

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 des Sciences Alimentaires



Mémoire de fin cycle

En vue d'obtention du diplôme de master en Sciences Alimentaires

Spécialité : Sécurité Agro-Alimentaire et Assurance Qualité

Thème

Évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles de gingembre (*Zingiber officinale*) et de clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) contre la souche aflatoxinogène d'*Aspergillus flavus*.

Présenté par :

CHERIFI Lydia

BOURENANE Sabrina

Soutenues le 30/06/ 2024 devant le jury composé de :

Mr SIFER Kamel	MAA	UMMTO	Président
Mr DJENNANE Djamel	Professeur	UMMTO	Promoteur
M^{me} BEN MIRI Yamina	MCA	UMBM	Co-Promotrice
Mr SI TAYEB Hachemi	MCB	UMMTO	Examineur

Année universitaire : 2023/2024

Remerciements

En premier lieu et avant tout, nous remercions Dieu le tout puissant qui nous a donné la force, le courage et la patience d'accomplir ce travail.

Nous tenons à remercier notre promotrice BEN MIRI Yamina et co- promoteur Mr DJENANE Djamel, pour leurs savoir-faire, leurs conseils, compétences, patiences, enthousiasmes et l'attention particulière avec laquelle ils ont suivi et dirigé ce travail.

Nous remercions vivement les membres de jury :

Monsieur SIFER Kamel, Maitre-assistant à l'UMMTO, nous sommes très honorés que vous ayez accepté la présidence du jury de ce mémoire. Merci pour l'effort et le temps consacré à évaluer notre travail.

Monsieur SI TAYEB Hachemi, Maitre de conférences à l'UMMTO, merci d'avoir accepté de faire partie du jury, et pour le temps consacré à évaluer notre travail.

On tient également à remercier tout le personnel du laboratoire physico-chimique et microbiologique en particulier Khadidja et Damia pour leurs conseils et leur disponibilité.

Enfin nous remercions, tous ceux qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents pour leur soutien de toujours,

Mes frères et ma belle-sœur,

Ma grand-mère qui m'a toujours souhaitée le meilleure,

Et à tous mes amies et à ceux qui me sont chers.

A mon amie, mon binôme Sabrina, avec laquelle j'ai partagé des moments inoubliables durant mon cursus universitaire et durant la réalisation de ce travail.

Lydia

Dédicaces :

Je dédie ce travail à :

Mes chers parents, pour l'amour qu'ils m'ont toujours donné, leurs encouragements et toute l'aide qu'ils m'ont apportée durant mes études. Puisse dieu leur accorder santé, bonheur, prospérité et longue vie afin que je puisse un jour combler de joie leurs vieux jours.

A mes frères Allilou, Mazigh, Aghilès

A mes chères sœurs Dihia, Souad et son mari Azouaou, Wissam

Pour leurs soutiens moraux et leurs conseils précieux tout au long de mes études

A mon binôme, Lydia

Pour son soutien moral, sa patience, et sa compréhension tout au long de ce travail, avec laquelle j'ai passée des bons moments durant mon cursus universitaire

A mon cher, Ghani

Qui m'a aidé, supporté et encouragé dans les moments difficiles

A mes chères amies

Qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotions lors de la réalisation de ce travail

Et à tous les membres de ma famille

Sabrina

Résumé

Dans cette étude, les huiles essentielles de gingembre (*Zingiber officinale*) et de clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) ont été évaluées pour leur efficacité contre *Aspergillus flavus*, en se concentrant sur leurs concentrations minimales inhibitrices (CMI) et fongicides minimales (CMF). Les caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles ont été décrites, avec le gingembre présentant une couleur jaune pâle et une odeur fraîche, tandis que le girofle exhibe une consistance légèrement visqueuse, une couleur jaune-brun et une odeur épicée. L'identification précise a été réalisée en utilisant la méthode AFPA, révélant des caractéristiques culturelles distinctes sur différents milieux de culture. Concernant l'activité antifongique, l'huile essentielle de gingembre a montré une inhibition progressive et significative de la croissance d'*A. flavus*, avec une efficacité dose-dépendante observable dès le troisième jour d'incubation. À une concentration de 5%, l'inhibition a atteint 74,75% au septième jour. De manière similaire, l'huile essentielle de girofle a également inhibé efficacement la croissance fongique, avec une inhibition de 87,95% à 4% de concentration. Les CMI mesurées étaient de 6% pour l'huile essentielle de gingembre et de 5% pour l'huile essentielle de girofle, avec des CMF correspondantes identiques. Cette étude soutient le potentiel des huiles essentielles de gingembre et de clou de girofle comme agents antifongiques efficaces contre *A. flavus*, offrant ainsi des perspectives prometteuses pour leur utilisation future dans divers domaines, y compris l'agriculture et la sécurité alimentaire.

Mots-clés : Huiles essentielles, *Aspergillus flavus*, gingembre, clou de girofle, activité antifongique, CMI, CMF.

Abstract

In this study, the essential oils of ginger (*Zingiber officinale*) and clove (*Syzygium aromaticum*) were evaluated for their effectiveness against *Aspergillus flavus*, focusing on their Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) and Minimum Fungicidal Concentrations (MFC). The organoleptic characteristics of the essential oils were described, with ginger exhibiting a pale yellow color and a fresh scent, while clove showed a slightly viscous consistency, a yellow-brown color, and a spicy odor. Precise identification was conducted using the AFPA method, revealing distinct cultural characteristics on different culture media. Regarding antifungal activity, ginger essential oil exhibited progressive and significant inhibition of *A. flavus* growth, with dose-dependent effectiveness observed as early as the third day of incubation. At a concentration of 5%, inhibition reached 74.75% by the seventh day. Similarly, clove essential oil also effectively inhibited fungal growth, achieving 87.95% inhibition at 4% concentration. The measured MICs were 6% for ginger essential oil and 5% for clove essential oil, with corresponding MFCs identical to the MICs. This study supports the potential of ginger and clove essential oils as effective antifungal agents against *A. flavus*, offering promising prospects for their future use in various fields, including agriculture and food safety.

Key-words: Essential oils, *Aspergillus flavus*, ginger, clove, antifungal activity, MIC, MFC.

µl : Microlitre.

µm : Micromètre.

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

AFB1 : Aflatoxine B1.

AFNOR : Association Française de Normalisation.

AFPA : Milieu sélectif pour la détection et l'identification d'*A.F* et d'*A.P*.

ARN : Acide Ribonucléique.

ATP : Adénosine-Triphosphate.

a_w : Activité de l'eau.

BHA : Butyl-hydroxyanisole.

BHT : Butyl-hydroxytoluène.

C : Carbone.

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

CCM : Chromatographie sur Couche Mince.

CG : Chromatographie Gazeuse.

CMF : Concentration minimale fongicide.

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse.

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

DO : Densité Optique.

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

EFSA : Agence Européenne de Sécurité des Aliments.

FDA : Food and Drug Administration.

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

GRAS : Généralement Reconnues Comme Sûres.

HE : Huile Essentielle.

IBS : Inhibiteurs de la Biosynthèse des Stéroïdes.

IRFT : Infrarouge à transformée de Fourier.

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

KCl : Chlorure de Potassium.

MDGC : Chromatographie Gazeuse Multi Dimensionnelle.

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

NaCl : Chlorure de Sodium.

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

PTLC : Chromatographie en Couche Mince Préparative (Preparative Thin-Layer Chromatography).

RMN : Résonance magnétique.

SM : Spectrométrie de Masse.

SPME : Micro Extraction en Phase Solide.

Tr : Temps de rétention.

UV : ultra-violet.

V : Volume.

Table des matières

Résumé

Abstract

Listes des abréviations

Listes des figures

Liste des tableaux

Introduction1

I. Etude bibliographique

I.1. Moisissures3

I.2. Caractéristiques morphologiques des moisissures3

I.3. Conditions de développement des moisissures4

I.3.1. Facteurs environnementaux4

➤ Activité de l'eau (a_w).....4

➤ Température.....4

➤ pH.....5

➤ Aération.....5

I.3.2. Éléments nutritifs6

I.4. Genre *Aspergillus*6

I.4.1. Définition6

I.4.2. *Aspergillus flavus*7

I.5. Huiles essentielles8

I.5.1. Définition, localisation et composition chimique8

I.5.2. Méthode d'extraction des huiles essentielles9

• L'hydrodistillation.....9

• Entraînement par la vapeur d'eau.....10

• Enfleurage11

I.5.3. Méthodes d'analyses des huiles essentielles11

I.6. Inconvénients des fongicides synthétiques	12
I.6.1. Agents de conservation faible impact	13
I.7. Les huiles essentielles comme antifongiques naturels	13
I.7.1. Le mode d'action des huiles essentielles	17
I.8. Application des huiles essentielles dans la prévention des aliments de la contamination	19
I.9. Stratégies pour améliorer l'efficacité des composés antifongiques d'origine végétale..	21

II. Partie pratique

II.1. Appareillage et produits chimiques.....	23
II.2. Huiles essentielles	23
II.3. Analyse mycologique	23
II.3.1. Identification de l'espèce d' <i>A. flavus</i>	23
II.3.2. Test de confirmation du pouvoir aflatoxinogène de la souche	24
II.4. Préparation de l'inoculum	25
II.5. Évaluation de l'activité antifongique <i>in vitro</i> des huiles essentielles	25
II.5.1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et fongicides (CMF)	26

III. Résultats et Discussion

III.1. Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles	28
III.2. Analyse mycologique.....	29
III.2.1. Identification de l'espèce	29
III.3. Test de confirmation du pouvoir aflatoxinogène de la souche Test de confirmation du pouvoir aflatoxinogène de la souche	30
III.4. Activité antifongique des huiles essentielles	31
Conclusion et Perspective	37

Références bibliographiques

Annexes

Figure 1. Structure typique d'un *Aspergillus* bisérié (à gauche) et unisérié (à droite).....7

Figure 2. *A. flavus* (A : Culture de 7 jours sur gélose au malt à 25°C ; B : Aspect microscopique)8

Figure 3. Schéma du procédé de l'hydrodistillation..... 10

Figure 4. Schéma du processus de distillation par entraînement à la vapeur d'eau 10

Figure 5. Montage de l'enfleurage 11

Figure 6. Aspect macroscopique d'*A. flavus*.....30

Figure 7. Mise en évidence par fluorescence sous lumière U.V. (365 nm) de la production d'AFB1 par d'*A. flavus* BTK4 sur milieu CAM31

Figure 8. CCM sous UV 365 nm montrant les taches bleues d'AFB1 produite par *A. flavus* BTK4 sur milieu CAM31

Figure 9. Effet de l'huile essentielle de gingembre aux différentes concentrations sur la croissance de l'*A. flavus* pendant 7 jours d'incubation32

Figure 10. Effet des différentes concentrations (0 à 6%, respectivement) de l'huile essentielle de gingembre sur la croissance de l'*A. flavus* durant 7 jours d'incubation33

Figure 11. Effet de l'HE de clou de girofle aux différentes concentrations sur la croissance de l'*A. flavus* pendant 7 jours d'incubation.....34

Figure 12. Effet des différentes concentrations (0 à 6%, respectivement) de l'huile essentielle de clou de girofle sur la croissance de l'*A. flavus* durant 7 jours d'incubation34

Figure 13. Les pourcentages d'inhibition de la croissance du mycélium de l'*A. flavus* après 7 jours d'incubation 37

Tableau I. Effets antifongiques des HEs.....	16
Tableau II. Effet antifongique de certaines HEs <i>in vivo</i>	20
Tableau III. Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle étudiées.	28
Tableau IV. Identification d' <i>A. flavus</i> BTK4	30

Introduction

De nombreux ravageurs et maladies attaquent les cultures vivrières à travers le monde, et la majorité de ces afflictions sont dues à des champignons pathogènes. À l'échelle mondiale, les pertes post-récolte sont estimées à 50 %, une grande partie de ces pertes étant causée par des infections fongiques et bactériennes (**Magro et al., 2006**).

Les moisissures, agents biologiques omniprésents, colonisent les aliments grâce à leur capacité à synthétiser une large gamme d'enzymes hydrolytiques. Elles provoquent des maladies chez les plantes, entraînant des pertes économiques considérables pour les producteurs alimentaires. Les fruits et les légumes, en particulier, sont très sensibles à la détérioration par les moisissures, tant sur le champ que pendant le stockage post-récolte. Les genres significatifs incluent *Pythium*, *Phytophthora*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Geotrichum*, *Sclerotinia* et *Rhizoctonia* spp (**Prakash et al., 2015**).

La croissance fongique sur les fruits et légumes frais est responsable de leur dégradation et de nombreuses maladies végétales, entraînant ainsi des pertes économiques significatives (**Ben Miri et al., 2023**). La prolifération des moisissures dépend de facteurs abiotiques tels que le pH, l'activité de l'eau (aw), la concentration de solutés, la température, l'atmosphère et le temps. Cependant, les conditions de température et d'aw sont les principales variables déterminant le développement des moisissures (**Mahlo et al., 2010**).

Les cultures céréalières sont également vulnérables à la contamination fongique, notamment par les genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* et *Alternaria*. Dans ces matrices, les moisissures causent des odeurs désagréables et contribuent à l'échauffement et à la perte de matière sèche des grains en utilisant les hydrates de carbone comme source d'énergie, en dégradant les lipides et les protéines, et en produisant des métabolites volatils et des composés allergènes. Ces processus réduisent la qualité des aliments destinés aux animaux et des semences (**Magan et Aldred, 2007**), et peuvent se produire avant même que la croissance fongique ne soit visible (**Lee et al., 2007**).

En plus de provoquer des maladies chez les plantes, de nombreuses espèces de *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* et *Alternaria* peuvent synthétiser des mycotoxines. Ces composés sont dangereux pour la santé animale et humaine car ils peuvent être létaux, cancérigènes, mutagènes, toxiques, immunosuppresseurs, ou mimétiques des œstrogènes. Leur activité dépend du type de toxine et de leur concentration dans les aliments. Les préoccupations concernant ces risques chimiques augmentent en raison de la diversité des aliments susceptibles d'être affectés et de la variabilité des symptômes causés. La présence de mycotoxines dans les

aliments est liée à un inoculum fongique sur des substrats prédisposés. Les mycotoxines peuvent être produites avant et après la récolte et leurs niveaux peuvent augmenter pendant la manipulation et le stockage post-récolte. Prévenir la croissance fongique est donc une stratégie efficace pour éviter l'accumulation de mycotoxines (**Lee *et al.*, 2007**). Il est important de noter que l'inhibition partielle de la croissance fongique, telle que la réduction du taux de croissance fongique, pourrait en fait favoriser la production de mycotoxines, car la moisissure peut les produire en réponse au stress (**Kedia *et al.*, 2015**).

C'est dans cette optique que se situent nos objectifs principaux, lesquels se résument comme suit :

- Isoler et identifier la souche aflatoxinogène *Aspergillus flavus* à partir d'une matrice alimentaire, le pain.
- Tester l'activité antifongique des huiles essentielles de gingembre (*Zingiber officinale*) et de clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) contre cette souche aflatoxinogène.

Étude bibliographique

I.1. Moisissures

Le terme « moisissure » n'a pas de signification systématique précise, il est communément utilisé pour désigner des champignons microscopiques filamenteux, importants dans diverses industries humaines et dans l'environnement, de manière bénéfique ou néfaste (**Leyral et Vierling, 2001**). Les moisissures sont constituées de filaments ramifiés appelés hyphes, formant un ensemble connu sous le nom de mycélium. Elles appartiennent au règne des champignons. Selon certains auteurs, il existe entre 65 000 et 100 000 espèces différentes dans ce règne, dont environ 20 000 sont des moisissures (**Pinton, 2012**).

Les moisissures ne forment pas un groupe systématique homogène, mais se répartissent parmi diverses familles de champignons microscopiques. Leur classification, comme celle des autres champignons, repose principalement sur le mode de reproduction sexuée. Ce critère définit quatre des cinq classes de mycètes : les Chytridiomycètes, les Zygomycètes, les Basidiomycètes, et les Ascomycètes. Les Deutéromycètes, ou Fungi imperfecti, constituent une subdivision pour les champignons dont la reproduction sexuée n'est pas connue (**Leveau et Bouix, 1993 ; Heritage et al., 1996**).

Les moisissures produisent une grande variété de métabolites secondaires. Certains sont très utiles à l'homme et présentent un intérêt considérable dans divers domaines (agriculture, biotechnologie, environnement, santé, industrie agroalimentaire, etc.). Toutefois, elles peuvent également provoquer d'importantes détériorations, notamment dans le domaine agronomique (**Nguyen, 2007**). L'impact le plus négatif des moisissures sur les denrées alimentaires est sans doute lié à la synthèse de substances toxiques : les mycotoxines.

I.2. Caractéristiques morphologiques des moisissures

Les caractéristiques morphologiques des moisissures peuvent varier en fonction des espèces et des conditions environnementales dans lesquelles elles se développent. Voici quelques types de ces caractéristiques couramment observées (**Roland., Brigitte ; et Vian, 1999**) :

Les moisissures peuvent avoir des formes variées, allant de filamenteuses à globuleuses, et peuvent être unicellulaires ou pluricellulaires. Leur taille peut varier de quelques micromètres à plusieurs centimètres. En termes de couleur, elles peuvent présenter une grande variété, allant du blanc, du gris et du noir au vert, au bleu et même au rose. La couleur dépend souvent de l'espèce de moisissure et des pigments qu'elle produit, tels que les mélanines et les caroténoïdes.

La texture des moisissures peut être veloutée, poudreuse, cotonneuse ou granuleuse, dépendant de la structure des filaments (hyphes) qui les composent. En général, les moisissures sont des champignons microscopiques eucaryotes constitués d'un thalle filamenteux appelé mycélium, formé de filaments ramifiés appelés hyphes. Ces hyphes peuvent être septés (divisés par des cloisons) ou aseptés (non divisés), ainsi qu'hyalins (translucides) ou pigmentés.

Les hyphes se divisent en différents types : les hyphes aériens, qui se dressent verticalement et peuvent se ramifier pour former des structures conidiennes ; les hyphes stolonifères, qui rampent sur le substrat et peuvent donner naissance à de nouvelles colonies ; et les rhizomorphes, qui sont des cordons d'hyphes épais et agrégés.

Les moisissures se reproduisent soit de manière asexuée (via des conidies, des chlamydospores), soit de manière sexuée (via des ascospores, des basidiospores), en utilisant des spores. Elles sont principalement connues pour leur capacité à altérer les aliments, tels que le pain et les fruits, et jouent un rôle de décomposeurs naturels dans la chaîne alimentaire.

I.3. Conditions de développement des moisissures

I.3.1. Facteurs environnementaux

➤ Activité de l'eau (a_w)

Les moisissures peuvent tolérer des valeurs d'activité de l'eau (a_w) plus basses ($<0,85$). En général, aucune croissance n'est observée en dessous de 0,62 (Chirife et Buera, 1994). Par exemple, *Aspergillus parasiticus* ne croît pas en dessous d'une a_w de 0,85 (Garcia *et al.*, 2011). Des valeurs encore plus basses ont été observées pour des souches plus résistantes comme *Xeromyces bisporus*, *Chrysosporium fastidium* et *Basipetospora halophila*.

➤ Température

La température joue un rôle crucial dans la croissance du mycélium, la sporulation et la germination des spores des moisissures. En règle générale, ces organismes se développent à des températures comprises entre 15 et 30°C, avec une croissance optimale autour de 20 à 25°C (guide-des-aliments.com). Cependant, certaines moisissures peuvent prospérer à des températures modérées et élevées (thermotolérantes), telles qu'*Aspergillus niger*, qui peut se développer dans une fourchette d'environ 8 à 45°C. Cette espèce est reconnue comme l'un des

champignons les plus destructeurs en raison de sa capacité d'adaptation à un large spectre de températures.

➤ pH

De nombreuses moisissures se développent dans une plage de pH allant de 2 à 9. La croissance optimale de la plupart des micro-organismes est généralement observée à des niveaux de pH entre 4 et 6, bien qu'un petit nombre puisse prospérer à un pH inférieur à 4, comme c'est le cas pour *Aspergillus oryzae* (Jay *et al.*, 2005). Le pH influence la croissance des micro-organismes de manière indirecte en affectant la disponibilité des éléments nutritifs, ou directement en agissant sur la membrane cellulaire. De plus, les champignons ont tendance à modifier le pH du milieu par l'absorption sélective et l'échange d'ions, la production de CO₂ ou NH₃, ou encore d'acides (Boiron, 1996).

➤ Aération

La plupart des moisissures sont aérobies et nécessitent une bonne oxygénation, avec un taux de CO₂ inférieur ou égal à 10 %, bien que leur croissance soit inhibée par une augmentation de la concentration de dioxyde de carbone (Taniwaki *et al.*, 2009). Les espèces les plus exigeantes se développent en périphérie des substrats, tandis que les moins exigeantes peuvent prospérer en profondeur, comme c'est le cas pour *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus fumigatus*. Cependant, certaines moisissures tolèrent des niveaux d'oxygène relativement bas et peuvent même se développer en anaérobiose. Ces espèces, qualifiées de microaérophiles, incluent *Penicillium roqueforti* et *Aspergillus niger*, capables de supporter jusqu'à 4,2 % d'oxygène et de croître en anaérobiose en produisant de l'éthanol et des diacides organiques.

➤ Lumière

Bien que l'influence de la lumière sur la croissance des moisissures ne soit pas clairement établie, des indications suggèrent qu'elle peut jouer un rôle dans la germination des spores et la dispersion des champignons. Certaines espèces dépendent de la lumière, tandis que d'autres l'évitent. Par exemple, chez *Verticillium agaricinum*, une exposition prolongée aux rayons UV peut restreindre la croissance voire entraîner la mort du mycélium (Gauthier, 2016).

I.3.2. Éléments nutritifs

Pratiquement tous les composés organiques peuvent être utilisés comme source de carbone et d'énergie par les moisissures. La plupart d'entre elles peuvent métaboliser le glucose et le saccharose ainsi que quelques polysaccharides comme l'amidon et la cellulose (**Nicklin et al., 2000**).

La majorité des moisissures absorbent l'ammoniac sous forme de sels (NH_4^+), ce qui inhibe l'utilisation d'autres sources d'azote telles que les nitrates, les acides aminés et les protéines. L'ammoniac est métabolisé en acide glutamique, en glutamine ou en d'autres acides aminés par transamination (**Boiron, 1996**). Alors que certaines espèces sont capables d'utiliser le nitrate, d'autres nécessitent la présence d'azote organique pour se développer, et aucune moisissure n'a la capacité de fixer l'azote atmosphérique (**Punt et al., 2002**).

La présence d'ions minéraux dans les milieux de culture est indispensable pour favoriser la croissance et la reproduction de diverses espèces fongiques. Ces ions comprennent principalement le sulfate, le magnésium, le potassium, le sodium et le phosphore, présents à des concentrations variables selon l'espèce (**Uchicoba et al., 2001**). De plus, des traces d'éléments tels que le fer, le cuivre, le manganèse, le zinc et le molybdène sont essentiels pour la plupart des moisissures afin de produire des cytochromes, des pigments, des acides organiques, etc. (**Boiron, 1996**).

I.4. Genre *Aspergillus*

I.4.1. Définition

Le genre *Aspergillus* (**Figure 1**) regroupe environ 250 espèces (**Klich, 2007**). Il est nommé d'après une structure caractéristique ressemblant à l'aspergillum, un instrument utilisé pour asperger l'eau bénite, qui a inspiré le prêtre catholique Micheli en 1729 (**Klich, 2009**). Les espèces d'*Aspergillus* sont très répandues dans la nature, notamment dans le sol, où elles jouent un rôle crucial dans la biodégradation et le recyclage des matières organiques (**Scheidegger et Payne, 2003**). Elles sont également utilisées dans divers domaines, notamment l'agriculture, la biotechnologie et la santé, pour la production de métabolites utiles tels que des enzymes, des protéines et des acides.

En raison de leur importance économique, tant pour leurs effets bénéfiques que nuisibles, de nombreux ouvrages ont été consacrés au genre *Aspergillus*, en mettant l'accent sur

sa taxonomie et sa phylogénie (Samson et Pitt, 2000 ; Varga et al., 2003 ; Frisvad et Samson, 2004 ; Samson *et al.*, 2006).

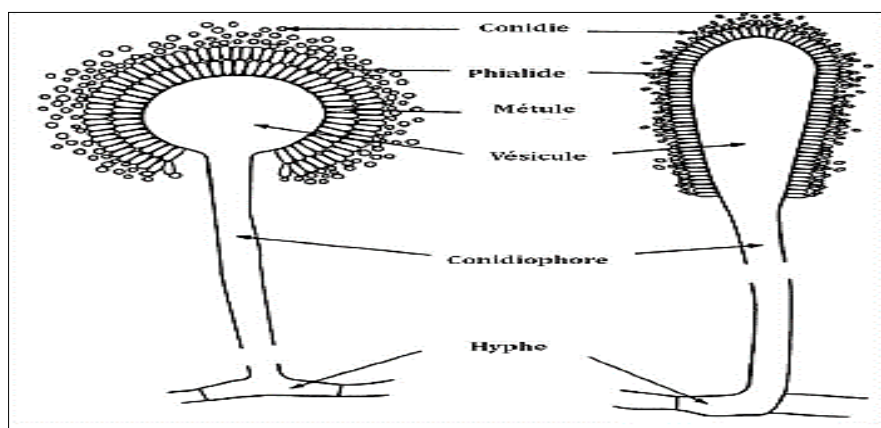


Figure 1. Structure typique d'un *Aspergillus* bisérié (à gauche) et unisérié (à droite) (El Khoury, 2016).

I.4.2. *Aspergillus flavus*

Aspergillus flavus est une moisissure de couleur allant du vert-jaune au vert olive, caractérisée par des têtes conidiennes, unisériées ou bisériées, d'abord radiées, puis se répartissant en plusieurs colonnes de spores mal individualisées, jaunâtres au début, puis devenant vert-jaune foncé. Les conidiophores sont hyalins et verruqueux, atteignant de 1 à 2,5 mm de long. La vésicule est globuleuse ou subglobuleuse, mesurant entre 10 et 65 μm de diamètre. Les têtes sont majoritairement bisériées, comportant deux rangées de stérigmates, et les conidies sont lisses ou légèrement rugueuses (Hedayati, 2007 ; Samson, 2010).

A. flavus est une espèce principalement tropicale et subtropicale, capable de coloniser de nombreux substrats. On la trouve fréquemment dans le sol, les produits végétaux en décomposition, les fourrages, les grains et semences en stockage, les aliments pour animaux, et les dérivés de céréales (Horn et Dörner, 1998). Cette espèce présente également un important pouvoir pathogène, attaquant principalement les voies respiratoires des humains et des animaux. Elle est l'un des principaux responsables des aspergilloses bronchiques allergiques.

En plus de ses impacts pathogènes, *A. flavus* produit divers métabolites toxiques, notamment les aflatoxines, avec l'aflatoxine B1 (AFB1) étant l'un des plus puissants hépatocarcinogènes connus. L'aflatoxinogénèse peut se produire entre 12 °C et 42 °C, avec un optimum situé entre 25 °C et 30 °C.

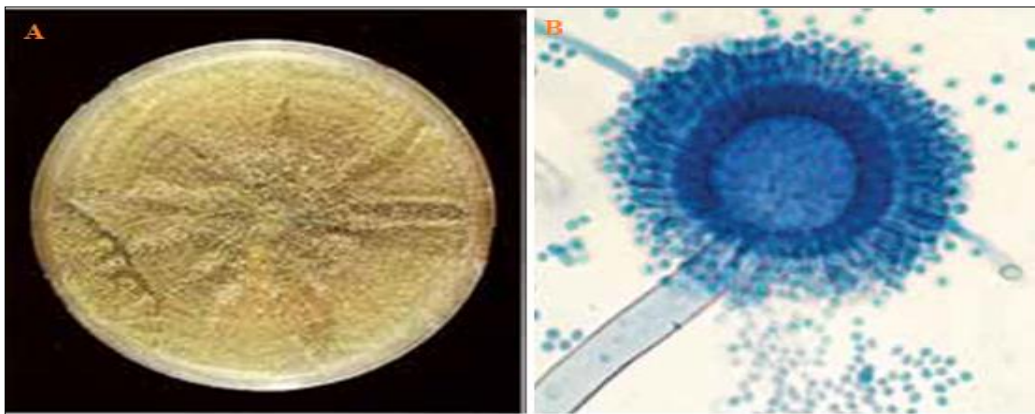


Figure 2. *A. flavus* (A : Culture de 7 jours sur gélose au malt à 25°C ; B : Aspect microscopique) (Tabuc, 2007).

I.5. Huiles essentielles

I.5.1. Définition, localisation et composition chimique

Les huiles essentielles sont des produits obtenus à partir de matières premières végétales par distillation. Le terme "essence" désigne les parfums exhalés, des sécrétions naturelles produites par différents organes des plantes, attribuables à la présence de composés volatils aromatiques dans les cellules végétales. Le terme "huile" fait référence à la nature lipophile (hydrophobe) et visqueuse de ces substances, tandis que "essentiel" souligne leur préciosité et leur parfum caractéristique de plantes (Li *et al.*, 2014).

On retrouve les huiles essentielles dans divers organes de plantes appartenant à différentes familles. Les familles des Lamiacées, des Myrtacées (comme l'Eucalyptus) et des Rutacées (comme les agrumes) présentent un niveau élevé de composés aromatiques volatils (Chemat *et al.*, 2013). Elles se trouvent dans les fleurs (camomille, lavande), feuilles (eucalyptus, laurier noble), tiges (citronnelle), racines (vétiver), rhizomes (curcuma, gingembre), bois (bois de rose, santal), écorce (cannelle), fruits (anis, badiane) et graines (muscade) (Stéphane et Jules, 2020). La concentration en huiles essentielles dans les plantes est souvent très faible, voire infime : par exemple, il faut environ 10 kg de clous de girofle, de 4 à 10 tonnes de pétales de rose, pour obtenir un litre d'huile essentielle (Degryse *et al.*, 2008).

Les HEs sont des liquides incolores, transparents et mobiles à température ambiante. Elles peuvent présenter tout le spectre de couleurs, du jaune au noir brun, avec diverses nuances intermédiaires. Certaines huiles essentielles contiennent également des solides, tels que des cristaux. L'odeur caractéristique dépend des organes, des espèces et de l'origine des plantes, ainsi que du chémotype. Contrairement aux huiles végétales, les huiles essentielles sont volatiles, avec un indice de réfraction élevé et une rotation optique due à la présence de nombreux composés asymétriques. Leur densité relative est généralement inférieure à celle de l'eau. Elles sont largement solubles dans les graisses, les alcools et la plupart des solvants organiques. Elles sont composées de divers composés chimiques, produits dans toutes les plantes aromatiques et les arbres par la photosynthèse, via deux voies principales : la multiplication de l'isoprène activé (isopentényl pyrophosphate C5) et la biosynthèse de l'acide shikimique, dont certaines déviations de biomolécules sont responsables des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, tels que l'eugénol, l'anéthole, l'aldéhyde cinnamique, etc. Les composés des huiles essentielles peuvent être divisés en deux catégories principales : les hydrocarbures, principalement les composés mono-, sesqui- et di-terpènes, et les composés oxygénés, tels que les alcools, oxydes, aldéhydes, cétones, phénols, acides et esters/lactones (Fernandez *et al.*, 2013).

I.5.2. Méthode d'extraction des huiles essentielles

De nombreuses méthodes d'extraction sont utilisées pour obtenir les précieuses substances aromatiques des plantes, un processus délicat visant à capturer les produits les plus subtils et les plus fragiles sans altérer leur qualité. Ces méthodes sont adaptées aux propriétés clés des huiles essentielles (HE), notamment leur volatilité dans l'air et la vapeur d'eau, ainsi que leur solubilité dans les solvants organiques.

- **L'hydrodistillation** : consiste à immerger le matériel végétal dans l'eau et à le chauffer jusqu'à ébullition sous pression atmosphérique dans un alambic. Les vapeurs produites sont condensées dans un réfrigérant, permettant ainsi de libérer les molécules odorantes des huiles essentielles et de se séparer de l'eau en raison de leur différence de densité (Figure 3).

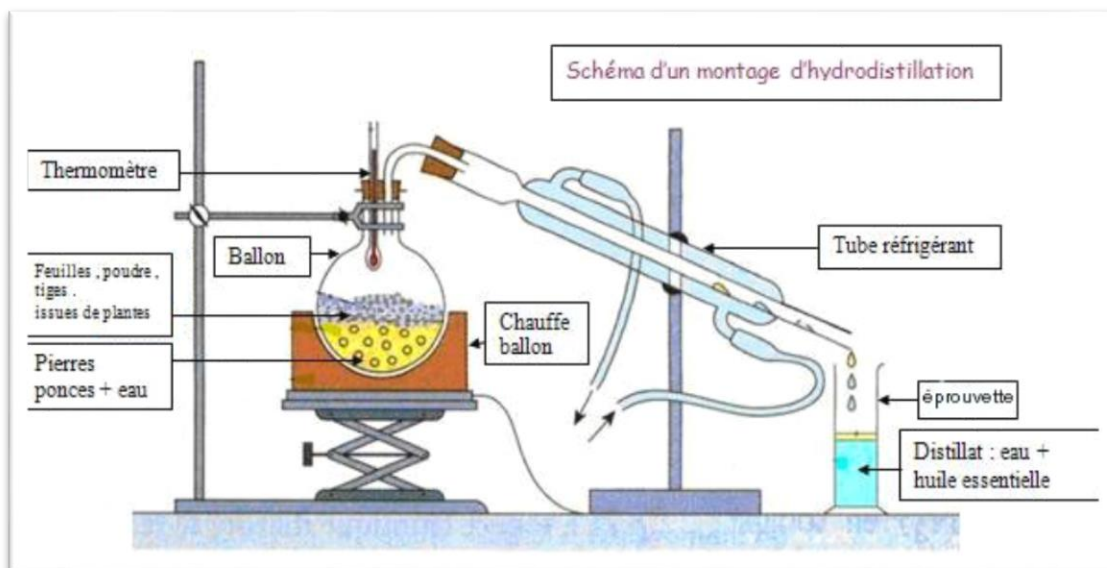


Figure 3. Schéma du procédé de l'hydrodistillation.

- **L'entraînement par la vapeur d'eau** : utilise la vapeur saturante pour extraire les HE des plantes vers un condenseur où elles sont liquéfiées et séparées de l'eau, tandis que l'hydro-diffusion injecte de la vapeur de haut en bas pour condenser directement les HE sous le support de la plante (Jacques et Francis, 2012) (Figure 4).

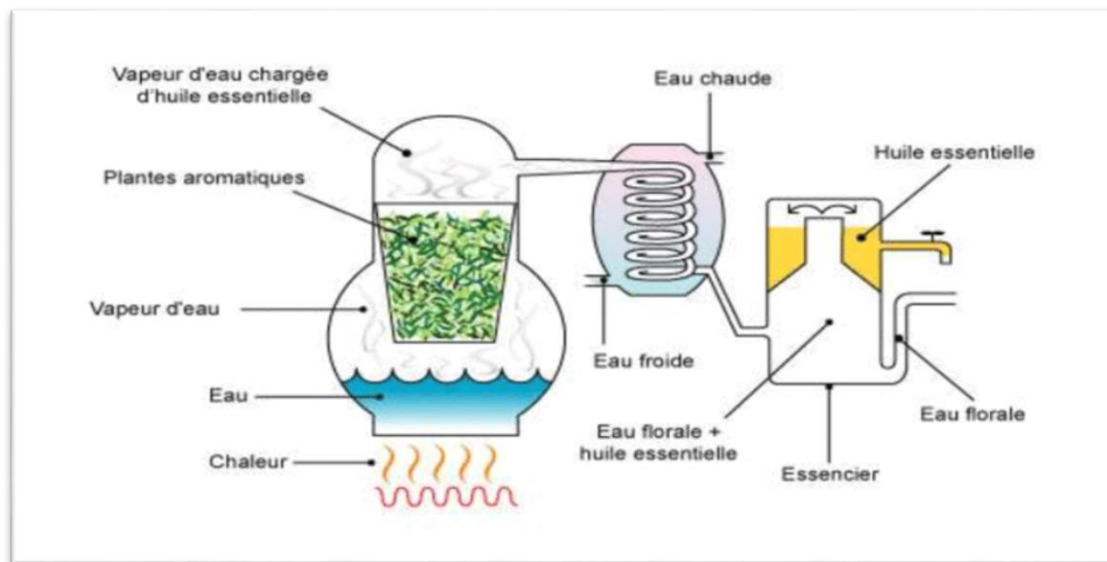


Figure 4. Schéma du processus de distillation par entraînement à la vapeur d'eau.

- **Enfleurage** : un processus d'extraction de parfums à travers des corps gras. L'enfleurage à chaud, en combinaison avec l'enfleurage à froid, utilise des dissolvants fixes pour obtenir des résultats supérieurs à la distillation. Les organes fragiles (fleurs d'oranger, pétales de Rose) sont mis en contact avec un corps gras, qui se sature en essence au bout de quelques jours. La pommade obtenue est épuisée par l'alcool absolu. L'alcool est ensuite évaporé sous vide (**Hanif et al. 2019**).



Figure 5. Montage d'enfleurage.

Ainsi que des méthodes telles que l'extraction assistée par micro-ondes qui utilise les micro-ondes pour chauffer la matière végétale dans une enceinte fermée, tandis que l'extraction au CO₂ supercritique combine les caractéristiques des gaz et des liquides pour extraire les HE sans résidus de solvant. La distillation Turbo permet une agitation et un mélange considérables avec un effet de cisaillement sur les matières végétales, tandis que l'extraction par ultrasons utilise des ultrasons pour détruire les glandes des HEs, facilitant leur transfert des plantes. D'autres méthodes incluent les headspace dynamique et statique, l'extraction par fluide supercritique et la micro-extraction en phase solide (SPME), chacune offrant des avantages spécifiques en termes d'efficacité et de rendement, comme le soulignent diverses études (**Porto et al., 2009 ; Mason et al., 2011**).

I.5.3. Méthodes d'analyses des huiles essentielles

L'analyse de la composition chimique des huiles essentielles (HEs) repose généralement sur l'utilisation de techniques comme la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ou à l'infrarouge (GC/SM ou GC/IRFT) sur deux colonnes de polarité différente (**Hedges et Wilkins, 1991**). Les composés sont identifiés à partir de leur indice de rétention (Ir) et de leur spectre de masse. Une autre méthode, développée par **Formáček et**

Kubeczka (1982), permet d'identifier les composants individuels des HEs à partir d'un spectre RMN ¹³C, sans séparation préalable des constituants.

Pour la séparation des énantiomères, la chromatographie gazeuse chirale (GC chirale) est généralement utilisée. Différentes approches sont distinguées, comme l'injection directe du mélange dans une colonne chirale (souvent avec la confirmation par spectrométrie de masse pour l'identification précise des pics). Une autre méthode implique la séparation des énantiomères purifiés préalablement sur une colonne chromatographique achirale avant la chromatographie chirale (**Casabianca et Graff, 1994**), ainsi que l'utilisation de la chromatographie gazeuse multidimensionnelle (MDGC), permettant une pré-séparation des composés sur une première colonne achirale suivie d'une séparation en colonne chirale via la technique de coupe-cœur (heart-cutting) (**Bicchi et Pisciotta, 1990**).

Les propriétés physiques et la composition chimique des huiles essentielles sont déterminées dès leur extraction, ces données étant cruciales pour l'authentification des HEs en vue de leur utilisation industrielle.

I.5. Utilisation des huiles essentielles comme agents antifongique

I.6. Inconvénients des fongicides synthétiques

Les fongicides synthétiques présentent plusieurs inconvénients significatifs. Initialement utilisés comme première ligne de défense contre les contaminations fongiques, ces produits chimiques antimicrobiens, tels que le thiabendazole, l'ortho-phénylphénate de sodium et l'imazalil, ont été largement employés en agriculture pour lutter contre les maladies des plantes. Cependant, leur utilisation excessive et non ciblée a favorisé l'émergence de souches pathogènes résistantes, nécessitant ainsi des concentrations plus élevées et entraînant une accumulation de résidus toxiques dans les produits alimentaires. De plus, certains de ces composés ne sont pas biodégradables et peuvent s'accumuler dans l'environnement, affectant potentiellement la santé humaine par le biais de la chaîne alimentaire (**EFSA, 2022**). En raison de ces préoccupations, le type et la concentration des fongicides autorisés sont limités après la récolte, en raison de leur longue période de dégradation et de leurs effets néfastes sur la santé. Des études récentes ont même conduit à l'annulation de l'homologation de certains fongicides efficaces. Parallèlement, les inquiétudes du public concernant la contamination des aliments par ces résidus de fongicides ont augmenté, ce qui souligne la nécessité urgente de développer de

nouvelles alternatives sûres, biodégradables, efficaces et économiquement viables (*Fogliata et al., 2001 ; Amiri et al., 2008*).

I.6.1. Agents de conservation faible impact

Au fil des années, les préférences des consommateurs ont évolué vers des aliments comportant moins de conservateurs chimiques et affichant des caractéristiques plus naturelles. Les sels d'acides faibles, comme le benzoate de sodium et le sorbate de potassium, sont utilisés pour inhiber la croissance de champignons pathogènes après la récolte, offrant des avantages tels qu'une faible toxicité pour les mammifères, un large spectre d'activité et une facilité d'utilisation, bien que des concentrations élevées soient parfois nécessaires, entraînant des modifications potentielles du goût. L'acide benzoïque, largement utilisé, est appliqué sous forme de benzoates de sodium, et son efficacité inhibitrice est optimale dans un environnement acide, où il peut traverser librement la membrane cellulaire cible. Des composés comme le butylhydroxyanisole (BHA), le propylparaben (PP) et le butylhydroxytoluène (BHT) sont également utilisés pour leur activité fongistatique, étant généralement reconnus comme sûrs par les autorités réglementaires. Certains conservateurs "naturels", tels que la nisine, la monolaurine et la lactopéroxydase, sont disponibles, mais ils présentent des limites telles qu'un spectre d'activité restreint et des coûts d'application élevés. La combinaison de composés antimicrobiens d'origine naturelle avec des traitements chimiques a été étudiée pour assurer la sécurité microbiologique tout en préservant les propriétés sensorielles, nutritionnelles et économiques des aliments. De nouvelles techniques telles que la haute pression et la nanotechnologie, ainsi que de nouveaux ingrédients fonctionnels, contribuent également à l'amélioration des aliments sains (*Droby et al., 2003 ; Shukla et al., 2012*).

I.7. Les huiles essentielles comme antifongiques naturels

Pour atténuer l'utilisation des fongicides synthétiques dans l'agroalimentaire, différentes alternatives sont envisagées, parmi lesquelles les métabolites produits par les plantes se démarquent. Ces substances suscitent un intérêt grandissant en raison de leur statut GRAS (généralement reconnues comme sûres). Les huiles essentielles émergent comme des candidats prometteurs du fait de leur activité antimicrobienne inhérente, influencée par la structure chimique de leurs composants et leurs interactions. Leur capacité bioactive en phase vapeur en fait des fumigants attrayants pour la préservation des produits stockés, tandis que leur gamme de composés antioxydants enrichit leurs propriétés antimicrobiennes. De plus, leur complexité chimique leur permet de cibler divers genres de champignons, limitant ainsi le risque de

développement de la résistance des agents pathogènes. Les recherches ont principalement porté sur les genres *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, et d'autres genres phytopathogènes, avec des résultats prometteurs (**voir Tableau I**).

Les HEs ont été largement étudiées pour leur efficacité dans l'inhibition de la croissance de divers champignons pathogènes. Par exemple, l'huile de *Chenopodium ambrosioides* a démontré une forte inhibition de la croissance de plusieurs souches de champignons, y compris *A. flavus*, *A. fumigatus* et *Botryodiplodia theobromae* (**Kumar et al., 2007**). De même, l'HE de *Peumus boldus* a montré une activité inhibitrice contre *A. niger*, *A. flavus* et *Fusarium* spp (**Souza et al., 2005**). Des extraits aqueux de camomille et de malva ont également présenté des propriétés inhibitrices contre plusieurs moisissures (**Magroet et al., 2006**).

Les HEs d'agrumes, telles que le citron, l'orange, la mandarine et le pamplemousse, ont également été étudiées pour leur capacité à inhiber la croissance de champignons tels que *Penicillium chrysogenum* et *A. flavus* (**Viuda-Martos et al., 2008**). Des HEs dérivées de différentes plantes, dont *Carum carvi*, *Cymbopogon nardus*, *Pelargonium roseum*, *Pimenta dioica* et *Thymus vulgaris*, ont montré une efficacité contre diverses espèces fongiques (**Zabka et al., 2009**).

Des études ont également révélé l'efficacité de l'HE d'*Eucalyptus globulus* contre *A. flavus* et *A. parasiticus* (**Vilela et al., 2009**), ainsi que celle de l'huile volatile de feuille de cannelier contre plusieurs souches de champignons, dont *A. niger*, *A. flavus* et *Penicillium* spp (**Singh et al., 2007**). De plus, l'HE de *Bidens pilosa* a été testée avec succès contre *Fusarium* spp (**Deba et al., 2008**).

Des HEs d'herbes traditionnellement utilisées, comme le cumin et le thym, ont également montré une forte activité antifongique contre différents isolats de *Fusarium* (**Naeini et al., 2010**). D'autres extraits végétaux, tels que ceux de *Zimmu* et d'*Artemisia dubia*, ont également été efficaces contre des champignons pathogènes, offrant ainsi une large gamme de possibilités pour le contrôle des moisissures dans l'agriculture.

Le thymol, eugénol, anéthole, menthol, citral, pinènes, isothiocyanates, cinnamaldhydes, carvacrol, carvone, acides benzoïques, acides phénoliques et flavones sont des substances phytochimiques qui ont fait l'objet d'études approfondies sur leur spectre antimicrobien, pour différentes espèces bactériennes et fongiques, par exemple l'eugénol (C₁₀H₁₂O₂) est un composé phénolique extrait principalement des bourgeons et des feuilles du clou de girofle (*Eugenia caryophyllata* Thumb) et de la cannelle, constituant le composé

phénolique le plus important de l'huile de clou de girofle (85 à 95 %), en plus de l'iso-eugénol et du méthyleugénol, ce composé a été largement étudié pour ses propriétés antimicrobiennes, extraites de divers substrats et testées contre une grande variété de micro-organismes (**Souza et al., 2005**).

L'eugénol, extrait comme composant principal de l'HE de *Piper betle var. magahi*, était plus efficace en tant qu'inhibiteur de la croissance fongique et aflatoxine que l'HE entière. Ils ont suggéré que les autres composants de l'huile agissaient en synergie dans le sens négatif et réduisaient l'activité de l'eugénol (**Prakash et al., 2010**). D'autre part, il a été signalé qu'*A. niger* était la seule souche de moisissure parmi tous les champignons testés à présenter une résistance à l'eugénol à toutes les concentrations (**Souza et al., 2005**).

Dans ce domaine, de nombreuses recherches ont été menées pour tenter d'isoler les composés responsables de l'activité biologique, l'HE d'*Eucalyptus teretecornis* a été soumise à la PTLC pour l'isolement de molécules pures, en utilisant l'analyse GC/MS, ils ont trouvé que les molécules bioactives correspondant à deux fractions étaient les terpénoïdes oxygénés β -fenchol et α -eudesmol, et ont démontré le potentiel antifongique de ces composés de l'HE d'*E. teretecornis* contre *A. alternata* (**Guleria et al., 2012**).

Le capsantal, un mélange naturel de caroténoïdes contenant de la capsanthine et de la capsorubine, a été testé contre des isolats d'*Aspergillus* produisant de l'OTA, Son ajout a entraîné une augmentation des phases de latence à 15 °C pour toutes les souches testées, *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* et *A. tubingensis*, alors que les taux de croissance sont restés relativement constants. Cependant, à 25 °C, l'ajout de capsantal a entraîné une réduction des taux de croissance, avec des phases de latence plutôt constantes (**Santos et al., 2010**).

Il est difficile d'établir une corrélation entre l'activité fongitoxique et un seul composé ou une seule classe de composés, par exemple, ils ont testé l'HE d'*E. globulus* et son composé principal, le 1,8-cinéole, contre *A. flavus* et *A. parasiticus* et ont constaté que l'activité antifongique de la molécule isolée était incomplète et ne montrait des effets qu'à la plus forte concentration testée, ce qui pourrait indiquer que le principal composant de l'huile n'est pas le seul responsable de la limitation de la croissance fongique.

Les HEs sont constitués d'une grande variété de composés chimiques, ce qui rend difficile l'établissement d'une relation entre un composé et une cible unique dans la cellule. Il est prouvé que même des composants mineurs jouent un rôle essentiel dans l'activité antimicrobienne, et il semble que les effets inhibiteurs sont le résultat de leur action synergique.

Ainsi, les risques de développement d'une résistance chez les moisissures après l'application de l'HE seraient réduits, et le spectre des organismes sensibles à son action serait plus large. En outre, les étapes de purification des composés impliqueraient des coûts plus élevés, de sorte que les extraits de plantes entières semblent plus prometteurs en termes d'application commerciale que les composés individuels (Vilela *et al.*, 2009).

Tableau I. Effets antifongiques des HEs.

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

I.7.1. Le mode d'action des huiles essentielles

Le mode d'action des extraits végétaux, bien que pas entièrement compris, repose sur trois aspects principaux selon la majorité des auteurs :

- La présence de groupes OH qui peuvent former des liaisons hydrogène, modifiant ainsi diverses fonctions intracellulaires.
- Leur interaction avec les enzymes membranaires, altérant la morphologie des moisissures et entraînant la perte de rigidité de la membrane plasmique.
- Des modifications dans la perméabilité des membranes cellulaires, la granulation du cytoplasme et la rupture de la membrane cytoplasmique.

Ces aspects sont étroitement liés. La nature hydrophobe de ces composés leur permet de traverser la membrane cellulaire, affectant à la fois la membrane et le cytoplasme ainsi que les enzymes intracellulaires. Certains de ces composés hydrophobes peuvent modifier la perméabilité de la membrane microbienne aux ions, tels que H⁺ et K⁺, impactant le pH cellulaire et la composition chimique des cellules.

Bien que la solubilité des composés dans la membrane cytoplasmique soit cruciale, elle ne garantit pas toujours une action antimicrobienne accrue. La perte de perméabilité de la membrane cytoplasmique est généralement associée à la mort cellulaire, conduisant à un déséquilibre de la pression osmotique, à la rupture des organites intracellulaires, à la fuite du contenu cytoplasmique et finalement à la mort de la cellule.

Ces extraits peuvent également entraîner la fuite de certains composants cellulaires, y compris l'ATP, principal vecteur d'énergie. Les composés phénoliques, présents dans ces extraits, sont connus pour altérer la perméabilité des cellules microbiennes, facilitant la perte de macromolécules intracellulaires et pouvant déformer la structure et la fonction des protéines membranaires.

Divers phénomènes peuvent induire un dysfonctionnement membranaire et perturber le fonctionnement cellulaire. Ces phénomènes comprennent la dissipation des gradients de pH et du potentiel électrique, l'interférence avec la production d'ATP et l'inhibition des enzymes, ainsi que la prévention de l'utilisation des substrats pour la production d'énergie (**Coutinho de Oliveira et al., 2011 ; El-Mogy et Alsanius, 2012**).

Des observations similaires ont été rapportées pour les huiles de *Thymus eriocalyx* et *Thymus x-porlock*, qui ont entraîné des dommages morphologiques dans les hyphes d'*A. niger*,

compromettant la membrane plasmique et perturbant les mitochondries (**Rasooli et al., 2006**). De plus, l'huile d'*Origanum syriacum* var. *bevanii*, entre autres, a induit des changements morphologiques et une coagulation cytoplasmique chez *Phytophthora infestans*, impactant l'intégrité de la paroi cellulaire et la perméabilité de la membrane plasmique (**Soylu et al., 2006**).

L'exposition d'*A. niger* à une concentration de 250 ppm d'huile essentielle de *T. x-porlock* a entraîné plusieurs altérations morphologiques, notamment un pliage des cellules, une perte de cytoplasme et des dommages à la membrane nucléaire, ainsi qu'une perte d'intégrité et de rigidité de la paroi cellulaire. Les chercheurs ont conclu que ces modifications de la structure cellulaire étaient probablement dues à l'interférence de l'HE avec les enzymes responsables de la synthèse de la paroi cellulaire (**Rasooli et al., 2006**).

L'effet des HE obtenues à partir de diverses plantes aromatiques, telles que l'origan, le thym, la lavande, le romarin, le fenouil et le laurier, a été étudié contre *Phytophthora infestans*, l'agent responsable du mildiou de la tomate. Les observations ont révélé une suppression de la croissance fongique et des changements morphologiques significatifs dans les hyphes, y compris la coagulation cytoplasmique, les vacuolisations et le flétrissement, suggérant une altération de l'intégrité de la paroi cellulaire et de la perméabilité de la membrane plasmique (**Soylu et al., 2006**).

Des études sur l'exposition d'*A. flavus* à l'HE de *C. jensenianum* ont montré une rugosité de la membrane plasmique, des repliements dans le cytoplasme et des altérations des mitochondries. L'augmentation de la concentration d'huile a entraîné une vacuolisation massive du cytoplasme et des perturbations graves des organites cellulaires, notamment les mitochondries (**Tian et al., 2012**).

L'exposition à l'HE de *Matricaria chamomilla* L. a également induit des changements morphologiques significatifs chez *A. niger*, affectant la membrane plasmique et les organites membranaires tels que les mitochondries. Ces altérations ont conduit à une autolyse complète et à la mort cellulaire (**Tolouee et al., 2010**).

Les facteurs environnementaux, comme la température, l'activité de l'eau (aw) et le pH, influencent l'efficacité des extraits de plantes contre les champignons. Par exemple, des études ont montré que les extraits de boldo, de thym de montagne et de poleo inhibent la croissance fongique à des niveaux d'aw plus bas, tandis que l'anis et le clou de girofle montrent une activité inhibitrice moins prononcée dans ces conditions (**Bluma et Etcheverry, 2008**). De plus, l'interaction entre les extraits de plantes et l'aw peut influencer leur efficacité antifongique. Par

exemple, une diminution de l'*aw* combinée à des doses sub-inhibitrices d'extraits de plantes peut stimuler la croissance fongique dans certains cas, tandis que dans d'autres cas, une faible *aw* renforce les effets antifongiques des extraits volatils (**Passone *et al.*, 2012**).

Le pH du milieu peut également jouer un rôle dans l'activité des extraits de plantes. Par exemple, l'huile essentielle d'*O. gratissimum* a montré une activité antifongique plus élevée à un pH égal à 9, tandis que son efficacité à un pH de 3 était plus élevée que celle à un pH de 6 (**Nguefack *et al.*, 2009**). Ces variations peuvent être liées à la composition chimique des extraits et à leur capacité à interagir avec les conditions environnementales spécifiques.

I.8. Application des huiles essentielles dans la prévention des aliments de la contamination

Lors de la recherche d'alternatives antifongiques pour une application dans les aliments, il est crucial de considérer leur efficacité *in vivo*. Bien que le dépistage *in vitro* des extraits de plantes soit une première étape importante pour identifier les candidats potentiels, la confirmation de leur activité *in vivo* est indispensable. En effet, les matrices alimentaires peuvent interagir avec les composés bioactifs, réduisant ainsi leur efficacité. Généralement, pour obtenir un effet similaire à celui observé dans les essais *in vitro*, des concentrations plus élevées d'HE sont nécessaires. Cette augmentation peut s'expliquer par le fait que les substances actives, hautement hydrophobes et volatiles, se lient aux composants alimentaires (hydrates de carbone, lipides et protéines) au contact de la surface de l'aliment. Par conséquent, d'autres composants sont dispersés dans le produit en fonction de leur affinité avec l'eau, ce qui peut entraîner des modifications indésirables de la saveur et du goût. Il a été avancé que les lipides présents dans les aliments pourraient former un revêtement autour des micro-organismes, les protégeant ainsi contre les agents antimicrobiens. De plus, la faible teneur en eau des aliments par rapport aux milieux de laboratoire pourrait entraver le transfert des molécules antimicrobiennes vers le site actif dans la cellule microbienne. Les essais *in vivo* récents, répertoriés dans le **tableau II** de la littérature, fournissent des connaissances importantes dans ce domaine.

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

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

Dans une étude *in vivo* sur l'efficacité de l'huile de cassia contre *Botrytis cinerea* sur les fraises, les chercheurs ont observé une inhibition complète de la croissance fongique *in vitro*. Cette huile a montré une activité fongistatique à faible concentration et à exposition prolongée, ainsi que des effets fongicides à des concentrations élevées. L'application de l'huile de cassia a significativement réduit le pourcentage de pourriture des fruits inoculés artificiellement, sans affecter les paramètres de qualité organoleptique ni la perte de poids des fraises (El-Mogy *et Alsanis*, 2012). Des résultats similaires ont été rapportés pour l'huile de cassia contre la pourriture d'*A. alternata* sur les tomates cerise (Feng *et Zheng*, 2007), montrant que les

concentrations efficaces *in vitro* étaient plus élevées que celles *in vivo*. Des essais sur l'huile d'orange et de bergamote ont révélé une inefficacité *in vivo* contre *A. alternata* sur les tomates (Phillips *et al.*, 2012). L'huile d'*Origanum syriacum* a montré une activité curative et protectrice contre *B. cinerea* sur les feuilles de tomate, suggérant un effet précoce sur le développement fongique (Soylu *et al.*, 2010). L'utilisation d'huile d'origan en phase gazeuse a supprimé la viabilité des spores de *Colletotrichum coccodes* dans les fruits de tomate (Tzortzakis, 2010). L'huile de *Chenopodium virosa* a réduit significativement l'infection fongique dans les tomates cerise inoculées artificiellement et non inoculées (Tian *et al.*, 2011). L'HE de thym, de sarriette d'été et de clou de girofle a montré une inhibition du développement d'*A. flavus* dans de la pâte de tomate, bien que des altérations organoleptiques aient été observées à des concentrations élevées (Omidbeygi *et al.*, 2007). Une combinaison de chitosane et d'huile d'*O. vulgare* a montré une activité antifongique sur les raisins, bien que des altérations sensorielles aient été observées pendant le stockage (Dos Santos *et al.*, 2012). Enfin, l'huile de *Chenopodium ambrosioides* s'est avérée efficace pour contrôler la contamination fongique du blé lorsqu'elle était utilisée comme fumigant (Kular *et al.*, 2007).

I.9. Stratégies pour améliorer l'efficacité des composés antifongiques d'origine végétale

Les traitements combinés offrent une stratégie prometteuse pour surmonter les limitations des composés antifongiques d'origine végétale, notamment la forte saveur qu'ils peuvent conférer aux produits alimentaires, limitant ainsi leur applicabilité. Une approche consiste à utiliser l'extrait de plante non seulement comme conservateur, mais aussi comme composant aromatique, ce qui pourrait masquer la saveur des antifongiques naturels dans les produits alimentaires déjà riches en saveur. Une autre possibilité est d'appliquer les composants les plus actifs plutôt que l'extrait entier, bien que l'activité antimicrobienne des HEs soit souvent attribuée à une interaction synergique entre leurs différents composants. Dans une étude, l'huile d'eugénol extraite du clou de girofle, combinée à de la lécithine, a été efficace pour réduire la germination des pathogènes post-récolte de pommes lorsqu'elle était appliquée avec un traitement thermique. Cette combinaison a permis d'éviter les dommages phytotoxiques observés avec l'huile d'eugénol seule et a réduit de manière significative les infections naturelles sur les fruits (Amiri *et al.*, 2008). De même, l'huile de cassia combinée à du KCl ou du NaCl a montré des effets inhibiteurs accrus contre *A. alternata* sur les fruits de tomate, bien que des concentrations élevées de sels puissent altérer la résistance des tomates aux agents pathogènes (Feng et Zheng, 2006). Dans une autre étude, des mélanges d'HEs de cannelle et de clou de girofle ont été testés en atmosphère modifiée pour inhiber la croissance de divers micro-

organismes. Les résultats ont montré une synergie accrue avec de faibles niveaux d'oxygène et des concentrations élevées de CO₂ (Matan *et al.*, 2006). De plus, des mélanges d'extraits de citrates de différentes plantes ont démontré une synergie contre *Penicillium expansum*, suggérant un effet combiné des composants individuels (Nguefack *et al.*, 2012).

L'association de chitosane et d'huile d'*O. vulgare* a également montré une forte activité antifongique contre *Rhizopus stolonifer* et *A. niger* dans les raisins de table, inhibant la germination des spores et réduisant l'infection tout au long du stockage à différentes températures (Dos Santos *et al.*, 2012). Ces études mettent en lumière le potentiel des traitements combinés pour améliorer l'efficacité des composés antifongiques d'origine végétale tout en minimisant les altérations organoleptiques des aliments et en réduisant le risque de résistance fongique.

L'utilisation d'enrobages comestibles constitue une méthode essentielle pour améliorer la durée de conservation des aliments tout en préservant leur qualité. Ces enrobages, souvent fabriqués à partir de protéines ou de polysaccharides, sont respectueux de l'environnement et peuvent également inhiber la croissance microbienne, soit grâce à leur propre activité antimicrobienne, soit en incorporant des composés antimicrobiens. L'incorporation de composés végétaux, tels que des extraits ou des huiles essentielles, dans ces enrobages peut prolonger leur activité antimicrobienne, avec une libération progressive des composants actifs au fil du temps (Avila-Sosa *et al.*, 2012).

Des études ont montré que le type de polymère utilisé pour former le film influence directement son efficacité antimicrobienne. Par exemple, les films de chitosane et d'amidon se sont révélés plus efficaces pour inhiber la croissance de certains micro-organismes par rapport aux films d'amarante. De plus, des films comestibles à base de chitosane modifié incorporant des huiles essentielles ont été efficaces pour prolonger la durée de conservation des fraises en inhibant la croissance de champignons comme *R. stolonifer* et *B. cinerea* (Vu *et al.*, 2011).

Outre les enrobages comestibles, les emballages actifs sont une innovation importante dans le domaine de l'emballage alimentaire. Ces emballages permettent une interaction entre le produit et l'emballage, limitant ainsi la croissance des micro-organismes et réduisant d'autres processus de détérioration de la qualité. Les avantages de cette technologie incluent la libération contrôlée des composés bioactifs dans le produit pendant la durée de stockage, avec un risque moindre de développement de saveurs indésirables. Les films à base de polyoléfine sont

couramment utilisés pour développer ces systèmes d'emballage actifs, offrant à la fois des propriétés mécaniques et une efficacité antimicrobienne ou antioxydante (**Ramos *et al.*, 2012**).

Enfin, des recherches ont montré que l'efficacité des films contenant des HEs, comme la cannelle, contre les champignons dépend moins du substrat du film que de la libération cohérente des composés actifs, suggérant que les substrats plastiques peuvent être aussi efficaces que le papier actif pour inhiber la croissance microbienne (**Manso *et al.*, 2013**).

Matériels et méthodes

La partie expérimentale de ce travail a été réalisée au sein du laboratoire de microbiologie de la faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques de l'Université de Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou et l'ENS de Kouba.

II.1. Appareillage et produits chimiques

Tous les appareils et produits chimiques utilisés dans cette étude sont répertoriés dans l'annexe (I et II), où la composition chimique des milieux est également indiquée.

II.2. Huiles essentielles

Les huiles essentielles de gingembre (*Zingiber officinale*) et de clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) ont été achetées auprès d'une société spécialisée dans la production et la distribution d'huiles essentielles de haute qualité. Ces huiles, extraites des racines séchées de gingembre et de clou de girofle, ont été obtenues par distillation à la vapeur, respectant des normes rigoureuses de qualité et de pureté. Après extraction, les huiles obtenues ont été stockées dans des flacons en verre scellés à température ambiante jusqu'à son utilisation ultérieure.

II.3. Analyse mycologique

L'isolement de l'*Aspergillus flavus* dans le pain a été réalisé par la technique de suspension-dilution et l'inoculation sur milieu gélosé. Dix (10) grammes de chaque échantillon de couscous ont été ajoutés à 90 ml d'eau distillée additionnée de tween 80 et homogénéisés en remuant pendant 15 minutes. Des dilutions sérielles (10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4}) ont été réalisées à partir de la solution mère. Cent (100) microlitres de chaque dilution ont étéensemencés en surface des boîtes de Petri contenant le milieu DRBC et incubés à 28 °C pendant 5 à 7 jours dans l'obscurité. Des isolats représentatifs de chaque échantillon ont été purifiés, puis sous-cultivés dans des tubes à essai contenant du PDA. Après incubation pendant 7 jours à 28 °C, les isolats ont été stockés à 4 °C pour des analyses ultérieures.

II.3.1. Identification de l'espèce d'*A. flavus*

Pour identifier l'espèce d'*A. flavus*, plusieurs étapes ont été suivies. Tout d'abord, l'identification du genre a été réalisée. Cette étape a impliqué une observation macroscopique des colonies développées de la souche pour déterminer si elles correspondent à celles

d'*Aspergillus*, en se basant sur les caractères morphologiques du mycélium. Ensuite, une observation microscopique a été effectuée, en examinant le mode de groupement des conidies, le mode de conidiophore et l'agencement des cellules conidiogènes. Cette observation microscopique a été facilitée par la préparation d'échantillons microscopiques à l'aide d'un ruban adhésif transparent, permettant de coller légèrement à la surface de la culture puis d'observer au microscope avec des grossissements de 10 et 40.

Une fois le genre identifié, l'espèce a été déterminée en utilisant la méthode de single spore sur trois milieux de culture différents : MEA à 25 °C, G25N à 25 °C et CYA à 37 °C. La couleur des colonies a été observée après une et deux semaines de croissance. L'identification spécifique de l'espèce a été réalisée conformément au guide de **Pitt et Hocking (2009)**. Enfin, la confirmation de l'espèce a été obtenue en utilisant le milieu AFPA, où la couleur du revers de la colonie a été observée après une incubation de 5 à 7 jours à 28 ± 2 °C, confirmant ainsi l'appartenance au groupe *A. flavus* et *A. parasiticus*.

II.3.2. Test de confirmation du pouvoir aflatoxinogène de la souche

L'étude du pouvoir aflatoxinogène sur milieu de culture solide a débuté par l'ensemencement de la souche fongique sur un milieu gélosé à base d'extrait de noix de coco déchiqueté (CAM), connu pour favoriser la production d'aflatoxines (**Fente et al., 2001**). Après une incubation de 48 à 72 heures à 28 °C, la souche productrice d'AFB1 a présenté une fluorescence bleue visible sous UV (365 nm) et un revers de la colonie jaune orangé observable à la lumière du jour. Pour confirmer la production d'AFB1, la culture a été soumise à une extraction au méthanol. Trois rondelles de 6 mm de diamètre de milieu colonisé par le mycélium ont été découpées et placées dans un tube Eppendorf de 2 ml, où l'extraction de l'aflatoxine a été réalisée en ajoutant 1 ml de méthanol. Après une incubation d'une heure à température ambiante et à l'abri de la lumière, le mélange a été centrifugé pendant 10 minutes à 12000 tours/min, et le surnageant a été aspiré à l'aide d'une micropipette puis transféré dans un autre tube Eppendorf. Ensuite, la production d'aflatoxine a été confirmée par chromatographie sur couche mince (CCM) selon **Calvo et al. (2004)**. Un volume de 50 µl d'échantillon a été déposé sur une plaque CCM espacée de 2 cm et développée dans une cuve standard saturée avec le système de solvant de développement Toluène/Alcool iso-amylque/Méthanol (90:32:2; v/v/v). Après migration, les plaques ont été retirées, séchées, et les aflatoxines ont été détectées sous lumière UV (365 nm). L'AFB1 est apparue sous forme de tache bleue, confirmant ainsi la présence d'aflatoxine grâce à l'intensité de la fluorescence des taches.

II.4. Préparation de l'inoculum

Les spores issues de cultures jeunes (âgées de 7 jours) de chaque souche ont été collectées en rinçant les boîtes de Pétri avec 10 ml d'une solution stérile de Tween-80 à 0,1% (v/v). Ensuite, la suspension a été filtrée à travers un tissu de mousseline stérile placé sur un entonnoir stérile, récupérant ainsi le filtrat qui constitue l'inoculum. Pour préparer la gamme étalon, 1 ml de la suspension de spores, préalablement agitée, a été mélangé avec 9 ml d'eau contenant du Tween. Le nombre de spores dans chaque dilution a été déterminé en effectuant un comptage à l'aide de la cellule de Mallassez. La courbe d'étalonnage a été établie en mesurant la densité optique (DO) de chaque dilution à une longueur d'onde de 625 nm, en fonction du nombre de spores comptées sur la cellule. Avant chaque inoculation, le nombre de spores a été estimé en se référant à la courbe d'étalonnage, et la suspension a été diluée pour obtenir un nombre de spores de 1×10^6 /ml (**Annexe III**).

II.5. Évaluation de l'activité antifongique *in vitro* des huiles essentielles

L'évaluation de l'activité des huiles essentielles (HEs) sur la croissance mycélienne de la souche test a été réalisée par la technique de contact direct, selon la méthode décrite par **Ben Miri et al. (2023)**.

Les HEs sélectionnées ont été incorporées dans le milieu gélosé pour obtenir les concentrations suivantes : 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00 % (v/v) de milieu PDA. Ce milieu a été versé dans des boîtes de Pétri à raison de 10 ml par boîte. Après solidification, 10 µl de la suspension fongique (1×10^6 spores/ml) ont été déposés au centre de chaque boîte de culture. Un témoin sans HE a également été préparé. L'ensemble des boîtes a été incubé dans une étuve à une température de 28 ± 2 °C.

La croissance mycélienne est suivie en mesurant le diamètre suivant deux droites perpendiculaires au centre. Les mesures ont été faites quotidiennement pendant 7 jours. La comparaison des dimensions obtenues avec celles des témoins a permis de calculer le pourcentage d'inhibition (I%) selon la formule suivante (**Albuquerque et al., 2006**):

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

Dont:

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

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

II.5.1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et fongicides (CMF)

La CMI et la CMF de chaque huile essentielle (HE) ont été déterminées selon la méthode de dilution en milieu liquide décrite par **Ben Miri *et al.* (2022)**. Pour cela, 10 µl de la suspension fongique (1×10^6 spores/ml) à tester ont été inoculés dans des tubes à essai contenant 10 ml du milieu liquide PDB à différentes concentrations d'HE (1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00 % (v/v) de). Des tubes témoins contenant uniquement le milieu PDB ont également été inoculés avec la suspension fongique. Après homogénéisation, l'ensemble a été incubé à 28 ± 2 °C pendant 7 jours. À la fin de l'incubation, l'observation visuelle de la gamme a permis de déterminer la CMI, correspondant à la plus faible concentration d'HE capable d'inhiber la croissance du microorganisme (**Tatsadjieu *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2011**).

Les tubes présentant une inhibition totale ont été réensemencés dans des boîtes contenant 10 ml du milieu de culture PDA. Si une reprise de la croissance mycélienne était observée, la concentration était qualifiée de fongistatique (CMFs) (**Bajpai *et al.*, 2010**). En revanche, si aucune reprise de croissance n'était observée, elle était considérée comme fongicide (CMFc) (**Shukla *et al.*, 2012**).

Résultats et discussions

III.1. Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles utilisées dans cette étude présentent diverses caractéristiques organoleptiques. L'huile essentielle de gingembre (*Zingiber officinale*) est liquide, limpide, avec une couleur jaune pâle et une odeur fraîche. En revanche, l'huile essentielle de girofle (*Syzygium aromaticum*) est également liquide, mais avec une consistance fluide à légèrement visqueuse, une couleur variant du jaune clair au jaune-brun, et une odeur épicée caractéristique de l'eugénol.

Les paramètres organoleptiques de ces huiles essentielles sont conformes aux normes établies par l'AFNOR (1999). Les résultats obtenus et leur conformité avec les normes AFNOR sont représentés dans un **tableau III**.

Les caractéristiques organoleptiques désignent les propriétés perceptibles par les sens, telles que l'odeur, la couleur et la texture d'une huile essentielle. En revanche, les caractéristiques physico-chimiques englobent des propriétés mesurables et quantifiables, comme la densité, l'indice de réfraction et la composition chimique. Ces deux types de caractéristiques sont essentiels pour évaluer la qualité et la valeur commerciale des huiles essentielles. Les méthodes standardisées par des organismes comme l'AFNOR garantissent que les huiles essentielles répondent à des critères de qualité uniformes, facilitant ainsi leur évaluation, leur comparaison et leur utilisation.

Tableau III. Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle étudiées.

Nom de la plante	Aspect	Couleur	Odeur
<i>Zingiber officinale</i>	Liquide Limpide	Jaune pâle	Fraîche
<i>Syzygium aromaticum</i>	Liquide Limpide	Jaune clair au jaune-brun	Epicée, chaude, caractéristique

III.2. Analyse mycologique

L'étude mycologique a permis d'isoler les espèces *Aspergillus flavus* dans l'échantillon de pain, en suivant une méthodologie rigoureuse. Les résultats ont été obtenus par la technique de suspension-dilution et l'inoculation sur milieu gélosé, avec des procédures de culture et d'identification spécifiques.

Les résultats de cette analyse démontrent la présence d'*Aspergillus flavus* dans l'échantillon de pain. Ces espèces sont souvent associées à des contaminations fongiques dans les produits alimentaires et peuvent présenter des risques pour la santé publique. La méthodologie utilisée, combinant des techniques de culture et d'identification, a permis une caractérisation précise des souches isolées, fournissant ainsi des informations essentielles pour évaluer la qualité et la sécurité du produit alimentaire. Les résultats mettent en évidence l'importance de la surveillance et du contrôle de la qualité microbiologique des aliments pour prévenir les risques sanitaires liés à la présence de contaminants fongiques.

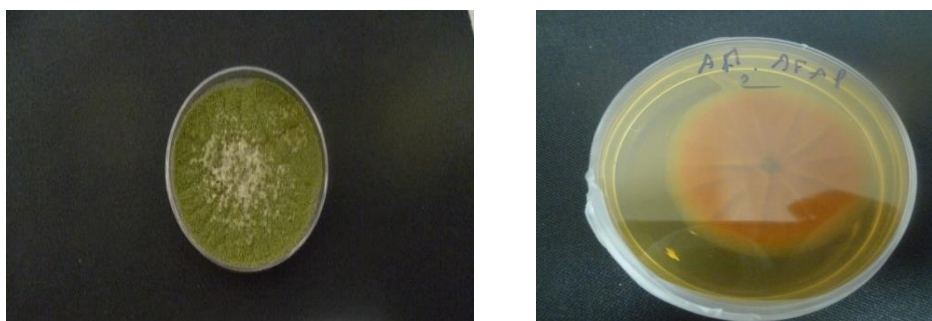
III.2.1. Identification de l'espèce

Le tableau IV et la figure 6 montrent les caractéristiques culturelles observées dans quatre milieux de culture (MEA, G25N, CYA) selon la méthode de **Pitt et Hocking (2009)**. *Aspergillus flavus* a été identifié dans le milieu *Aspergillus flavus* et *parasiticus* agar (AFPA), où il produit une coloration jaune-orangé à orange. Cette coloration résulte de la production d'acide aspergillique, qui réagit avec le citrate d'ammonium ferreux pour former un complexe coloré après une incubation à 28 °C pendant 7 jours.

Le milieu AFPA contient du dichloran et du chloramphénicol pour inhiber la croissance des autres moisissures et des bactéries. Il est recommandé pour détecter et dénombrer les moisissures productrices d'aflatoxines dans les noix, le maïs, les épices et d'autres produits. Ses avantages incluent une incubation rapide (généralement 48 heures), une grande spécificité et une simplicité d'utilisation, ce qui en fait un outil efficace pour dépister la contamination par les aflatoxines.

Tableau IV. Identification d'*A. flavus* BTK4.

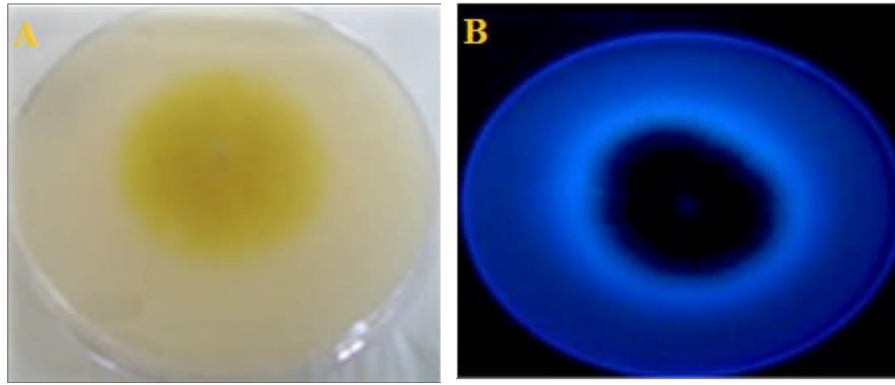
	Milieu	Température d'incubation	Couleur
<i>A. flavus</i> BTK4	MEA	25 °C	Vert pistachio
	G 25N	25 °C	Vert d'olive
	CYA	37°C	Vert foncé
	AFAP	28 °C	Revers orange



Figures 6. Aspect macroscopique d'*A. flavus*.

III.3. Test de confirmation du pouvoir aflatoxinogène de la souche

L'étude a débuté par l'ensemencement d'une souche fongique sur un milieu CAM, conçu pour favoriser la production d'aflatoxines, conformément aux protocoles établis par **Fente *et al.* (2001)**. Après une période d'incubation de 48 à 72 heures à une température constante de 28 °C, la souche fongique a été observée sous une lampe UV à 365 nm, révélant une fluorescence bleue caractéristique. De plus, les colonies présentaient un revers de couleur jaune orangé visible à la lumière du jour, suggérant la présence d'AFB1, une aflatoxine bien connue. Pour confirmer cette production, une extraction au méthanol a été réalisée sur des rondelles de milieu colonisé par le mycélium. Ce mélange méthanolique a ensuite été centrifugé, permettant de récupérer le surnageant pour des analyses plus approfondies. La présence d'aflatoxine a été définitivement confirmée par chromatographie sur couche mince (CCM). Lors de cette analyse, l'AFB1 est apparue sous forme d'une tache bleue distincte sous éclairage UV, corroborant la présence de l'aflatoxine, comme illustré dans la figure de l'étude (**Figure 7 et 8**).



(A) : revers jaune orangé

(B) : fluorescence bleue

Figure 7. Mise en évidence par fluorescence sous lumière U.V. (365 nm) de la production d'AFB1 par d'*A. flavus* BTK4 sur milieu CAM.

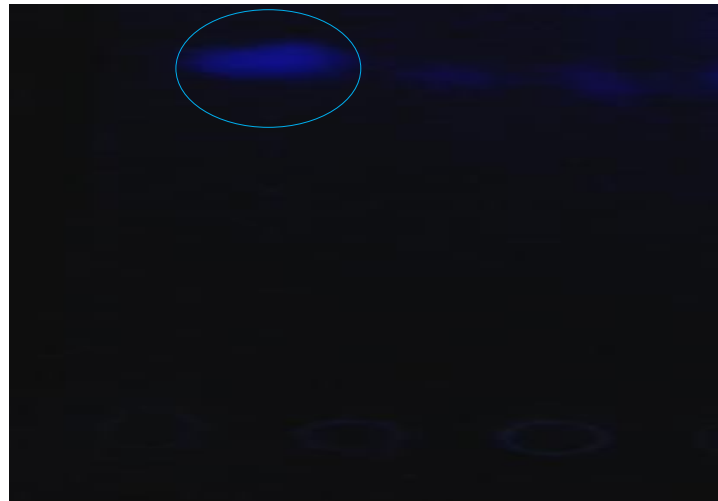


Figure 8. CCM sous UV 365 nm montrant les taches bleues d'AFB1 produite par *A. flavus* BTK4 sur milieu CAM.

III.4. Activité antifongique des huiles essentielles

Les résultats de cette étude mettent en évidence des différences d'efficacité entre différentes huiles essentielles sur la croissance d'*A. flavus*, qui est potentiellement toxigènes. Une sensibilité significative ($p < 0,05$) à toutes les huiles essentielles par rapport au témoin a été observé.

L'expérimentation avec l'huile essentielle de gingembre a révélé une inhibition progressive et significative de la croissance du mycélium d'*A. flavus* ($p < 0,05$) (**Figure 9 et**

10). Dès le premier jour, les effets inhibiteurs ont commencé à se manifester, mais c'est à partir du troisième jour que les différences sont devenues statistiquement significatives par rapport au témoin. À une concentration de 1%, la croissance du mycélium a été retardée de trois jours par rapport au témoin. Ce retard s'est intensifié avec l'augmentation de la concentration, atteignant une inhibition complète à partir de 5%. À cette concentration maximale, l'huile essentielle de gingembre a affiché un impressionnant pourcentage d'inhibition de 74,75% au septième jour, comparé au témoin (Figure 13).

Ces résultats mettent en évidence une réponse dose-dépendante claire, où des concentrations plus élevées d'huile essentielle de gingembre ont conduit à une inhibition plus forte de la croissance de *A. flavus*. Ce phénomène suggère que l'huile essentielle de gingembre pourrait être une option efficace dans le contrôle de la croissance fongique, en particulier dans des conditions où une inhibition rapide et complète est nécessaire.

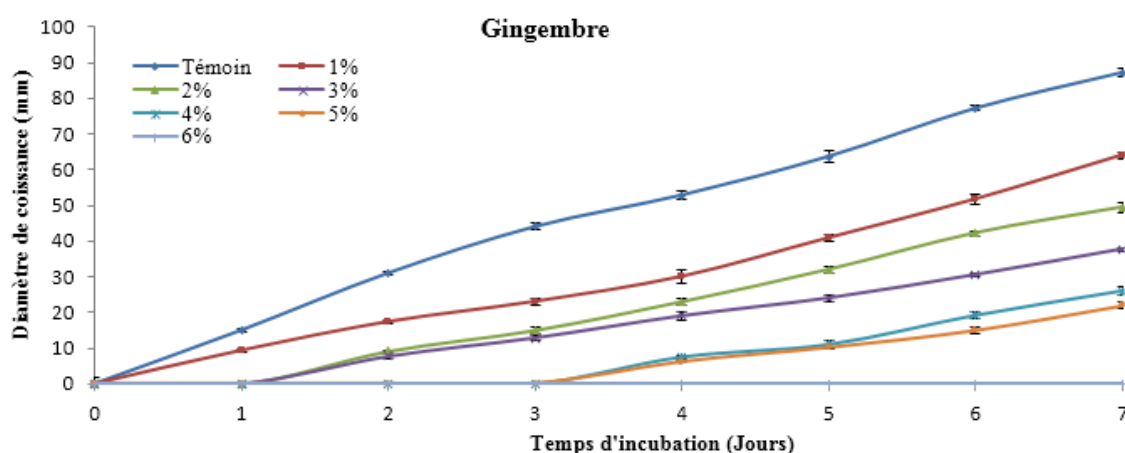


Figure 9. Effet de l'huile essentielle de gingembre aux différentes concentrations sur la croissance de l'*A. flavus* pendant 7 jours d'incubation.

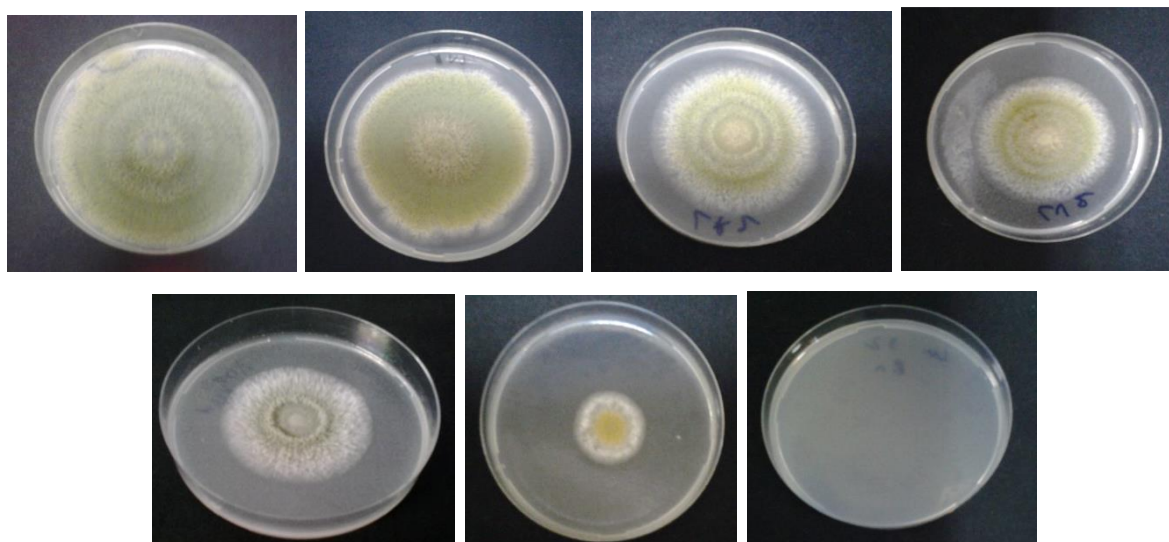


Figure 10. Effet des différentes concentrations (0 à 6%, respectivement) de l'huile essentielle de gingembre sur la croissance de l'*A. flavus* durant 7 jours d'incubation.

De manière similaire à l'huile essentielle de gingembre, l'huile essentielle de clou de girofle a également démontré des propriétés inhibitrices significatives contre *A. flavus* ($p < 0,05$) (**Figure 10 et 11**). Dès les premiers jours, une réduction notable de la croissance du mycélium a été observée, avec une intensification de l'effet au fil du temps et en fonction de la concentration.

À 1%, l'huile essentielle de clou de girofle a retardé la croissance du mycélium de deux jours par rapport au témoin. Cette inhibition a progressivement augmenté avec l'augmentation de la concentration, atteignant une inhibition complète à partir de 4%. Notamment, à la concentration de 4%, l'huile essentielle de clou de girofle a affiché un pourcentage d'inhibition impressionnant de 87,95% au septième jour (**Figure 13**).

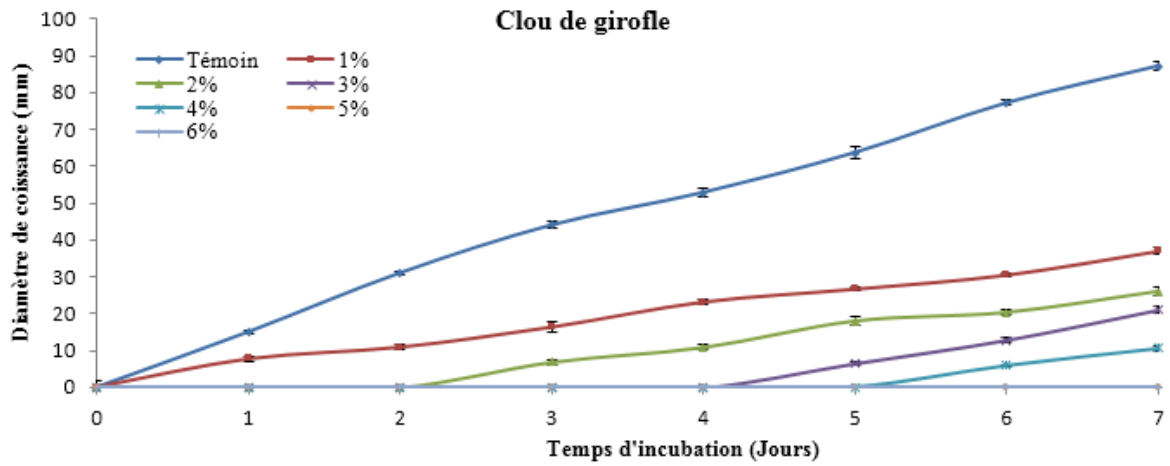


Figure 11. Effet de l'HE de clou de girofle aux différentes concentrations sur la croissance de l'*A. flavus* pendant 7 jours d'incubation.

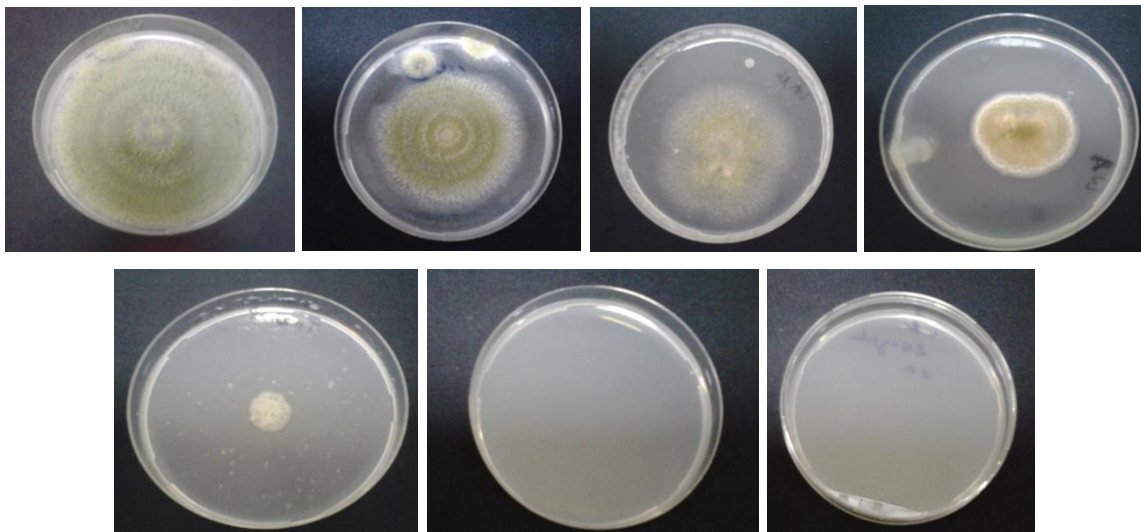


Figure 12. Effet des différentes concentrations (0 à 6%, respectivement) de l'huile essentielle de clou de girofle sur la croissance de l'*A. flavus* durant 7 jours d'incubation.

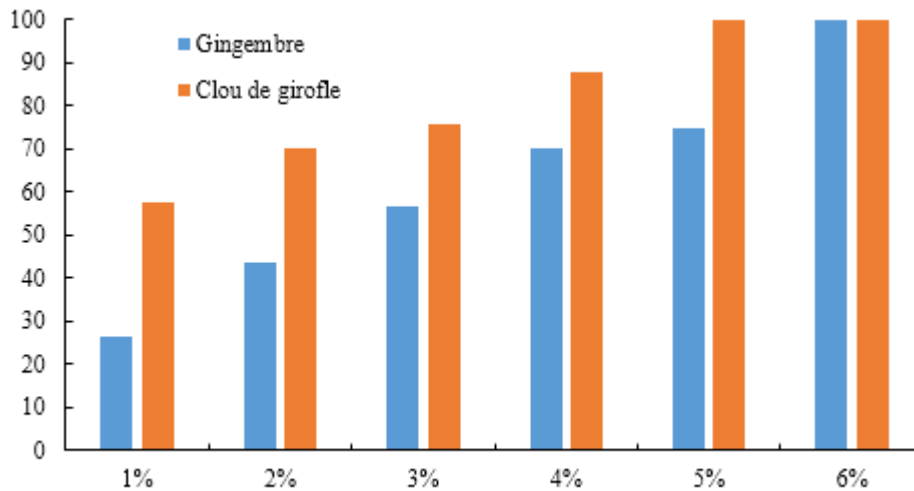


Figure 13. Les pourcentages d’inhibition de la croissance du mycélium de l’*A. flavus* après 7 jours d’incubation.

La sensibilité à ces huiles essentielles semble dépendre de la composition chimique ainsi que de la fonction des composés majoritaires ayant des propriétés antimicrobiennes.

L’huile de gingembre est riche en composés phénoliques tels que le gingerol, shogaol et zingibérène, qui ont démontré des effets antifongiques contre diverses souches de moisissures pathogènes et plusieurs souches de *Candida* (Joung *et al.*, 2018). Dans leur étude, Nerilo *et al.* (2020) ont exploré le potentiel de l’huile essentielle de gingembre en tant que fumigant pour atténuer la contamination fongique, en se concentrant particulièrement sur son efficacité contre *Aspergillus flavus* dans les grains de maïs stockés. Leur recherche met en lumière les propriétés antifongiques significatives de cette huile essentielle, attribuant son efficacité à des composés clés tels que l’ α -zingibérène et le gèranial, identifiés à l’aide de techniques analytiques avancées. Les résultats ont souligné la capacité de l’huile essentielle à inhiber la production d’aflatoxines et à supprimer la croissance fongique dans les grains de maïs de manière dose-dépendante.

En revanche, l’huile essentielle clou de girofle est connue pour sa teneur élevée en eugénol, un composé ayant des propriétés antifongiques bien établies. Des recherches telles que celles menées par Khan *et al.* (2015) ont mis en évidence l’effet inhibiteur de l’eugénol sur les souches de *Candida*, mettant en lumière son rôle dans la perturbation de la membrane cellulaire des moisissures et dans l’inhibition de leur croissance. L’eugénol a été largement étudié pour ses propriétés antimicrobiennes, extrait de divers substrats et testé contre une grande variété de micro-organismes. Prakash *et al.* (2010) ont observé que l’eugénol, extrait en tant que

composant majeur de l'huile essentielle de *Piper betle* var. *magahi*, était plus efficace comme inhibiteur de la croissance fongique et suppresseur d'aflatoxine que l'ensemble de l'huile essentielle. Ils ont suggéré que les composants restants de l'huile agissaient de manière synergique dans une direction négative et réduisaient l'activité de l'eugénol. **Souza et al. (2005)** ont rapporté que *A. niger* était la seule souche de moisissure parmi toutes celles testées qui présentait une résistance à l'eugénol à toutes les concentrations testées.

Le mécanisme d'action des huiles essentielles au niveau cellulaire n'est pas encore entièrement élucidé. Cependant, plusieurs cibles cellulaires potentielles ont été identifiées. Composées de plusieurs types de molécules bioactives, les huiles essentielles peuvent agir simultanément sur plusieurs cibles cellulaires (**Kim et al., 2006 ; Kedia et al., 2014 ; Kedia et Dubey, 2015**). La nature hydrophobe des constituants des huiles essentielles facilite leur incorporation dans les membranes plasmiques et celles des organites intracellulaires (notamment les mitochondries). Ces composés peuvent alors agir en altérant la composition lipidique de la membrane. Ils sont souvent associés à une diminution des niveaux d'ergostérol (**Kedia et al., 2014 ; Prakash et al., 2015**). Ce dernier est un lipide membranaire et un constituant majeur de la membrane cellulaire fongique, essentiel à son intégrité et au développement fongique. La déstructuration de la paroi cellulaire peut également se produire en agissant sur les membranes polysaccharidiques (galactose et galactosamine) (**Tatsadjieu et al., 2010**). Ces déséquilibres membranaires conduisent à une fuite d'organites et d'ions nécessaires à la survie des cellules fongiques. L'étude de **Tatsadjieu et al. (2010)** a ainsi démontré l'inhibition dose-dépendante de l'acidification du milieu extracellulaire par l'huile essentielle de verveine en relation avec la modulation de la croissance d'*A. flavus*.

La complexité des huiles essentielles rend difficile la corrélation entre leur activité antifongique et des composés spécifiques. Même les composants mineurs peuvent jouer un rôle critique dans leur efficacité, et les effets inhibiteurs semblent résulter de leur action synergique. Cela suggère que l'utilisation des huiles essentielles entières peut réduire le développement de la résistance fongique et élargir le spectre des organismes sensibles à leur action, ce qui les rend potentiellement plus prometteuses dans les applications commerciales par rapport aux composés isolés (**da Cruz Cabral et al., 2013**).

L'étude évalue les effets des huiles essentielles de gingembre et de girofle sur la croissance d'*A. flavus*, en se focalisant particulièrement sur leurs concentrations minimales inhibitrices (CMI) et fongicides minimales (CMF). Pour l'huile essentielle de gingembre, les

valeurs mesurées sont de 6% pour la CMI et la CMF, tandis que pour l'huile essentielle de clou de girofle, la CMI est de 5% avec une CMF correspondante identique. Ces paramètres déterminent les concentrations minimales nécessaires pour inhiber visiblement la croissance fongique et pour induire la mort cellulaire fongique, essentielles pour évaluer l'efficacité des huiles essentielles comme agents antifongiques.

La méthode utilisée pour évaluer les CMI et CMF était la dilution en milieu liquide PDB, sélectionnée pour garantir un contact optimal entre les huiles essentielles et les spores fongiques, comme démontré par plusieurs études précédentes (**Kalemba et Kunicka, 2003 ; Sharma et Tripathi, 2008**). Cette approche a confirmé l'efficacité des huiles essentielles dans des conditions contrôlées de laboratoire.

Les différences observées entre l'huile essentielle de gingembre et celle de clou de girofle peuvent être attribuées à leur composition chimique distincte, ainsi qu'à la spécificité de l'*A. flavus* étudié. Ces facteurs influencent significativement l'activité antifongique des huiles essentielles et nécessitent une considération minutieuse lors de l'interprétation des résultats. Cependant, la comparaison directe des résultats entre différentes études est souvent complexe en raison de la diversité des méthodes expérimentales et des unités de mesure utilisées pour rapporter les CMI et CMF. Cette variabilité souligne l'importance de standardiser les protocoles d'essai afin de faciliter une évaluation précise et comparable de l'activité des huiles essentielles sur une gamme étendue de microorganismes.

Cette étude met en lumière le potentiel des huiles essentielles de gingembre et de clou de girofle comme agents antifongiques efficaces contre *A. flavus*. Elle souligne également la nécessité de poursuivre les recherches pour affiner les méthodes d'évaluation et comprendre pleinement les mécanismes sous-jacents à leur activité antifongique, afin de les utiliser de manière optimale dans divers contextes de traitement antifongique.

Conclusion et Perspectives

Cette étude approfondit notre compréhension de l'activité antifongique des huiles essentielles de gingembre et de girofle contre *A. flavus*. Les résultats indiquent clairement que ces huiles essentielles sont capables d'inhiber de manière significative la croissance de ce champignon, avec des profils d'inhibition qui varient selon la concentration utilisée. L'huile essentielle de gingembre présente une CMI et une CMF de 6%, tandis que pour l'huile essentielle de clou de girofle, la CMI est de 5% avec une CMF correspondante. Ces données fournissent une base solide pour leur utilisation potentielle comme agents antifongiques efficaces.

Ces résultats ouvrent la voie à plusieurs perspectives de recherche et d'application :

- Il est essentiel de comprendre en détail comment les composés actifs présents dans ces huiles essentielles perturbent les processus cellulaires d'*A. flavus*. Des études approfondies sont nécessaires pour identifier les cibles moléculaires spécifiques et les interactions biochimiques qui sous-tendent leur activité antifongique.
- La recherche devrait se concentrer sur le développement de formulations améliorées, potentiellement synergiques avec d'autres agents antifongiques ou adjuvants. Cela pourrait non seulement renforcer leur efficacité, mais aussi résoudre les défis de solubilité et de stabilité rencontrés dans différents environnements.
- Tester l'efficacité des huiles essentielles de gingembre et de girofle dans la protection des cultures contre *A. flavus* dans des conditions réelles est crucial. Cela pourrait offrir des solutions alternatives et durables pour la gestion des maladies fongiques en agriculture.
- Bien que les huiles essentielles soient d'origine naturelle, leur sécurité d'utilisation doit être rigoureusement évaluée, y compris leur impact sur la santé humaine et l'environnement. Des études approfondies sur leur toxicité potentielle pour les organismes non ciblés sont nécessaires.
- Explorer la faisabilité d'intégrer ces huiles essentielles dans des produits alimentaires, des produits cosmétiques ou des formulations pharmaceutiques pourrait ouvrir de nouvelles perspectives commerciales et thérapeutiques.

Références bibliographiques

- Albuquerque, C.C., Camara, T.R., Marian, R.D.R., Willadino, L., Marcelino, C. & Ulisses C. (2006). Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 49, 527-535.
- Amiri, A., Dugas, R., Pichot, A.L. & Bompeix G. (2008). In vitro and in vitro activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. *International Journal of Food Microbiology*. 126, 13-19.
- Bajpai, V.K. & Kang, S.C. (2010). Antifungal activity of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 87, 327-336.
- Benabdelkader, T. (2012). Biodiversité, Bioactivité et Biosynthèse des Composés Terpéniques Volatils des Lavandes Aillées, *Lavandula stoechas* Sensu Lato, un complexe d'espèces méditerranéennes d'intérêt pharmacologique. Université Jean monnet, Saint-Etienne. Thèse de Doctorat, pp.23. France.
- Bicchi, C. & Pisciotta, A. (1990). Use of two-dimensional gas chromatography in the direct enantiomer separation of chiral essential oil components. *Journal of Chromatography A*. 508, 341-348.
- Bluma, R., Amaiden, M.R., Daghero, J. & Etcheverry, M. (2008). Control of *Aspergillus* section *Flavi* growth and aflatoxin accumulation by plant essential oils. *Journal of Applied Microbiology*. 105, 203-14.
- Boiron, P. 1996. Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris. P : 13-19-69-79.
- Calvo, A.M., Bok, j., Brooks, W. & Keller, N.P. (2004). VeA is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 70, 4733-4739.
- Casabianca, H. & Graff, J.B. (1994). Separation of linalyl acetate enantiomers: Application to the authentication of bergamot food products. *Journal of High Resolution Chromatography*. 17, 184-186
- Chemat, F., Abert-Vian, M. & Fernandez, X. (2013). Microwave-assisted extraction of essential oils and aromas. In: Chemat, F. *Microwave-assisted extraction for bioactive compound: Theory and practice*. Springer, New York, USA, pp. 5366.
- Chirife, J., and Buera, M. D. P. (1994). Water activity, glass transition and microbial stability in concentrated/semimoist food systems. *Journal of Food Science* 59, 921-927.
- Coutinho, de Oliveira, T.L., de Araújo Soares, R., Mendes Ramos, E., das Graças Cardoso, M., Alves, E. & Piccoli, R.H. (2011). Antimicrobial activity of *Satureja montana* L. essential

- oil against *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. *International Journal of Food Microbiology*. 144, 546-555.
- Deba, F., Xuan, T., Yasuda, M. & Tawata, S. (2008). Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*. *Food Control*. 19, 346-352.
- Degryse, A.C., Ianis, D. & Voinier, M.A. (2008). Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. *Atelier santé et environnement-IGS-EHESP*, pp. 2-3.
- Dos Santos Oliveira, M. & Badiale Furlong, E. (2008). Screening of antifungal and antimycotoxigenic activity of plant phenolic extracts. *World Mycotoxin Journal*. 1,139-146.
- Droby, S., Wisniewski, M., El Ghaouth, A., Wilson, C., 2003. Influence of food additives on the control of postharvest rots of apple and peach and efficacy of the yeast-based biocontrol product *aspire*. *Postharvest Biology and Technology* 27, 127–135.
- EFSA, 2022. Rapport annuel sur les résidus de pesticides dans les denrées alimentaires (European Food Safety Authority).
- El-Mogy, M.M., Alsanius, B.W., 2012. Cassia oil for controlling plant and human pathogens on fresh strawberries. *Food Control* 28, 157–162.
- El Khoury, R. (2016). Maitrise du risque aflatoxique : utilisation d'extraits naturels et mise en évidence de leurs mécanismes d'action. Institut National Polytechnique de Toulouse. Thèse de doctorat, pp.9. France.
- Feng, W. & Zheng, X. (2007). Essential oils to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo. *Food Control*. 18, 1126-1130.
- Fente, C.A., Ordaz, J.J., Vazquez, B.I., Franco, C.M. & Cepeda, A. (2001). New additive for culture media for rapid identification of aflatoxin-producing *Aspergillus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(48), 58-62.
- Fernandez, X., Chemat, F. & Do, T.K.T. (2013). *Essential oils: Virtues and applications*. Vuibert, Paris.
- Fogliata, G.M., Torres, L.G.J., Ploper, L.D., 2001. Detection of imazalil-resistant strains of *Penicillium digitatum* Sacc. in citrus packing houses of Tucumán Province (Argentina) and their behaviour against current employed and alternative fungicides. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán* 77, 71–75.

- Formáček, V. & Kubeczka, K.H. (1982). Essential oil analysis by capillary gas chromatography and carbon-13 NMR spectroscopy, John Wiley and Sons, Chichester, USA, pp.480.
- Frisvad, J.C. & Samson, R.A. (2004). *Emericella venezuelensis*, a new species with stellate ascospores producing stérigmatocystine and aflatoxin B1, System. Applied Microbiology. 27, 672-680
- Garcia, D., Ramos, A. J., Sanchis, V., and Marín, S. (2011). Modelling the effect of temperature and water activity in the growth boundaries of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus*. Food Microbiology 28, 406-417.
- Gauthier, A. (2016). Les mycotoxines dans l'alimentation et leur incidence sur la santé. Sciences pharmaceutiques. P : 132.
- Guide des aliments. Les moisissures et les levures (Mycètes). <https://www.guide-des-aliments.com/dietetique/Information/Micro-organismes/AD-Moisissures-et-levures.html>
- Guleria, S., Tiku, A.K., Gupta, S., Singh, G., Koul, A., Razdan, V.K., 2012. Chemical composition, antioxidant activity and inhibitory effects of essential oil of *Eucalyptus teretecornis* grown in north-western Himalaya against *Alternaria alternata*. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 21, 44–50.
- Hedayati, M. T., Pasqualotto, A. C., Warn, P. A., Bowyer, P., and Denning, D. W. (2007). *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. Microbiology. 153[Pt 6], 1677-1692.
- Hedges, L.M. & Wilkins, C.L. (1991). Component analysis of Eucalyptus oil by gas chromatography-fourier transform-infrared spectrometry-mass spectrometry. Journal of Chromatography Science. 29, 345-350.
- Heritage, J., Evans, E.G.V. & Killington, R.A. (1996). Introductory microbiology. Edition : Cambridge University Press, pp. 234.
- Horn, B.W. & Dorner, J.W. (1998). Soil populations of *Aspergillus* species from section Flavi along a transect through peanutgrowing regions of the United States. Mycologia. 90, 767-776.
- Jay JM, Loessner MJ, Golden DA (2005) Modern food microbiology, 7th edn. Spring Science, New York.
- Kedia, A., J.H.A, D.K. & Dubey, N.K. (2015). Plant essential oils as natural fungicides against stored product fungi. In The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science,

- Technological Advances and Educational Programs (Méndez-Vilas A., Ed.).© FORMATEX, pp. 214.
- Klich, M. A. (2009). Health effects of *Aspergillus* in food and air. *Toxicology and Industrial Health*. 25, 657-667.
- Klich, M.A. (2007). *Aspergillus flavus* : the major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology*, 8, 713-22.
- Kumar, R., Mishra, A.K., Dubey, N.K. & Tripathi, Y.B. (2007). Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity. *International Journal of Food Microbiology*. 115, 159-164.
- Lee, S. H., Chang, K. S., Su, M. S., Huang, Y. S. & Jang, H. D. (2007). Effects of some Chinese medicinal plant extracts on five different fungi. *Food Control*. 18, 1547-1554.
- Leveau, J.Y. & Bouix, M. (1993). *Microbiologie industrielle : les micro-organismes d'intérêt industriel*. Édition : Tec et Doc, Lavoisier et APRIA, France, pp. 612.
- Leyral, G. & Vierling, E. (2001). *Microbiologie et toxicologie des aliments : Hygiène et sécurité alimentaires*. 3^{ème} édition, DOIN, Paris, pp. 738.
- Li, Y., Fabiano-Tixier, A.S. & Chemat, F. (2014). *Essential oils as agents in green chemistry*. Springer Cham Heidelberg, New York, Dordrecht, London, pp.78.
- Magan, N., Aldred, D., 2007. Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology* 119, 131–139.
- Mahlo, S.M., McGaw, L.J., Eloff, J.N., 2010. Antifungal activity of leaf extracts from South African trees against plant pathogens. *Crop Protection* 29, 1529–1533.
- Mason, T., Chemat, F. & Vinatoru, M. (2011). The extraction of natural products using ultrasound and microwaves. *Current Organic Chemistry*. 15, 237-247.
- Matan, N., Rimkeeree, H., Mawson, A.J., Chompreeda, P., Haruthaithanasan, V., Parker, M., 2006. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *International Journal of Food Microbiology*.
- Naeini, A., Ziglari, T., Shokri, H. & Khosravi, A.R. (2010). Assessment of growth-inhibiting effect of some plant essential oils on different *Fusarium* isolates. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*. 20, 174-178.
- Nguefack, J., Dongmo, J.B.L., Dakole, C.D., Leth, V., Vismer, H.F. & Torp, J. (2009). Food preservative potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against mycotoxigenic fungi. *International Journal of Food Microbiology*.131, 151-156.

- Nguefack, J., Tamgue, O., Dongmo, J.B.L., Dakole, C.D., Leth, V., Vismer, H.F., Amvam Zollo, P.H., Nkengfack, A.E., 2012. Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*. *Food Control* 23, 377–383.
- Nguyen, M.T. (2007). Identification des espèces de moisissures potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam. Etude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines. Institut national polytechnique de Toulouse. Thèse de doctorat, pp.23- 28, 32- 35. France.
- Nicklin, J ; Graeme-Cook, K ; Paget, T & Killington, R. 2000. L'essentiel en microbiologie, (edn) Berti. Paris.
- Omidbeygi, M., Barzegar, M., Hamidi, Z., Naghdibadi, H. (2007). Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control*.18, 1518-1523.
- Passone, M.A., Girardi, N.S. & Etcheverry, M. (2012). Evaluation of the control ability of five essential oils against *Aspergillus section Nigri* growth and ochratoxin A accumulation in peanut meal extract agar conditioned at different water activities levels. *International Journal of Food Microbiology*. 159, 198-206.
- Phillips, C.A., Laird, K. & Allen, S.C. (2012). The use of Citri-V™® — an antimicrobial Citrus essential oil vapours for the control of *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus Niger* and *Alternaria alternata* in vitro and on food. *Food Research International*. 47, 310-314.
- Pinton, P. (2012). Toxicité et mode d'action, du déoxynivalenol et de ses dérivés acétyles sur l'intestin. Ecole doctorale 472. Thèse de doctorat, pp.10. France.
- Pitt, J. I. & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. 3ème édition, Springer, London, New York, pp.524.
- Porto, C., Decorti, D. & Kikic, I. (2009). Flavour compounds of *Lavandula angustifolia* L. to use in food manufacturing : Comparison of three different extraction methods. *Food Chemistry*. 112, 1072-1078.
- Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P.K. & Dubey, N.K. (2015) Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities - Potentials and challenges. *Food Control*. 47, 381-391.
- Prakash, B., Shukla, R., Singh, P., Kumar, A., Mishra, P.K. & Dubey, N.K. (2010). Efficacy of chemically characterized Piper beetle L. essential oil against fungal and aflatoxin

- contamination of some edible commodities and its antioxidant activity. *International Journal of Food Microbiology*. 142, 114-119.
- Punt, P. J., Van Biezen, N., Conesa, A., Albers, A., Mangnus, J et Van den Hondel, C. (2002). Filamentous fungi as cell factories for heterogenous protein production. *Trends in Biotechnology* 20 (5), 200-206.
- Ramos, C., Teixeira, B., Batista, I., Matos, O., Serrano, C., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Nunes, M.L. & Marques, M. (2012). Antioxidant and antibacterial activity of essential oil and extracts of bay leave *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) from Portugal. *Natural Product Research*. 6, 518-529.
- Rasooli, I. & Owlia, P. (2005). Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Phytochemistry*. 66, 2851-2856.
- Roland C. Brigitte Vian. Jean, 1999 : *Biologie végétale, organisation des plantes sans fleurs*, 5 ème édition, Dunod, Paris.
- Samson, R., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C. & Andersen, B. (2010). *Food and Indoor Fungi*. Utrecht : CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, pp.390.
- Samson, R.A. & Pitt, J.I. (2000). *Integration of Modern Methods for Penicillium and Aspergillus*. Harwood academic publishers, Amsterdam, the Netherlands, pp.510.
- Samson, R.A., Hong, S.B. & Frisvad, J.C. (2006). Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology*. 44, 133-148.
- Samson, RA, Hoekstra, ES, and Frisvad, JC. (2004). *Introduction to food and airborne fungi*. 7th, -389 p. Baarn, Centralalbureau voor Schimmellcultures, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences.
- Scheidegger, K.A. & Payne, G.A. (2003). Unlocking the secrets behind secondary metabolism, a review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. *Journal of Toxicology and Toxin Review*. 22, 427-463.
- Shukla, R., Singh, P., Prakash, B. & Dubey, N.K. (2012). Antifungal, aflatoxin inhibition and antioxidant activity of *Callistemon lanceolatus* (Sm.) Sweet essential oil and its major component 1,8-cineole against fungal isolates from chickpea seeds. *Food Control*. 25, 27-33.
- Singh, G., Maurya, S., de Lampasona, M.P. & Catalan, C.A.N. (2007). A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food and Chemical Toxicology*. 45, 1650-1661.

- Souza, E.L.d, Lima, E.d.O., Freire, K.R.d.L. & Sousa, C.P.d. (2005). Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 48, 245-250.
- Soylu, E.M., Soyly, S. & Kurt, S. (2006). Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia*. 161, 119-128.
- Stéphane FFY, Jules BKJ (2020). Dans : Huile essentielles – Composés bioactifs, nouvelles perspectives et applications. Oliveira MSD, Costa WAD, Silva SG, éditeurs. IntechOpen ; Terpénoïdes en tant que constituants bioactifs importants des huiles essentielles.
- Tabuc, C. (2007). Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Institut national polytechnique de Toulouse et université de Bucarest. Thèse de doctorat, pp. 65. France.
- Taniwaki, M. H., Hocking, A. D., Pitt, J. I., and Fleet, G. H. (2009). Growth and mycotoxin production by food spoilage fungi under high carbon dioxide and low oxygen atmospheres. *International Journal of Food Microbiology* 132, 100-108.
- Tatsadjieu, N.L., Dongmo, P.M.J., Ngassoum, M.B., Etoa, F.X. & Mbofung, C.M.F. (2009). Investigations on the essential oil of *Lippia rugosa* from Cameroon for its potential use as antifungal agent against *Aspergillus flavus* Link ex. Fries. *Food Control*. 20, 161- 166.
- Tian, J., Huang, B., Luo, X., Zeng, H., Ban, X., He, J. & Wang, Y. (2012). The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand.-Mazz essential oil and its potential use as a food preservative. *Food Chemistry*. 130, 520-527.
- Tolouee, M., Alinezhad, S., Saberi, R., Eslamifar, A., Zad, S.J., Jaimand, K., Taeb, J., Rezaee, M.-B., Kawachi, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Razzaghi-Abyaneh, M., 2010. Effect of *Matricaria chamomilla* L. flower essential oil on the growth and ultrastructure of *Aspergillus niger* van Tieghem. *International Journal of Food Microbiology* 139, 127–133.
- Tzortzakakis, N.G. (2009). Impact of cinnamon oil-enrichment on microbial spoilage of fresh produce. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 10, 97-102.
- Uchicoba, T ; Mase, T ; Arima, K : Yonezawa, H & Kaneda, M. (2001). Isolation and characterization of a trypsin-like protease from *Trichoderma viride*. *Biol. Chem.* 382 : 1509- 1513. Masson. Paris. P. 12-426.

- Varga, J., Rigo, K., Toth, B., Teren, J. & Kozakiewicz, Z. (2003). Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. *Food Technology and Biotechnology*. 41, 29-36.
- Vilela, G.R., De Almeida, G.S., D'Arce, M.A.B.R., Moraes, M.H.D., Britob, J.O., Da Silva, M.F.d.G.F., Silva, S.C., De Stefano Piedade, S.M., Calori-Domingues, M.A. & Da Gloria, E.M. (2009). Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill. against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. *Journal of Stored Products Research*. 45, 108-111.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J. & Pérez-Álvarez, J. (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*. 19, 1130-1138.
- Vu, K.D., Hollingsworth, R.G., Leroux, E., Salmieri, S., Lacroix, M., 2011. Development of edible bioactive coating based on modified chitosan for increasing the shelf life of strawberries. *Food Research International* 44, 198–203.
- Yamina Ben Miri, Ahmed Nouasri, Marta Herrera, djamel djennan, and agustin Arino 2023. Antifungal Activity of Menthol, Eugenol and Their Combination against *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus niger* In Vitro and in Stored Cereals.
- Zabka, M., Pavela, R. & Slezakova, L. (2009). Antifungal effect of *Pimenta dioica* essential oil against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi. *Industrial Crops and Products*. 30, 250-253.

Annexes

Annexe I

Appareillage :

- Agitateur magnétique.
- Autoclave.
- Spectrophotomètre : UV/ visible
- Balance analytique.
- Micropipettes.
- Plaque chauffante.
- Etuve.
- Bec benzène.
- Microscope optique.

Verreries

- Bêches.
- Entonnoirs.
- Epprouvettes graduées à pied.
- Erlenmeyers.
- Fioles jaugées à 1 trait.
- Pipettes graduées à écoulement.
- Tubes à essai.

Produits chimiques

- | | |
|--|---------------------|
| -Agar | - Méthanol |
| -Chloramphénicol | - Tween-80 |
| -Citrate d'ammonium ferreux | -Alcool isoamylique |
| -Cu SO ₄ , 5 H ₂ O | - Huile à immersion |
| -Czapek Concentré | - Plaque CCM |
| -Dichloran (2,6 dichloro-4-nitroaniline) | - Toluène |
| -Eau distillée | |
| -Extrait de levure | |
| -Extrait de Malt | |
| -Fe SO ₄ , 7H ₂ O | |
| -Glucose | |
| -Glycérol | |

-KCl

-KH₂PO₄

-KNO₃

-NaNO₃

-Noix de coco

-Peptone

-Pomme de terre

-Saccharose

-Zn SO₄, 7H₂O

β-cyclodextrine (β-cyd)

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

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

Extract de Malt Agar (MEA) :

Extrait de Malt.....	20 g
Glucose.....	20 g
Peptone.....	20 g
Eau distillée	1000 ml
pH = 5,6 ± 0,2	

G25N (25% Glycérol Nitrate Agar) :

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

Czapek concentré :

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

Milieu CYA (Czapek Yeast extract Agar)

Saccharose	30 g
Extrait de levure	5 g
Czapek concentré	10 ml
K ₂ HPO ₄	1 g

Agar15 g
Eau distillée.....1000 ml

pH = 6,7 ± 0,2

Milieu AFPA :

Peptone.....10 g
Extrait de levure20 g

Citrate d'ammonium ferreux0,5 g

Chloramphénicol100 mg

Agar.....15 g

Dichloran (2,6 dichloro-4-nitroaniline).....2 mg

Eau distillée 1000 ml

pH = 6 ± 0,2

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

Noix de coco.....100 g

Agar.....20 g

β-cyclodextrine (β-cyd)3 g

Eau distillée.....1000 ml

pH = 7

Annexe III

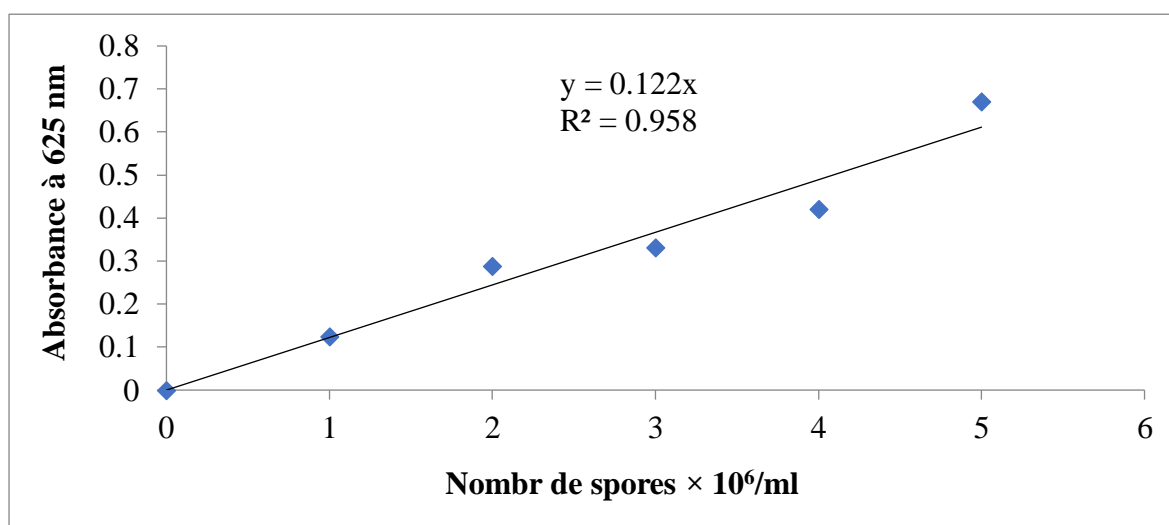


Figure 1. Courbe d'étalonnage des spores d'*Aspergillus flavus*.