., HÓVÁRI J., SÁGI K V. & BIRO L. (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis*, 47 (4), 119-125.

MACHEIX. JEAN-JACQUES., ANNIE FLEURIET., CHRISTIAN JAY –ALLMEND. (2005). Les composés phénoliques des végétaux .collection biologie. Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne.

MAHONEY N & MOLYNEUX R.J. (2004). Phytochemical inhibition of aflatoxigenicity in *Aspergillus flavus* by constituents of walnut (*Juglans regia*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52,1882–1889.

MARBRY .T.J & ULUBLEN A. (1980). Chemistry and utilization of phenylpropanoïdes including Flavonoïds, Coumarins and lignans. *Journal of Agriculture. Food Chemistry*, 28, 188-196.

MARTIN. S, ANDRIANTSITOHAINA. R. (2002).Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*, 51, 304–315.

MASAKI H., ATSUMI T., SAKURAI H.(1994). Hamamelitannin as a new potent active oxygen scavenger. *Phytochemistry* , 37, 337–343.

MASAKI H., ATSUMI T., SAKURAI H. (1995a). Peroxyl radical scavenging activities of hamamelitannin in chemical and biological systems. *Free Radical Research*, 22, 419–430.

MASAKI H., ATSUMI T., SAKURAI H. (1995b). Protective activity of hamamelitannin on cell damage of murine skin fibroblasts induced by UVB irradiation. *Journal of Dermatological Science*, 10, 25–34.

MASQUELIER J., DUMON M. C. ET DUMAS J. (1979).Stabilisation des collagènes par des oligomères procyanidoliques. *Acta thérapeutique*, 1, 101-104.

MANGAN .J. L. (1988). Nutritional Effects Of Tannins In Animal Feeds. *Nutrition Research Reviews*, 1, 209-231.

MAGAN N., ALDRED D. (2007). Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 131–139.

MAYURA K., ABDEL-WAHHAB M.A., MCKENZIE K.S., SARR A.B., EDWARDS J.F., NAGUIB K., PHILLIPS T.D. (1998). Prevention of maternal and developmental toxicity in rats via dietary inclusion of common aflatoxin sorbents: potential for hidden risks. *Society of Toxicology*, **41**, 175-182.

MCDONALD S., PRENZLER P.D., ANTOLOVICH M., ROBRADS K. (2001). Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry*, 73, 73-84.

MEDINA-REMÓN ALEXANDER., ANA BARRIONUEVO-GONZÁLEZ., RAÚL ZAMORA-ROS., CRISTINA ANDRES-LACUEVA., RAMÓN ESTRUCH., MIGUEL-ÁNGEL MARTÍNEZ-GONZÁLEZ., JAVIER DIEZ-ESPINO., ROSA M. LAMUELA-RAVENTOS. (2009). Rapid Folin–Ciocalteu method using microtiter 96-well plate cartridges for solid phase extraction to assess urinary total phenolic compounds, as a biomarker of total polyphenols intake. *Analytica Chimica Acta*, 634, 54–60.

MILLER J. D. (1992). Fungi as contaminants in indoor air. *Atmospheric Environment*. 26, 2163–2172.

MISHRA A.K. & DUBEY N.K.(1994). Evaluation of some Essential oils for their toxicity Against Fungi causing Deterioration of stored food commodities. *Applied and Environmental Microbiology*. 60 (4) , 1101-1105.

MISIRLI A., KÜDEN A., DEMIR G & GÜLCAN R. (2001). Determination of phenolic compounds in some almond hybrids varying in resistance to pseudomonas amygdale. In : Ak B.E. (ed). 11 GREMPA Seminar on pistachio and almonds= 11ème colloque du GREMPA sur le pistachier et l'amandier. Zaragoza. CIHEAM-IAMZ, P71-86.

MONBALIU SOFIE., VAN POUCKE CHRISTOF., VAN PETEGHEM CARLOS., VAN POUCKE KRIS., HEUNGENS KURT & DE SAEGER SARAH. (2009). Development of a multi-mycotoxin liquid Chromatography / tandem mass spectrometry method for sweet pepper analysis. *RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY*. *Rapid Commun. Mass Spectrometry*, 23, 3–11.

MORIN O. (1994). *Aspergillus* et aspergilloses: biologie, Ed. Techniques (EMC) Encyclopédie Médico-chirurgicale. (Elsevier, Paris), *Maladies infectieuses* 8-600-A-10.

NARAYANA K. R., REDDY M. S., CHALUVADI M. R. & KRISHNA D. R. (2001). bioflavonoids Classification, Pharmacological, Biochemical Effects end Therapeutic Potential. *Indian Journal of pharmacology*, 33, 2-16.

NACZK MARIAN & SHAHIDI FEREIDOON. (2004).Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054, 95–111.

NESCI A. & ETCHEVERRY .M. (2008). Effect of natural maize phytochemicals on *Aspergillus* section *Flavi* sclerotia characteristics under different conditions of growth media and water potential. *fungal ecology*. *Article in press*.

NESCI A.V., ETCHEVERRY M.G. (2006). Control of *Aspergillus* group and aflatoxin production using natural maize phytochemicals under different conditions of water activity. *Pest Management Science*, 6, 775–784.

NITSH J. P & NITSH C. (1961). Synergistes naturels des auxines et des giberellines. *Bulletin. Soc. Fr.* 26, 2237-2240.

NICHOLAS W. TURNERA., SREENATH SUBRAHMANYAM., SERGEY A. PILETSKY. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, 632, 168–180.

NOSTRO A., GERMANO M., D'ANGELO V., MARINI A. & CANNATELLI M. (2000). Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letter Applied Microbiology*, 30 (5), p379.

NUNZIA CICCO., MARIA T. LANORTE., MARGHERITA PARAGGIO., MARIASSUNTA VIGGIANO., VINCENZO LATTANZIO. (2009). A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal*, 91, 107–110.

OATLEY J.T., RARICK M.D., LINZ J.E., JI G.E. (2000). Binding of Aflatoxin B1 to Bifidobacteria in vitro. *Journal of Food Protection*, 63, 1133–1136.

OBIED H. K., ALLEN M. S., BEDGOOD D. R., PRENZLER P. D., ROBARDS K. & STOCKMANN R. (2005). Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 823–837.

OKAMURA H., MIMURA A., YAKOU Y., NIWANO M. & TAKAHARA Y. (1993). Antioxydant Activity of Tannins and Flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochemistry*, 33, 557-561.

OK-HWAN LEE & BOO-YONG LEE. (2010). Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. Short Communication. *Bioresource Technology*, 101, 3751–3754

OKUDA T., KIMURA Y., YOSHIDA T., HATANO T., OKUDA H., ET ARICHI S. (1983). Studies on activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs. I. Inhibitory effect of lipid peroxidation in mitochondria and microsome of liver. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 31 (5), 1625-1631.

OLSEN M., JONSSON N., MAGAN N., BANKS J., FANELLI C., RIZZO A., HAIKAR A., RUSSELL R. PATERSON M. (2006). Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR. *Process Biochemistry*, 41, 1467–1474.

OLUTIOLA P.O. (1976). Cellulase enzymes in culture filtrates of *Aspergillus flavus*. *Transaction of the British Mycological Society*, 67, 265–268.

OWEN R. W., HAUBNER R., MIER W., GIACOSA A., HULL W. E., SPIEGELHALDER B. (2003). Isolation, structure, elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food and Chemical Toxicology*, 41, 703–717.

PASSONE MARÍA A., RUFFINO MARIANA., PONZIO VERÓNICA., RESNIK SILVIA., ETCHEVERRY MIRIAM G. (2009). Postharvest control of peanut *Aspergillus* section *Flavi* populations by a formulation of food-grade antioxidants. *International Journal of Food Microbiology*, 131, 211–217.

PASSONE MARÍA A., SILVIA RESNIK., ETCHEVERRY MIRIAM G. (2008). The potential of food grade antioxidants in the control of *Aspergillus* section *Flavi*, interrelated mycoflora and aflatoxin B1 accumulation on peanut grains. *Food Control*, 19, 364–371.

PASSONE MARÍA A., RESNIK SILVIA, ETCHEVERRY MIRIAM G. (2007). Antiaflatoxigenic property of food grade antioxidants under different conditions of water activity in peanut grains. *International Journal of Food Microbiology*, 118 , 8–14.

PAULA RODRIGUES., ARMANDO VENANCIO., ZOFIA KOZAKIEWICZ., NELSON LIMA.(2009). A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. *International Journal of Food Microbiology*, 129, 187–193.

PAUL E., CORREA & DENNIS P RILEY. (2000).« Highly selective direct oxidation of thioethers to sulfoxides using molecular oxygen ». *Journal of Organic Chemistry*, 50 (10), 1787-1788.

PAUL P.A., LIPPS P.E., HERSHMAN D.E., MCMULLEN M.P., DRAPER M.A., MADDEN L.V. (2008). Efficacy of Triazole-Based Fungicides for Fusarium Head Blight and Deoxynivalenol Control in Wheat: A Multivariate Meta-Analysis. *Phytopathology*, 98, 999-1011.

PELTONEN K., EL-NEZAMI H., HASKARD C., AHOKAS J., SALMINEN S. (2001). Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, 84, 2152- 2156.

PEREIRA ANA PAULA., FERREIRA .ISABEL C.F.R., MARCELINO .FILIPA., VALENTÃO PATRICIA., ANDRADE PAULA B., SEABRA ROSA., ESTEVINHO.LETICIA., ALBINO BENTO & JOSÉ ALBERTO PEREIRA. (2007). Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves. *Molecules*, 12, 1153-1162. ISSN 1420-3049.

PEREIRA .S.A., PEREIRA.A.P.G., FERREIRA.C.F.R., VALANTAO P., ANDRADE P.B. SEABRA R., ESTEVINHO .L. & BENITO .A. (2006). Table olive from Portugal : Phenolic compounds antioxidant potential and antimicrobial activity. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 54, 8425-8431.

PERAICA M., RADIC B., LUCIC A., PAVLOVIC. M. (1999).Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organisation*, 77, 754-766.

PETTI STEFANO & SCULLY CRISPIAN. (2009). Polyphenols, oral health and disease: A review. *Journal of dentistry* 37, 413–423.

PFAENDTNER JIM, BROADBELT LINDA J. (2007). Elucidation of structure–reactivity relationships in hindered phenols via quantum chemistry and transition state theory. *Chemical Engineering Science*, 62, 5232 – 5239.

PFOHL-LESZKOWICZ .A. (2009). Mycotoxins: a cancer risk factor. *African. Journal of Cancer*, 1, 42-55 .SYNTHESIS ARTICLE.

PFOHL-LESZKOWICZ A., PETKOVA-BOCHAROVA T., CHERNOZEMSKY I.N. & CASTEGNARO M. (2002). Balkan endemic nephropathy and the associated urinary tract tumours: review on etiological causes, potential role of mycotoxins. *Food Additive and Contaminants*, 19 (3), 282-302.

PIERIDES M., EL-NEZAMI H., PELTONEN K., SALMINEN S., AHOKAS. (2002).J. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind Aflatoxin M1 in a food model. *Journal of. Food Protection*, 63, 645-650.

PIETTA P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63, 1035-1042.

PISOSCHI AURELIA MAGDALENA, CHEREGI MIHAELA CARMEN & ANDREI FLORIN DANET. (2009). Total Antioxidant Capacity of Some Commercial Fruit Juices: Electrochemical and Spectrophotometrical Approaches. *Molecules*, 14, 480-493.

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

PRAKASH D., UPADHYAY G., BRAHMA N., SINGH H.B.(2007). Singh antioxidant and free radical scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean (*Glycine max*). *Food chemistry*, 104, 783-790.

PRASAIN J.K., WANG C.C., BARNES S. (2004). Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(9), 1324-1350.

PSOTOVA J., LASOVSKY J & VICAR J. (2003). Metal chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolic. *Biomed. Papers*, 174-153 p.

QUIROGA EMMA NELLY., SAMPIETRO ANTONIO RODOLFO., VATTUONE MARTA AMELIA. (2008). Screening antifungal activities of selected medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 74, 89–96.

RAPER K.B., FENNEL D.I. (1965). The genus *Aspergillus*. William and Wilkins New York, USA.

RAO JP & SUBRAMANYAM C. (2000). Calmodulin mediated activation of cetyl-CoA carboxylase during aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Letter in Applied Microbiology*, 30, 277–281.

RAO JP & SUBRAMANYAM C. (1999). Requirement of Ca²⁺ for aflatoxin production: inhibitory effect of Ca²⁺ channel blockers on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. *Letter in Applied Microbiology*, 28, 85–88.

RAO JP, SASHIDHAR RB, SUBRAMANYAM C. (1998) .Inhibition of aflatoxin production by trifluoperazine in *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. W. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, 71–75.

RAWAL SUMIT., JI EUN KIM., ROGER COULOMBE JR. (2010). Aflatoxin B1 in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. *Research in Veterinary Science. Article in press*.

REDDY K.R.N., REDDY .C.S., MURALIDHARAN. K. (2009a). Efficacy of certain agrochemicals on *Aspergillus* spp. and subsequent aflatoxin production in rice. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93, 53–57.

REDDY K.R.N., REDDY. C.S., MURALIDHARAN .K. (2009b). 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., REDDY. C.S., MURALIDHARAN .K. (2008). Efficacy of certain agrochemicals on *Aspergillus* spp. and subsequent aflatoxin production in rice. *Pesticide Biochemistry and Physiology, Article in press.*

REMIC GROUPE.(1998).. Référentiel en microbiologie médicale (bactériologie et mycologie). 1^{ère} Ed, Le Rémic, Paris. p153.

RIBA. A. (2008). Recherche sur les champignons producteurs d'aflatoxines et d'ochratoxines A dans la filière blé en Algérie. Thèse de doctorat. Faculté des sciences biologiques et agronomiques.UMMTO. 169p.

RIBUREAU-GAYON. (1968).Les composés phénoliques des végétaux. DUNOD.Paris.

RICES-EVANS. (2001). Flavonoids as antioxidant. *Current medicinal chemistry*, 8, 797-807.

RICES-EVANS C.A., MILLER N J., PAGANGA G.(1996). Structure antioxidant activity relations of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956.

RICHARD. JOHN L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses. An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 3-10.

RICHARDS J & ADAMS F. (1987). Study of reaction rates of the antioxidants gallic acid, BHT and BHA using the technique of pulse radiolysis. *International. Journal of. Food Science. Technology.* 22 (5), 501–508.

RINGOT DIANA. (2008). Contaminants naturels de la chaîne alimentaire et cancer : la gestion du risque associé aux mycotoxines. Enseignant chercheur en Toxicologie et Analyse des risques sanitaires Institut Polytechnique La Salle, Beauvais 4ème forum Agro-santé

RIZZI L., SIMIOLI M., RONCADA P & ZAGHINI A. (2003). Aflatoxin B1 and clinoptilolite in feed for laying hens. Effect on egg quality, mycotoxin residues in livers and hepatic mixed function oxidase activities. *Journal of Food Protection*, 66, 860–865.

ROBARDS KEVIN., PRENZLER PAUL D., TUCKER GREG., SWATSITANG PRASAN., GLOVER WILLIAM. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits .Rapid communication. *Food Chemistry*, 66, 401-436.

ROBERT A. HOLMES & REBECCA S. BOSTON & GARY A. PAYNE. (2008). Diverse inhibitors of aflatoxin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 78, 559–572.

ROCHA VILELA GEORGIA., GUSTAVO STEFFEN DE ALMEIDA., MARISA APARECIDA BISMARA REGITANO D'ARCE., MARIA HELOISA DUARTE MORAES., JOSE´ OTA´VIO BRITO., MARIA FA´TIMA DAS G.F. DA SILVA., SEBASTIAˆO CRUZ SILVA., SONIA MARIA DE STEFANO PIEDADE., MARIA ANTONIA CALORI-DOMINGUES., EDUARDO MICOTTI DA GLORIA. (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. Article in press.*

ROMINA V. BLUMA MIRIAM G. ETCHEVERRY. (2008). Application of essential oils in maize grain: Impact on *Aspergillus* section *Flavi* growth parameters and aflatoxin accumulation. *Food Microbiology*, 25, 324–334.

ROQUEBERT M.F. (1998). Moisissures des aliments peu hydrates. *Lavoisier Tec&Doc*, France.

RUPPOL P., DELFOSSE PH., 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.

RYAN D., ANTOLOVICH .M., PAUL PRENZLER., ROBARDS K., SHIMON L. (2002). Biotransformation of phenolic compounds in *Olea europaea*. *L. Scientia Horticulturae* , 92, 174-176.

RYAN D., LAWRENCE H., PRENZLER P.D., ANTOLOVICH M., ROBARDS K. (2001). Recovery of phenolic compounds from *Olea europaea*. *Analytica Chimica Acta* 445, 67–77.

RYAN D., ROBARDS K. & LAVEE S. (1999). Changes in phenolic content of olive during maturation. *International Journal of Food Science and Technology*, 34, 265–274.

SABATER-VILAR M., MALEKINEJAD H., SELMAN M.H., VAN DER DOELEN M.A., FINK- GREMMELS J. (2007). *In vitro* assessment of adsorbents aiming to prevent deoxynivalenol and zearalenone mycotoxicoses. *Mycopathologia*, 163, 81-90.

SALTA .F.N MYLONA.A CHIOU. A BOSKOU. G. & ANDRIKOPOULOS. (2007). Oxidative stability of Edible Vegetable Oils Enriched in polyphenols with Olive Leaf Extract. *Food Science and Technology international*, 13, 413.

SAKIHAMA YASUKO., COHEN .MICHAEL F., GRACE.STEPHEN C., YAMASAKI. HIDEO. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 177, 67–80.

SALTA F. N., MYLONA A., CHIOU A., BOSKOU G. & ANDRIKOPOULOS. (2007). Oxidative stability of Edible Vegetable Oils Enriched in polyphenols with Olive Leaf Extract. *Food Science and Technology international*, 13 (6), 413-420.

SÁNCHEZ F. DE MEDINA & ZARZUELO A. (2008) .Polyphenols and immunity. 1st International Immunonutrition Workshop, Valencia, 3–5, Valencia, Spain. *Proceedings of the Nutrition Society*, 67 (OCE), E1.

SANTO GIAMMANCO & MAURIZIO LA GUARDIA. (2005). The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health *.Nutrition Research Reviews*, 18, 98–112.

SAQER M. & HERZALLAH. (2009). Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. *Analytical Methods.Food Chemistry* 114, 1141–1146.

SARNI-MANCHADO PASCALE & CHEYNIER VERONIQUE. (2006). Les Polyphénols en Agroalimentaire. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris. 398p.

SAVARESE M., DE MARCO E., SACCHI.R. (2007). Characterization of phenolic extracts from olives (*Olea europaea* cv.Pisciottana) by electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical, Nutritional and Clinical Methods.Food Chemistry*, 105 , 761–770.

SAWA T., NAKAO M., AKAIKE T., ONO K., MAEDA H.(1999). Alkylperoxyl radical scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: implications for the anti-tumor-promoter effect of vegetables. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 47 (2), 397–402.

SCALBERT A., C. MORAND C. MANACH & C. REMESY. (2002). «Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health». *Biomed Pharmacolher.* 56 (6), 276-282.

SCHMID J. & AMRHEIN N. (1995). Molecular organization of the shikimate pathway in higher plants. *Phytochemistry*, 39 (4), 737-749.

SCHNEWEIS, I., MEYER, K., RITZMANN, M., HOFFMANN, P., DEMPFLER, L., BAUER, J. (2005). Influence of organically or conventionally produced wheat on health, performance and mycotoxin residues in tissues and bile of growing pigs. *Archives of Animal Nutrition* , 59, 155-163.

SCUDAMORE K.A. & LIVESEY C.T. (1998). Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage, a review. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 77, 1-7.

SERVILI M., ESPOSTO R. S., FABIANI S., URBANI A., TATICCHI F., MARIUCCI R., SELVAGGINI., MONTEODORO. G. F. (2009). Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. *Review. Inflammopharmacology*, 17, 76–84.

SERVILI MAURIZIO., SELVAGGINI ROBERTO., ESPOSTO SONIA., TATICCHI AGNESE., MONTEODORO GIANFRANCESCO., MOROZZI GUIDO.(2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. Review. *Journal of Chromatography,(A)*, 1054, 113–127.

SERVILI. M. & MONTEODORO G. (2002). Contribution of phenolic compounds in virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 602-613.

SEYOUM A., ASRES K., EL- FIKY F.K. (2006). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Journal of phytochemistry*, 67, 2058-2070.

SHENG WANG JIA., GROOPMAN JOHN D. (1999). DNA damage by mycotoxins. *Mutation Research*, 424, 167–181.

SHERIF O.SHERIF., EMAD E., SALAMA., MOSAAD A.ABDEL-WAHHAB. (2009). Mycotoxins and child health: The need for health risk assessment. Review. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 212, 347–368.

SHETTY, P & JESPERSEN L. (2006). *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 48-55.

SHIMA YOKO., MARISA SHINA., TAKAO SHINOZAWA., YASUHIRO ITO., HIROMITSU NAKAJIMA., YOSHIKAZU ADACHI., KIMIKO YABE. (2009). Participation in aflatoxin biosynthesis by a reductase enzyme encoded by *vrda* gene outside the aflatoxin gene cluster, *Fungal Genetics and Biology*, *Accepted Manuscript* .S1087-1845; 00271-5.

SHIRLEY B. (1996). Flavonoid biosynthesis: "new" functions for an "old" pathway. *Trends Plant Science*, 1, 377-382.

SILVA .BY SANDRA., LUCÍLIA GOMES., FAUSTO LEITÃO., MARIA BRONZE., ANA V COELHO. & LUÍS VILAS BOAS. (2010). Secoiridoids in olive seed: characterization of nüzhenide and 11-methyl oleosides by liquid chromatography with diode array and mass spectrometry, . *Food Science. Technology*, 61 (2), 157-164.

SILVA S., GOMES L., LEITAO F., COELHO A.V. & BOAS. L.V. (2006). Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europea* L. Fruits and leaves. *Food Science. Technology*, 2, 385-396.

SINGLETON V.L., R.O. ORTHOFER., R.M. LAMUELA-RAVENTOS.(1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent, *Methods Enzymology*, 299, 152–178.

SINGLETON VL & ROSSI JA. (1965) .Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.

SMILEY R.D., DRAUGHON F.A. (2000). Preliminary evidence that degradation of aflatoxin B1 by *Flavobacterium aurantiacum* is enzymatic. *Journal of Food Protection*, 63, 415-418.

SORENSEN W.G., FRAZER D.G., JARVIS B.B., SIMPSON J., ROBINSON V.A. (1987). Trichothecene mycotoxins in aerosolized conidia of *Stachybotrys atra*. *Applied. Environmental. of Microbiology*, 53, 1370–1375.

SOUSA A., FERREIRA I.C.F.R., BARROS L., BENTO A., PEREIRA J.A.(2008). Antioxidant potential of traditional stoned table olives “Alcaparras”: influence of the solvent and temperature extraction conditions. *LWT – Food Science and Technology*, 41, 739–745.

STARK A.A. (2001). Mechanisms of action of aflatoxin B1 at the biochemical and molecular levels In *Microbial Food Contamination* (C.L. Wilson and S. Droby, eds), pp. 47–60. *Boca Raton, FL: CRC Press*.

STAVRIC B. & MATULA T.I.(1992). Flavonoïds in food. Their significance for nutrition and health. *Biochemistry and Clinical Applications*. p.274- 294.

STIPCEVIC TAMARA., JASENKA PILJAC & DIRK VANDEN BERGHE. (2006). Effect of Different Flavonoids on Collagen Synthesis in Human Fibroblasts. *Plant Foods for Human Nutrition*, 61, 29–34.

STEYN P. S. (1980). The biosynthesis of mycotoxins. *Acad. Press. N. Y. and London*.

SUBRAHMANYAM M., HEMMADY A. & PAWAR S.G. (2001). Antibacterial Activity Of Honey On Bacteria Isolation From Wounds. *Annals of Burns and Fire DISASTERS. XIV (I)*.

SUNG-HYE CHO., CHANG-HEE LEE., MI-RAN JANG., YOUNG-WOOK SON., SANG-MOK LEE,IN-SUN CHOI., SO-HEE KIM., DAI-BYUNG KIM. (2008). Aflatoxins contamination in spices and processed spice products commercialized in Korea. *Analytical Methods. Food Chemistry*, 107, 1283–1288.

SUN J., KHTAN B., HUANG S-H., WHITEMAN M & ZHU Y-Z. (2002).Effect of natural products on ischemic heart diseases and cardiovascular system. *Acta Pharmacologica Sinica*,23 (12), 1142-1151.

TABUC CRISTINA. (2007). Flore fongique de differents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat, spécialité : pathologie, mycologie, génétique et nutrition Institut national polytechnique de toulouse et de l'université de bucarest. 190 p.

TAMIL SELVI A., JOSEPH G.S., JAYAPRAKASHA G.K. (2003). Inhibition of growth and aflatoxin production in *Aspergillus flavus* by *Garcinia indica* extract and its antioxidant activity. *Food Microbiologie*, 20, 455–460.

TANGNI, E.K., SIMONIS, J., LARONDELLE, Y., DE MEEUS, D'ARGENTEUIL, L. (2006). Biological method for detoxification of a liquid food medium. US patent 2006/0263410 A1, Clark & Brody, Washington.

TEISSEDRE. PIERRE LOUIS. (2008). Dossier : les effets du vin sur la santé. *Biofutur*, 294 (31), 45-48.

TRIPOLI ELISA., GIAMMANCO MARCO., GARDEN TABACCHI, DANILA DI MAJO., SANTO GIAMMANCO & MAURIZIO LA GUARDIA. (2005). The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health *.Nutrition Research Reviews*, 18, 98–112.

TURNER W. B. (1971). Fungal metabolites. *Acad. Press, N. Y. and London*.

TURNER W.B & ALBRIDGE D.C. (1983). Fungal metabolites. Academic Press Inc., London.

ÜNAL.K.M. (1994). Polyphénols, *o*-diphénols et acides phénoliques totaux dans les grignons d'olive et la margines, *OLIVAE*, 15, 34-35.

VAN ACKER S.A.B.E., VAN DEN BERG D.J., TROMP M.N.L., GRIFFIOEN D.H., BENNENKOM W.P.V., VAN DER VIJGH W.J.F., BAST A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free radical biology and medicine*, 20, 331- 342.

VAN EGMOND H. B & JONKER M. A. (2004). Current situation on regulation for mycotoxins. In T. Yoshizawa, S. Kumagai, & T. Goto (Eds.), *New horizon of mycotoxicology for assuring food safety* (pp. 1–15). Tokyo: *Japanese Association of Mycotoxicology*.

VARGA JÁNOS., RIGÓ KRISZTINA., BEÁTA TÓTH., JÓZSEF TÉREN & ZOFIA KOZAKIEWICZ.(2003). Evolutionary Relationships among *Aspergillus* Species Producing Economically Important Mycotoxins. *Food Technol. Biotechnol*, 41 (1), 29–36.

VASILEIOS ZIOGAS., GEORGIA TANOU B., ATHANASSIOS MOLASSIOTIS A., GRIGORIOS DIAMANTIDIS B., MILTIADIS VASILAKAKIS.(2010).Antioxidant and free radical-scavenging activities of phenolic extracts of olive fruits. *Food Chemistry*, 120, 1097–1103.

VESELY D., VESELA D., JELINEK R. (1983).Comparative assessment of the aflatoxin B₁, B₂, G₁,G₂ and M₁ embryotoxicity in the chick embryo, *Toxicology Letters*, 15, 297-302.

VERGE S., SOULET S. LACAN F., MAS. T., AMONDINAUD V., NAY B. (1999). Les polyphénols du vin : de la chimie pour la vie .Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 138,75-90.

VINOD KUMAR., BASU M.S., RAJENDRAN T.P.(2008). Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. *Crop Protection*, 27, 891–905.

VISIOLI F. & GALLI C. (2002). Biological properties of olive oil phytochemicals. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, 42 (3), 209–221.

VISIOLI F. & HAGEN .T.M. (2007). Nutritional strategies for healthy cardiovascular aging: focus in micronutrients. *Pharmaceutical research*, 55, 199-206.

WANG J. & MAZZA G. (2002). Effects of Anthocyanins and Other Phenolic Compounds on the production of tumor necrosis factor α in LPS/ IFN γ -activated RAW 264.7 Macrophage. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 50, 4183-4189.

WEISSHAAR B. & JENKINS G. I. (1998). Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 251-257.

WENYING REN., ZHENHUA QIAO., HONGWEI WANG., LEI ZHU., LI ZHANG. (2003). Flavonoids: Promising Anticancer Agents. *Medicinal Research Reviews*, 23 (4), 519-534.

WILDERMUTH M. C., DEWDNEY J., WU G. & AUSUBEL F. M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414, 562-5.

- WILD C. P & HALL A.J.(1996).** Epidemiology of mycotoxin-related disease. in : Howard, J.D. & Miller D. eds, *The Mycota VI : Human and animal relationships*. Springer-Verlag, (Berlin) Heidelberg. 213-227.
- WILD C.P., HUDSON G.J., SABBIONI G., CHAPOT B., HALL A.J., WOGAN G.N., WHITTLE H., MONTESANO R. & GROOPMAN J.D. (1992).** Dietary intake of aflatoxins and the level of aflatoxin in peripheral blood in the Gambia, West Africa, *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 1, 229-234.
- WINKEL-SHIRLEY B. (2002).** Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biology*, 5, 218-223.
- WITHLOW L.W., HAGLER W.M. (2002).** Mycotoxins in feeds. *Feedstuffs*, 74, 1-10.
- WOLFENDER J.L., WARIDEL P., NDJOKO K., HOBBY K.R., MAJOR H.J. & HOSTETTMANN K. (2000).** Evaluation of Q-TOFMS/ MS and multiple stage IT-MSn for the dereplication of flavonoids and related compounds in crude plant extracts. *Analysis*, 28(10), 895-906.
- YAKOUB-BOUGDAL S. (2005).** Morphogènèse in vitro du palmier dattier (*Phoenix dactylifera L*) et de l'olivier (*Olea europea L.var.chemlal*). Thèse de doctorat d'état des sciences en biologie végétale. Université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. 191p.
- YAKOUB-BOUGDAL SALIHA, CHERIFI DJAMILA, BONALY JACQUELINE. (2007).** Production de vitroplants d'Olea europea var. Chemlal. *Cahiers Agricultures*, 16 (2), 125-7.
- YIANNIKOURIS A., JOUANY J.P. (2002a).** Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Animal Resource*, 51, 81–99.
- YIANNIKOURIS A., JOUANY J.P. (2002b).** Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal. *INRA ,Productions Animales*, 15 (1), 3-16.
- YOU-CHENG HSEU., WEN-HUEI CHANG., CHEE-SHAN CHEN., JIUNN-WANG LIAO CHIN-JUNG HUANG., FUNG-JOU LU., YI-CHEN CHIA., HSENG-KUANG HSU., JIA-JIUAN WU., HSIN-LING YANG .(2008).** Antioxidant activities of Toona Sinensis leaves extracts using different antioxidant models. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 105–114 .
- YRJÖNEN T. (2004).** Extraction and planar chromatographic separation Techniques in the Analysis of natural products. Conference Room 513at Viikki Infocentre. *Faculty of pharmacy of the university Helsinki*. 64p.
- YUN TAN., XIA CHU., GUO-LI SHEN., RU-QIN YU. (2009).** A signal-amplified electrochemical immunosensor for aflatoxin B1 determination in rice. *Analytical Biochemistry*. 01-27.

ZHAO YAPINGA., YU WENLIA., WANG DAPUA., LIANG XIAOFENGB., HU - TIANXIB.(2003).Chemiluminescence determination of free radical scavenging abilities of 'tea pigments' and comparison with 'tea polyphenols' *Analytical, Nutritional and Clinical MethodsSection.FoodChemistry*, 80,115–118.

Liens internet:

-www.thegourdreserve.com/mold/into.shtml (Digital Graphics and web design for *The Gourd Reserve*)

Annexe

Annexe 2

La Composition des milieux de cultures utilisés :

1. Milieu PDA (Pomme de terre, Dextrose, Agar) :

Pomme de terre.....	200g
Agar.....	15g
Glucose.....	20g
Eau distillée.....	1000ml
pH final= 5,6 ± 0,2	

Ramollir la pulpe de pomme de terre dans 300ml d'eau en chauffant. Ajouter ensuite le glucose et l'agar. Porter à ébullition pour solubiliser l'agar puis filtrer sur gaze et compléter à un litre avec de l'eau distillée.

2. Milieu CAM : Coconut Agar Medium : milieu à base de coco gélosé

Noix de coco déchiquetée.....	100g
Eau distillée.....	300ml.
Tissu en mousseline	
Agar	20g
Eau distillée.....	1000ml

Préparation : 100g de noix de coco déchiquetée sont homogénéisés pendant 05 min avec 300 ml puis porté à ébullition, le mélange est filtré à l'aide du tissu en mousseline.

Le pH final ajusté à 7 avec une solution de NaOH 2N (cette étape on peut ne pas l'effectuer)

Le filtrat est additionné de 20 g d'agar puis complété à 1000ml par l'eau distillée.

NB : tous les milieux sont stérilisés par autoclave durant 15min à 120°C.

Autoclave à utiliser pour les milieux de cultures, la verrerie, matière en caoutchouc (boite de Pétri).