

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**Université Docteur Moulay Tahar Saïda  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**



## ***MEMOIRE***

*Présenté pour l'obtention du diplôme de Master  
Spécialité : Microbiologie*

Par Melle : Reguig Yousra et Boufala Amel

### **Thème**

**Etude prophylactique de quelques plantes  
médicinales contre l'intoxication induit par les  
mycotoxines (l'aflatoxine et l'ochratoxine A)**

**Soutenu le : 09/09/2021**

**Devant le jury :**

<b>Président :</b> Sitayeb Tayeb	professeur	Université Moulay Tahar Saïda
<b>Encadreur :</b> Adli Djallal	Docteur	Université Moulay Tahar Saïda
<b>Examineur :</b> Benreguieg Mokhetar	Docteur	Université Moulay Tahar Saïda

**Année universitaire 2020/2021**

## *Remerciement*

*Mes premiers remerciements vont à notre promoteur Monsieur Pr. ADLI, professeur à l'université Docteur Moulay Tahar de Saïda. Pour avoir accepté de nous encadrer et de nous suivre tout au long de la réalisation de ce mémoire. Et par son caractère de noblesse incomparable, pour sa générosité et la grande patience dont il a su faire preuve malgré ses charges académiques et professionnelles.*

*Mes remerciements s'adressent aussi aux différents membres du jury Dr. Benrguig Mokhtare*

*Et Pr. Sitayeb Tayeb*

*Un grand remerciement à tous les professeurs de l'université Moulay Taher de Saïda plus précisément le département de biologie : le Vice doyen, le chef département Monsieur AMMAM, le chef de spécialité Microbiologie Monsieur BENREGUIG MOKHTAR et tous les enseignantes.*

## *Dédicace*

*Je remercie dieu de m'avoir donné le courage et la  
force  
Pour compléter mon études et arriver là ou je suis  
Aujourd'hui et d'avoir enfin compléter mon  
éducation.*

*Un grand remerciement A mon cher encadreur : Dr.  
ADLI.*

*A mes très chers parents :  
Mon père Mokhtar et ma mère Bakhta.*

*A ma seul sœur Imane et mes frères : Mohammed et  
Sofiane.*

*A mon binôme : Amel.*

*A toute ma famille REGUIG, grande et petite,  
Hommes et femmes qui m'ont Soutenue et  
Encouragé tout au long de ce travail.*

*Yousra.*

## *Dédicace*

*Je remercie **dieu** de m'avoir donné le courage et la force  
Pour compléter mon études et arriver là ou je suis  
Aujourd'hui et d'avoir enfin compléter mon éducation.*

*Je remercie mon cher encadreur: Dr. **ADLI**.*

*A mes très chers parents :  
Mon père **Slimane** et ma mère **Zohra**.*

*A mes sœurs **Hanane** et **Mounia** et mes frères : **Mohammed**,  
**Ali** et **Majid***

*A mon binôme : **Yousra**, pour son aide précieuse et  
chaleureuse et son inestimable collaboration*

*A tout la famille **CHERIET** spécialement **Tata Fatima** et ma  
tante **Zahra**, que Dieu ait pitié d'elle*

*Mon oncle **Kouider***

*Ames chères amies **Zahra**, **Om Ikheir**, **Yakoute**,  
**Dounia**, **Karima**, **Ikram***

*A toute la promotion de la 2ème Master*

*Microbiologie de l'université*

***Molay Taher-Saïda**.*

***Amel**.*

## Résumer

L'ochratoxine A (OTA) et les aflatoxines (AFs) sont des mycotoxines dérivées de métabolites secondaires de champignons filamenteux appartenant aux genres *Penicillium* et *Aspergillus*. Cependant, *Aspergillus carbonarius* est le principal producteur d'OTA et d'*Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* est célèbre pour sa capacité à synthétiser l'aflatoxine.

L'OTA et l'aflatoxine se trouvent dans divers types d'aliments et leurs produits. Les Caractéristiques toxicologiques de l'ochratoxine A et de l'aflatoxine en raison de leurs effets indésirables existe sur la santé humaine et animale (effets hépatotoxique, immunotoxique, génotoxiques, tératogènes et cancérigènes) ces deux toxines fongiques ont fait l'objet d'une attention particulière compétence avec les organismes internationaux afin de réduire son occurrence. Ce projet dédié à trouver un moyen de contrôle biologique, qui peut réduire l'OTA produit par *A. carbonarius* d'une part et d'autre part réduire les aflatoxines produites, détoxifiant les matrices alimentaires qui lui sont incompatibles normes.

D'après le travail de synthèse des principaux résultats et discussion de plusieurs travaux dans déférents régions, les huiles essentielles (HEs) ont montré une variation dans le rendement. Les rendements des HEs de *C. cuminum* et *L. nobilis* et *S. officinalis* sont : 1,08%, 1,13%, 1,36% respectivement. Par contre à Tiaret, Laghouat, Bejaïa le rendement de *Mentha spicata* est : 1,97%, 1,04%, 1,1% respectivement. Ces résultats sont variable de chercheur à l'autre et selon la région de l'étude et les conditions favorables.

Aussi une variation trouvée dans les compositions des HEs, où le cuminaldéhyde (65,98%) était le composé majoritaire dans l'HE de *C. cuminum*. L'HEs de *L. nobilis* a été dominé par le 1,8-cinéole (35,54%). La carvone était le composé le plus dominant dans l'HE de *Mentha spicata* avec des variations dans le pourcentage en trois régions : la carvone (63.59%), (49.5%), (48.5%) à Tiaret, Laghouat, Bejaïa respectivement. alors que celle de *S. officinalis* a été caractérisée par trois principaux composants :  $\alpha$ -thuyone ( $27,5 \pm 1,03\%$ ), camphre ( $25,0 \pm 1,56\%$ ) et 1,8-cinéole ( $21,9 \pm 1,1\%$ ). les HEs étaient capables d'inhiber la croissance de la souche aflatoxinogène et ochratoxinogène.

## Abstract

Ochratoxin A and aflatoxins are mycotoxins derived from secondary metabolites of filamentous fungi belonging to the genera *Penicillium* and *Aspergillus*. However, *Aspergillus carbonarius* is the main producer of OTA and *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* is famous for its ability to synthesize aflatoxin.

OTA and aflatoxin are found in various types of foods and their products. The toxicological characteristics of ochratoxin A and aflatoxin due to their adverse effects exist on human and animal health (hepatotoxic, immunotoxic, genotoxic, teratogenic and carcinogenic effects) these two fungal toxins have been the subject of a special attention to competence with international organizations in order to reduce its occurrence. This project dedicated to finding a means of biological control, which can reduce the OTA produced by *A. carbonarius* on the one hand and on the other hand reduce the aflatoxins produced, detoxifying food matrices which are incompatible with standards.

Based on the synthesis of the main results and discussion of several works in different regions, HEs showed variation in yield. The yields of the HEs of *C. cyminum* and *L. nobilis* and *S. officinalis* are: 1.08%, 1.13%, 1.36% respectively. On the other hand in Tiaret, Laghouat, Bejaïa the yield of *Mentha spicata* is: 1.97%, 1.04%, 1.1% respectively. These results vary from researcher to researcher and according to the study region and favorable conditions.

Also a variation found in the compositions of EOs, where cuminaldehyde (65.98%) was the major compound in EO of *C. cyminum*. *L. nobilis* HEs was dominated by 1,8-cineole (35.54%). Carvone was the most dominant compound in EO of *Mentha spicata* with percentage variations in three regions: carvone (63.59%), (49.5%), (48.5%) in Tiaret, Laghouat, Bejaïa respectively. while that of *S. officinalis* was characterized by three main components:  $\alpha$ -thujone ( $27.5 \pm 1.03\%$ ), camphor ( $25.0 \pm 1.56\%$ ) and 1,8-cineole ( $21.9 \pm 1.1\%$ ). EOs were able to inhibit the growth of the aflatoxinogenic and ochratoxinogenic strain.

## ملخص

Ochratoxin A و aflatoxins هي السموم الفطرية المشتقة من المستقلبات الثانوية للفطريات الخيطية التي تنتمي إلى أجناس *Aspergillus* و *Penicillium*. ومع ذلك، فإن *Aspergillus carbonarius* هو المنتج الرئيسي لـ OTA و *Aspergillus flavus*، تشتهر *A. Parsiticus* بقدرتها على تصنيع الأفلاتوكسين.

تم العثور على OTA والأفلاتوكسين في أنواع مختلفة من الأطعمة ومنتجاتها. الخصائص السمية للأوكراتوكسين أ والأفلاتوكسين بسبب آثارهما الضارة موجودة على صحة الإنسان والحيوان (التأثيرات السامة للكبد ، السامة للمناعة ، السمية الجينية ، المسخية والمسرطنة) كان هذان السمان الفطريان موضع اهتمام خاص للاختصاص مع المنظمات الدولية بالترتيب لتقليل حدوثه. يخصص هذا المشروع لإيجاد وسيلة للتحكم البيولوجي ، والتي يمكن أن تقلل من OTA التي تنتجها *A. Carbonarius* من ناحية ومن ناحية أخرى تقليل الأفلاتوكسينات المنتجة ، وإزالة السموم من مصفوفات الطعام التي لا تتوافق مع المعايير.

بناءً على توليف النتائج الرئيسية ومناقشة العديد من الأعمال في مناطق مختلفة ، أظهر التعليم العالي تبايناً في العائد. كانت حصيللة المعامل العالية لنبات *C. Cyminum* و *L. nobilis* و *S. officinalis* هي: 1.08% ، 1.13% ، 1.36% على التوالي. من ناحية أخرى في تيارت والأغواط وبجاية كان إنتاج النعناع سبيكاتا: 1.97% ، 1.04% ، 1.1% على التوالي. تختلف هذه النتائج من باحث إلى باحث وحسب منطقة الدراسة والظروف المواتية.

وجد أيضاً تبايناً في تركيبات EOs ، حيث كان cuminaldehyde (65.98%) هو المركب الرئيسي في EO لـ *C. cyminum*. هيمنت *L. nobilis* على المعالجات العالية الكثافة 1.8-cineole (35.54%). كان الكارفون هو المركب الأكثر انتشاراً في EO في *Mentha spicata* مع تفاوتات في النسبة المئوية في ثلاث مناطق: 63.59% carvone (، 49.5%) ، (، 48.5%) في تيارت ، الأغواط ، بجاية على التوالي. بينما تميزت *S. officinalis* بثلاثة مكونات رئيسية:  $27.5 \pm 1.03$  %  $\alpha$ -thujone ، الكافور ( $25.0 \pm 1.56$ %) و  $21.9 \pm 1.1$ -1،8% cineole). كانت EOs قادرة على تثبيط نمو سلالة الأفلاتوكسين المنشأ و ochratoxinogenic.

## Liste des Abréviations

**A.** : *Aspergillus*

**AFB1** : aflatoxine bleu 1

**AFB2** : aflatoxine bleu 2

**AFG1** : aflatoxine green 1

**AFG2** : aflatoxine green 2

**AFM1** : aflatoxine milk 1

**AFM2** : aflatoxine milk 2

**AFs** : les aflatoxines

**APCI** : ionisation chimique à pression atmosphérique

**AW** : activité d'eau

**°C** : degré Celsius

**CCM** : chromatographie sur couche mince

**COA** : Coenzyme

**DL** : dose létale

**Eliza** : enzyme-linked-immunosorbant -assay

**HE** : huiles essentielles

**HPLC** : chromatographie liquide à haute performance

**LAB** : bactéries lactiques

**OTA** : ochratoxine A

**OTB** : ochratoxine B

**OTC** : ochratoxine C

**P.** : *Penicillium*

**pH** : potentielle d'hydrogène

## Liste des figures

**Figure 1.** Structure typique d'un *Aspergillus*.

**Figure 2.** *Aspergillus flavus*.

**Figure 3.** *Aspergillus parasiticus*.

**Figure 4.** Structure des aflatoxines.

**Figure 5.** Aflatoxine biosynthèses.

**Figure 6.** Structure chimique de l'OTA.

**Figure 7.** Voie biochimique de la synthèse de l'ochratoxine A.

**Figure 8.** *Cuminum cyminum L.*

**Figure 9.** *Mentha spicata*.

**Figure 10.** *Laurus nobilis L.*

**Figure 11.** Les feuilles de la sauge.

**Figure 12.** Effet de l'HE de *C. cyminum* aux différentes concentrations sur la croissance de l'*A. flavus* pendant 7 jours d'incubation.

**Figure 13.** Effet de l'HE de *L. nobilis* aux différentes concentrations sur la croissance de l'*A. flavus* pendant 7 jours d'incubation.

## Liste des tableaux

**Tableau 1.** Principaux facteurs influençant la production des mycotoxines dans la chaîne alimentaire.

**Tableau 2.** Principales caractéristiques des quatre Aflatoxines majeurs.

**Tableau 3.** Production d'OTA par les espèces d'*Aspergillus*.

**Tableau 4.** Production d'OTA par les espèces de *Penicillium*.

**Tableau 5.** Composition caractéristique des Ochratoxines

**Tableau 6.** Propriétés chimiques et physiques les plus importantes de l'OTA.

**Tableau 7.** Production d'ochratoxine A (en mg/kg) par *Aspergillus ochraceus* Wilhem pour diverses valeurs de température après 2 semaines d'incubation.

**Tableau 8.** Les avantages et inconvénients des méthodes pour l'analyse des mycotoxines.

**Tableau 9.** Effet inhibiteur de quelques huiles essentielles sur la production des aflatoxines et l'ochratoxine A.

**Tableau 10.** Variation des rendements d'extractions par hydrodistillation des HEs de *C. cyminum* et *L. nobilis*.

**Tableau 11.** Composés chimiques d'HE de *C. cyminum*.

**Tableau 12.** Composés chimiques d'HE de *L. nobilis*.

**Tableau 13.** Rendements en huile essentielle de *Mentha spicata*.

**Tableau 14.** La composition chimique des huiles essentielles de *Mentha spicata* récoltée en Algérie.

**Tableau 15.** Activité antifongique de l'huile essentielle de *Mentha spicata* contre quelques souches fongiques.

**Tableau 16.** Variation des rendements d'extractions par hydrodistillation des HEs de *Laurus nobilis* et *Salvia officinalis*.

**Tableau 17.** La composition chimique des huiles essentielles de *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis*.

## Table des matières

Introduction .....	1
1. Généralités sur les mycotoxines .....	4
2. Conditions des toxino-génèse .....	4
2.1. Facteurs intrinsèques .....	4
2.2. Facteurs extrinsèques .....	4
3. L'aflatoxine .....	5
3.1. Définition de l'aflatoxine .....	5
3.2. Les souches fongiques productrices de l'aflatoxine .....	6
3.3. Structure chimique de l'aflatoxine .....	7
3.4. Propriété physicochimique de l'aflatoxine .....	8
3.5. Biosynthèse de l'aflatoxine .....	9
3.6. Facteurs influençant la biosynthèse d'aflatoxines .....	12
3.7. Méthodes d'extraction et de dosage des aflatoxines .....	12
3.8. Aflatoxine et les produits contaminés .....	13
3.8.1. Contamination du lait par l'aflatoxine M1 .....	13
3.9. Toxicocinétique des aflatoxines (ADME) .....	14
3.10. Toxicité des aflatoxines .....	14
3.10.1 Toxicité aiguë .....	15
3.10.2 Toxicité chronique .....	15
3.10.3 Hépatotoxicité .....	15
3.10.4 Hémato-toxicité .....	16
4. L'ochratoxines .....	17
4.1. Définition de l'Ochratoxine A .....	17
4.2. Souches fongiques productrices d'ochratoxine A .....	17
4.2.1. Genre <i>Aspergillus</i> .....	17
4.2.2. Genre <i>Penicillium</i> .....	18
4.3. Structure chimique et physique .....	19

4.4. Propriétés physiques et chimiques de l'ochratoxine.....	20
4.5. Biosynthèse de l'ochratoxine A.....	21
4.6. Facteurs influençant la biosynthèse de l'OTA .....	22
4.6.1. Activité en eau et température. ....	22
4.6.2. PH.....	23
4.6.3. Les nutriments .....	24
4.7. Les méthodes de détection et de dosage de l'OTA.....	24
4.8. Contamination par l'ochratoxine A.....	27
4.8.1. Contamination des denrées d'origine végétale par l'ochratoxine A .....	27
4.8.2. Contamination des denrées d'origine animale par l'ochratoxine A.....	28
4.8.3. Contamination humaine par l'ochratoxine A .....	28
4.9. Toxicocinétique de l'ochratoxine A.....	28
4.10. Toxicité de l'Ochratoxine A .....	29
4.10.1. Toxicité aiguë.....	29
4.10.3. Néphrotoxique.....	30
4.10.4. Tératogène.....	30
4.10.5. Hépatotoxicité .....	30
1. Détoxification par microorganismes .....	33
1.1. Détoxification par microorganismes contre l'aflatoxine .....	33
1.1.1. Lutte par utilisation des bactéries ubiquitaires du sol .....	33
1.1.2. Lutte par utilisation des bactéries lactiques .....	33
1.2. Détoxification par microorganismes ou enzyme contre l'ochratoxine A ....	34
2. Détoxification par utilisation des plantes médicinales contre l'aflatoxine et l'ochratoxine A.....	35
2.1. Généralité sur les plantes médicinales .....	35
2.1.1. Les huiles essentielles .....	35
2.3. Présentation et description botanique de quatre plantes utilisées dans cette étude .....	36
2.3.1. <i>Cuminum cyminum</i> .....	36
2.3.1.2. Les activités biologiques de <i>Cuminum cyminum L.</i> .....	37

2.3.1.2.2. Activité anti-oxydante.....	37
2.3.2. <i>Mentha spicata</i> .....	38
2.3.2.1. Classification (Quezel et Santa et al. 1962).....	38
2.3.2.2.1. Activité antimicrobienne.....	39
2.3.2.2.2. Activité anti-oxydante.....	39
2.3.2.2.3. Activités insecticide .....	39
2.3.3. <i>Laurus nobilis</i> .....	40
2.3.3.1. Classification (Quezel et santa et al.,1963).....	40
2.3.3.2. Les activités biologiques de <i>Laurus nobilis L.</i> .....	40
2.3.3.2.1. Activité antioxydant.....	40
2.3.3.2.2. Activité antibactérienne .....	41
2.3.3.2.3. Activité antifongique.....	41
2.3.4. <i>Salvia officinalis</i> .....	42
2.3.4.1. Classification taxonomique.....	42
2.3.4.2. Les activités biologiques du <i>Salvia officinalis</i> .....	42
2.3.4.2.1. Effets anticancéreux et antimutagènes.....	42
2.3.4.2.2. Activités antioxydantes .....	43
2.3.4.2.3. Activités anti-inflammatoires.....	43
2.3.4.2.4. Activités antiseptiques .....	43
2.3.4.2.5. Effets métaboliques.....	44
1. Etude prophylactique de <i>Cuminum cyminum</i> et <i>Laurus nobilis</i> contre l'aflatoxine.....	50
1.1. Rendements en huile essentielle .....	50
1.2. Composition chimique des huiles essentielles.....	51
1.2.1. <i>C. cyminum</i> .....	51
1.2.2. <i>L. nobilis</i> .....	54
1.3. Activité antifongique des huiles essentielles.....	57
1.3.1. Effet d'huile essentielle de <i>C. cyminum</i> sur la croissance d' <i>A. flavus</i> ... 57	
1.3.2. Effet des huiles essentielles de <i>L. nobilis</i> sur la croissance d' <i>A. flavus</i> . 58	

2. Etude analytique de l'huile essentielle de <i>Mentha spicata</i> commun entre l'aflatoxine et l'ochratoxine A .....	59
2.1. Rendement.....	59
2.2. Composition chimique d'huile essentielle de <i>Mentha spicata</i> .....	60
3. Etude prophylactique de <i>Laurus nobilis</i> et <i>Salvia officinalis</i> contre l'ochratoxine A.....	68
3.1. Rendement.....	68
3.2. Compositions chimiques des huiles essentielles.....	69
3.3. Activité antifongique de <i>S. officinalis</i> et <i>L. nobilis</i> contre l'ochratoxine A. ....	71
4. Comparaison entre les quatre plantes étudiée .....	72
Conclusion.....	74
Référence bibliographique	

# *Introduction*

## Introduction

Dans le monde, Les mycotoxines sont des substances toxiques pour l'homme et les animaux, élaborées par des moisissures développées dans les denrées alimentaires (**Moreau et al., 1974**). Les intoxications liées à ces substances peuvent se manifester par des syndromes forts variés : gastro-entérites, hémorragies, convulsions, paralysies. Mais surtout lésions des reins et du foie; dans certains cas, ces dernières peuvent se traduire par des cancers. De plus, L'exposition à ces mycotoxines est à l'origine de toxicités aiguës, sub-chroniques et chroniques en engendrant des effets délétères sur le système nerveux central, l'appareil cardiovasculaire, l'appareil respiratoire, l'appareil digestif et le système urinaire. Elles peuvent aussi induire des effets hépatotoxiques, mutagènes, carcinogènes, tératogènes et immunosuppresseurs (**Bennet et Klich et al., 2003 ; AFSSA, 2006**).

De nos jours, parmi la multitude de contaminants connus, les mycotoxines sont des substances naturelles produites par le métabolisme secondaire des champignons. Elles exercent un pouvoir toxique réel pour le consommateur (homme et animal) même lorsqu'elles sont présentes en faibles quantités (**Eskola et al., 2002; El khoury et al., 2010; Chen et al., 2017**). Les conditions de contamination par les champignons responsables, leur prolifération, ainsi que les conditions de production des mycotoxines par ces micro-organismes sont peu connues.

Actuellement, il existe plus de 300 métabolites secondaires fongiques recensés mais seule une trentaine posséderait des caractéristiques toxiques préoccupantes (**El khoury et al., 2010**). La même toxine peut être élaborée par diverses espèces fongiques mais pas obligatoirement par toutes les souches appartenant à une même espèce (**Eskola et al., 2002**). Parmi les métabolites les Plus toxiques, l'ochratoxine A (OTA) et l'aflatoxine B1 (AFB1) sont des contaminants majeurs de l'alimentation animale (volaille, porcs, vaches) et humaine (chaîne alimentaire) par l'intermédiaire des céréales et des farines. L'OTA est la mycotoxine la plus courante ; elle a été détectée dans les raisins et les produits dérivés, tels que les jus de raisin, les vins et les fruits de vigne séchés (**Aksoy et al., 2007; Visconti et al., 2008**).

Par ailleurs, les plantes ont toujours été utilisées comme médicaments. Ces derniers à base de plantes sont considérés comme peu toxiques et doux par rapport aux médicaments pharmaceutiques. Les industries pharmaceutiques sont de plus en plus intéressées par l'étude ethnobotanique des plantes (**Dibong et al., 2011**). Les plantes médicinales demeurent encore une source de soins médicaux dans les pays en voie de développement, en absence d'un

système médical moderne (**Tabuti et al., 2003**). Le recours à la médecine à base des plantes est profondément ancré dans notre culture, car l'Algérie est réputée par la richesse de sa flore médicinale qui comprend des centaines d'espèces végétales. Ainsi qu'elle a un savoir-faire testé de longue date par nos ancêtres. Parallèlement, toutes les cultures et les civilisations de l'Antiquité à nos jours dépendent entièrement ou partiellement de la phytothérapie en raison de leur efficacité, l'accessibilité, la disponibilité, faible toxicité et d'acceptabilité (**Akhariayi et Boboye et al., 2010**). Selon l'Organisation mondiale de la Santé (**O.M.S.**) en 2008, plus de 80% de la population mondiale repose sur la médecine traditionnelle pour leurs besoins de soins de santé primaires (**Pierangeli et al., 2009**). Plusieurs plantes peuvent être une guérison de nombreux maux quotidiens qui vont des simples troubles digestifs jusqu'à le traitement des maladies chroniques comme le cancer, l'ulcère, le diabète, les calculs rénaux (**Anonyme, 2001**).

Les plantes médicinales constituent des ressources précieuses pour la grande majorité des populations rurales en Afrique, où plus de 80% de cette population s'en sert pour assurer les soins de santé (**Jiofack et al., 2009**). De plus, les produits forestiers non ligneux ont éveillé un intérêt considérable en Afrique au cours de ces dernières années pour leur contribution à l'économie des ménages et la conservation de la biodiversité végétale.

L'objectif de ce travail porte sur l'étude prophylactique des plantes médicinales contre les mycotoxines (l'aflatoxine et l'ochratoxine A).

Ce travail est divisé en trois parties, la première partie est consacrée à une analyse bibliographique sur les mycotoxines et les souches produites.

La deuxième partie est consacrée sur la détoxification des mycotoxines par l'utilisation des plantes médicinales dans cette étude.

Dans la troisième partie présente un travail de synthèse des principaux résultats et discussion de plusieurs travaux dans différents régions et à la fin on clôture avec une conclusion.

*Chapitre 1 :*  
*Synthèse*  
*bibliographique*

---

## **1. Généralités sur les mycotoxines**

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires, toxiques, de faible poids moléculaire (entre 200 et 10.000 daltons), excrétées par certaines moisissures qui se développent sur divers produits agricoles sous des conditions environnementales particulières (**Krska, 2009**). A ce jour, 300 à 400 mycotoxines sont connues (**Pamel et al., 2010**). Il s'agit de petites molécules peu solubles dans l'eau, peu volatiles et difficilement métabolisées par les organismes vivants. Elles sont très stables à l'acidité et à la chaleur (**Ruppel et al., 2004**). L'origine chimique des mycotoxines est très diverse, certaines dérivent des polycétoacides (aflatoxines, ochratoxine, patuline, stérigmatocystine), d'autres des acides aminés (alcaloïdes de l'ergot, acide aspergillique, acide cyclopiazonique) et les derniers sont des dérivés terpéniques (désoxynivalénol, diacétoxyscirpénol, fusarénone (**Leclerc et al., 2005**)).

## **2. Conditions des toxinogénèse**

Les mycotoxines peuvent être produites à tous les stades de la chaîne alimentaire depuis le champ jusqu'au produit fini (**Pfohl- Leszkowicz et al., 1999**). La sécrétion des métabolites toxiques par les moisissures dans les aliments dépend de plusieurs facteurs qui peuvent être intrinsèques (lié à la souche fongique) ; extrinsèques (conditions de l'environnement).

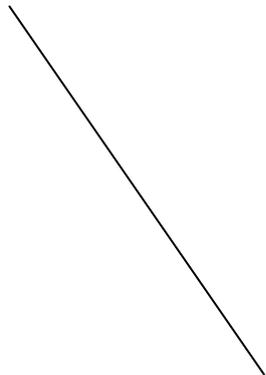
### **2.1. Facteurs intrinsèques**

Les facteurs biologiques peuvent être liés à l'espèce fongique, à la spécificité de la souche et à l'instabilité des propriétés toxiques (Tableau I). Une même toxine peut être élaborée par différentes espèces quelque fois appartenant à différents genres et une même espèce peut produire plusieurs mycotoxines. De plus, la présence de plusieurs espèces fongiques sur la même denrée a généralement un effet dépressif sur la production de toxine. Cela s'explique d'une part, par la compétition pour le substrat et d'autre part, par le fait que certaines souches peuvent dégrader la toxine (**Le Bars et al., 1987**).

### **2.2. Facteurs extrinsèques**

La production de mycotoxines par les moisissures est fortement dépendante des conditions climatiques, notamment de la température et de l'humidité, mais aussi des nutriments présents. En effet, diverses conditions doivent être réunies pour entraîner la production des mycotoxines le climat, la nature du substrat, les pratiques agronomiques, le conditionnement des produits, l'utilisation de produits fongicides, les facteurs environnementaux (Tableau 01) (**Heit, 2015**).

**Tableau 1:** Principaux facteurs influençant la production des mycotoxines dans la chaîne alimentaire (Atoui, 2006).

Facteurs	Physiques	Chimiques	biologiques
	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Humidité</li> <li>-Rapidité de séchage</li> <li>-Ré-humidification</li> <li>-Humidité relative</li> <li>- Température</li> <li>- Damage mécanique</li> <li>- Mélange de grains</li> <li>- Temps</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- CO2</li> <li>- O2</li> <li>-Nature du substrat</li> <li>-Nutrition minérale</li> <li>-Traitement chimique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Stress de plante</li> <li>- Vecteurs invertébrés</li> <li>- Infection fongique</li> <li>- Différences entre les variétés des plantes</li> <li>- Différences entre les souches fongiques</li> <li>- Charge en spores</li> <li>-Système microbiologique</li> </ul>

### 3. L'aflatoxine

#### 3.1. Définition de l'aflatoxine

Les aflatoxines (AFs) sont des métabolites secondaires hautement toxiques produites par différentes espèces fongiques toxigènes (*Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*...) (Wagacha et Muthomi et al., 2008) Elles ont été isolées pour la première fois en Angleterre en 1960, suite à des intoxications dans un élevage de dindonneaux (Adams et al., 2002 ; Chapeland-Leclerc et al., 2005).

Les recherches menées sur les aflatoxines depuis une trentaine d'années ont établi la prévalence de deux principaux types d'aflatoxines :

- les aflatoxines du type B.
- les aflatoxines du type G (Schmidt et Esser et al., 1985).

Les aflatoxines du type M, non moins importantes que les premières, ont été détectées pour la première fois dans le lait comme métabolites des aflatoxines du type B. Mais le plus important dans les produits alimentaires, et le plus potentiellement cancérigène est l'aflatoxine BI (Richard and Lyon et al., 1986).

### 3.2. Les souches fongiques productrices de l'aflatoxine

Il existe plusieurs espèces productrices de l'aflatoxine telle que : *A.arachidicola*, *A.bombycis*, *A.flavus*, *A.minisclerotigenes*, *A.nomius*, *A.novoparasiticus*, *A.parasiticus*, *A.parvisclerotigenus*, *A.pseudocaelatus*, *A.pseudonomius*, *A.togoensis*, *A.mottae*, *A.sergii*.

Deux souches d'*Aspergillus* sont plus connues pour leur capacité à synthétiser des aflatoxines :

- *Aspergillus flavus*, produit principalement l'aflatoxine B1 et l'aflatoxine B2 alors qu'il ne produit habituellement ni d'aflatoxine G1 ni d'aflatoxine G2, bien que quelques rares exceptions aient été décrites. (Figure 02).
- *Aspergillus parasiticus*, produit les quatre aflatoxines : B1, B2, G1, G2 (**Castegnaro et Pfohl Leszkowicz et al., 1999**) (Figure 03). Plus deux formes supplémentaires : M1 et M2 (qui peuvent être formées à partir des aflatoxines B et G).

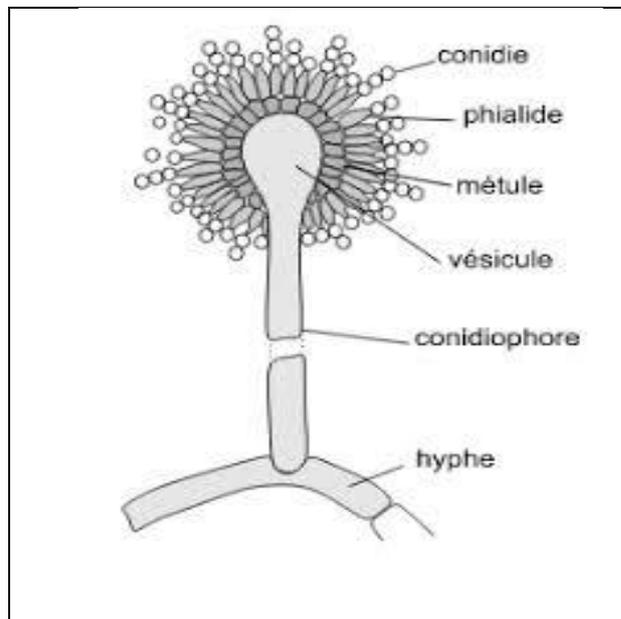
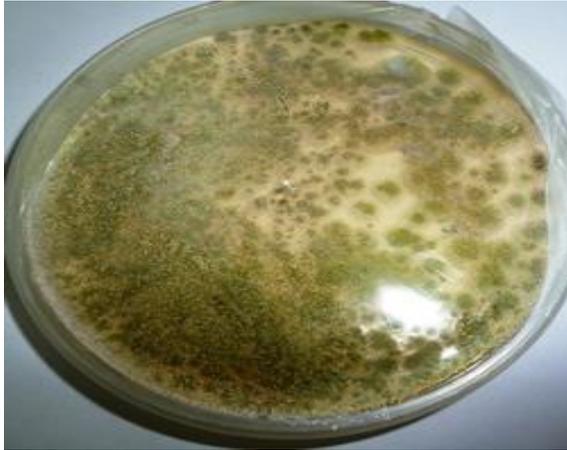


Figure 1 : Structure typique d'un *Aspergillus* (Varga et al., 2015).



**Figure 2:** *Aspergillus flavus*  
(El Khoury et al, 2011).



**Figure3 :** *Aspergillus parasiticus*  
(El Khoury et al, 2011).

### 3.3. Structure chimique de l'aflatoxine

Les aflatoxines sont des molécules ne contenant pas d'azote, elles sont synthétisées uniquement à partir d'acétate par la voie métabolique qui conduit aux stérols. Elles présentent une ressemblance très grande avec certaines hormones stéroïdes. Ce sont des dérivés coumariniques, de structure extrêmement active sur le plan biologique, et elles en possèdent la fonction lactone. Cette fonction est facilement hydrolysée en milieu alcalin. Elles possèdent un groupement bifurannique qui se retrouve dans beaucoup d'autres toxines mycéliennes, et qui constitue une structure plane à une extrémité de la molécule. Ce groupement permet des interactions spécifiques avec certains constituants cellulaires et son ouverture abolit la toxicité (Frayssinet et Fremy et al., 1999).

**-La formule brute de chaque type d'aflatoxine (IARC Monograph et al., 2002) :**

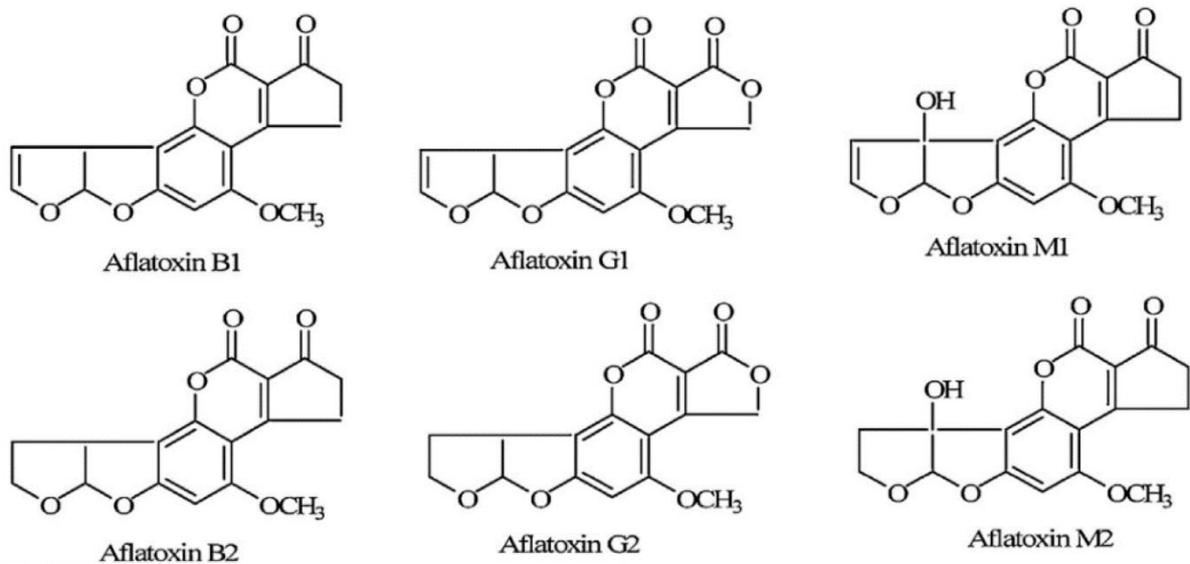
**AFB1 :** formule brute :  $C_{17}H_{12}O_6$  Masse molaire : 312,3 g/mol

**AFB2 :** formule brute :  $C_{17}H_{14}O_6$  Masse molaire : 314,3 g/mol

**AFG1:** formule brute :  $C_{17}H_{12}O_7$  Masse molaire : 328,3 g/mol

**AFG2 :** formule brute :  $C_{17}H_{14}O_7$  Masse molaire : 330,3 g/mol

**AFM1 :** formule brute :  $C_{17}H_{12}O_7$  Masse molaire : 328,3 g/mol



**Figure 4:** Structure des aflatoxines (Frayssinet et Fremy et al., 1999).

### 3.4. Propriété physicochimique de l'aflatoxine

Les aflatoxines sont des molécules stables et très résistantes aux différents procédés de transformation alimentaire tels la torréfaction, l'extrusion et la cuisson (Marin et al., 2013). En effet, la décomposition des aflatoxines a lieu à de très hautes températures qui sont difficilement compatibles avec les procédés de fabrication ou de transformation des aliments. Par exemple, l'AFG2 est dénaturée à partir de 237°C, l'AFG1 se décompose entre 244-246°C, tandis que l'AFB1 et l'AFB2 s'avèrent être encore plus résistantes, se décomposant respectivement à partir de 268-269 et 286-289°C (IARC Monograph et al., 2002) (Tableau 02).

**Tableau 2 :** Principales caractéristiques des quatre Aflatoxines majeurs (Andrian et al., 1996).

Caractéristique	Aflatoxines			
	B1	B2	G1	G2
Poids moléculaires (g /mol)	312	314	328	330
Température de fusion (°C)	268-269	286-289	244-250	237-240
Pouvoir rotatoire (mL/g/dm)	-560°	-465°	-545°	-475°
Fluorescence en ultra-violet (nm)	Entre 0.7 et 0.55	Entre 0.7 et 0.55	Légèrement moindre Que celui des B	

Les aflatoxines sont des cristaux incolores ou jaune pâle-fluorescents de façon très intense sous une lumière ultra-violette. Les aflatoxines B1 et B2 émettent une fluorescence bleue les aflatoxines G1, G2, une fluorescence vert jaune. Ces couleurs de fluorescence sont l'origine du nom des mycotoxines (B pour *Blue* et G pour *Green*). L'aflatoxine M1 présente une fluorescence bleu-violette sous irradiation ultra-violette. Le M vient de *Milk*, car ce métabolite a été tout d'abord isolé du lait (Doriane Gouas et al., 2009).

### 3.5. Biosynthèse de l'aflatoxine

Les processus complexes impliquant des réactions multienzymatiques sont utilisés pour la biosynthèse des aflatoxines. Biosynthétique d'aflatoxine La voie commence par la détection des structures des toxines. Inversement, au niveau moléculaire, les principales étapes biochimiques et les constituants génétiques ultérieurs de la biosynthèse des aflatoxines n'ont été éclairés que dans la dernière décennie (Bhatnagar et al., 2002; Yu et al., 2003).

En général, les gènes de biosynthèse de l'aflatoxine d'*A. parasiticus* et d'*A. flavus* sont significativement homologues et la disposition des gènes au sein du cluster étant le idem (Yu et al., 1995). Minto et Townsend (1997) ont déterminé que les aflatoxines sont synthétisées en deux étapes à partir du malonyl CoA, premier avec la formation d'hexanoyl CoA, et dernièrement avec la formation d'une anthraquinone décahéride. Pour le transfert de acétyl coenzyme A (acétyl CoA) à ses produits ultimes, qui est, AFB1, AFB2, AFG1 et AFG2, au moins 18 étapes enzymatiques sont nécessaires (Yabe et Nakajima et al., 2004; Roze et al., 2007). De nombreux gènes codant pour les enzymes et la transcription les facteurs ont été clonés et caractérisés. Ils sont situés au sein d'un énorme groupe de gènes d'environ 70 kb dans les génomes d'*A. parasiticus* et *A. flavus*. Le sens de chaque transcription est unique dans

chaque gène (Woloshuk et Prieto et al., 1998; Brown et al., 2001; Schmidt-Heydt et Geisen et al., 2007) et les structures de Les grappes de gènes chez *A. flavus* et *A. parasiticus* sont pour la plupart même. Le groupe de gènes de l'aflatoxine et a la biosynthèse a été présentée sur la Figure dissous (Yabe et Nakajima et al., 2004). Yabe et al., (1999) et Yabe et Nakajima (2004) présentent le schéma actuellement accepté pour biosynthèse de l'aflatoxine qui est: précurseur de l'hexanoyl CoA -> acide norsolorinique, NOR -> moyennine, AVN -> hydroxyaverantine, HAVN -> moyfine, AVF -> hydroxyversicolorone, HVN—> acétate hémiacétalique versiconal, VHA -> versiconal, VAL -> versicolorine B, VERBE -> versicolorine A, VERA Déméthyl-stérigmatocystine, DMST -> stérigmatocystine, ST—> O-méthylstérigmatocystine, OMST—> AFB1 et AFG1.

Les métabolites secondaires sont naturels de bas poids moléculaire produits à distribution taxonomique restreinte, souvent synthétisés Après l'arrêt de la croissance active

du champignon, le  $\beta$  lactame antibiotique pénicilline, synthétisée par un peptide non ribosomal synthétase, ainsi que polycétides aflatoxine et stérigmatocystine synthétisés par une voie polykétide, font partie des Les métabolites secondaires fongiques les mieux étudiés (L ori et al., 2003). La découverte que les gènes impliqués dans les métabolites secondaires

La production est regroupée, tout comme les gènes qui codent pour la production de la majorité des autres métabolites secondaires qui ont été étudié, a des implications importantes pour la régulation des gènes et évolution. Gènes de voie de biosynthèse putatifs pour le secondaire Le métabolisme peut être facilement détecté par une analyse in silico de la génomique donnée (Keller et al, 2005).

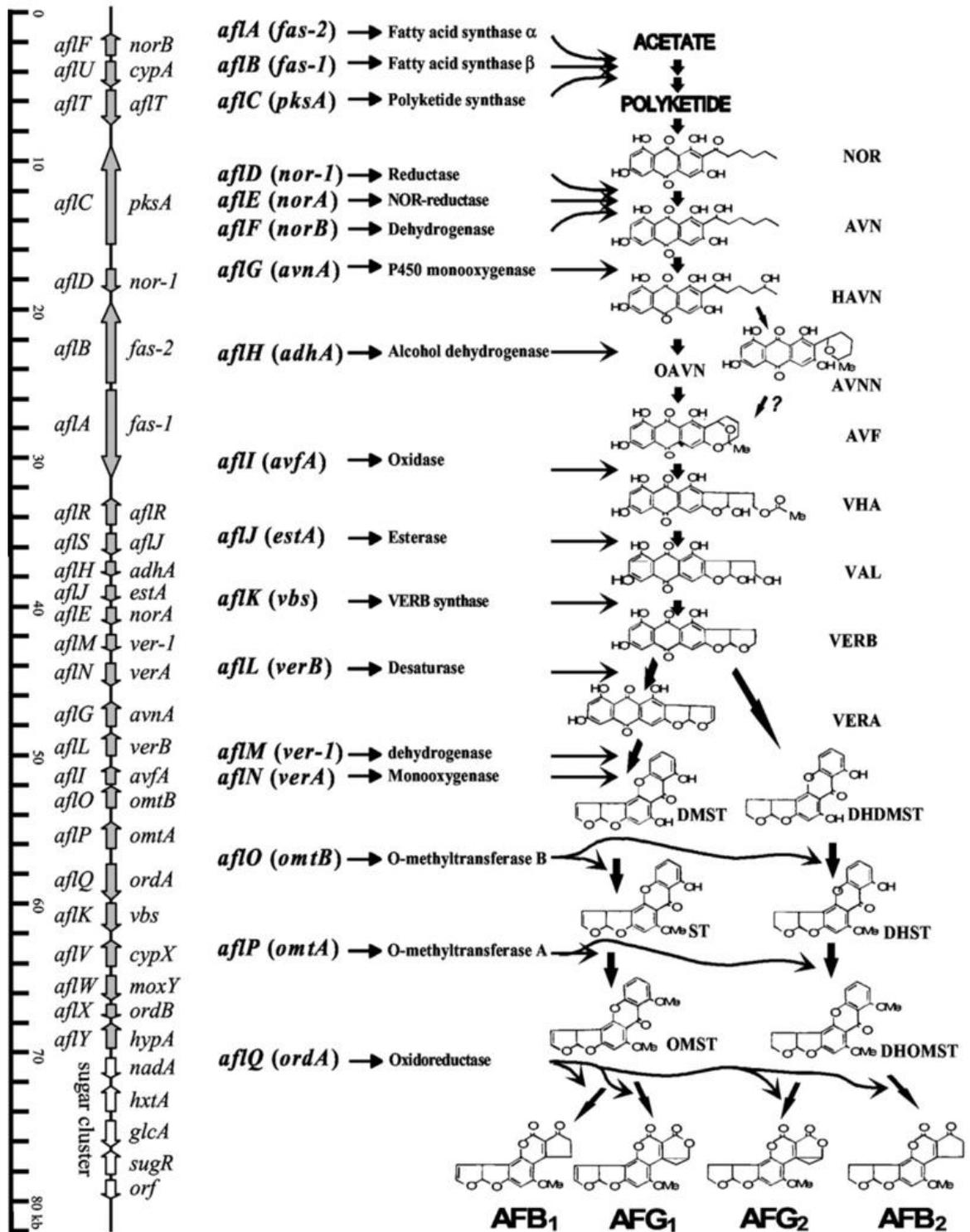


Figure 5 : les voie de biosynthèses d'Aflatoxine, (Yabe et Nakajima et al., 2004).

### 3.6. Facteurs influençant la biosynthèse d'aflatoxines

La prolifération des moisissures et la synthèse des mycotoxines peuvent avoir lieu avant ou après la récolte, durant l'entreposage, le transport ou la transformation du produit (ANONYME, 1997). Il s'agit d'un phénomène d'une grande complexité qui dépend d'une combinaison des facteurs température et humidité ainsi que de l'oxygénation au niveau du substrat. Les stress thermique, hydrique (sècheresse) et physique (lésions causées par les insectes) favorisent la contamination par les moisissures et la synthèse de mycotoxines (Pfohl-Leszkowicz et al, 2002 ; Nesci et Etcheverry et al., 2006).

Les conditions les plus favorables pour le développement d'*A. flavus* et la production d'aflatoxines sont :

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

### 3.7. Méthodes d'extraction et de dosage des aflatoxines

Les mycotoxines spécifiquement les aflatoxines se retrouvent dans de nombreux aliments, ce qui en terme d'analyse correspond à une multitude de matrices complexes. Les protocoles destinés à la quantification des aflatoxines renferment systématiquement des étapes préliminaires de préparation des échantillons (broyage, centrifugation, extraction en milieu organique). Souvent longues et manuelles, ces étapes doivent être optimisées pour chaque type de matrice (échantillon). Dans les aliments les aflatoxines sont souvent sous forme de traces, c'est-à-dire en quantité minime (ppm), soit inférieure au µg/kg. Ainsi il existe toute une panoplie de méthodes d'analyses ; on peut citer la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Cette dernière peut être

couplée à différentes méthodes de détection qui permettent aussi bien l'identification que la quantification des aflatoxines. Ces dernières années, l'analyse par spectrométrie de masse s'est accrue avec le développement de techniques d'ionisation dites « douces » : l'électrospray (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) qui ont en outre permettent l'analyse de très faibles quantités d'échantillons. Ces techniques sensibles sont excessivement coûteuses et elles nécessitent un personnel qualifié (**Saqer et al., 2009 ; Monbaliu et al., 2009**).

D'autres méthodes plus récentes utilisent le principe de l'immunoanalyse type ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) autorisent suivant leur configuration soit une détection de type présence ou absence (résultat qualitatif), soit une détection semi-quantitative ou quantitative de la mycotoxine (**Sung-Hye Cho et al., 2008 ; Nicholas et al., 2009 ; Yun Tan et al., 2009**).

### **3.8. Aflatoxine et les produits contaminés**

La présence des aflatoxines dans l'alimentation humaine et animale est le résultat d'une contamination par des espèces fongiques aflatoxinogènes. Le taux et le degré de contamination dépendent étroitement de la température, de l'humidité et des conditions de stockage. Les aflatoxines sont couramment rencontrées sur les cultures dans les champs avant la récolte dans les pays chauds et humides. La contamination après la récolte et/ou pendant le stockage est également possible, si le séchage des cultures est retardé. Elles contaminent surtout les arachides, les pistaches, les amandes, mais aussi les graines de coton et de tournesol, ainsi que certaines céréales (maïs, blé, sorgho) et leurs produits dérivés. Les aflatoxines peuvent également être retrouvées dans les épices (piment rouge, poivre), les fruits secs et le tabac (**Vargas et al., 2001**).

L'aflatoxine M1, dérivé de L'AFB1, peut être retrouvée dans le lait et ses dérivés issus d'animaux consommant des aliments contaminés par l'AFB1. L'accumulation des aflatoxines dans les viandes et les produits de charcuteries semble être peu probable (**Pfhol-Leszkowicz et al., 1999**).

#### **3.8.1. Contamination du lait par l'aflatoxine M1**

Le lait et ses produits dérivés sont particulièrement prédisposés à la contamination par l'AFM1 et sont considérés comme présentant certains risques pour la santé humaine. Par conséquent, le lait présente le plus grand potentiel avéré d'introduction de résidus d'aflatoxine dans l'alimentation humaine (**Campagnollo et al., 2016**).

Le lait est plus susceptible de transmettre les résidus d'aflatoxine des tissus animaux vers l'alimentation humaine. En outre, les enfants dépendent principalement du lait dans leur nutrition, et sont de ce fait, plus vulnérables que les adultes. Ainsi, l'hygiène alimentaire dans les produits laitiers est principalement perturbée par la prévalence de la « toxine du lait » ou de l'AFM1 dans le lait et ses produits dérivés (Mohammadi et al., 2017).

### **3.9. Toxicocinétique des aflatoxines (ADME)**

D'après Turner (1971), la toxicocinétique comporte les étapes suivantes :

**3.9.1. L'absorption :** L'absorption des AF est possible par voie orale et trachéale. Elle est relativement rapide et s'effectue au niveau de l'intestin grêle, plus précisément au niveau du duodénum. Les toxines sont ensuite transportées dans l'organisme grâce au phénomène de fixation aux protéines plasmatiques, notamment à l'albumine.

**3.9.2. La distribution :** La distribution de l'aflatoxine, par exemple, a lieu principalement au niveau du foie via la veine porte. Elle s'effectue à partir du plasma sanguin vers les hépatocytes, par un processus de diffusion passive à travers les membranes cellulaires. La distribution au sein même de la cellule se fait essentiellement au niveau du noyau, du réticulum endoplasmique, du cytosol et des mitochondries.

**3.9.3. Le métabolisme :** Le métabolisme hépatique de l'aflatoxine se produit en deux étapes. La phase I s'effectue par l'intermédiaire des cytochromes hépatiques P450 (CYP450). Sous l'action des CYP450, notamment le cytochrome P1A2 (CYP1A2), l'AFB1 donne par hydroxylation l'AFM1 et par époxydation l'AFB1-8,9-époxyde, le métabolite le plus toxique.

**3.9.4. L'élimination :** L'élimination est principalement biliaire. Elle représente environ 50 % de la dose excrétée chez la plupart des espèces animales, tandis que la voie urinaire représente 15 à 25 % de la dose ingérée.

### **3.10. Toxicité des aflatoxines**

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

**3.10.1 Toxicité aiguë**

La toxicité aiguë se caractérise par la dose létale DL50 qui correspond à la concentration capable d'entraîner la mort de la moitié de la population testée. Concernant les aflatoxines, ce type de toxicité est moins fréquent chez l'homme que chez les animaux. Chez le caneton, la DL50 des AFB1, AFB2, AFG1 et AFG2 est respectivement de l'ordre de 0,36, 0,78, 1,70 et 3,44 mg/kg (**Hussein et Brasel et al., 2001**).

**3.10.2 Toxicité chronique**

La toxicité chronique des aflatoxines survient après l'ingestion répétée de doses très faibles. Ce type de toxicité peut apparaître aussi bien chez l'homme que chez l'animal. Des études épidémiologiques menées dans le Sud-est asiatique et en Afrique ont démontré que les cancers hépatiques sont beaucoup plus fréquents chez certains groupes de la population humaine dont le régime alimentaire est élevé en aflatoxines. D'après **Hussein et Brasel (2001)**, plus de 250 milles décès annuels sont recensés en Chine et en Afrique subsaharienne et qui sont causés par des carcinomes hépatocellulaires attribués aux facteurs de risques comme l'ingestion journalière élevée en aflatoxines qui atteint 1,4 µg/kg et l'incidence du virus de l'hépatite B (VHB). Selon **Herrman et Walker (1999)**, la virulence des aflatoxines chez des individus porteurs du VHB est nettement plus élevée que chez ceux qui ne le sont pas. L'AFB1 et le VHB peuvent agir en synergie, l'infection par le VHB induit les enzymes activatrices de l'aflatoxine en augmentant son pouvoir cancérogène potentiel (**Chen et al., 2001**).

**3.10.3. Hépto-toxicité**

En raison de ses capacités de bio activation, le foie est la cible principale des aflatoxines. La principale conséquence d'une intoxication grave par l'AFB1 est la nécrose hépatique qui se traduit par une forte augmentation des transaminases plasmatiques. Cette nécrose est associée à une infiltration de cellules inflammatoires. La réduction du nombre d'hépatocytes et leur dysfonctionnement provoquent une stéatose et une cholestase avec l'augmentation des taux plasmatiques en bilirubine, phosphatases alcalines (PAL) et  $\gamma$ -glutamyl transférases ( $\gamma$ -GT).

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

contre l'hépatite B n'est pas appliquée de façon systématique pour des raisons économiques et /ou politique.

#### **3.10.4. Hémato-toxicité**

L'AFB<sub>1</sub> exerce des effets hématotoxiques secondaires se caractérisant par des altérations dans les fonctions de la moelle osseuse (une myélotoxicité qui affecte les lignées des granulocytes et monocytes) et l'anémie consécutive à une aflatoxicose serait due à une aplasie médullaire et une hémolyse mais aussi à une diminution de l'absorption de fer.

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

#### **3.10.5. Mutagénicité**

L'AFB<sub>1</sub> n'est pas réactive ou mutagène par elle-même, mais elle peut être activée en un époxyde très électrophile qui peut former des adduits à l'ADN. Ces adduits génèrent une mutation qui se situe sur le codon 249 et qui pourra être le point de départ d'un processus de cancérogenèse hépatique. Des résultats *in vivo* ont montré que l'AFB<sub>1</sub> provoque très fréquemment cette mutation (**Aguilar et al, 1993**). D'autres études effectuées sur le rat ont montré également que l'aflatoxine se lie à l'albumine plasmatique (**Wild et al, 1986**).

#### **3.10.6. Tératogénicité**

L'AFB<sub>1</sub> peut aussi traverser la barrière placentaire et donc contaminer les foetus in utero. Des adduits aflatoxine-albumine (AF-ALB) ont été identifiés dans le sang des mères et celui du cordon ombilical de nouveaux nés en Afrique (**Wild et al., 1991**). L'enzyme CYP3A7 qui est la forme majeure de cytochrome P450 présente dans le foie foetal humain, est également capable de transformer l'AFB<sub>1</sub> en son dérivé 8,9-époxyde (Wild et Turner, 2002), induisant ainsi l'apparition d'effets tératogènes et des malformations congénitales (**Bbosa et al., 2013**).

## **4. L'ochratoxines**

Les ochratoxines A (OTA), B (OTB) et C (OTC) sont des métabolites secondaires issus de micromycètes mais ne possèdent pas toutes une activité toxicologique et une fréquence de contamination importante (**Helher et al., 1998 ; Biro et coll., 2002**). Seule l'ochratoxine A a démontré une toxicité cellulaire et une grande fréquence de contamination tandis que OTB (moins toxique que OTA (**Moss et al., 1996**) et OTC (absence de toxicité) sont peu rencontrées dans l'alimentation.

L'ochratoxine A fait partie d'une famille de mycotoxines comprenant les ochratoxines B et C qui sont respectivement l'analogue déchloré et l'ester éthylique. L'acide carboxylique d'isocoumarine (ochratoxine a) et son analogue déchloré. De ce fait, ce travail se polarisera sur l'ochratoxine A.

### **4.1. Définition de l'Ochratoxine A**

L'OTA a été originellement découverte en 1965 par une équipe de chercheurs Sud Africains au cours d'une recherche systématique destinée à la découverte de nouveaux mycotoxines (**Van der Merwe et al., 1965**). Le premier champignon classé ochratoxinogènes est *Aspergillus ochraceus*, mais plus tard, des études plus pointues ont montré que plusieurs espèces au sein des genres *Aspergillus* et *Penicillium* appartiennent aussi à cette catégorie (**Horie et al., 1995 ; Abarca et al., 1994 ; Ciegler et al., 1972**).

### **4.2. Souches fongiques productrices d'ochratoxine A**

#### **4.2.1. Genre *Aspergillus***

L'OTA a été découverte par Van der Merwe dans de la semoule de maïs inoculée avec *Aspergillus ochraceus* (**Van der Merwe et al., 1956**). L'OTA est également produite par *Aspergillus niger* (**Abarca et al., 1994**) L'OTA est produite aussi par *Aspergillus carbonarius* dans les raisins et les fruits similaires qui mûrissent au soleil et à des températures élevées (**Pitt et al., 2002**). En 2004, *Aspergillus* section *Circumdati* *A.westerdijkiae* et *A. steyniiont* été découvertes et isolées du café. **Samson et al. (2004)** ont également découvert que *Aspergillus* section *Nigri*, *A. lacticoffeatus* et *A. sclerotioniger* produisent aussi de l'OTA dans le café. La production d'OTA par *Aspergillus tubingensis* dans les raisins a été découverte pour la première fois en 2005.

4.2.2. Genre *Penicillium*

*Penicillium viridicatum*, qui est aussi une productrice d'OTA, a été isolé par **Walbeek et al.** Pour la première fois en **1969**. Dans les céréales, on trouve *P. verrucosum* qui est capable de produire de l'OTA dans les zones froides, entre le nord et le centre de l'Europe et au Canada (**Pitt et al., 2002**). En 2001, *Penicillium nordicum* été confirmée comme deuxième espèce de *Penicillium* produisant de l'OTA après *P. Verrucosum* (**Larsen et al., 2001**). Les OTA qui sont trouvées dans les matières d'origine végétale sont presque toujours produites par *P. verrucosum*, alors que les OTA qui sont trouvées dans la viande ou le fromage sont produites par *P. Nordicum* (**Larsen et al., 2001 ; Bogs et al., 2006**).

Les Tableaux suivant montrent l'identité actuelle des espèces *Aspergillus* et *Penicillium* qui sont capables de produire de l'OTA dans les aliments.

**Tableau 3:** Production d'OTA par les espèces d'*Aspergillus*. (**Bogs et al., 2006**).

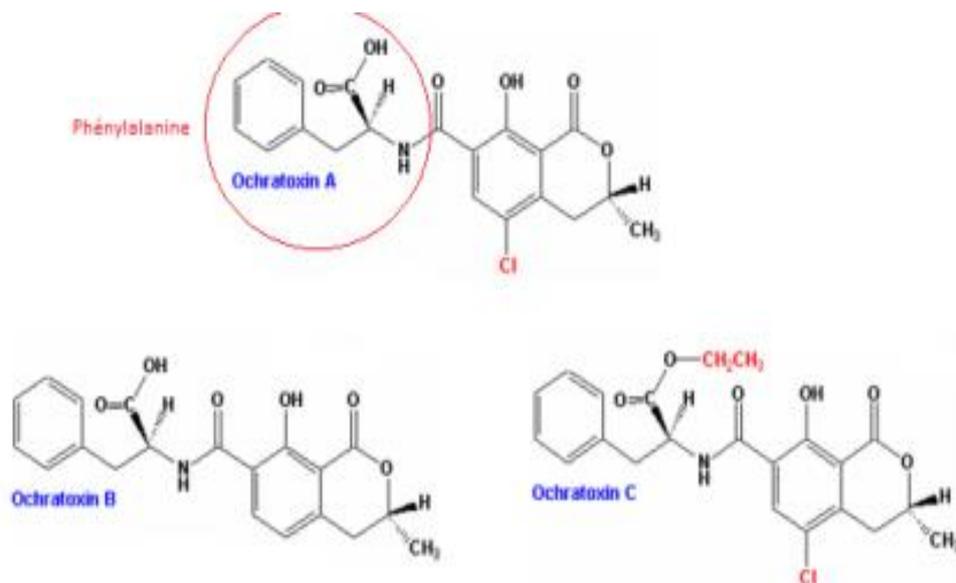
Genre	Sections	Espèces	Exemples des matrices alimentaires
<i>Aspergillus</i>	<i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceus</i>	Café et céréales
		<i>A. steynii</i>	Café et raisins
		<i>A. carbonarius</i>	Café
		<i>A. westerdijkiae</i>	Café
	<i>Nigri</i>	<i>A. niger</i>	Raisins
		<i>A. foetidus</i>	Raisins
		<i>A. lacticoffeatus</i>	Café
		<i>A. sclerotiumiger</i>	Café
		<i>A. tubingensis</i>	Raisins

**Tableau 4:** Production d'OTA par les espèces de *Penicillium* (Bogs et al., 2006).

Genre	Séries	Espèces	Exemples des matrices alimentaires
<i>Penicillium</i>	<i>Verrucosa</i>	<i>P. verrucosum</i>	Céréales
		<i>P. nordicum</i>	Fromage et viande

**4.3. Structure chimique et physique**

Jusqu'à présent, il existe trois ochratoxines appelées OTA, OTB et OTC naturelles reconnues, désignées par A, B et C. La Figure 6 présente la structure générale commune à ces différents métabolites et le Tableau 5 montre la composition caractéristique de chacune d'elles (El Khoury et al., 2010).



**Figure 6 :** Structure chimique de l'OTA. Schéma adapté et modifié d'El Khoury and Atoui (2010).

**Tableau 5:** Composition caractéristique des Ochratoxines (El Khoury and Atoui et al., 2010).

Nom	Abréviation	R1	R2	R3	R4	R5
Ochratoxine A	OTA	Phénylalanine	Cl	H	H	H
Ochratoxine B	OTB	Phénylalanine	H	H	H	H
Ochratoxine C	OTC	Éthyl-ester, Phénylalanine	Cl	H	H	H

L'OTA est la toxine la plus répandue de ce groupe (Bayman et al., 2006). Elle est chlorée en R2, tandis que l'Ochratoxine B et C (l'ester éthylique de l'OTA) sont moins toxiques et moins communes. Le nom chimique de l'OTA est L-phénylalanine-N- [(5-chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-méthyl-1-oxo-1H-2-benzopyrane-7-yl) carbonyle]-(R). Ainsi que son nom IUPAC est N-[[[(3R) -5-chloro-8-hydroxy-3-méthyl-1-oxo-3, 4- dihydro1H- isochromen-7-yl]carbonyl-L-phénylalanine.

#### 4.4. Propriétés physiques et chimiques de l'ochratoxine

À la température ambiante et sous une lumière normale, c'est un acide organique faible (Kuiper-Goodman et Scott, 1989, Bredenkamp et al., 1989) . l'OTA est un cristal incolore mais sous une lumière UV, cette molécule émet une fluorescence verte intense dans un milieu acide, et bleue dans un milieu alcalin (Budavari et al., 1989). Dans des solutions à pH acide et neutre, l'OTA est soluble dans des solvants organiques polaires (alcool, cétones, chloroforme), très peu soluble dans l'eau mais complètement insoluble dans les hydrocarbures saturés. Néanmoins, dans les solutions à pH basique, cette molécule est soluble dans une solution de bicarbonate de sodium (solution aqueuse) et dans toutes les solutions basiques.

**Tableau 6:** Propriétés chimiques et physiques les plus importantes de l'OTA.  
(Budavari et al., 1989).

<b>Masse moléculaire</b>	403,81 g/mol
<b>Constante de dissociation</b>	Acide organique faible (7,1)
<b>Structure</b>	Cristal incolore
<b>Solubilité</b>	pH neutre et acide : soluble dans les solvants organiques polaires (alcools, cétones, chloroforme). pH alcalin : soluble dans toutes les solutions alcalines en général.
<b>Stabilité</b>	Haute stabilité: résistance aux acides et à la température moyenne
<b>Fluorescence</b>	Milieu acide : Verte Milieu alcalin : Bleue

#### 4.5. Biosynthèse de l'ochratoxine A

L'ochratoxine A est composé de 2 éléments distincts, la L-B-phénylalanine et l'ochratoxine a. La L-B-phénylalanine est synthétisée par la voie shikimique des acides aminés. L'administration de précurseurs marqués au  $^{14}\text{C}$  et la méthode de dégradation chimique ont permis d'élucider la synthèse de l'ochratoxine a. Il s'agit de cinq unités acétate et d'une addition de carbone en C-7 provenant de la méthionine et formant un cycle dihydrocoumarinique (Searcy et al., 1969 ; Steyn et al., 1970). La figure 7 montre les différentes étapes de la synthèse de l'OTA.

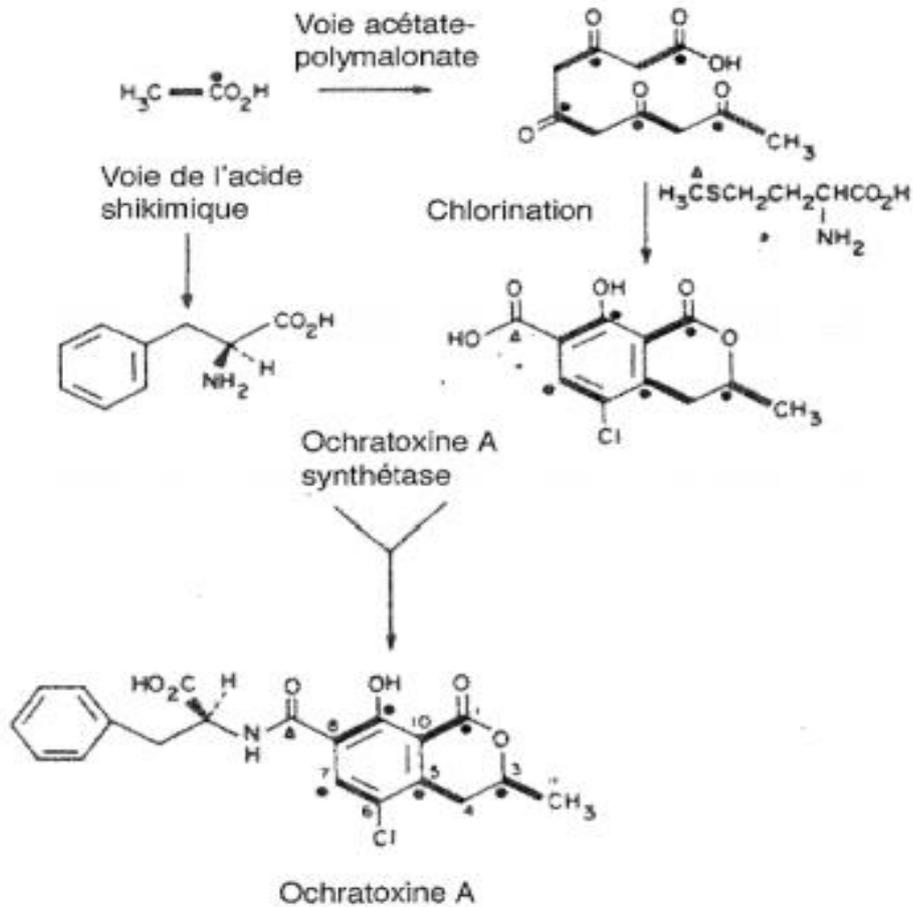


Figure 7: Voie biochimique de la synthèse de l'ochratoxine A (Steyn et al., 1984).

#### 4.6. Facteurs influençant la biosynthèse de l'OTA

##### 4.6.1. Activité en eau et température.

L'activité en eau ( $a_w$ ) et la température sont les éléments déterminants dans la production d'ochratoxine A. Le tableau 7 donne les concentrations d'OTA produites par les souches fongiques en fonction de ces deux paramètres.

**Tableau 7:** Production d'ochratoxine A en (mg/kg) par *Aspergillus ochraceus* Wilhem pour diverses valeurs  $a_w$  et de température après 2 semaines d'incubation (d'après Bacon et coll et al., 1973).

Activité en eau ( $a_w$ )	Production d' OTA (mg/kg) à 15 °C	Production d'OTA (mg/kg) à 22°C	Production d'OTA (mg/kg) à 30°C
0,852	0	0	50
0,901	0	46	111
0,953	36	201	302
0,997	81	156	218

Dans les régions froides, l'ochratoxine A est plutôt produite par *P. viridicatum* alors que dans les régions chaudes, ce seraient plutôt les *Aspergillus* qui la produisent (Krogh et al., 1987 ; Pittet et al., 1998 ; Corn. du codex alimentarius et al., 2002a). Dans des conditions de stockage, les espèces *Eutorium*, *Aspergillus* et *Penicillium* sont les plus fréquemment rencontrées. *Eurotium* et *Aspergillus* sont les plus tolérantes vis-à-vis des conditions de stockage, et l'humidité relative pour leur croissance est de 14-15 % dans les petites graines (blé, avoine, orge et seigle) à une température comprise entre 20 et 35 °C (Corn. du codex alimentarius et al., 2002a).

*Penicillium sp.* Nécessite une humidité relative plus élevée pour croître, l'humidité minimum étant par exemple de 16-17 % pour *P. verrucosum*. Quant à la production d'ochratoxine A, elle débiterait dès que l'humidité relative dépasse d'un pour cent celle nécessaire à la croissance fongique (Jonsson et Petterson et al., 1999).

#### 4.6.2. pH

La production d'ochratoxine A se fait surtout sur des denrées modérément acides. En effet, le pH optimum de production d'ochratoxine A se situe vers 5,6 pour *Aspergillus ochraceus* et *Penicillium verrucosum*. Lai et coll. (1970) donne un pH optimum de 6,0 - 6,3 pour la production d'ochratoxine A par *Aspergillus sulphureus* (Fresenius) Thom et Church.

**4.6.3. Les nutriments**

La présence des micronutriments cités ci-dessous influence plus la production de l'ochratoxine A plutôt que la croissance du mycélium (**Lia et al., 1970**).

Les différents sucres sont une source très importante de carbone. La production d'OTA est maximale avec le glucose et le saccharose, mais décroît avec le mannose, le galactose, la xylose, le maltose et l'arabinose. La croissance du mycélium, liée avec la production d'ochratoxine A, est nulle en présence de lactose (**Lia et al., 1970**).

Une meilleure production de mycotoxine est observée lors d'un apport en soufre sous forme de  $SO_4^{2-}$ ,  $SO_3^{2-}$ ,  $S_2O_4^{2-}$ , méthionine ou cystéine plutôt que sous forme de  $S^{-2}$  ou  $S_2O^{2-}$ . L'apport de magnésium ( $MgSO_4$ ) est suffisant à une concentration de 300 mg/l (**Lia et al., 1970**). L'apport de 100 mg/l de potassium (KCl) et de 25 mg /l de phosphore ( $KH_2PO_4$ ) induit une production maximum d'ochratoxine A alors que le tiers de cette concentration suffit pour une bonne croissance mycélienne.

Certains éléments comme le fer, zinc, cuivre, molybdène et bore sont nécessaires pour la production du mycélium et de cette mycotoxine chez *Aspergillus ochraceus* et melleus Yukawa alors qu'ils ne le sont pas avec *A. sulphureus* (**Steele et al., 1973 ; Aziz et Moussa et al., 1997**).

Des agents antimicrobiens utilisés contre *A. sulphureus* et *P. viridicatum* inhibent totalement la production d'OTA. Il s'agit du sorbate de potassium, du méthylparabène et du propionate de sodium (**Tong et Draughon et al., 1985**).

**4.7. Les méthodes de détection et de dosage de l'OTA**

Diverses méthodes (biologiques, physicochimiques et immunologiques) peuvent être employées dans la détection des mycotoxines dans les denrées alimentaires. La surveillance des niveaux de mycotoxines s'effectue avant et après leur stockage à l'aide de plans d'échantillonnage et d'essais appropriés régis selon la réglementation en vigueur. La directive (CE) n° 401/2006 de la Commission du 23 février 2006 fixe les modes de prélèvement d'échantillons et des méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des teneurs en mycotoxines dans les denrées alimentaires.

La quantification des mycotoxines renferme systématiquement des étapes préliminaires de préparation des échantillons (broyage, centrifugation, extraction en milieu organique). Diverses méthodes officielles de dosage sont disponibles pour la quantification de l'ochratoxine au niveau des céréales et les produits dérivés, dans le café, le vin et la bière.

Les méthodes extractives sont classiques et basées le plus souvent sur de l'extraction solide-liquide (échantillons solides) ou liquide-liquide (vin, bière) associant des solvants de natures très variables chloroforme-acide phosphorique, tert-butylméthyléther ou encore méthanol-eau. Toutefois, les colonnes d'immuno-affinité sont de plus en plus utilisées lors de l'extraction de l'OTA dans les denrées alimentaires (**Zöllner et Mayer-Helm, 2006**).

Des méthodes physicochimiques comme la chromatographie sur couche mince (**Ventura et al., 2005**), la chromatographie en phase gazeuse (Santos & Vargas, 2002) ou la chromatographie liquide à haute performance HPLC (**Ceci et al., 2007 ; Nguyen et al., 2007**) permettent la quantification des mycotoxines.(Tableau 08).

En raison de la propriété fluorescente de l'OTA, la technique sensible de chromatographie liquide haute performance couplée à la détection fluorimétrique (HPLC-FD) est la plus utilisée dans sa détection (**Frenette et al., 2008**). Le couplage chromatographie liquide – spectrométrie de masse (LC-MS) a été également procédé mais il n'améliore pas drastiquement la sensibilité, il délivre plutôt des signaux plus spécifiques confirmant davantage la présence de l'OTA dans une matrice alimentaire (**Valenta et al., 1998**). En revanche, le couplage chromatographie gazeuse – spectrométrie de masse (GC-MS) s'est avéré mal adapté à l'analyse de l'OTA (**Valenta et al., 1998**). (Tableau 08).

D'autres méthodes plus récentes sont utilisées telles que les techniques immunochimiques de type ELISA permettent une détection qualitative, semi-quantitative ou quantitative de la mycotoxine (**De Saeger et al., 2002**). (Tableau 08).

**Tableau 8 :** les avantages et inconvénients des méthodes pour l'analyse de l'OTA.

<b>Méthode</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
<b>TLC..</b>	Simple , Peu coûteux et rapide. Sensibles pour les aflatoxines et l'Ochratoxine A.	Mauvaise sensibilité pour certaines mycotoxines. Mauvaise précision. Qualitative seulement, nécessite un scanner pour la quantification
<b>GC</b>	Analyse simultanée de plusieurs mycotoxines. Bonne sensibilité. Peut-être automatisé.	Équipement coûteux. Expertise spécialisée nécessaire. Dérivatisation nécessaire.
<b>HPLC</b>	Bonne sensibilité. Une bonne sélectivité. Bonne répétabilité. Peut-être automatisé. Temps d'analyse courts.	Équipement coûteux. Expertise spécialisée nécessaire.
<b>LC/ MS</b>	Analyse simultanée de plusieurs mycotoxines. Bonne sensibilité. Non dérivatisation.	Cher car colonnes immunoaffinité nécessaires pour purifier les mycotoxines. Expertise spécialisée nécessaire.
<b>LC/MS-MS</b>	Analyse simultanée de plusieurs mycotoxines. Très bonne sensibilité. Non dérivatisation.	Expertise spécialisée nécessaire. Équipement cher.
<b>ELISA</b>	Préparation simple de l'échantillon. Équipement peu cher. Haute sensibilité. Adapté pour le criblage. Utilisation limitée de solvant organique.	Problèmes de la matrice d'interférence. Possibilité des faux résultats. Confirmation chromatographique nécessaire. Semi-quantitative.

**4.8. Contamination par l'ochratoxine A****4.8.1. Contamination des denrées d'origine végétale par l'ochratoxine A**

L'ochratoxine A est retrouvée essentiellement dans les céréales (blé, maïs, seigle, orge, avoine...), mais aussi dans le riz, le soja, le café, le cacao, les haricots, les pois, les cacahuètes et les fruits secs (figues, raisins). Elle est présente aussi dans les produits dérivés des céréales comme la farine, le pain, les pâtes (**Majerus et al., 1993**), dans la bière (**El-Dessouki et al., 1992**) et même dans le vin et les jus de raisin (**Zimerli, Dick et al., 1996**). Contrairement aux aflatoxines, retrouvée plus souvent dans des céréales issus des régions chaudes, l'ochratoxine A est retrouvée dans les céréales de toutes les régions car elle peut être produite par l'*Aspergillus ochraceus* dans les régions chaudes et par les *Penicillium* dans les climats tempérés.

L'ochratoxine A, se retrouve dans les aliments composés pour les animaux, conséquence d'utilisation de matières premières contaminées ou de mauvaises conditions de stockage. Cette mycotoxine a été retrouvée à des niveaux pouvant atteindre 30 µg/kg dans les aliments composés pour les porcs (**Dalcero et al., 2002**) et jusqu'à 25 µg/kg dans les aliments composés pour les porcs, les volailles et les lapins produits en Argentine (**Magnoli et al., 1998**).

Les produits alimentaires à base de céréales contiennent parfois de l'ochratoxine A ; les quantités retrouvées sont en générale faibles (**Ngundi et al., 2006**). Les *Aspergillus* et les *Penicillium* prolifèrent le plus souvent en surface des grains et une grande quantité de mycotoxine est éliminée pendant les processus technologiques.

Les figues et raisins secs (**Zinedine et al., 2007b ; Tjamos et al., 2006**), les arachides (**Zinedine et al., 2007b**), le café (**Fujii et al., 2006 ; Fazekas et al., 2002 ; Robledo et al., 2001**) sont souvent contaminés par l'ochratoxine A. On trouve aussi des petites quantités de cette mycotoxine dans les pommes de terre et les lentilles (**Baydar et al., 2005**).

L'ochratoxine A a aussi pu être retrouvée dans les abats et les viandes d'animaux recevant des aliments contaminés (**Jorgensen et al., 1998**). Elle a été mise en évidence dans le sang et les tissus des animaux d'élevages où elle s'accumule au niveau rénal et hépatique (**Terplan, Wenzel et al 1993 ; Mac Donald et al., 1993 ; Gareis et al., 1996**).

**4.8.2. Contamination des denrées d'origine animale par l'ochratoxine A**

L'OTA, bien que contaminant direct de végétaux tels que les céréales, se retrouve dans la viande et dérivés ainsi que dans les produits laitiers. C'est un mode de contamination indirecte qui passe par l'administration d'aliments contaminés (principalement des céréales moisis) aux animaux (**Kuiper-Goodmann, Scott et al., 1989**).

Il est rare de retrouver des traces d'ochratoxine A chez les ruminants car la mycotoxine est dégradée par la carboxypeptidase A dans le rumen (**Stoev et coll., 2002**). Lorsque le porc, animal monogastrique, souffre de néphropathie, 25 à 39 % des cas ont un taux d'OTA compris entre 2 et 100 µg/kg (**Krogh et al., 1992**). Après les néphropathies porcines danoises, les autorités ont mis en place une marche à suivre lors de changements macroscopiques de l'aspect des reins de porcs.

**4.8.3. Contamination humaine par l'ochratoxine A**

L'homme se contaminant exclusivement par son alimentation, il était logique de pratiquer des analyses sanguines, urinaires ou de lait maternel pour déterminer le taux moyen de contamination.

**4.9. Toxicocinétique de l'ochratoxine A**

L'OTA, une fois ingérée, est partiellement absorbée par la diffusion passive de la forme non ionisée au niveau du jéjunum proximal (**Kumagai et al., 1988**). La distribution de l'OTA se fait par voie sanguine où elle est liée à plus\_ de 99 % aux protéines plasmatiques (seulement 78% chez les poissons) (**Hagelberg et al., 1989**).

La distribution tissulaire de l'OTA est généralisée mais se retrouve en plus forte concentration dans certains organes cibles: reins (47%), foie (27%), autres (26%) (**Pfohl-Leskowicz et Castegnaro et al., 1999b**). Il a été démontré chez divers mammifères (rats et lapins) et chez l'être humain que cette mycotoxine passait facilement dans le lait maternel (**Ribelin et al., 1978; Skaug et al., 2001**). Par contre, chez les ruminants où la microflore du rumen métabolise l'OTA grâce à la carboxypeptidase A (**Stoev et al., 2002**), la mycotoxine se retrouve de ce fait en très faible quantité dans le lait.

L'OTA est principalement métabolisée en ochratoxine a mais aussi sous des formes hydroxylées (4-hydroxy-OTA et 10-hydroxy-OTA) qui ne présentent, ainsi que les autres métabolites, qu'une faible activité toxicologique ( **Xiao et al., 1996; Gross-Steinmeyer et al., 2002**).

Son élimination se fait par les urines (>50%) et les fèces selon la capacité du cycle entérohépatique et sa fixation aux protéines plasmatiques (**Kuiper-Goodman et Scott et al., 1989**). La demi-vie d'élimination varie donc en fonction de ces facteurs : 24 à 39 heures chez la souris, 55 à 120 heures chez le rat, 72 à 120 heures chez le cochon, 510 heures chez le macaque et 840 heures soit 35 jours chez l'homme (**Petzinger et Ziegler et al., 2000**).

#### **4.10. Toxicité de l'Ochratoxine A**

La toxicité de l'OTA est due à sa structure chimique : son atome de chlore et son groupement phénolique ainsi que sa partie isocoumarinique jouent un rôle important (**Xiao et al., 1996ab**). L'OTA a été impliquée dans plusieurs mécanismes toxiques, incluant des effets néphrotoxiques, mutagènes, tératogènes, neurotoxiques, hépatotoxiques, immunotoxiques et cancérigènes. En effet, l'OTA exerce de nombreux effets délétères sur différents organes : le rein est l'organe cible de l'action toxique de l'OTA mais celle-ci pourra également toucher le foie, le coeur ou les intestins (**Pfohl-Leszkowicz et al., 2002**).

##### **4.10.1. Toxicité aiguë**

La toxicité aiguë d'une substance implique les effets toxiques qui surviennent dans un temps court (24, 48, 72 heures jusqu'à 2 semaines) après administration d'une dose unique ou de doses répétées dans un temps bref. L'étude de la toxicité aiguë permet de calculer la dose létale 50 ou DL50, qui est la dose de la substance entraînant la mort de 50% des animaux traités.

##### **4.10.2. Toxicité chronique**

Les effets chroniques de l'OTA sont fréquents. Cette toxine s'est avérée néphrotoxique, hépatotoxique, tératogène et immunotoxique chez plusieurs espèces animales (**Petzinger et Ziegler et al., 2000; Walker et al., 2002**) et cancérigène chez la souris et le rat induisant des tumeurs rénales et hépatiques (**Boorman et al., 1989 ; Mantle et al., 2005**).

Chez les animaux atteints de néphropathie, les reins deviennent pâles et augmentent considérablement de taille (**Elling et al., 1985**). Kane et al. (1986) ont mis en évidence une augmentation significative dans l'urine de trois enzymes spécifiques (phosphatase alcaline, leucine aminopeptidase et  $\gamma$ -glutamyl transférase), chez des rats traités par gavage avec 290  $\mu\text{g}$  d'OTA/kg p.c., tous les 2 jours pendant 8 à 12 semaines. Des lésions dégénératives sur l'ensemble du système tubulaire ont été observées chez le rat après exposition sub-chronique à l'OTA par la voie orale (**AFSSA, 2006**).

En outre, l'OTA est considérée comme un cancérigène rénal suite à une exposition à long terme. Elle a été classée dans le groupe 2B « cancérogène possible pour l'homme » par L'Agence Internationale pour la Recherche sur le Cancer (**IARC, 1993**).

L'implication de l'OTA dans le développement de différents types de cancer à savoir les adénocarcinomes rénaux, le cancer des testicules et les tumeurs hépatiques a été rapporté chez le rat, la souris mais aussi chez l'homme (**Castegnaro et al., 1998**).

#### **4.10.3. Néphrotoxique**

L'OTA est potentiellement néphrotoxique chez tous les mammifères non ruminants (**Ribelin et al., 1978**). Cette mycotoxine est également associée à la néphropathie humaine (**Pfohl-Leskowicz et al., 2009**) et elle cause aussi la néphropathie endémique des Balkans (BEN) chez l'homme, une maladie rénale dégénérative chronique, et des tumeurs du rein affectant la population du sud-est de l'Europe (**Pfohl-Leskowicz, A et al., 2009**). L'OTA est également considérée comme la principale cause de la néphropathie tunisienne (**Grosso, F et al., 2003**).

#### **4.10.4. Tératogène**

Le mécanisme de la tératogénèse induite par l'OTA n'a pas été clairement défini jusqu'à présent. Mais plusieurs recherches ont montré que l'OTA peut traverser le placenta et s'accumuler dans les tissus fœtaux, provoquant diverses anomalies morphologiques. Des cas de dysmorphogénèse prénatale ont été rapportés chez les souris (**Hayes, A.W., R. Melton, et S.J. Smith, 1974**), les poulets (**Gilani, S.H., J. Bancroft, et M. Reily et al., 1978**), les rats et les hamsters (**Mayura, K. et al, 1984**).

#### **4.10.5. Hépatotoxicité**

A également pour cible le foie où elle sera bio transformée et détoxifiée (**Gareis et al., 1996**). L'OTA s'est montrée hépatotoxique aussi bien in vitro (**Hundhausen et al., 2005**) qu'in vivo (**Gagliano et al., 2006**). Au niveau des mitochondries hépatiques, l'OTA inhibe compétitivement la cytochrome C oxydase, la succinate déshydrogénase et l'ATPase (**Wei et al., 1985**).

L'hépatotoxicité induite par l'OTA semble être aussi due à l'altération de la balance oxydo-réductrice Revue bibliographique 18 (**Gagliano et al., 2006**). L'administration orale de l'OTA à des souris augmente l'incidence de tumeurs hépatiques (**Bendele et al., 1985**).

**4.10.6. Neurotoxique**

L'OTA semble d'être hautement toxique pour les cellules nerveuses et capable d'atteindre à tout moment le tissu neural (**Brown, M.H., G.M. Szczech, et B.P. Purmalis et al., 1976**). Il a été démontré que l'administration d'OTA à la gestation 38 chez le rat induisait de nombreuses malformations du système nerveux central (**Pfohl-Leskowicz et al., 1999**). En 2001, Soleas et al. ont rapporté que l'OTA peut être considérée comme une cause possible de certaines lésions (**Soleas, G.J., J. Yan, et D.M. Goldberg et al., 2001**).

**4.10.7. Immunotoxicité**

De nombreuses études ont montré que l'OTA est un puissant immunosuppresseur in vitro et in vivo (**Castegnaro, Pfohl-Leskowicz et al., 2002**). L'OTA peut inhiber la prolifération des lymphocytes périphériques T et B, abolir la production d'interleukine 2 et de ses récepteurs (**Lea et al., 1989**), diminuer la production d'anticorps (IgG, IgM, IgA) (**Muller et al., 1995**) et supprimer l'activité de cellules tueuses et la production d'interféron (**Luster et al., 1987**). En revanche, l'OTA semble exercer un effet immuno-stimulateur par l'induction de cytokines (médiateurs pro-inflammatoires) tel que le TNF $\alpha$  (Facteur de nécrose de tumeur) hépatique (**Weidenbach et al., 2001**).

**4.10.8. Toxicité cancérigène, génotoxique et mutagène de l'OTA**

Plusieurs études ont été publiées expliquant les modes d'action impliqués dans la toxicité et la cancérigénicité de l'OTA (**Schilter, B., et al., 2005**). Après de nombreuses recherches, la génotoxicité de l'OTA et son rôle dans la cancérigénicité ne sont pas très claires (**Kuiper-Goodman, T., et al., 2010**). Plusieurs auteurs et groupes d'experts ont conclu que l'OTA est génotoxique (**Russo, A., et al., 2010 ; Pfohl-Leskowicz, A, R.A. Manderville et al., 2012**). Cependant, d'autres auteurs indiquent qu'il est probable que l'OTA agisse par un mécanisme génotoxique direct (**JECFA, 2007**) et que sa cancérigénicité soit due à un mécanisme indirect, tel que l'induction d'un stress oxydatif (**Arbillaga, L., et al., 2007**). Enfin et après nombreuses preuves de l'effet carcinogène de l'OTA découvertes dans plusieurs études sur des animaux, le Centre International de Recherche sur le Cancer (IARC) a classé l'OTA comme cancérigène possible pour l'homme (groupe 2B) en 1993.

*Chapitre 02 :*  
*Détoxification*  
*d'aflatoxine et*  
*l'ochratoxine A*

### 1. Détoxification par microorganismes

#### 1.1. Détoxification par microorganismes contre l'aflatoxine

##### 1.1.1. Lutte par utilisation des bactéries ubiquitaires du sol

Des souches bactériennes bio-compétitives ubiquitaires du sol peuvent aussi être utilisées pour leurs effets antagonistes sur différentes espèces d'*Aspergillus* ainsi que d'autres champignons toxigènes (Shams-Ghahfarokhi et al., 2013 ; Tsitsigiannis et al., 2012). Ces bactéries, de distribution mondiale, appartiennent surtout aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas*, ainsi que *Agrobacterium* et *Streptomyces*. Ces espèces sont capables de produire des endospores et des composés bioactifs à large spectre d'activité rendant possible leur utilisation en tant qu'agents potentiels de bio contrôle (Shams-ghahfarokhi et al., 2013). C'est en 1988 qu'une souche de *Bacillus subtilis* a été identifiée comme ayant un effet inhibiteur sur le développement des souches d'*A. flavus* et d'*A. parasiticus* (Kimura and Hirano, 1988). Le métabolite actif, l'iturine A, a été breveté pour le contrôle des aflatoxines dans les céréales et graines oléagineuses (Mehdi RazzaghiAbyaneh, 2013). Il existe d'autres exemples de molécules actives d'origine bactérienne. Ainsi, les blasticidines A et S, l'aflastatine A et la dioctatine A sont des métabolites produits respectivement par des souches de *S. griseochromogenes*, *Streptomyces* sp. MRI142 et *Streptomyces* sp. SA-2581 et qui présentent toutes un effet anti-aflatoxinogène lié à une inhibition au niveau transcriptomique de la voie de biosynthèse de l'AF (Razzaghi-Abyaneh et al., 2010). Enfin, une souche de *Bacillus megaterium*, isolée de la mer jaune en Chine de l'Est, a été évaluée pour son potentiel à réduire l'altération liée à *A. flavus* sur des grains d'arachides après la récolte.

##### 1.1.2. Lutte par utilisation des bactéries lactiques

Parmi les souches bactériennes exerçant une inhibition sur la synthèse de mycotoxines, les bactéries lactiques (LAB) ont également démontré une efficacité à inhiber la production d'aflatoxines par *A. flavus* et *A. parasiticus*, in vitro. Les LAB sont des microorganismes largement utilisés dans les procédés fermentaires alimentaires et font également partie de la flore intestinale humaine normale (Dalié et al., 2010). Elles peuvent aussi se trouver dans le sol (Chen et al., 2005) et représenter des agents de bio-contrôle pour les cultures. Les espèces de LAB anti-mycotoxinogènes connues appartiennent aux genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella* (Ahlberg et al., 2015). En acidifiant le milieu, ces bactéries acquièrent une prédominance compétitive et épuisent les nutriments du milieu, bloquant ainsi la croissance d'autres espèces (De Muyne et al., 2004). De plus, des études ont démontré une diminution de la contamination par des mycotoxines, pouvant aller jusqu'à 50% pour les

## **Chapitre 02 : Détoxification d'aflatoxine et l'ochratoxine A**

aflatoxines (AFB1 et AFG1), dans les aliments fermenté par les LAB. Ce phénomène pourrait être lié à une dégradation de la toxine présente dans le milieu. Ainsi, les niveaux d'AFM1 dans le lait peuvent être réduits de 34% par fermentation et stockage de yaourts ayant un pH de 4 (**Juodeikiene et al., 2012**). Un traitement par une souche ou bien un mélange de plusieurs LAB (*Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc*) ainsi que d'autres bactéries produisant de l'acide acétique pourrait permettre une inhibition totale du développement d'*A. flavus* et donc éviter la production d'aflatoxines dans les aliments fermentés (**Ahlberg et al., 2015; Silva et al., 2015**).

### **1.2. Détoxification par microorganismes ou enzyme contre l'ochratoxine A**

L'OTA peut être également dégradée par les bactéries présentes dans le rumen des polygastriques, ce qui rend ces animaux plus résistants aux mycotoxines que les animaux monogastriques. A titre d'exemple, *Eubacterium* et *Acinetobacter calcoaceticus* se sont révélées capables de dégrader l'OTA en OT $\alpha$  (**Hwang & Draughon, 1994 ; Schatzmayr et al., 2005**). De même, des souches de *Rhizopus stolonifer* et *R. microsporus* peuvent dégrader l'OTA avec une efficacité pouvant atteindre 96% sur un blé humidifié (**Varga et al., 2005**).

Les bactéries lactiques (*Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Bifidobacterium*) et les levures (*Saccharomyces cerevisiae*), utilisées dans les procédés de fermentation agro-alimentaires, peuvent aussi décontaminer les denrées contaminées par les mycotoxines (**Varga et al., 2005**). L'OTA présente dans l'orge s'est retrouvée dégradée par fermentation éthanolique (**Karlovsky et al., 1999**). En revanche, l'OTA retrouvée dans le vin explique sa résistance au processus de fermentation (**Lopez de Cerain et al., 2002**).

Des enzymes naturelles ont également la capacité de dégrader l'OTA. La dégradation de l'OTA, en divers produits non identifiés, a été mise en évidence par des suspensions de cellules de blé, d'orge ou de maïs. Ces transformations enzymatiques incluent des réactions d'hydrolyse, de méthylation et d'hydroxylation qui conduisent parfois à une perte du potentiel toxique de la molécule (**Ruhland et al., 1996**). Une lipase, isolée à partir d'*Aspergillus niger* dégrade l'OTA en OT $\alpha$  (**Stander et al., 2001**). D'autres activités enzymatiques, ainsi que d'autres microorganismes, ont été caractérisés pour leur potentiel de dégradation de l'OTA.

### **2. Détoxification par utilisation des plantes médicinales contre l'aflatoxine et l'ochratoxine A**

#### **2.1. Généralité sur les plantes médicinales**

Dans le monde, les plantes médicinales ont toujours été utilisées comme médicaments. Ces derniers à base de plantes sont considérés comme peu toxiques et doux par rapport aux médicaments pharmaceutiques. Les industries pharmaceutiques sont de plus en plus intéressées par l'étude ethnobotanique des plantes (**Dibong et al., 2011**). Les plantes médicinales demeurent encore une source de soins médicaux dans les pays en voie de développement, en absence d'un système médical moderne (**Tabuti et al., 2003**).

Généralement ont utilisé les extraits des huiles essentielles des plantes pour lutter contre les intoxications induites par les mycotoxines (**Isman and Machial, 2006**).

##### **2.1.1. Les huiles essentielles**

Les huiles essentielles (HE) sont un mélange de composés volatils (métabolites secondaires) isolés des plantes essentiellement par hydro-distillation. Elles sont majoritairement constituées de mono- et sesquiterpènes mais peuvent aussi contenir des hydrocarbures non terpenoïdes, phenylpropanoïdes, esters, lactones, phthalides, des structures azotées ou sulfurisées et des isothiocyanates. il s'agit de composés lipophiles qui se distinguent par leurs propriétés aromatiques, d'où leur utilisation comme arômes ou parfums (**Chizzola et al., 2013**). Par ailleurs, certains composés sont également utilisés pour leurs nombreuses activités biologiques: bactéricide, insecticide et fongicide (**Isman et al., 2000**).

À la vue de leurs différentes propriétés biologiques, les HE ont été testées pour lutter contre les mycotoxines (**Abd ElAziz et al., 2015**). Les résultats de différentes études sont regroupés dans le Tableau 9. Ils montrent que de nombreuses huiles sont capables de bloquer la synthèse d'aflatoxine et l'ochratoxine A (**Tian et al., 2012**).

## **Chapitre 02 : Détoxification d'aflatoxine et l'ochratoxine A**

**Tableau 09** : Effet inhibiteur de quelques huiles essentielles sur la production des aflatoxines et l'ochratoxine A.

<b>Nom scientifique</b>	<b>Nom commun</b>	<b>Références</b>
<i>Cuminum cyminum</i>	Cumin	<b>(Kedia et al., 2014b)</b>
<i>Laurus nobilis</i>	Feuilles de Laurier	<b>(Atanda et al., 2007)</b>
<i>Mentha spicata</i>	Menthe	<b>(Snoussi et al., 2015)</b>
<i>Salvia officinalis</i>	les feuilles de la sauge	<b>(Pujuguet et al., 2008)</b>

### **2.3. Présentation et description botanique de quatre plantes utilisées dans cette étude**

#### **2.3.1. Cuminum cyminum**

Le cumin est une plante médicinale provient probablement du secteur méditerranéen. Cette plante a diverses propriétés médicinales, on peut citer : stomachique, diurétique, carminative, stimulante et antispasmodique (Minakshi-De, Amit Krishna De, Ranjana Mukhopadhy A Y, Arun Baran Benerjee et Manuel Miro et al., 2003) (figure 08).

##### **2.3.1.1. Classification (Quezel et santa et al ., 1963)**

**Règne** : Végétale

**Embranchement** : Spermaphytes

**Classe** : Dicotyledones

**Ordre** : Apiales

**Famille** : Apiaceae

**Genre** : *Cuminum*

**Espèce** : *Cuminum cyminum* L.

### 2.3.1.2. Les activités biologiques de *Cuminum cyminum L.*

#### 2.3.1.2.1. Activité antibactérienne

En 1994 Shetty, Singhal et Kulkarni ont rapporté que l'huile essentielle des graines de cumin a des propriétés antimicrobiennes (A. B. Hendrich et al., 2006) Sagdic et Ozcan ont testé in vitro, sur quinze bactéries l'activité antibactérienne des hydrosols de sieze épices (S. A. B. E.Van Acker et al., 1996) Les hydrosols du cumin ont été actifs, seulement sur *bacillus brevis*, *Entérobacter aerogenes* et *E.coli*.

L'huile essentielle du cumin a montré un effet antibactérien, plus fort que celui du romarin contre *E.coli*, *Staphylococcus aureus* et *listeria monocytogenes* (Z. Sroka et al., 2005).

L'étude in vitro, a montré une activité antifongique des hydrosols du cumin contre quelques mycètes de microbes pathogènes de plantes (C. Aliaga et al. 2004). O'Riordan et Wilkinson et al. 2002 ont constaté l'absence de la contamination par l'aflatoxine, dans les échantillons commerciaux du cumin.

#### 2.3.1.2.2. Activité anti-oxydante

Les huiles essentielles du romarin et du cumin ont montré des activités anti radicalaires et anti-oxydantes. Les résultats de l'essai de blanchissement du B-carotène ont été meilleurs que ceux de l'essai du balayage du radical libre 2-2diphénylpicrylhydrazyl (DPPH) 44.



**Figure 08 :** *Cuminum cyminum L.*

### **2.3.2. Mentha spicata**

Aujourd'hui, Le Menthe probablement la plus répandue et la plus célèbre de nos plantes médicinales et aromatiques.

Selon **Snoussi et al (2015)** *M. Spicata* a été utilisée traditionnellement pendant des siècles Comme plante médicinale pour :

- soigner les affections biliaires, la constipation et les maux de ventre, pour combattre la fièvre et les rhumatismes, (**Boukef et al., 1986**).
- les maladies gastro-intestinales et respiratoires, et comme carminatif, antispasmodique, diurétique et agents sédatifs, (**Snoussi et al., 2015**)
- La plante est employée comme aromatisant, pour parfumer le thé (**Boukef et al ., 1986**).

#### **2.3.2.1. Classification (Quezel et Santa et al. 1962)**

**Règne** : Plantae.

**Embranchement** : Embryophytes

**Classe** : Angiospermes

**Ordre** : Lamiales.

**Famille** : Lamiacées.

**Genre** : *Mentha*.

**Espèce** : *Mentha spicata*.

#### **2.3.2.2. Les activités biologiques de *Mentha spicata*.**

Divers études ont montré que le *Mentha spicata* L possède plusieurs activités biologiques, grâce à leur richesse en composés phénoliques et en huiles essentielles (**Abootalebian et al., 2016 ; Alace et al., 2016**).

### **2.3.2.2.1. Activité antimicrobienne**

Plusieurs études ont démontrées que l'huile essentielle de *Mentha spicata* possède une activité antimicrobienne contre des microorganismes pathogènes y compris des Gram négative, Gram positive et fongique. Cette activité est attribuée à la présence de carvone en concentration élevé, mais comme les huiles essentielles contiennent plusieurs composants, leurs activités antimicrobienne sont plutôt en raison d'effets additifs, synergiques ou antagonistes des constituants individuels (**Bardaweel et al ., 2018**).

### **2.3.2.2.2. Activité anti-oxydante**

Il a été rapporté que le menthe verte possède une activité anti-oxydante en raison de la présence d'acides phénoliques, de flavonoïdes, de carvones et d'acide ascorbique dans les feuilles (**Guimaraes et al ., 2011**). Selon **Scherer et al. 2013**, la menthe verte peut devenir une forme alternative d'antioxydants synthétiques ayant des effets néfastes.

### **2.3.2.2.3. Activités insecticide**

**Teixeira et al .,(2014)** ont montré que l'huile essentielle des feuilles de *Mentha spicata* L est considérée comme une source alternative pour la gestion des insectes.



**Figure 9:** *Mentha spicata*

### **2.3.3. *Laurus nobilis***

Le laurier est une plante originaire des régions méditerranéennes, Il est largement utilisé comme agents de saveur pour la préparation des aliments (**Ouchikh et al., 2011**). Ses feuilles sont utilisées pour supprimer l'hypoglycémie, les infections fongiques et bactériennes, pour traiter l'éructation, flatulences et des problèmes gastro-intestinaux. Il présente également des activités biologiques anti-inflammatoires, anti-convulsivantes, antiépileptiques, antimicrobiennes et antioxydants (**Chmit et al., 2014 ; Djenane et al.2015; Taoudiat et al., 2018**)(figure 10).

#### **2.3.3.1. Classification (Quezel et santa et al.,1963)**

**Règne** : Végétale

**Embranchement** : Spermaphytes

**Classe** : Dicotylédone

**Ordre** : Laurales

**Famille** : Lauraceae.

**Genre** : *Laurus*

**Espèce** : *Laurus nobilis L.*

#### **2.3.3.2. Les activités biologiques de *Laurus nobilis L.***

Plusieurs travaux ont mis en évidence les différentes activités biologiques des plantes aromatiques et médicinales (*Laurus nobilis*), en particulier leurs pouvoirs antifongiques, antibactériens, antioxydants et insecticides.

##### **2.3.3.2.1. Activité antioxydant**

Activité antioxydant des extraits méthanoliques (bruts et dégraissé) des feuilles, d'écorce et de fruit de *Laurus nobilis*, et de ont été étudiés au niveau de la peroxydation lipidique dans les liposomes, (**Simić et al., 2003**).

**Ozcan et al., (2010)** déterminé l'antioxydant potentiel activité de l'huile essentielle et extrait méthanolique d'huile de graines de *L. nobilis* en employant le piégeage des radicaux libres DPPH (diphenylpicrylhydrazyle) et les systèmes de test à l'acide  $\beta$ -carotène / acide

## Chapitre 02 : Détoxification d'aflatoxine et l'ochratoxine A

linoléique. Dans les deux systèmes de test l'huile essentielle et l'extrait méthanolique d'huile de graine de *L.nobilis* a montré des propriétés anti-oxydantes.

### **2.3.3.2.2. Activité antibactérienne**

Les huiles essentielles de laurier noble possèdent une notable activité anti-infectieuse. Celle-ci peut être considérée comme modérée en comparaison à d'autres HE, mais néanmoins intéressante en thérapeutique. Par ailleurs de nombreux travaux confirment son activité antimicrobienne à large spectre in vitro de par sa forte concentration en 1,8-cinéol associée notamment à de l'eugénol ou son méthyle. Etude de (Dadalioglu et Evernddilek et al., 2004) a montré une efficacité d'HE sur *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* et *E.coli*. L'HE a une capacité d'inhiber les souches buccales de *S.aureus* avec une importante activité anti-biofilm (Elsevier et al., 2017).

Yakhlefet et al., (2011) montrent que les extraits de *Laurus nobilis* possèdent une capacité antimicrobienne mais faible en comparaison avec les extraits d'autres espèces (*Thymus vulgaris*) avec un spectre antimicrobien plus large et à des doses plus faibles.

### **2.3.3.2.3. Activité antifongique**

Une étude de l'activité antifongique d'huile essentielle de la plante *laurus nobilis* sur les souches d'*Aspergillus ochraceus*. a été réalisée par la méthode d'hydrodistillation. Le test est réalisé par méthode de contact direct sur l'*Aspergillus ochraceus* dans des différentes concentrations d'huile (0.05, 0.25 et 0.5% de HE). Les résultats de cette étude montrent qu'HE de *laurus nobilis* possède une importante activité antifongique sur cette souche ; un indice d'inhibition de 100% avec la concentration de 0.5%. (Salhi. N et al., 2015).



**Figure 10 :** *Laurus nobilis* L

### **2.3.4. *Salvia officinalis***

Les sauges ont été employées comme des plantes à propriétés médicinales salutaires pendant des milléniums. La sauge était un composant fréquent des mélanges de tisanes, recommandés pour les patients tuberculeux. Outre ces utilisations, les feuilles de la sauge (*S.officinalis*), montrent une gamme des activités biologiques; antibactérienne, antifongique, antivirale et astringente (**Baricevic et Bartol et al. , 2000**). La sauge est avérée active dans les préparations combinées pour le traitement de la bronchite aiguë et chronique (figure 11).

#### **2.3.4.1. Classification taxonomique**

La sauge suit la classification suivante selon **Cronquist(1968)**.

**Règne** : Plantae

**Embranchement** : Magnoliophyta

**Classe** : Magnoliopsida

**Ordre** : Lamiales

**Famille** : Lamiaceae

**Genre** : *Salvia*

**Espèce** : *Salvia officinalis* L

#### **2.3.4.2. Les activités biologiques du *Salvia officinalis***

##### **2.3.4.2.1. Effets anticancéreux et antimutagènes**

L'activité anti tumorale potentielle de *Salvia officinalis* a été étudiée sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses et des modèles animaux de cancer. Il a été rapporté que la boisson au thé de sauge a empêché les phases d'initiation de carcinogenèse du côlon (**Pedro et al ., 2016**) .

Les extraits de cette plante ont des effets inhibiteurs de la croissance sur les lignées cellulaires du cancer du sein, du col, colorectal, insulinome, carcinome laryngé, carcinome pulmonaire, mélanome et carcinome épidermoïde de cavité buccale (**Garcia et al., 2016 ; El Hadri et al., 2010 ;Russo et al.,2013**).

## **Chapitre 02 : Détoxification d'aflatoxine et l'ochratoxine A**

En plus, *Salvia officinalis* a des effets anti-migrateurs, anti-angiogéniques et antiproliférative (**Keshavarz et al., 2010 ; Bidmeshkipour et al., 2011**) et peut agir comme inhibiteur de mutagenèse. Son huile essentielle a permis de réduire les mutations induites par les UV chez *Escherichia coli* et *Saccharomyces cerevisiae* (**Vukovic-Gacic et al., 2006**).

*Salvia officinalis* contient l'acide rosmarinique qui empêche la croissance de diverses cellules cancéreuses humaines, y compris l'adénocarcinome du sein, le carcinome du côlon, la leucémie myéloïde chronique, la prostate, le carcinome hépatocellulaire et le carcinome pulmonaire à petites cellules (**Xavier et al., 2009 ; Yesil-Celiktas et al., 2010**).

### **2.3.4.2.2. Activités antioxydantes**

Le stress oxydatif joue un rôle important dans l'initiation et progression de plusieurs maladies, comme le cancer, les troubles cardiovasculaires, le diabète et les maladies neurologiques (**Toyokuni et al., 2016**).

Les antioxydants naturels protègent les cellules contre la ROS, alors que plusieurs études suggèrent que *Salvia officinalis* possède de puissantes activités antioxydantes (**Horvathova et al., 2016**).

### **2.3.4.2.3. Activités anti-inflammatoires**

L'inflammation et la douleur sont les deux principaux symptômes qui se produisent en réponse à des dommages aux tissus. Les médicaments conservateurs anti-inflammatoires non stéroïdiens sont encore un élément clé du traitement pharmacologique de ces symptômes. Cependant, les utilisations cliniques de ces médicaments sont accompagnées d'effets secondaires désagréables tels que les complications cardiovasculaires (**Brune et al., 2015**).

Des études ont montré que *Salvia officinalis* a été anti-inflammatoire. Par exemple, il a été démontré que cette plante aide à contrôler la douleur neuropathique en chimiothérapie (**Abad et al., 2011**).

### **2.3.4.2.4. Activités antiseptiques**

Plusieurs études montrent que *salvia officinalis* a des effets antimicrobiens. L'huile essentielle et l'extrait éthanolique de *Salvia officinalis* ont des effets bactéricides et bactériostatiques contre les deux bactéries : Gram-positives et Gram négatives (**Hayouni et al., 2008 ; Mitic-Culafic et al., 2005**).

## **Chapitre 02 : Détoxification d'aflatoxine et l'ochratoxine A**

En plus de l'action antibactérienne, *Salvia officinalis* a été rapporté pour induire des effets antifongiques, antiviraux et antipaludiques (**Badiee et al., 2012**).

### **2.3.4.2.5. Effets métaboliques**

Les études expérimentales et cliniques ont confirmé les bienfaits des certaines plantes médicinales sur le métabolisme corporel en particulier l'état glycémique, les lipides sériques, la lipolyse et l'adipogénèse (**Hernandez-Saavedra et al., 2016 ; Milne et al., 2006 ; Ghorbani et al., 2014**)

. Des enquêtes pharmacologiques récentes ont démontré que différents extraits de parties aériennes de *Salvia officinalis* peuvent diminuer la glycémie (**Behradmanesh et al., 2013 ; Lima et al., 2006**).

**Hernandez-Saavedra et al. (2016)** ont déclarés que la perfusion préparée à partir de cette plante réduisait les triglycérides sériques, le cholestérol total et les lipoprotéines de faible densité (LDL).



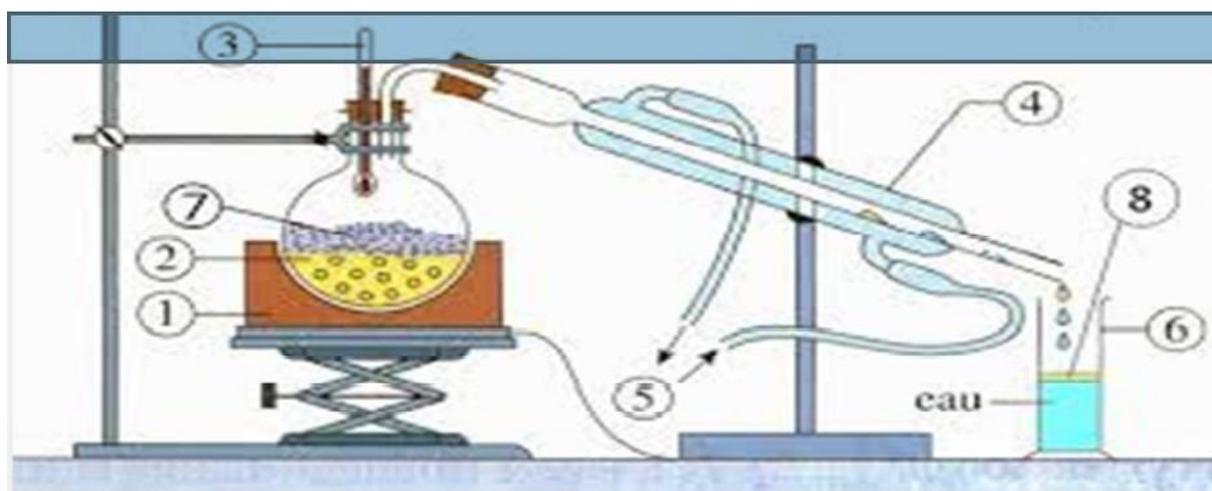
**Figure 11:** Les feuilles de la sauge

### 3. Procède d'obtention d'huile essentielle

Il existe plusieurs méthodes d'extraction, elles sont choisies en fonction de la partie de la plante où se trouve l'huile essentielle, ainsi que de la qualité et de sa valeur thérapeutique. De chaque procédé résulte un produit différent (Huete et al., 2012).

#### 3.1. Hydrodistillation

L'hydrodistillation simple consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé « turbodistillation ») dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite portée à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité. Dans une variante du procédé le matériel végétal est broyé in situ (turbo-extracteur) (Bruneton et al., 1999).



**Figure 12 :** Appareil d'hydro-distillation (Cazau-beyret et al., 2013).

(1) Chauffe-ballon ; (2) L'eau en ébullition ; (3) thermomètre ; (4) réfrigérant ; (5) arrivée et sortie d'eau ; (6) éprouvette graduée ; (7) matériel végétal ; (8) huile essentielle ou essence.

##### 3.1.1. Les avantages

- C'est l'une des méthodes les plus anciennes et facile à mettre en oeuvre.
- L'équipement est peu coûteux.
- Ce mode d'extraction respecte les composants très fragiles des plantes à huiles essentielles.
- Essence de bonne qualité, très concentrée.
- Rendement en huile essentielle très élevé (Bocchio et al., 1985).

### **3.1.2. Les inconvénients**

- Perte d'une partie d'essence par évaporation et oxydation de certains constituants des essences solubles dans l'eau.
- Procédé violent en cas de manque de précaution, il y a casse du chauffe ballon.
- Altération de certaines substances odorantes à la température d'ébullition de l'eau (Ben yousef et al., 1999).

## **4 .Isolement, identification, purification des champignons**

### **4 .1. Isolement des champignons**

Rarement, un environnement naturel contient uniquement un seul type de microorganisme. Dans la plupart des cas, une énorme variété de micro-organismes est simultanément présente et c'est aux microbiologistes de concevoir la stratégie, les méthodes et les procédures qui permettront d'isoler, de cultiver et de sélectionner un micro-organisme particulier. Pour cet isolement, des échantillons appropriés, contenant une importante microflore naturelle, doivent être choisis très attentivement. En particulier, il faut aller chercher le micro-organisme dans son habitat.

Pendant l'isolement d'un micro-organisme, la technique d'enrichissement est généralement utilisée. Cette technique est réalisée, en ajoutant un échantillon dans un milieu de culture sélectif et en fixant diverses conditions d'incubation. L'objectif d'une culture d'enrichissement est l'obtention d'une population microbienne spécifique en culture pure.

La mise en œuvre d'une culture d'enrichissement fait appel à la technique de l'étalement en surface (technique des stries) ou à la technique de dilutions successives en milieu liquide jusqu'à l'épuisement de la microflore. La première et principale étape pour la production d'un métabolite microbien par un procédé fermentatif, consiste à sélectionner un micro-organisme adéquat qui soit capable de produire, le plus rapidement possible, le métabolite d'intérêt à des concentrations convenables. Pour atteindre ce but, il est nécessaire d'isoler et de sélectionner des nouveaux microorganismes possédant la caractéristique souhaitée. La sélection d'un micro-organisme constitue une étape très importante en Biotechnologie et elle est un des paramètres essentiels de la réussite ou de l'échec du développement d'un nouveau procédé microbien. De plus, on devrait considérer, dès le départ, comme un des critères pour la sélection d'un micro-organisme, sa capacité de se développer

sur un milieu simple et bon marché. En règle générale, ce micro-organisme devrait être pur et doté d'une viabilité et d'une stabilité génétique remarquables (**SCRIBAN et al, 1993**).

Par ailleurs, si la préparation enzymatique obtenue par un procédé de fermentation est destinée à entrer en contact avec des aliments, la souche qui l'a produite doit avoir reçu le label «alimentaire », c'est-à-dire de faire partie des souches G.R.A.S. (Generally Recognized As Safe).

#### **4 .2. Identification de champignons**

Pour des questions pratiques, nous allons consacrer cette section d'identification des champignons, uniquement pour deux ordres de champignons: Les Mucorales et les Hyphomycétales. Plus particulièrement, la description des espèces thermophiles ou thermotolérantes de *Rhizomucor*, de *Rhizopus* et d'*Aspergillus* sera développée, étant donné que ces trois genres seront étudiés tout au long de ce travail. L'identification des champignons selon **BOTION et al. (1985a)** fait essentiellement appel aux caractères cultureux et morphologiques tels que:

- **Caractères cultureux** : vitesse de la croissance apicale ; texture, marge, épaisseur et couleur de la colonie; pigmentation de l'agar, production d'exsudat et odeur des colonies.

- **Caractères morphologiques :**

- a - Du mycélium : absence ou présence de cloisons, couleur, dimensions, ornementation des parois, mode de ramification, différenciation des thallospores.

- b - Des organes différenciés et de leur contenu : forme, couleur, dimensions, texture des parois et ornementations.

Les observations culturelles et microscopiques des \_structures fongiques réalisées pour identifier la classe, l'ordre, le genre et l'espèce des nouvelles souches isolées répondent aux descriptions évoquées par **BOTION et coll. (1985)**, **SAMSON et coll. (1996)** et **DOMSCH et GAMS (1993)**. En règle générale, ces observations sont faites à partir des cultures réalisées sur Malt Extrait Agar (MEA) à 30°C.

Des clés d'identification des champignons sont établies par différents groupes de chercheurs afin de classer les nouvelles souches. On donnera par la suite uniquement les clés nécessaires pour identifier les souches que nous avons isolées.

#### **4.2.1. Le genre Aspergillus**

Les clés d'identification du genre Aspergillus sont les suivantes:

- Coniophores dressés et renflés en vésicule.
- Vésicules portant des phialides (cellules conidiogènes).
- Spores unicellulaires (conidies) groupées en chaînes formées à partir des phialides.

Si les phialides sont directement insérées sur la vésicule, ces Aspergillus sont appelés Aspergillus unisériés. Mais, si les phialides sont portées par des cellules intercalaires (métules) insérées sur la vésicule, ces Aspergillus sont appelés Aspergillus bisériés.

*Chapitre 03 :*  
*Résultats et*  
*Discussion*

## **1. Etude prophylactique de *Cuminum cyminum* et *Laurus nobilis* contre l'aflatoxine**

### **1.1. Rendements en huile essentielle**

Les rendements en HEs ont été calculés en fonction de la matière végétale sèche. Les valeurs obtenues représentent la moyenne des rendements d'extraction sur 3 extractions indépendantes. Les deux plantes étudiées montrent des rendements variables, allant de 1,08% à 1,13% (p/p, poids sec). Ces derniers sont résumés dans le Tableau 10.

Le rendement obtenu pour l'HE de *Cuminum cyminum* est 1,08%. Ce rendement est comparable à ceux obtenus par d'autres auteurs. En effet, **Ramy et al. (2010)** ont indiqué que le rendement en HEs de *Cuminum cyminum* était 3,20%. Cependant, **Benrejdal et al. (2012)** et **Ravi et al. (2007)** ont indiqué des rendements de 2,25%.

Concernant, *Laurus nobilis* le rendement était de 1,13%. Ce résultat est comparable à ceux obtenus pour **Haddouchi et al. (2009)** qui ont observé que le rendement de *L. nobilis* originaire de Tlemcen (Algérie) était de 1,2%. L'HE extraite de *L. nobilis* Iranien avait comme rendement 1,1% (**Verdian-Rizi et Hadjiakhoondi, 2008**). Cependant, le rendement de notre HE extraite à partir de laurier est plus élevé que celui de laurier originaire d'El Kala (Algérie): 1,3 vs. 0,6% (**Ouibrahim et al., 2013**). Notre laurier a révélé un rendement inférieur par rapport à celui du Maroc: 1,3 vs. 2,5% (**Yilmaz et al., 2013**).

Ces différences de rendement en HE peuvent être expliquées par les divers paramètres appartenant à deux catégories. Ceux intrinsèques qui correspondent aux espèces, aux organes et à la maturité des plantes, ainsi qu'aux méthodes culturales, à la récolte, les interactions temporelles et environnementales (climat, sol, etc.) et, ceux extrinsèques comprenant l'extraction, le stockage et le conditionnement. Selon **Vekiari et al. (2002)**, la période de récolte, l'organe de la plante, la durée de séchage et la méthode d'extraction sont des facteurs parmi d'autres qui peuvent aussi avoir un impact direct sur les rendements en HE.

**Tableau 10 :** Variation des rendements d'extractions par hydrodistillation des HEs de *C. cyminum* et *L. nobilis*

<b>HE</b>	<b>Rendement (%)</b>
<i>C. cyminum</i>	1,08 ± 0,15
<i>L. nobilis</i>	1,13 ± 0,028

## 1.2. Composition chimique des huiles essentielles

### 1.2.1. *C. cyminum*

La CG/SM a permis de recenser 13 composés à partir de l'essence de *C. cyminum* dont le cuminaldéhyde, l'*o*-cymène, l' $\alpha$ -méthyl benzène méthanol et le  $\beta$ -pinène sont les constituants majoritaires représentés avec des pourcentages de 65,98%, 18,39%, 4,51%, 4,38% et 1,89%, respectivement. Les composants identifiés ont constitué 99,98% de l'huile (tableau 11).

Tableau 11 : Composés chimiques d'HE de *C. cyminum*

Composants	% <i>C. cyminum</i>
$\alpha$ - Pinène	0.22
$\beta$ -Pinène	4.38
2-Viny 1-2,3-dihydro-4H-pyran	0.27
o-Cymène	18.39
1,8-Cinéole	0.23
4-t-Pentylcyclohexène	0.26
Tricyclo[5,1,0,0(2,8)]octane	0.29
Méthyl chavicol	0.29
m-Cuménol	0.50
Cuminaldehyde	65.98
1-Phényl-1-butanol	0.71
$\alpha$ -Méthyl- benzène méthanol	4.51
p-Cymen-7-ol	0.63
2-Thiophènealdehyde	1.89
1-Méthyl-2 Phénylcyclopropane	0.73
Isomenthol	0.70
<b>Total identifié</b>	<b>99.98</b>
<b>Monoterpènes Hydrocarbonés</b>	<b>22.99</b>
<b>Monoterpenes oxygénés</b>	<b>72.84</b>
<b>Autres</b>	<b>4.15</b>

Selon Saha et al. (2016), le cuminaldéhyde était le constituant majeur de l'HE de *C. cyminum*. Ses concentrations étaient de 52,6 et 37,3% pour une hydrodistillation et extraction par CO<sub>2</sub> supercritique, respectivement. Les autres constituants principaux sont le carenal (2-carene-10-al) (24,5-25,8%) et l'alcool cuminique (13,3-19,3%). Li et Jiang (2004) ont indiqué que les graines de cumin provenant de la Chine sont constituées du carenal (2-carene-10-al) (36,31%), de l'alcool cuminique (16,92%), du  $\gamma$ -terpinène (11,14%), du safranal (10,87%), du p-cymène (9,85%) du  $\beta$ -pinène (7,75%) comme composants principaux. Des observations similaires ont été rapportées par Uhl (2000). Cette étude a rapporté que le cuminaldéhyde

(33%), le  $\beta$ -pinène (13%), le terpinène (29,5%), le p-cymène (8,5%), le p-menthon-1,3-diène-7-al (5,6%), l'alcool (2,8%) et le  $\beta$ -farnesène (1,1%). Une observation similaire a été signalée par **Viuda-Martos et al. (2007)**, à l'exception de la présence d'alcool cuminique. **Beis et al. (2000)** ont rapporté que le p-mentha-1, 3-dien-7-al et le p-mentha-1, 4-dien-7-al sont également des constituants majeurs de l'HE de cumin en dehors du cuminaldéhyde, du p-cymène et du  $\beta$ -pinène. **Rebey et al. (2012)** ont signalé 38 composés dans l'HE de *C. cyminum*, représentant 98,07% des constituants totaux. Cette HE a été caractérisé par la domination des hydrocarbures terpéniques, constituant la classe principale (54,38%) suivi par les alcools (26,90%), les aldéhydes (15,83%), tandis que les cétones, époxydes, phénols et ester sont faiblement représentés. L'HE a été caractérisé par le  $\gamma$ -terpinène (25,58%) en tant que composé principal, suivi par le 1-phényl-1,2 éthanediol (23,16%), le cuminaldéhyde (15,31%), le  $\beta$ -pinène (15,16%) et le p-cymène (9,05%). En fait, plusieurs chimiotypes ont été rapportés selon l'origine du cumin étudié.

Quatorze (14) composés représentant 86,75% de l'HE extraite de *C. cyminum* ont été identifiés selon **Ladan (2015)**. Les composés détectés sont le thymol (40,65%), le  $\gamma$ -terpinène (24,51%), le  $\beta$ -pinène (5,38%), l' $\alpha$ -pinène (3,47%), le camphène (2,31%), le terpinène-4-ol (2,00%), le cuminaldéhyde (1,79%), l' $\alpha$ -thujène (1,45%), l' $\alpha$ -terpinolène (1,17%), le myrcène (1,07%), le limonène (1,04%), l' $\alpha$ -phyllanderène (0,94%) et l'acétoxylinol (0,57%) et le sabinène (0,37%). **Li et al. (2009)** ont signalé les composés majoritaires de l'HE de *C. cyminum*: cuminal, le safranal, le 2-éthylidène-6-méthyl-3,5-heptadiénal, l' $\alpha$ -proylbenzène-méthanol et le 1-méthyl-4-(1-méthyléthyl)-1,4-cyclohexadiène. Dans une autre étude réalisée par **Derakhshan et al. (2008)**, les constituants principaux de l'HE de *C. cyminum* sont le cuminaldéhyde, le p-mentha-1,3-dien-7-al, le p-mentha-1,4-dien-7-al, le terpinène, le p-cymène et le  $\beta$ -pinène. **Kedia et al. (2014)** ont identifié 16 composants différents de l'HE de *C. cyminum*, représentant 97,45% de la composition totale. Les composants les plus abondants de l'HE sont le cymène (47,08%), le  $\gamma$ -terpinène (19,36%), le cuminaldéhyde (14,92%) et le laevo- $\beta$ -pinène (11,50%). **Jalali-Heravi et al. (2007)** ont utilisé la CG-SM pour caractériser les composants d'HE du cumin iranien. Au total, 19 composants ont été identifiés par des recherches directes de similarité pour l'huile de cumin. Ce nombre a été étendu à 49 composants, à l'aide de techniques chimiométriques. Les principaux constituants du cumin sont le  $\gamma$ -terpinène (15,82%), le 2-méthyl-3-phénylpropanal (32,27%) et le myrténique (11,64%).

**1.2.2. *L. nobilis***

Le profil chimique de l'huile de *L. nobilis* concorde avec plusieurs investigations qui ont dénoté la forte teneur de cette HE en 1,8-cinéole (35,54%). Les monoterpènes les plus prédominants dans l'huile du laurier, sont le camphène (13,35%), le linalol (11,39%), le méthyl eugénol (7,78%), le sabinène (4,79%), l' $\alpha$ -pinène (4,66%) le  $\beta$ -pinène (3,21%) et le terpène-4-ol (3,15%) (Tableau 12). **Ben Jemâa et al. (2012).**

Tableau 12 : Composés chimiques d'HE de *L. nobilis*.

Composants	% <i>L. nobilis</i>
$\alpha$ -Phéllandrène	0.59
$\alpha$ -Pinène	4.66
Camphène	0.47
Sabinène	4.79
$\beta$ -Pinène	3.23
Myrcène	0.20
$\delta$ -3-Carène	0.59
$\alpha$ -Terpinolène	0.54
p-Cymène	0.19
m-Cymène	0.81
Limonène	1.30
1,8-Cinéole	35.54
$\gamma$ -Terpinène	0.89
trans-Sabinène hydrate	0.26
$\alpha$ -Terpinolène	0,31
Linalol	11,39
$\delta$ -Terpinéol	0,23
endo-Bornéol	0,40
Terpinène-4-ol	3,16
$\alpha$ -Terpinéol	2,17
Nérol	0,21
Zeta- Fenchène	0,18
Sabinène	0,69
Camphène	13,35
Eugénol	1,00
$\beta$ -Elemène	0,31
Méthyl Eugénol	7,78
$\beta$ -Caryophyllène	0,56
Acide cinnamique	0,26
Bicyclogermacrène	0,17

δ-Cadinène	0,23
12-Nor-caryophyl-5-en-2-on	0,21
Elemicine	0,57
Spathuléol	0,85
Caryophyllène oxide	0,57
Valencène	0,16
(E,Z)-1,2-diethylidèncyclopentane	0,20
t-Muurolol	0,66
Longifolène	0,23
<b>Total identifié</b>	<b>97,77</b>
<b>Monoterpènes hydrocarbonés</b>	<b>32,77</b>
<b>Monoterpènes oxygénés</b>	<b>62,14</b>
<b>Autres</b>	<b>0,63</b>

**Kilic et al. (2005)** ont rapporté que l'HE de *L. nobilis* de Turquie est principalement constitué du 1,8-cinéole (24,2-32,1%), du sabinène (7,1-7,6%), de l' $\alpha$ -terpinyl acétate (4,8-6,5%), de l' $\alpha$ -pinène (3,9-5,0%), et du  $\beta$ -pinène (3,0-3,8%). **Zheng-kui et al. (1990)** ont montré que le 1,8-cinéole (25,5-43,0%), le sabinène (2,1-6,8%), le linalol (4,4-22,7%), l' $\alpha$ -terpinyl acetate (9,5-18,0%), et le méthyl eugénol (1,7-8,9%) sont les principaux constituants de l'HE de *L. nobilis* Chinoise. Le 1,8-cinéole (42,3%), l' $\alpha$ -terpinyl acétate (11,2%), l' $\alpha$ -pinène (7,8%), le  $\beta$ -pinène (5,9%), et le sabinène (5,4%) sont les composés majoritaires chez l'HE de Tunisie (**Bouzouita et al., 2001**). **Flamini et al. (2007)**, ont signalé que le 1,8-cinéole (35,7%), l'E-sabinène hydrate (9,7%), l' $\alpha$ -terpinyl acétate (9,3%), le méthyl eugénol (6,8%), et le sabinène (6,5%) sont les composés les plus représentatifs de *L. nobilis* récoltés en Italie. **Snuossi et al. (2016)** ont rapporté que les constituants principaux d'HE de *L. nobilis* Tunisien étaient le 1,8-cinéole (56%), l' $\alpha$ -terpinyl acétate (9,0%), le 4-terpinéol (5,2%), le méthyleugénol (3,6%), le sabinène (3,5%) et l' $\alpha$ -pinène (3,2%). **Caputo et al. (2017)** ont trouvé que le 1,8-cinéole (31,9%), le sabinène (12,2%) et le linalol (10,2%) sont les principaux composants de l'HE de *L. nobilis* Italien. **Ben Jemâa et al. (2012)** ont démontré que les principaux composés communs de trois HES de lauriers provenant de l'Algérie, de la Tunisie et du Maroc étaient le 1,8-cinéole, le linalool et l'isovaléraldéhyde. **Marzouki et al. (2009)**, ont également rapporté que les HES de *L. nobilis* cultivées en Tunisie et en Algérie

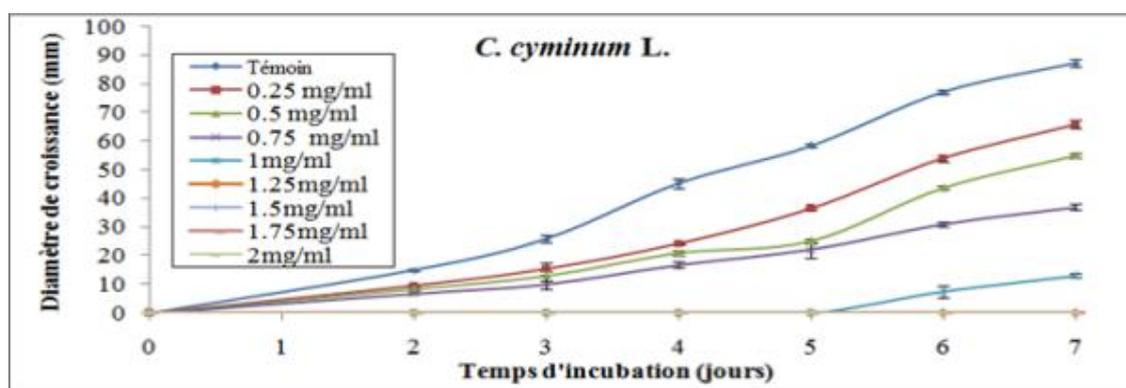
n'ont pas révélé de différences dans leur composition chimique. Les deux huiles ont contenu les principaux constituants dans des proportions variables. Le 1,8-cinéole a représenté 31,0% de l'huile dans les échantillons tunisiens et seulement 17,0% dans l'huile algérienne.

### 1.3. Activité antifongique des huiles essentielles

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

#### 1.3.1. Effet d'huile essentielle de *C. cyminum* sur la croissance d'*A. flavus*.

L'activité antifongique d'HE de *C. cyminum* est représentée dans la Figures 13. Une activité significative ( $p < 0,05$ ) a été observée proportionnellement à la concentration d'HE de *C. cyminum*. En effet, la croissance d'*A. flavus* a été retardée de quatre jours à une concentration de 1,00 mg/ml pour *C. cyminum*. La croissance mycélienne de l'*A. flavus* a été totalement inhibée par le HE de *C. cyminum* à 1,25 mg/ml. L'activité antifongique traduite par l'inhibition de la croissance de mycélium était proportionnelle à la concentration de l'huile, cela n'a pas empêché d'observer une évolution dans croissance mycélienne au cours d'incubation.



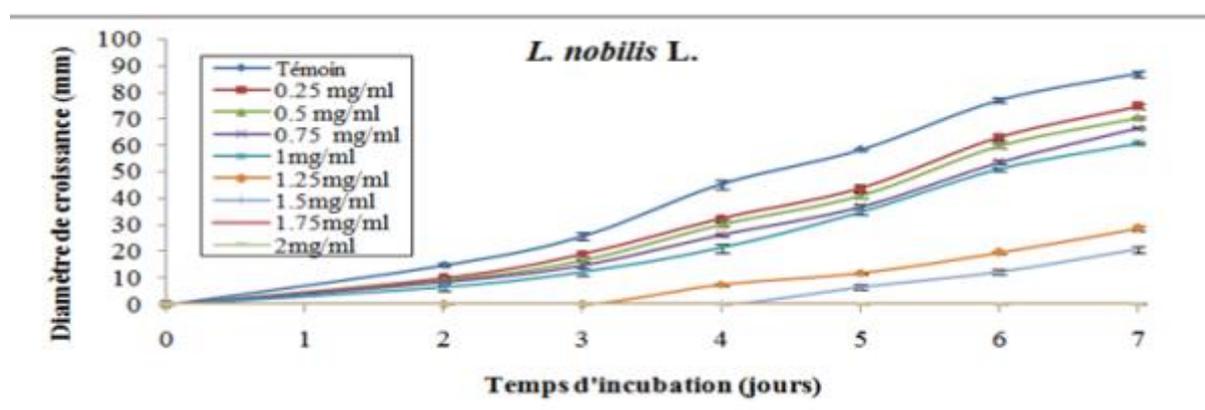
**Figure 13 :** Effet de l'HE de *C. cyminum* aux différentes concentrations sur la croissance de l'*A. flavus* pendant 7 jours d'incubation.

L'HE de *C. cuminum* montre une bonne activité antifongique qui pourrait être attribuée au cuminaldéhyde (65,98%) majoritaire. Ce composé volatil s'est avéré avoir une forte activité antifongique (Singh et Upadyay et al., 1991; Tian et al., 2011).

L'activité antifongique de l'HE de *C. cuminum* pourrait être aussi attribuée à la présence de certains composants tels que le cymène et le  $\beta$ -pinène qui sont déjà connus pour leur activité antimicrobienne (Souza et al., 2005). Outre, Kedia et al. (2014) ont révélé que la teneur en ergostérol dans la membrane plasmique d'*A. flavus* a significativement été réduite par les différentes concentrations de l'HE de *C.cuminum*. L'absence ou la présence d'ergostérol dans les membranes fongiques entraîne des instabilités métaboliques de la cellule fongique, compromettant la reproduction et l'activité infectieuse (Kerekes et al., 2013; Freires de Almeida et al., 2014).

### 1.3.2. Effet des huiles essentielles de *L. nobilis* sur la croissance d'*A. flavus*.

Les résultats ont montré une efficacité antifongique prononcée de l'HE de *L. nobilis* contre la souche testée. La croissance a été retardée de trois jours à 1,5 mg/ml. Aussi la croissance du mycélium était proportionnelle à la concentration de l'HE utilisée (Figure 14).



**Figure 14 :** Effet de l'HE de *L. nobilis* aux différentes concentrations sur la croissance de l'*A. flavus* pendant 7 jours d'incubation.

Daferera et al. (2000) ont indiqué que l'effet antifongique de HE est une conséquence de la formation de liaisons hydrogènes entre les groupes hydroxyles des composés phénoliques de HE et les sites actifs des enzymes cellulaires de la cible fongique. Dos Santos Oliveira et Badiale Furlong (2008) ont rapporté que le type de la structure phénolique est plus important que la concentration en ces composés. Il a été démontré que les molécules possédant un groupe hydroxyle plus un système d'électrons délocalisés dans la

structure du cycle phénolique ont une activité antifongique élevée (Safaei-Ghomi et Ahd, 2010).

Dans la présente étude l'HE de *L. nobilis* a montré une bonne activité antifongique. Les résultats corroborent d'autres travaux sur le pouvoir antifongique de l'HE de *L. nobilis* ont obtenu une bonne activité antifongique contre la croissance des *Aspergillus sp.* Guynot et al. (2005). Ceylan et Fung (2004); Tajkarimi et al. (2010) dans leurs travaux ont révélé que l'HE de *L. nobilis* a présenté des activités modérées.

Simiç et al. (2004) ont mis en évidence l'activité antifongique d'HE *L. nobilis*, vis-à-vis d'espèces fongiques. Cette activité peut être attribuée à l'interférence entre le composé majeure 1,8-cinéole et la présence du sabinène (Simiç et al., 2004). Safaei-Ghomi et Ahd (2010) ont indiqué que le 1,8-cinéole possède une activité antifongique potentielle.

Les travaux de Shukla et al. (2012) et Caputo et al. (2017) ont montré que le 1,8-cinéole pur a provoqué une inhibition de la croissance mycélienne, mais à des concentrations plus élevées que le HE dans leur totalité. D'après Gusarov et al. (2009), le 1,8-cinéole provoque des changements morphologiques hyphal et des dommages dans la membrane plasmique en provoquant une perméabilisation de la membrane.

## **2. Etude analytique de l'huile essentielle de *Mentha spicata* commun entre l'aflatoxine et l'ochratoxine A**

### **2.1. Rendement**

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse sèche de la matière végétale utilisée et la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction (AFNOR, 2000). Le tableau 13 illustre les rendements moyens en huile essentielle des parties aériennes de *Mentha spicata*, extraites par la technique d'hydrodistillation en différents régions en Algérie.

Tableau 13 : Rendements en huile essentielle de *Mentha spicata*.

Huile	Zones de récolte	Rendements %	Références
essentielle de <b>Mentha spicata en Algérie</b>	Béjaïa	1.1%	<b>Brahmi et al. (2016)</b>
	Laghouat	1.04%	<b>Bardaweel et al. (2018)</b>
	Tiaret	1.97%	<b>Selles et al. (2018)</b>

Les résultats du tableau n°13 montrent que pour la menthe verte algérienne, le plus grand rendement en huile essentielle est celui de la région de Tiaret (1.97%) (**Selles et al., 2018**), suivi par celui de la région de Laghouat (1.04%) (**Bardaweel et al., 2018**), tandis que le plus faible est celui de la région de Bejaïa (1.1%) (**Brahmi et al., 2016**).

Ces variations peuvent être expliquées par le fait que le rendement en huile essentielle peut être influencé par divers facteurs intrinsèques, tels que le génotype de la plante, les parties végétales utilisées, leur états de fraîcheur, mais aussi par des facteurs extrinsèques tels que l'origine géographique, la saison de récolte, le climat, les propriétés physico-chimiques du sol ainsi que, la méthode d'extraction employée, et sa période de séchage et de stockage (**Zhao et al., 2013 ; Boukartaba et Hammoum et al., 2018**).

## 2.2. Composition chimique d'huile essentielle de *Mentha spicata*

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) est une méthode d'analyse utilisée dans le domaine des huiles essentielles. La CPG consiste à séparer et analyser les molécules organiques de l'huile, tandis que la SM consiste à identifier et/ou à quantifier précisément de nombreux composés, le spectre de masse de chaque molécule, est comparé à ceux contenus dans des bibliothèques de spectres informatisées ou sous format papier construites au laboratoire ou commerciales (**Sutour et al., 2010 ; Fekih et al., 2015**).

Les résultats de l'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha spicata* récoltée dans trois régions algériennes, à savoir, Laghouat, Tiaret et Bejaïa, sont mentionnés dans le tableau n°14

**Tableau 14 :** La composition chimique des huiles essentielles de *Mentha spicata* récoltée en Algérie.

<b>Constituants</b> <b>Régions</b>	<b>Laghouat</b> <b>(Bardaweel et al.,</b> <b>2018)</b>	<b>Tiaret</b> <b>(Selles et al., 2018)</b>	<b>Béjaia</b> <b>(Brahmi et al.,</b> <b>2016).</b>
$\alpha$ -pinene	0.7	0.48	1.1
Sabinene	0.6	0.56	0.7
$\beta$ -pinene	1.1	0.74	1.3
Myrcene	0.8	ND	0.8
3-octanol	0.3	0.4	0.0
$\alpha$ -terpinene	0.3	0.17	0.3
$\rho$ -cymene	0.2	0.23	ND
Limonene	16.1	5.85	20.8
1,8-cineole	8.7	ND	5.4
(Z)- $\beta$ -ocimene	0.3	ND	0.6
(E)- $\beta$ -ocimene	0.1	ND	0.1
$\gamma$ -terpinene	0.4	0.34	0.6
cis-sabinene hydrate	0.8	ND	0.2
Terpinolene	0.2	0.1	0.2
Linalool	0.2	0.03	ND
Nonanal	0.1	0.03	ND
cis- $\rho$ -menth-2-en-1-ol	0.2	ND	ND
$\delta$ -terpineol	0.5	0.23	ND
4-terpineol	1.5	ND	ND
$\alpha$ -terpineol	0.3	0.32	ND
cis-dihydrocarvone	3.9	1.68	ND
trans-carveol	0.2	0.21	0.1
(Z)-3-hexenyl isovalerate	0.9	ND	ND
Pulegone	0.5	ND	0.6
Carvone	49.5	63.59	48.5
Dihydroedulan IA	0.1	ND	ND

<b>Constituants</b> <b>Régions</b>	<b>Laghouat</b> <b>(Bardaweel et al.,</b> <b>2018)</b>	<b>Tiaret</b> <b>(Selles et al., 2018)</b>	<b>Béjaia</b> <b>(Brahmi et al.,</b> <b>2016).</b>
Isodihydrocarvyl acetate	0.6	ND	ND
cis-carvyl acetate	0.3	ND	ND
$\beta$ -elemene	0.3	0.09	0.4
(Z)-jasmone	0.3	ND	0.3
$\beta$ -caryophyllene	2.7	1.31	3.4
$\beta$ -copaene	0.2	ND	0.1
Aromadendrene	0.1	ND	ND
$\alpha$ -humulene	0.2	0.14	0.1
cis-muurolo-4(14),5-diene	0.3	ND	ND
Germacrene D	2.1	0.96	3.4
Bicyclogermacrene	0.7	0.4	0.8
Germacrene A	0.7	ND	/
$\delta$ -cadinene	0.2	0.04	0.2
Spathulenol	0.2	0.17	0.3
Caryophyllene oxide	0.3	ND	0.3
1,10-di-epi-cubenol	0.2	ND	0.2
T-cadinol	0.3	0.07	ND
T-muurolol	0.2	ND	ND
T-muurolol	0.2	ND	ND
Ethanol	ND	0.1	ND
$\alpha$ -thujene	ND	0.08	0.1
trans-2,5-diethyltetrahydrofuran	ND	0.01	ND
Ethyl 2-methylbutyrate	ND	0.01	ND
Camphene	ND	0.2	0.1
$\beta$ -myrcene	ND	0.61	ND

<b>Constituants</b>  <b>Régions</b>	<b>Laghouat</b> <b>(Bardaweel et al.,</b> <b>2018)</b>	<b>Tiaret</b> <b>(Selles et al., 2018)</b>	<b>Béjaia</b> <b>(Brahmi et al.,</b> <b>2016).</b>
$\alpha$ -phellandrene	ND	0.01	ND
$\psi$ - limonene	ND	0.02	ND
1,8-cinaeole+ $\beta$ - phellandrene	ND	3.75	ND
1,2,8 -p – menthatriene	ND	0.03	ND
2 -hexenal	ND	0.02	ND
cis - $\beta$ -ocimene	ND	0.18	ND
trans - $\beta$ -ocimene	ND	0.05	ND
2-Methyl butyl 2- methyl butyrate	ND	0.01	ND
3-Heptanol	ND	0.02	ND
1 -Ethylhexyle acetate	ND	0.12	ND
Aliphatic ester	ND	0.01	ND
$\alpha$ , p -dimethylstyrene	ND	0.02	ND
1 -Octen - 3 -ol	ND	0.06	ND
cis-1,2-limonene epoxide	ND	0.01	ND
trans -thujanol	ND	2.74	ND
trans-limonene 1,2 – epoxide	ND	0.06	ND
cis- 2 -hexenyl methyl butyrate	ND	0.01	ND
Menthone	ND	0.01	ND
3 -Nonanol	ND	0.01	ND
cis-3-hexenyl methyl butyrate	ND	0.08	ND
$\alpha$ -copaene	ND	0.02	ND
Isomenthone	ND	0.02	ND

<b>Constituants</b> <b>Régions</b>	<b>Laghouat</b> <b>(Bardaweel et al.,</b> <b>2018)</b>	<b>Tiaret</b> <b>(Selles et al., 2018)</b>	<b>Béjaia</b> <b>(Brahmi et al.,</b> <b>2016).</b>
$\alpha$ -bourbonene	ND	0.03	ND
$\beta$ -bourbonen	ND	0.41	1.4
Dihydroedulan isomar	ND	0.03	ND
Aliphatic alcohol	ND	0.03	ND
cis -thujanol	ND	0.21	ND
1 -octanol	ND	0.02	ND
Isomeric limonene epoxide	ND	0.01	ND
trans -p -menth - 2 -en - 1 -ol	ND	0.1	ND
$\varepsilon$ -cadinene	ND	0.08	ND
Bornyl acetate	ND	0.09	ND
$\beta$ -cubebene	ND	0.06	ND
Terpinene - 4 -ol	ND	1.23	ND
cis-p-2,8 -menthadien - 1-ol	ND	0.06	ND
trans -dihydrocarvone	ND	0.15	ND
Cadina -3,5 -	ND	0.1	ND
Isomeric cadinadiene	ND	0.05	ND
Allo -aromadendrene	ND	0.03	ND
trans-pinocarveol	ND	0.02	ND
E - $\beta$ -farnesene	ND	0.04	ND
trans-p-2,8 menthadien -1-ol	ND	0.05	ND
Dihydrocarvyl acetate	ND	4.17	ND
cis-4,5-Muroladiene	ND	0.47	ND
Sesquiterpene	ND	0.06	ND
Borneol	ND	1.11	ND
Dihydrocarveolisomer	ND	0.16	ND

<b>Constituants</b>  <b>Régions</b>	<b>Laghouat</b> <b>(Bardaweel et al.,</b> <b>2018)</b>	<b>Tiaret</b> <b>(Selles et al., 2018)</b>	<b>Béjaia</b> <b>(Brahmi et al.,</b> <b>2016).</b>
trans -carvyl acetate	ND	0.03	ND
$\gamma$ - cadinene	ND	0.07	ND
cis -carvyl acetate	ND	1.07	ND
Methyl salicylate	ND	0.03	ND
Nerol	ND	0.02	ND
Perillaldehyde	ND	0.03	ND
$\alpha$ -amorphene	ND	0.09	ND
Terpenic alcohol	ND	0.04	ND
Terpenic ester	ND	0.02	ND
Calamenene	ND	0.35	ND
p-cymen-8-ol	ND	0.04	ND
Carvone oxide	ND	0.03	ND
E-geranyl acetone	ND	0.03	ND
cis-carveol	ND	0.58	0.9
Piperitenone	ND	0.2	ND
trans -jasmone	ND	0.66	ND
Piperitenone oxide	ND	0.03	ND
2-phenylethyle 2- methylbutyrate	ND	0.02	ND
Aliphatic ester+ aromatic compound	ND	0.05	ND
Caryophyllen oxide	ND	0.16	ND
Sesquiterpenol	ND	0.02	ND
Sesquiterpenol	ND	0.02	ND
Germacra-1,5-dien- 4ol	ND	0.05	ND
Epi-cubenol	ND	0.37	ND
Methylp-anisate	ND	0.03	ND
Eugenol	ND	0.08	ND

Constituants Régions	Laghouat (Bardaweel et al., 2018)	Tiaret (Selles et al., 2018)	Béjaia (Brahmi et al., 2016).
$\alpha$ -Muurolol	ND	0.03	ND
$\alpha$ -Bisabolol	ND	0.03	ND
Isospathulenol isomer	ND	0.03	ND
Sesquiterpenol	ND	0.07	ND
$\alpha$ -Cadinol	ND	0.27	ND
Carvacol	ND	0.03	ND
Caryophylla-3,7-dien- 6-ol	ND	0.02	ND
Aromatic compound	ND	0.04	ND
Sesquiterpenic epoxide	ND	0.02	ND
Sesquiterpenic epoxide	ND	0.03	ND
Borneole	ND	ND	0.2
p-mentha-1.5-dien-8- ol	ND	ND	0.2
$\alpha$ -terpineol	ND	ND	0.1
Neodihydrocarveol	ND	ND	1.3
terpinen-4-ol	ND	ND	1.5
cis-dihydro carvone	ND	0.32	0.6
cis-Carvyl acetate	ND	ND	0.2
cis-Cadina- 1(6),4diene	ND	ND	0.3
cis-Muurola-4(15),5- diene	ND	ND	0.1
Premnaspirodienne	ND	ND	0.7
trans-Calamenene	ND	ND	0.1
Epi- $\alpha$ -cadinol	ND	ND	0.2
Shyobunol	ND	ND	0.1

ND : Non Détecter.

D'après le tableau 14, il y a des variations dans la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha spicata*. En effet, celle de la région de Laghouat renferme 44 composés, celle de Tiaret 116 composés et celle de Béjaia 50 composés représentant respectivement 98.4%, 99.92% et 98.89% de l'huile totale.

Les composés majoritaires de l'huile essentielle de Laghouat sont la carvone (49.5%), limonène (16.1%), le 1,8-cinéole (8.7%) et la cis-dihydrocarvone (3.9%),  $\beta$ -caryophyllène (2.7%), germacrène D (2.1%), 4-terpinéol (1.5%) et  $\beta$ -pinène (1.1%), tandis que ceux de l'huile essentielle de Tiaret sont la carvone (63.59%), limonène (5.85%), dihydrocarvyl acétate (4.17%), 1,8-cinaéole+ $\beta$ -phellandrène (3.75%), trans-thujanol (2.74%), la cis-dihydrocarvone (1.68%),  $\beta$ -caryophyllène (1.31%), terpinen-4-ol (1.23%), bornéol (1.11%) et cis-carvyl acetate (1.07%). Enfin, ceux de l'huile essentielle de Béjaia sont la carvone (48.5%), limonène (20.8%), le 1,8-cinéole (5.4%),  $\beta$ -caryophyllène (3.4%), germacrène D (3.4%), terpinen-4-ol (1.5%),  $\beta$ -bourbonène (1.4%),  $\beta$ -pinène (1.3%), néodihydrocarveol (1.3%) et  $\alpha$ -pinène (1.1%).

La teneur élevée de la carvone indique qu'elle représente le chémotype des trois huiles essentielles de *Mentha spicata* de l'Algérie. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par les travaux de **Bensabah et al. (2013)** au Maroc et **Snoussi et al. (2015)** en Tunisie, et dont la carvone se trouve à des teneurs respectives de 57.11% et 40.8%. Par contre, l'analyse chimique effectuée par **Dhifiet al. (2013)**, a révélé que l'huile de *M.spicata* récoltée en Tunisie était caractérisée par la menthone (32.45%). Par ailleurs, celle de **Telci et al. (2004)**, a indiqué que l'huile de l'espèce provenant de Turquie était caractérisée par le linalool (82.8%).

Les variations observées dans la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha spicata* peuvent être attribuées aux conditions environnementales telles que la température, l'humidité relative, la photopériode, mais aussi, aux conditions agronomiques telles que la plantation, la période de récolte, la densité des cultures, ou encore, à l'écotype, la phénophase, la méthode d'extraction...etc (**Selles et al., 2016**).

### **2.3. Activité antifongique de *Mentha spicata* contre l'aflatoxine et l'ochratoxine A.**

L'huile essentielle de *Mentha spicata* est active contre les champignons, les résultats de recherches sont mentionnés dans le tableau 15.

**Tableau 15** : Activité antifongique de l'huile essentielle de *Mentha spicata* contre quelques souches fongiques.

Souches fongiques	DZI	CMI	Références
<i>Aspergillus flavus</i>	47	10.4 µg/ml	Saba et Anwar. (2018)
<i>Aspergillus niger</i>	40.3	12.7 µg/ml	Saba et Anwar. (2018)

**DZI** : diamètre de zone d'inhibition en mm ; **CMI** : concentration minimale inhibitrice en mg/ml ou µg/ml.

Le tableau 15 permet de constater que l'huile essentielle de *Mentha spicata* possède une grande activité antifongique. Les diamètres des zones d'inhibition sont supérieurs à 20 mm indiquant, d'après la classification établie par **Ponce et al. (2003)**, que les souches mentionnées sont extrêmement sensibles (+++). La valeur élevée est de 47 mm contre *Aspergillus flavus* suivie par 40.3 mm contre *Aspergillus niger* (**Saba et Anwar, 2018**).

Concernant la détermination de la CMI de l'huile essentielle de *M. spicata*, **Hussain et al. (2011)**, indiquent des valeurs allant de 10.4 µg/ml à 12.7 µg/ml. La plus faible concentration correspond à celle appliquée contre *Aspergillus flavus*.

L'activité antifongique de l'huile essentielle de *Mentha spicata* pourrait être attribuée à la carvone qui est généralement le composé majoritaire de l'huile (**Carlier-Loy et al., 2015**) mais aussi, au menthol, menthoforan, menthone, pipriton et polgon (**Nosrati et al., 2011**).

### 3. Etude prophylactique de *Laurus nobilis* et *Salvia officinalis* contre l'ochratoxine A

#### 3.1. Rendement

L'hydro-distillation des feuilles des deux plantes a donné Les rendements en huiles essentielles étaient de  $1,36 \pm 0,01$  et  $0,86 \pm 0,01$  % en poids sec chez *S. officinalis* et *L. nobilis*, respectivement (tableau 16)

**Tableau 16 :** Variation des rendements d'extractions par hydrodistillation des HEs de *Laurus nobilis* et *Salvia officinalis*

HE	Rendement%
<i>Laurus nobilis</i>	0.86 ± 0.01
<i>Salvia officinalis</i>	1.36 ± 0.01

Le rendement de ces deux HE testées était relativement élevé *S.officinalis* (1,36 ± 0,01 %) et *L. nobilis* (0,86 ± 0,01 %) sur base sèche poids. Par rapport aux études précédentes, l'hydrodistillation de les feuilles de *L. nobilis*, récoltées à Montecorice (Campanie, Italie) a fourni un rendement en huile essentielle de 0,57% (Caputo et al., 2017). De plus, le rendement d'extraction des feuilles de *S. officinalis* a été comparé à d'autres recherches.

Russo et al., (2013) ont fondé différents valeurs de rendements (0,55-2,20 %) de cette plante feuilles cultivées dans différents conditions environnementales dans la région du Molise (centre-sud de l'Italie). Arraiza et al., (2012) ont montré que les rendements d'extraction fluctuent entre 0,6 et 1,5% à partir de feuilles de *S. officinalis* cultivées à Marchamalo (Espagne) selon la période de récolte et le cycle végétatif de la plante.

### 3.2. Compositions chimiques des huiles essentielles

**Tableau 17 :** La composition chimique des huiles essentielles de *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* (Caputo et al., 2017).

Compositions chimiques	<i>Salvia officinalis</i>	<i>Laurus nobilis</i>
α-pinène	1.5 ± 0.2	4.1 ± 0.3
Camphène	3.0 ± 0.4	ND
Sabinene	ND	4.1 ± 0.8
β-pinène	1.9 ± 0.6	3.5 ± 0.9
β-myrcène	0.9 ± 0.2	ND
Décane	ND	ND
2-carène	ND	2.9 ± 0.6

3-carène	ND	1.2 ± 0.1
p –cymène	0.9 ± 0.2	ND
1,8-cinéole	21.9 ± 1.1	43.2 ± 1.7
γ-terpinène	0.4 ± 0.1	0.8 ± 0.1
Finchone	ND	ND
α-thuyone	27.5 ± 1.0	ND
β-thuyone	5.5 ± 1.0	ND
Camphre	25.0 ± 1.6	ND
Bornéol	ND	ND
Terpinèn-4-ol	0.9 ± 0.1	3.6 ± 0.3
Myrténol	ND	ND
δ-Terpinéol	ND	ND
Acétate de linalyle	ND	5.8 ± 0.6
Acétate d'-terpinyle	ND	13.7 ± 1.9
Isoeugénol		
Isoeugenol	ND	1.4 ± 0.3
Isolédène Eugénol	ND	1.4 ± 0.0
éter methylique	ND	11.5 ± 1.8
α-gurjunène	5.7 ± 0.8	1.0 ± 0.1
Trans- β-caryophyllène	1.2 ± 0.4	ND
Allo-Aromadendrene	ND	1.6 ± 0.4

$\alpha$ -humulène	$0.7 \pm 0.2$	ND
Oxygéné monoterpènes	$80.8 \pm 1.3$	$69.3 \pm 1.1$
Hydrocarbures monoterpéniques	$8.6 \pm 0.6$	$13.4 \pm 0.6$
Hydrocarbures Sesquiterpéniques	$7.6 \pm 0.1$	$4.0 \pm 0.3$
Des composants phénoliques	ND	$12.9 \pm 0.4$
Total des composants identifiés	$97.0 \pm 0.7$	$99.5 \pm 0.2$

**ND: Non Détecter.**

Selon **Porte et al., 2013**, les résultats des analyses (tableau 17) , le 1,8-cinéole était le plus abondant composé de *L. nobilis* HE ( $43,2 \pm 1,7$  %). D'autres composants principaux de ces HE se sont avérées être de l'acétate de -terpinyne ( $13,7 \pm 1,9$  %), de l'eugénol éther méthylique ( $11,7 \pm 1,8$  %), acétate de linalyle ( $5,8 \pm 0,6$  %), sabinène ( $4,1 \pm 0,9$  %),  $\alpha$ -pinène ( $4,1 \pm 0,3$  %), ainsi que Terpinen-4-ol ( $3,6 \pm 0,3$  %) et -pinène ( $3,2 \pm 0,9$  %).

Les résultats obtenus ont montré que l'HE de *S.officinalis* à trois principaux composants :  $\alpha$ -thuyone ( $27,5 \pm 1,03$ %), camphre ( $25,0 \pm 1,56$ %) et 1,8-cinéole ( $21,9 \pm 1,1$ %). Les autres composants principaux de l'huile étaient trouvé être du  $\alpha$ -gurjunène ( $5,7 \pm 0,8$  %), de la  $\beta$ -thuyone ( $5,5 \pm 1,0$  %) et camphène ( $3,0 \pm 0,4$  %).(**Fernandez.Andrade et al., 2016**)

### **3.3. Activité antifongique de *S. officinalis* et *L. nobilis* contre l'ochratoxine A.**

L'activité antifongique des deux HE testées à diverses concentrations contre *A.carbonarius* a également été évaluée à travers son effet sur la germination des spores. Des analyses statistiques ont montré que les deux tests Les HE ont une activité inhibitrice remarquable de la germination des spores contre testé ochratoxigène *A. carbonarius*, . Cent pour cent d'inhibition des spores' germination ont été enregistrées à 0,3% de *L. nobilis* et 0,5 % de *S. officinalis*.

Les activités antifongiques et anti-ochratoxigènes de les HE *L.nobilis* peuvent être uniquement dues à leurs composants majeurs ou synergiques interaction antagoniste entre les

différents composants de l'huile. Cependant, Le 1,8-cinéole, le composant majeur des deux HE utilisées a été testé en la présente conclusion pour suggérer si l'efficacité d'HE de *L. nobilis* faisait référence à la synergie entre les composants existants ou au composant principal uniquement.

Les résultats mettent en évidence que le 1,8-cinéole a inhibé le taux de croissance à la concentration de 0,1 %, mais la croissance de champignon n'était pas totalement inhibée à la concentration de 0,3 %. Sur le de l'autre côté, les HE de *L. nobilis* ont arrêté la croissance à cette concentration.

La production d'OTA a été inhibée à 0,2% de 1,8-cinéole et 0,1% des HE de *L. nobilis*. De plus, le la synthèse de mycotxine n'était pas complètement bloquée à 0,3% de 1,8-cinéole, alors qu'à cette concentration de *L. nobilis* HE, la production d'OTA était complètement inhibée. Ainsi, l'HE de *L. nobilis* présentait une forte activité antifongique et anti-ochratoxigène, contre *A. carbonarius* par rapport à celui de leur composé majoritaire (1,8-cinéole).

#### **4. Comparaison entre les quatre plantes étudiée**

Grâce à ces études, nous concluons que :

- L'huile essentielle de *C. cuminum* et l'HE de *L. nobilis* diffèrent par leur composé de base, où le composé volatil majoritaire du cumin est le cuminaldéhyde et le composé majoritaire de l'HE de *L. nobilis* est le 1,8-cinéole, mais ils partagent la même activité antifongique, qui est l'inhibition de la croissance de mycélium d'*Aspergillus flavus*.
- L'activité antifongique d'HE de *Mentha spicata* pourrait être attribuée au composé majoritaire : la carvone, qui inhibe la croissance d'*A.flavus* et *A.niger* (antiaflatoxinogènes et antiochratoxinogènes).
- l'HE de *S. officinalis* à trois principaux composants :  $\alpha$ -thuyone, camphre, 1,8-cinéole et son activité inhibitrice de la germination des spores d'*A.carbonarius*, par contre le 1,8-cinéole est le composé majoritaire de l'HE de *L. nobilis* qui provoque l'inhibition de la production de l'OTA.

*Conclusion et  
perspective*

### Conclusion

L'objectif principal de ce travail était de comparer des HEs de quatre plantes médicinales (*C. cyminum*, *L. nobilis*, *Mentha spicata*, *Salvia officinalis*) pour leur capacité à inhiber la production d'aflatoxine et l'ochratoxine A. En effet, cinquante cinq ans après sa découverte, la présence de l'AF et l'OTA dans la chaîne alimentaire est toujours un sujet d'actualité et ces composés restent des contaminants majeurs de par sa toxicité. Plusieurs stratégies de lutte ont été développées pour contrer le développement des souches aflatoxinogènes et ochratoxinogènes, et par la suite, la production d'aflatoxines et l'ochratoxine A. parmi ses stratégies, les plantes médicinales sont utilisées comme moyen de lutte contre l'intoxication induit par l'aflatoxine et l'ochratoxine A.

Cette étude a porté dans un premier temps sur les principales souches productrices d'AF et l'OTA, caractérisation physico-chimique, la biosynthèse et les facteurs nécessaires et aussi les méthodes d'extraction et de dosage de ces mycotoxines, et la contamination des produits alimentaires par AFs et l'OTA suit d'un Toxicocinétique et la toxicité.

Le deuxième chapitre est regroupé sur la description botanique des quatre plantes médicinales étudiées, la taxonomie, l'extraction des HEs par hydrodistillation et leur activité biologique à savoir les capacités antifongique, anti-aflatoxinogènes et anti-ochratoxinogènes.

Par l'étude des résultats des chercheurs, les HEs ont montré une variation dans le rendement. Les rendements des HEs de *C. cyminum* et *L. nobilis* et *S. officinalis* sont : 1,08%, 1,13%, 1,36% respectivement. Par contre à Tiaret, Laghouat, Bejaïa le rendement de *Mentha spicata* est : 1,97%, 1,04%, 1,1% respectivement. Ces résultats sont variables de chercheur à l'autre et selon la région de l'étude et les conditions favorables.

Sur le plan chimique, les HEs ont montré une composition variée, où le cuminaldéhyde (65,98%) était le composé majoritaire dans l'HE de *C. cyminum*. L'HE de *L. nobilis* a été dominé par le 1,8-cinéole (35,54%). La carvone était le composé le plus dominant dans l'HE de *Mentha spicata* avec des variations dans le pourcentage en trois régions : la carvone (63,59%), (49,5%), (48,5%) à Tiaret, Laghouat, Bejaïa respectivement. alors que celle de *S. officinalis* a été caractérisée par trois principaux composants :  $\alpha$ -thuyone ( $27,5 \pm 1,03\%$ ), camphre ( $25,0 \pm 1,56\%$ ) et 1,8-cinéole ( $21,9 \pm 1,1\%$ ).

**En perspective de :**

- ✓ Effectuer d'autres études plus approfondies et élargies sur tout le territoire national.
- ✓ Il sera bien convenable de continuer de travailler sur d'autres plantes médicinales afin de trouver une ou plusieurs plantes ayant un potentiel réducteur intéressant de l'OTA et l'AF.
- ✓ Introduire les analyses mycotoxicologiques (AF et OTA), comme paramètre d'analyse Permanent et de routine à l'échelle nationale.
- ✓ Recherche des techniques plus faciles, avec des résultats plus fiables et précis pour la détection des AFs et l'OTA.
- ✓ Faire un plan de surveillance et contrôle orienté, en ciblant par exemple une région suivie sur plusieurs années, permettra de surveiller l'évolution des teneurs en aflatoxines et l'ochratoxine A dans les matières premières végétales en fonction des conditions climatiques ; surtout climatiques sont favorables aux contaminations par les moisissures (au champ ou au stockage).
- ✓ Nous appelons à une réflexion sérieuse et urgente sur l'élaboration de normes algériennes relatives à la contamination par les mycotoxines.
- ✓ Maintenir un bon niveau de contrôle des aliments surtout lorsque les aliments importent en grandes quantités et contient un grands pouvoir nutritionnel.

*Référence*

*bibliographique*

**1-A .B.Hendrich,** (2006) Flavonoid-membrane interactions :possible conséquence for biological affects of some polyphenolic compounds. Acta pharmacologica Sinica.

**2-A.F.S.S.A** (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments).(2009). Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport synthétique, pp.309.

**3-ABAD N.A.A.,** Nouri M.H.K. &Tavakkoli F. (2011). Effect of Salvia officinalishydroalcoholic extract on vincristine-induced neuropathy in mice. Chin J Nat Med .9: 354-358.

**4-ABARCA, M. L. B., M.R.; CASTELLA, G.; CABANES, F.J.** (1994). OchratoxinA production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. Appl. Environ. Microbiol., 2650-2652.

**5-Abd El-Aziz, A.R.M.,** Mahmoud, M.A., Al-Othman, M.R. & Al-Gahtani, M.F. (2015) Use of selected essential oils to control aflatoxin contaminated stored cashew and detection of aflatoxin biosynthesis gene. Scientific World Journal, Volume 2015, Article ID 958192, 13 pages.

**6-Abootalebian M.,** keramat J.,kadivar M.,Ahmadi F.and Abdinian M.2016.comparison of total phenolic and antioxidant activity of different *Mentha spicata* and *M.longifolia* accessions. Annals of Agricultural Science,61.p :175-179.

**7-Adams M. R.,** & Moss, M. O. (2002). Toxingenic fungi. In, Food microbiology, RSC, UK, 282-301.

**8-AFNOR** (Association Française de Normalisation), 2000, Recueil des normes françaises : huiles essentielles. Monographies relatives aux huiles essentielles. AFNOR, Paris

**9-AFSSA.** (2006). Rapport synthétique de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans la chaîne alimentaire humaine et animale, décembre 2006.

- 10-Ahlberg, S.H., Joutsjoki, V. & Korhonen, H.J.** (2015) Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. *International Journal of Food Microbiology*, 207, 87–102.
- 11-ANONYME.** (1997). Agriculture food and nutrition for Africa: a resource book for teachers of agriculture. *Food and Agricultural Organization of the United Nation*. FAO.
- 12-Arbillaga, L., et al.,** In vitro gene expression data supporting a DNA non-reactive genotoxic mechanism for ochratoxin A. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007. 220(2): p. 216-24.
- 13-Arraiza, M.P., Arrabal, C., Lopez, J.V.,** 2012. Seasonal Variation of Essential Oil Yield and Composition of Sage (*Salvia officinalis* L.) Grown in Castilla - La Mancha (Central Spain). *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca* 40, 106–108.
- 14-Atanda, O.O., Akpan, I. & Oluwafemi, F.** (2007) The potential of some spice essential oils in the control of *A. parasiticus* CFR 223 and aflatoxin production. *Food Control*, 18, 601–607.
- 15-Atoui A.,** (2006) Approche de la mycotoxinogénèse chez *Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus carbonarius*: étude moléculaire et physiologique. *Thèse de doctorat d'université Microbiologie et biocatalyse industrielles. Toulouse : Institut National Polytechnique. France. P:17*
- 16-Aziz N.H. & Moussa L.A.,** 1997. Influence of white light, near-UV irradiation and other environmental conditions on production of aflatoxin B 1 by *Aspergillus flavus* and ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus*. *Nahrung. fun.*, 41: 150-154.
- 17-Bacon C.W., Sweeney J.G., Rabbins J.D. & Burdick D.,** 1973. Production of penicillic acid and ochratoxin A on poultry feed by *Aspergillus ochraceus*: temperature and moisture requirements. *Appl. Microbiol.*, 26: 155-160.

**18-Badiee P.**, Nasirzadeh A.R. & Motaffaf M. (2012). Comparison of *Salvia officinalis* L. essential oil and antifungal agents against candida species. *J Pharm Technol Drug Res.* 1:7.

**19-Bardaweel S.K.**, Gherib A., Bakchiche B., Alsalamat H.A., Rezzoug M., flamini G, 2018, Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of essential oil of *Mentha spicata* L.(Lamiaceae) from Algerian Saharan atlas. *Complementary and Alternative Medicine*, 18(201), 1-7p

**20-Baricevic, D.** & Bartol, T. (2000). Pharmacology: The biological /pharmacological activity of the *Salvia* genus. Dans E. K. Spiridon, SAGE: The genus *Salvia*. Athens, Greece: Overseas Publishers Association. pp. 143-184.

Bayman, P.a.B., J., Ochratoxins: A global perspective. *Mycopathologia*, 2006. 162(3): p. 215- 223.

**21-Bbosa, G.S.**, Kitya, D. & Lubega, A. (2013). Review of the biological and health effects of aflatoxins on body organs and body systems. *In Aflatoxin - Recent Advances and Future Prospects.* 12, 240 - 265.

**22-Beis, S. H.**, Azcan, N., Ozek, T., Kara, M. & Baser, K.H.C. (2000). Production of essential oil from cumin seeds. *Chemistry of Natural compound.* 36, 265-268.

**23-Beltrán, E.**; Ibáñez, M.; Sancho, J.V. UHPLC-MS/MS highly sensitive determination of aflatoxins, the aflatoxin metabolite M1 and ochratoxin A in baby food and milk. *Food Chem.* 2011, 126, 737–744. *Toxins* 2019, 11, 309; doi:10.3390/toxins11060309

**24-Ben Jemâa, J.M.**, Tersim, N., Toudert, K.T. & Larbi Khouja, M. (2012). Insecticidal activities of essential oils from leaves of *Laurus nobilis* L. from Tunisia, Algeria and Morocco, and comparative chemical composition. *Journal of Stored Products Research.* 48, 97- 104.

**25-Bendele A. M**, Carlton W. W, Krogh P., Lillehoj E. B. (1985). Ochratoxin A carcinogenesis in the (C57BL/6J X C3 H)F1 mouse. *Journal of the National Cancer Institute*. 75: 733–742.

**26-Benrejdal**, A., Dridi, F. & Nabiev, M. (2012). Extraction and analysis of essential oil of Cumin. *Asian Journal of Chemistry*. 24(5), 1949-1951.

**27-Bensabah F.**, Houbairi S., Essahli M., Lamiri A., Naja J, 2013, Chemical composition and inhibitory effect of the essential oil from *Mentha spicata* irrigated by wastewater on the corrosion of aluminum in 1 molar hydrochloric acid. *Portugaliae Electrochimica Acta*, 31(4),195-206p

**28-Bhatnagar**, D., Yu, J., and Ehrlich, K. C. (2002). Toxins of filamentous fungi. In: *Fungal Allergy and Pathogenicity*. *Chem Immunol*. Vol. 81. pp. 167–206,

**29-Bidmeshkipour A.**, Keshavarz M., Mostafaie A., Mansouri K. & Mohammadi- Motlagh H.R. (2011). Antitumor activity of *Salvia officinalis* is due to its anti- angiogenic, anti-migratory and anti-proliferative effects. *Cell J*.12: 477- 482.

**30-Biro K.**, Solti L., Banra-Vetro I., Bago G., Glavits R., Szabo E. & Fink-Gremmels J., 2002. Tissue distribution of ochratoxin A as determined by HPLC and ELISA and histopathological effects in chickens. *Avian Patho.*, 31 : 141-148.

**31-Boukartaba H.**, Hammoum K, 2018, Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Syzyguimaromaticum* L. Mémoire de Master, Université de Khmis-Miliana, 83p

**32-Bouzouita**, N., Nafti, A., Chaabouni, M.M., Lognay, G.C., Marlier, M. Zghoulli, S. & Thonart, P. (2001). Chemical composition of *Laurus nobilis* oil from Tunisia. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 13, 116-117.

**33-Brahmi F.**, Adjaoud A., Marongiu B., Falconieri D., Yalaoui-Guellal D., Madani K., Chibane M, 2016, Chemical and biological profiles of essential oils

from *Mentha spicata* L. leaf from Bejaia in Algeria. *Journal of essential oil Research*, 28(3),211-220p

**34-Bredenkamp, M. W., DILLEN, J. L., VAN ROOYEN, P. H. and STEYN, P. S. (1989).** Crystal structures and conformational analysis of ochratoxin A and B: Probing the chemical structure causing toxicity. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 1835-1839.

**35-Breitenbach, M., Cramer, R., and Lehrer, S. Eds., Basel, Karger. Blount, W. P. (1961).** Turkey 'X' disease. *J. Brit. Turk. Fed.* 9:52–61.  
<http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2011.563154>

**36-Brown, R. L., Chen, Z. Y., Menkir, A., Cleveland, T. E., Cardwell, K., Kling, J., and White, D. G. (2001).** Resistance to aflatoxin accumulation in kernels of maize inbreds selected for ear rot resistance in West and Central Africa. *J. Food Protect.* 64:396–400.  
<http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2011.563154>

**37-Brune K. & Patrignani, P. (2015).** New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Pain Res*;8:105-111.

**38-Budavari, S., O'NEIL, M. J., SMITH, A. and HECKELMAN, P. E. (1989).** *The Merck Index*, Merck & Co. Inc., Rahway, NJ, 1008.

**39-C.Aliaga et al.,(2004)** Comparison of the free radical scavenger activities of quercetin and rutin an experimental and theoretical study.*Can .J.Chem.*

**40-Campagnollo F. B., Ganev K. C., Khaneghah A. M., Portela J. B., Cruz A. G., Granato D. & Sant'Ana A. S. 2016.** The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M1: A review. *Food Control* 68:310-329.

**41-Campos, W.E.O.; Rosas, L.B.; Neto, A.P.** Extended validation of a sensitive and robust method for simultaneous quantification of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in Brazil nuts by HPLC-FLD. *J. Food Compos. Anal.* 2017, 60, 90–96.  
*Toxins* 2019, 11, 309; [doi:10.3390/toxins11060309](https://doi.org/10.3390/toxins11060309)

**42-Caputo, L.,** Nazzaro, F., Souza, L.F., Aliberti, L., De Martino, L., Fratianni, F., Coppola, R. & De Feo, V. (2017). *Laurus nobilis*: Composition of essential oil and its biological activities. *Molecules*. 22, 930.

**43-Carlier-Loy P,** 2015, *Mentha spicata* : Description et utilisations en thérapeutique et en agriculture comme anti germinatif sur la pomme de terre. Thèse de Doctorat. Université de Picardie, France, 99p

**44-Castegnaro M.,** Mohr U., Pfohl-Leszkowicz A., Esteve J., Steinmann J., Tillmann T., Michelon J., Bartsch H. (1998). Sex- and strain-specific induction of renal tumors by ochratoxin A in rats correlates with DNA adduction. *International Journal of Cancer*. 77: 70-75.

**45-Castegnaro M.,** Pfohl-Leszkowicz A., (2002). Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine. Moll & Moll (eds) Lavoisier. Castegnaro M., Canadas D., Vrabcheva T., Petkova-Bocharova T., Chernozemsky I. N, Pfohl-Leszkowicz A. (2006a). Balkan endemic nephropathy: Role of ochratoxins A through biomarkers. *Molecular Nutrition & Food Research*. 50: 519-529

**46-Catharino, R.R.;** Marques, L.A.; Santos, L.S. Aflatoxin screening by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal. Chem*. 2005, 77, 8155–8157. *Toxins* 2019, 11, 309; doi:10.3390/toxins11060309

**47-Ceci E.,** Bozzo G., Bonerba E., Di Pinto A., Tantillo M.G. (2007).Ochratoxin A detection by HPLC in target tissues of swine and cytological and histological analysis.*Food Chemistry*. 105: 364–368

**48-Ceylan, E. & Fung, Y.C.D.** (2004). Antimicrobial activity of spices. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*. 12, 1-55.

**49-Chao, L.K.,** Hua, K.F., Hsu, H.Y., Cheng, S.S., Lin, J.Y. & Chang, S.T. (2005). Study on the anti-inflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 53, 7274-7278.

**50-Chen SY**, Chen CJ, Chou SR, Hsieh LL, Wang LY, Tsai WY, Ahsan H et Santella RM (2001) Association of Aflatoxin B1–albumin adduct levels with hepatitis B surface antigen status among adolescents in Taiwan. *Cancer Epidemiol Biomarker*, 10 (11): 1223-1226

**51-Chen**, Y.-S., Yanagida, F. & Shinohara, T. (2005) Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure. *Letters in Applied Microbiology*, 40, 195–200.

**52-Chizzola**, R. (2013) Chapter 96 - Regular Monoterpenes and Sesquiterpenes (Essential Oils). In *Natural Products* p 2973.

**53-Chmit**, M., Kanaan, H., Habib, J., Abbass, M., Mcheik, A. & Chokr, A. (2014). Antibacterial and antibiofilm activities of polysaccharides, essential oil, and fatty oil extracted from *Laurus nobilis* growing in Lebanon. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 7(1), S546-S552.

**54-Ciegler**, A., FENNELL, D., MINTZLAFF, H.-J. and LEISTNER, L. (1972). Ochratoxin synthesis by *Penicillium* species. *Naturwissenschaften*, 59, 365-366.

**55-Commission des communautés européennes**, 2002a. Directive 2002/26/CE de la commission du 13 mars 2002 portant fixation des modes de prélèvement d'échantillons et des méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des teneurs en ochratoxine A des denrées alimentaires. *Journal officiel des Communautés européennes*. L 75 pp. 38-43.

**56-Commission du Codex Alimentarius**, 2002a. Document CX/FAC 02/21. Avant-projet de code d'usages en matière de prévention (réduction) de la contamination des céréales par les mycotoxines, y compris les appendices sur l'ochratoxine A, la zéaralénone, les fumonisines et les trichothécènes. Doc. Internet: [ftp://ftp.fao.org/codex/ccfac34/fa02\\_21f.pdf](ftp://ftp.fao.org/codex/ccfac34/fa02_21f.pdf)

**57-Creppy EE (2002) Update of survey**, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol Lett*, 127: 19-28

**58-Cronquist A.** (1968). The Evolution and Classification of Flowering Plants. pp 396.

**59-Daferera, D.J., Ziogas, B.N. & Polissiou, M.G.** (2000). GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48, 2576-2581.

**60-Dalcero A., Magnoli C., Hallak C., Chiacchiera S.M., Palacio G., Rosa C.A.,** (2002), Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus section Nigri* in Argentina, Food Addit Contam., 19(11), 1065-1072

**61-Dalié, D.K.D., Deschamps, a. M. & Richard-Forget, F.** (2010) Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. Food Control, 21, 370–380.

**62-De Muynck, C., Leroy, A.I.J., De Maeseneire, S., Arnaut, F., Soetaert, W. & Vandamme, E.J.** (2004) Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. Microbiological Research, 159, 339–346.

**63-De Saeger L. Sibanda A. Desmet C., Van Peteghem.** (2002). Int. J. Food Microbiol. 75-135.

**64-Derakhshana, S., Sattari, M. & Bigdelib, M.** (2008). Effect of subinhibitory concentrations of cumin (*Cuminum cyminum L.*) seed essential oil and alcoholic extract on the morphology, capsule expression and urease activity of *Klebsiella pneumonia*. International Journal of Antimicrobial Agents. 32, 432-436.

**65-Dhifi W., Jelali N., Mnif W., Litaïem M., Hamdi N,** 2013, Chemical composition of the essential oil of *Mentha spicata L.* from Tunisia and its biological activities. Journal of Food Biochemistry, 37(3), 362-368p

**66-Dibong, S. D., Mpondo, M. E., Nigoye, A., Kwin, M. F. & Betti, J. L.** 2011. Ethnobotanique et phytomédecine des plantes médicinales de Douala, Cameroun. [Ethnobotany and phytomedicine of medicinal plants sold in Douala

markets] — Journal of Applied Biosciences 37: 2496 – 2507. ISSN 1997– 5902.  
Published online at [www.biosciences.elewa.org](http://www.biosciences.elewa.org).<sup>1</sup>

**67-Djenane, D.** (2015). Cheminal profil, antimicrobial and antioxidant activity of Algerian Citrus essential oils and their application in *Sardina pilchardus*. *Foods*. 4, 208-228.

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

**69-Dos Santos Oliveira, M. & Badiale Furlong, E.** (2008). Screening of antifungal and antimycotoxigenic activity of plant phenolic extracts. *World Mycotoxin Journal*. 1,139- 146.

**70-El Hadri A., del Río M.A.G, Sanz J., et al.** (2010). Cytotoxic activity of a -humulene and transcaryophyllene from *Salvia officinalis* in animal and human tumor cells. *An R AcadNac Farm*. 76: 343-356.

**71-el Khoury, A. and A. Atoui,** Ochratoxin a: general overview and actual molecular status. -*Toxins (Basel)*, 2010. 2(4): p. 461-93.

**72-El-Dessouki S.,** (1992), Ochratoxin A in bier, *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 11, 354- 355.

**73-Elling F., Nielsen J. P., Lillehoj E. B., Thomassen M. S., Stormer F. C.** (1985). Ochratoxin A-induced porcine nephropathy: Enzyme and ultrastructure changes after shortterm exposure. *Toxicon*. 23: 247-254.

**74-El-nezami HS,** Nicoletti G, Neal GE, Donohue DC et Ahokas J (1995) Aflatoxin M1 in human breast milk samples from Victoria, Australia and Thailand. *Food Chem Toxicol*, 33:173-179.

**75-Fazekas B.**, Tar A.K., Zomborszky-Kovács M., (2002), Ochratoxin a contamination of cereal grains and coffee in Hungary in the year 2001, *Acta Vet Hung.*, 50 (2), 177-188

**76-Fekih N.**, 2015, Propriétés chimiques et biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre *Pinus* poussant en Algérie. Thèse de Doctorat. Université de Tlemcen, 178p

**77-Fernandez-Andrade**, C.M.M., Da Rosa, M.F., Boufleuer, É., Borges Padilha Ferreira, F., Iwanaga, C.C., Gonçalves, J.E., Cortez, D.A.G., Martins, C.V.B., Linde, G.A., Simões, M.R., Lobo, V.S., Gazim, Z.C., 2016. Chemical composition and antifungal activity of essential oil and fractions extracted from the leaves of *Laurus nobilis* L. cultivated in Southern Brazil. *J. Med. Plants. Res.* 10, 865–871.

**78-Flamini**, G., Tebano, M., Cioni, P.L., Ceccarini, L., Simone Ricci, A. & Longo, I. (2007). Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of *Laurus nobilis* L. and a novel method which uses microwaves applied in situ, without resorting to an oven. *Journal of Chromatography A.* 1143, 36-40.

**79-Frayssinet**, C., Fremy, J-M. (1999). Dosages des mycotoxines. Dans. *Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agroalimentaires.* Chapitre 15. 2ème édition. Lavoisier. Tec. Doc.Paris. p.349-370.

**80-Freires d'Almeida**, I., Murata, R.M., Furletti, V.F., Sartoratto, A., Matias d'Alencar, S., Figueira, G.M., d'Oliveira Rodrigues, J.A., Duarte, M.C.T. & Rosalen, P.L. (2014). *Coriandrum sativum* L. (Coriander) essential oil: Antifungal activity and mode of action on *Candida* spp. And molecular targets affected in human whole-genome expression. *PLoS ONE.* 9, 990-86.

**81-Frenette C.**, Paugh R. J., Tozlovanu M., Juzio M., Pfohl-Leszkowicz A., Manderville R. A. (2008). Structure–activity relationships for the fluorescence of ochratoxin A: Insight for detection of ochratoxin A metabolites. *Analytica chimica acta* (In press).

**82-Fujii S.**, Ribeiro R.M., Scholz M.B., Ono E.Y., Prete C.E., Itano E.N., Ueno Y., Kawamura O., Hirooka E.Y., (2006), Reliable indirect competitive ELISA used for a survey of ochratoxin A in green coffee from the North of Paraná State, Brazil, *Food Addit Contam.*, 23 (9), 902-909

**84-Gagliano N.**, Dalle Donne I., Torri C., Migliori M., Grizzi F., Milzani A., Filippi C., Annoni G., Colombo P., Costa F., Ceva-Grimaldi G., Bertelli A. A. E., Giovannini L., Gioia M.. (2006). Early cytotoxic effects of ochratoxin A in rat liver: A morphological, biochemical and molecular study. *Toxicology*. 225 : 214–224.

**85-Garcia C.S.C.**, Menti C., Lambert A.P.F., et al. (2016). Pharmacological perspectives from Brazilian *Salvia officinalis* (Lamiaceae): antioxidant, and antitumor in mammalian cells. *An Acad Bras Ciênc*. 88: 281-292.

Gareis M. (1996). Fate of ochratoxin A on processing of meat products. *Food Additives & Contaminants*. 13: 35–37.

**86-Ghorbani A.**, MoradiMarjaneh R., Rajaei Z. &Hadjzadeh M.A.R. (2014). Effects of *Securigerasecuridaca* extract on lipolysis and adipogenesis in diabetic rats. *Cholestrol*. 2014: 582-106.

**87-Gilani**, S.H., J. Bancroft, and M. Reily, Teratogenicity of ochratoxin A in chick embryos. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1978. 46(2): p. 543-6.

**88-Grosso**, F., et al., New data on the occurrence of ochratoxin A in human sera from patients affected or not by renal diseases in Tunisia. *Food Chem Toxicol*, 2003. 41(8): p. 1133-40.

**89-Gross-Steinmeyer K.**, Weymann J., Hege H.G. & Metzler M., 2002. Metabolism and lack of DNA reactivity of the mycotoxin ochratoxin A in cultured rat and human primary hepatocytes. *J. Agric. Food Chem.*, 50 : 938-945  
Guimaraes A.S.,Carmo F.B.,pauletti R.B.,Seyffert N.,Ribeiro D.,Lage A.P.,Heinemann M.B.,Miyoshi A.,Azevedo V.,Gouveia A.M.G.2011.Caseous

lymphadenitis :epidemiology ,diagnosis,and control .The IIOAB Journal,v.2.P :33-43.

**90-Gusarov, I.,** Shatalin, K., Starodubtseva, M. & Nudler, E. (2009). Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics. *Science*. 325, 1380-1384.

**91-Guynot, M.E.,** Marin, S., Setu, L., Sanchis, V. & Ramos, A.J. (2005). Screening for antifungal activity of some essential oils against common spoilage fungi of bakery products. *Food Science and Technology International*. 11(1), 25-32.

**92-Haddouchi, F.,** Lazouni, H.A., Meziane, A. & Benmansour, A. (2009). Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. *African Science*. 05 (2), 246 - 259.

**93-Hagelberg S.,** Hult K. & Fuchs R., 1989. Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. *J. Appt. Toxicol.*, 9: 91-96.

**94-Hayes, A.W.,** R. Melton, and S.J. Smith, Effect of aflatoxin B1, ochratoxin and rubratoxin B on a protozoan, *Tetrahymena pyriformis* HSM. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1974. 11(4): p. 321- 5.

**95-Hayes, A.W.,** R.D. Hood, and H.L. Lee, Teratogenic effects of ochratoxin A in mice. *Teratology*, 1974. 9(1): p. 93-7.

**96-Hayouni E.A.,** Chraief I., Abedrabba M., et al. (2008). Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *Int J Food Microbiol*.125: 242-251.

**97-Höhler D.,** 1998. Ochratoxin A in food and feed occurrence, legislation and mode of action. *Z. Ernährungswiss*; 37, 2-12.

**98-Heit S.,** (2015) Identification des fusarium et détection des mycotoxines associées par MALDI-TOF. *Thèse de l'université de Lorraine Faculté de Pharmacie*. P :23, 24, 25, 26, 27, 29, 33, 34, 38, 39, 41.

**99-Henry, S.H. & Bosch, F.X.** (2001). Foodborne disease and mycotoxin epidemiology, in *Foodborne Disease Handbook*. 2<sup>ème</sup> édition, Hui, Y.H., Smith, R.A., Spoerke, J.R. & Marcel Dekker, D.G., New York, USA, pp. 698.

**100-Hepsag, F.; Golge, O.; Kabak, B.** Quantitation of aflatoxins in pistachios and groundnuts using HPLC-FLD method. *Food Control* 2014, 38, 75–81. *Toxins* 2019, 11, 309; doi:10.3390/toxins11060309

**101-Hernandez-Saavedra D., Perez-Ramirez I.F., Ramos-Gomez M., Mendoza-Diaz S., Loarca-Pina G. & Reynoso-Camacho R.** (2016). Phytochemical characterization and effect of *Calendula officinalis*, *Hypericum perforatum*, and *Salvia officinalis* infusions on obesity associated cardiovascular risk. *Med Chem Res.* 25: 163-172.

**102-Herrman JL et Walker R.** (1999) Risk analysis of mycotoxins by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). *Food Nutr Agr*, 23: 17-24.

**103-Herzallah, S.M.** Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. *Food Chem.* 2009, 114, 1141–1146. *Toxins* 2019, 11, 309; doi:10.3390/toxins11060309

**104-HORIE, Y.** (1995). Productivity of ochratoxin A of *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus section nigri*. *Nippon Kingakki Kaiho*, 73-76.

**105-Horvathova E., Srancíková A., Regendova-Sedlackova E., et al.** (2016). Enriching the drinking water of rats with extracts of *Salvia officinalis* and *Thymus vulgaris* increases their resistance to oxidative stress. *Mutagenesis.* 31: 51-59.

**106-Hundhausen C., Bosch-Saadatmandi C., Augustina K., Blank R., Wolfram S., Rimbacha G.** (2005). Effect of vitamin E and polyphenols on ochratoxin A-induced cytotoxicity in liver (HepG2) cells. *Journal of Plant Physiology.* 162: 818-822.

**107-Hussain A.**, Anwar F., Shahid M., Ashraf M., Przybylski R, 2011, Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Spearmint (*Mentha spicata* L.) from Pakistan. *Journal of Essential Oil Research*, 22(1), 78-84p

**108-Hussein HS et Brasel JM** (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167: 101-134.

**109-Hwang C. A.**, Draughon F.A. (1994). Degradation of ochratoxin A by *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of Food Protection*. 57: 410– 414.

**102-IARC.** (1993). International Agency for Research on Cancer. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. 56, IARC, Lyon.

**103-Isman, M.B. & Machial, C.M.** (2006) Chapter 2 Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. *Advances in Phytomedicine*, 3, 29–44.

**104-Isman, M.B.** (2000) Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19, 603–608.

**105-Jalali-Heravi, M., Zekavat, B. & Sereshti, H.** (2007). Use of gas chromatography–mass spectrometry combined with resolution methods to characterize the essential oil components of Iranian cumin and caraway. *Journal of Chromatography A*. 1143, 215- 226.

**106-Jaquet J, Lafont J et Lafont P** (1982) Sur la contamination du lait par les aflatoxines. *Revue laitière française*, 42 : 63-67

**107-JECFA,** Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants: Ochratoxin A. WHO Technical Report Series 806, 1991.

**108-Jia,W.;** Chu, X.; Ling, Y. Multi-mycotoxin analysis in dairy products by liquid chromatography coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry. *J.*

Chromatogr. A 2014, 1345, 107–114. Toxins 2019, 11, 309; doi:10.3390/toxins11060309

**109-Jonsson N.** & Pettersson H., 1999. Evaluation of different preservation methods for cereal grain based on occurrence of moulds and mycotoxins (en Suédois). JTI-rapport, Lantbruk och Industri Nr 263, Jordbrukstekniska institutet, Uppsala, Suède.

**110-Juodeikiene, G.,** Basinskiene, L., Bartkiene, E. & Matusевичius, P. (2012) Mycotoxin Decontamination Aspects in Food, Feed and Renewables Using Fermentation Processes. In Structure and Function of Food Engineering pp 171–204.

**111-Kane A.** (1986). Intoxication subchronique par l'ochratoxine A, mycotoxine contaminant les aliments: effets néphrotoxiques et génotoxiques. Thèse de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg.

**112-Karlovsky P.** (1999). Biological detoxification of fungal toxins and its use in plant breeding, feed, and food production. *Natural Toxins*. 7: 1–23.

**113-Kedia, A.,** Prakash, B., Mishra, P.K. & Dubey, N.K. (2014b) Antifungal and antiaflatoxic properties of *Cuminum cyminum* (L.) seed essential oil and its efficacy as a preservative in stored commodities. *International Journal of Food Microbiology*, 168-169, 1–7.

**114-Kedia, A.,** Prakash, B., Mishra, P.K., Chanotiya, C.S. & Dubey, N.K. (2014a). Antifungal, antiaflatoxic, and insecticidal efficacy of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 89, 29-36.

**115-Keller, N. P.,** Turner, G., and Bennett, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology* 3:937–947. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2011.563154>

**116-Kerekes, E.B.,** Deak, E., Tako, M., Tserennadmid, R., Petkovits, T., Vagvolgyi, C. & Krisch, J. (2013). Anti-bio film forming and anti-quorum

sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related microorganisms. *Journal of Applied Microbiology*. 115, 933-942.

**117-Keshavarz M.**, Mostafaie A., Mansouri K., Bidmeshkipour A., Motlagh H.R. & Parvaneh S. (2010). In vitro and ex vivo antiangiogenic activity of *Salvia officinalis*. *Phytother Res*. 24: 1526-1531.

**118-Kilic, A.**, Kollmannsberger, H. & Nitz, S. (2005). Glycosidically bound volatiles and flavor precursors in *Laurus nobilis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 2231- 2235.

**119-Kimura, N.** & Hirano, S. (1988) Inhibitory Strains of *Bacillus subtilis* for Growth and Aflatoxin production of Aflatoxigenic Fungi. *Agricultural and Biological Chemistry*, 52, 1173–1179.

**120-Kong, W.;** Wei, R.; Logrieco, A.F. Occurrence of toxigenic fungi and determination of mycotoxins by HPLC-FLD in functional foods and species in China markets. *Food Chem*. 2014, 146, 320–326. *Toxins* 2019, 11, 309; [doi:10.3390/toxins11060309](https://doi.org/10.3390/toxins11060309)

**121-Krogh P.**, 1987. Ochratoxin in food. In: *Mycotoxins in Food*. Ed. Krogh P., London, Academic Press, pp. 97-121.

**122-Krogh P.**, 1992. Role of ochratoxin in disease causation. *Food Chem. Toxicol.*, 30: 213-224.

**123-Kuiper-Goodman T.** & Scott PM., 1989. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomed. Environ. Sei.*, 2 : 179-248.

**124-KUIPER-GOODMAN, T.** and SCOTT, P. M. (1989). Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomed Environ Sci*, 2, 179-248.

**125-Kuiper-Goodman, T.**, et al., Health risk assessment of ochratoxin A for all age-sex strata in a market economy. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2010. 27(2): p. 212-40.

**126-Kumagai S.**, 1988. Effects of plasma ochratoxin A and luminal pH on the jejunal absorption of ochratoxin A in rats. *Food Chem. Toxicol.*, 26: 753-758.

**127-Kurtzman CD**, Horn BW et Hesseltine CW (1987) *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 53: 174-158.

**128-Ladan, M. A. R.** (2015). Essential oil of the seeds of *Cuminum cyminum* L. (Apiaceae). *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*. 4 (3), 161-163.

**129-Lai M.**, Semenink G. & Hesseltine C.W., 1970. Conditions for productions of ochratoxin A by *Aspergillus* species in synthetic medium. *Appt. Environ. Microbiot.*, 19 : 542-544.

**130-Larsen T.O.**, Svendsen A. & Smedsgaard J., 2001. Biochemical characterization of ochratoxin A-producing strains of the genus *Penicillium*. *Appt. Environ. Microbiot.*, 67: 3630-3635.

**131- Le Bars J.**, Le Bars P., (1987) Les moisissures des denrées alimentaires et leurs conséquences. *Conférences prononcées dans le cadre de la réunion de la "Section MidiPyrénées" à Toulouse*

**132-Lea T.**, Steien K., Stormer C. (1989) Mechanism of ochratoxin A induced immunosuppression. *Mycopathologia*. 107: 153-159.

**133-Leclerc F.C.**, Papon N., Noel T., Villard J., (2005) Moisissures et risques alimentaires (Mycotoxicoles). *Revue Francophone des Laboratoires*. p : 61-66.

**134-Li, R. & Jiang, Z.** (2004). Chemical composition of the essential oil of *Cuminum cyminum* L. from China. *Flavour and Fragrance Journal*. 19, 311-313.

**135-Li, X.M., Tian, S.L., Pang, Z.C., Shi, J.Y. & Feng, Z.S.** (2009). Extraction of *Cuminum cyminum* essential oil by combination technology of organic solvent with low boiling point and steam distillation. *Food Chemistry*. 115, 1114-1119.

**136-Lima C.F.**, Azevedo M.F., Araujo R., Fernandes-Ferreira M. & Pereira-Wilson. (2006). C Metformin-like effect of *Salvia officinalis* (common sage): is it useful in diabetes prevention? *Br J Nutr.* 96: 326-333.

**137-Lopez de Cerain A.**, Gonzalez-Penas E., Jimenez A. M., Bello J. (2002). Contribution to the study of ochratoxin A in Spanish wines. *Food Additives & Contaminants.* 19: 1058–1064.

**138-Lori, G. A.**, Sisterna, M., Haidukowski, N., and Rizzo, I. (2003). *Fusarium graminearum* and deoxy nivalenol contamination in the durum wheat area of Argentina. *Microbiol. Res.* 158:29–35.

<http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2011.563154>

**139- Luo, X.**; Wang, R.; Wang, L. Analyses by UPLC Q-TOF MS of products of aflatoxin B1 after ozone treatment. *Food Addit. Contam. Part A* 2014, 31, 105–110. *Toxins* 2019, 11, 309; doi:10.3390/toxins11060309

**140-Luster M. I.**, Germolec D. R., Burleson G. R., Jameson C. W., Ackermann M. F., Lamm K. R., Hayes H. T. (1987). Selective immunosuppressions in mice of natural killer cell activity by ochratoxin A. *Cancer Research.* 47: 2259-2263.

**141-Magnoli C.**, Dalcerro A.M., Chiacchiera S.M., Miazzo R., Saenz M.A., (1998), Enumeration and identification of *Aspergillus* group and *Penicillium* species in poultry feeds from Argentina, *Mycopathologia*, 142 (1), 27-32

**142-Majerus P.**, Cutko I., Dreyer A., El-Dessouki S., Eyrich W., Reusch H., Schurer B., Waiblinger H.U., (1993), Zur Belastungssituation von Ochratoxin A, in *Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs*, *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 89, 112-113.

**143-Mantle P.**, Kulinskaya E., Nestler S.(2005). Renal tumorigenesis in male rats in response to chronic dietary Ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants.* 22 (supplement 1): 58-64.

**144-Mao, J.; Zheng, N.**; Wen, F. Multi-mycotoxin analysis in raw milk by ultra high performance liquid chromatography coupled to quadrupole orbitrap

mass spectrometry. *Food Control* 2018, 84, 305–311 *Toxins* 2019, 11, 309; doi:10.3390/toxins11060309

**145-Marin, S., Ramos, A., Cano-Sancho, G. and Sanchis, V., 2013.** Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*. 60, 218-237.

**146-Marzouki, H., Khaldi, A., Chamli, R., Bouzid, S., Piras, A., Falconieri, D. & Marongiu, B. (2009).** Biological activity evaluation of the oils from *Laurus nobilis* of Tunisia and Algeria extracted by supercritical carbon dioxide. *Natural Product Research*. 23, 230- 237.

**147-Mayura, K., et al.,** Ochratoxin A-induced teratogenesis in rats: partial protection by phenylalanine. *Appl Environ Microbiol*, 1984. 48(6): p. 1186-8.

Mayura, K., et al., Teratogenic effects of Ochratoxin A in rats with impaired renal function. *Toxicology*, 1984. 32(4): p. 277-85.

**148-Mehdi Razzaghi-Abyaneh (2013)** Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects.

**150-Meissonier, G.M., Oswald, I.P. & Galtier, P. (2005).** Aflatoxicoses chez le porc –Étude bibliographique de données cliniques et expérimentales. *Revue de MédecineVétérinaire*. 156(12), 591-605.

**151-Milne E., White S., Campbell R, Swettenham J., Hansen P. & Ramus F. (2006).** Motion and form coherence detection in autistic spectrum disorder: relationship to motor control and 2:4 digit ratio. *J Autism DevDisord*. 36: 225-237.

**152-Mitic-Culafi C.D., Vukovic-Gacic B., Knezevic-Vukcevic J., Stankovic S. & Simic D. (2005).** Comparative study on the antibacterial activity of volatiles from sage (*Salvia officinalis* L.). *Arch Biol Sci*.57: 173-178

**153-Mohammadi H., Mazloomi S. M., Eskandari M. H., Aminlari M., & Niakousari M. 2017.** The Effect of Ozone on Aflatoxin M1, Oxidative Stability, Carotenoid Content and the Microbial Count of Milk. *Ozone: Science & Engineering* 39(6):447-453.

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

**155-Moss**, M. O., 1996. Mode of formation of ochratoxin A. *Food Addit. Contam.*, 13: 5-9.

**156-Muller G.**, Kielstein P., Kohler H., Berndt A., Rosner H. (1995). Studies of the influence of ochratoxin A on immune and defense reactions in the mouse model. *Mycoses*. 38: 85–91.

**157- Nesbitt**, B.F.; O’Kelly, J.; Sargeant, K. *Aspergillus flavus* and Turkey X disease: Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature* 1962, 195, 1062–1063. *Toxins* 2019, 11, 309; doi:10.3390/toxins11060309

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

**159-Ngundi M.M.**, Shriver-Lake L.C., Moore M.H., Ligler F.S., Taitt C.R., (2006), Multiplexed detection of mycotoxins in foods with a regenerable array, *J Food Prot.*, 69 (12), 3047-3051

**160-Nguyen M. T.**, Tozlovanu M., Tran T. L. , Pfohl-Leszkowicz A. (2007) Occurrence of a.atoxin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in .ve provinces of the central region of Vietnam. *Food Chemistry*. 105 :42–47.

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

**162-Norsati S.**, Hosseini S.A.E.Z., Sarpeleh A., Shahrabak M.S., Shahrabak Y.S, 2011, Antifungal activity of spearmint (*Mentha spicata* L.) Essential oil on

the causal agent of stem and crown rot of Greenhouse Cucumber in Yazd, Iran. International conference on Environmental and Agriculture Engineering, 15, 52-56p

**163-Ouchikh, O.**, Chahed, T., Ksouri, R., Taarit, M.B., Faleh, H., Abdelly, C. (2011). The effects of extraction method on the measured tocopherol level and antioxidant activity of *L. nobilis* vegetative organs. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24, 103-110.

**164-Ouibrahim, A.**, Tlili-Ait-kaki, Y., Bennadja, S., Amrouni, S., Djahoudi, A.G, & Djebar, M.R. (2013). Evaluation of antibacterial activity of *Laurus nobilis* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Ocimum basilicum* L. from Northeast of Algeria. *African Journal of Microbiology Research*. 7(42), 4968-4973.

**165-Ozcan B,** Esen M, Sangun MK, Coleri A, Caliskan M. (2010). Effective antibacterial and antioxidant properties of methanolic extract of *Laurus nobilis* seed oil. *Journal of Environmental Biology.*; 31(5):637-641.

**166-Pamel E.V.,** Vlaemynck G., Heyndrickx M., Herman L., Verbeken A and Daeseleire E., (2010) Mycotoxin production by pure fungal isolates analysed by means of an hplc-ms/ms multimycotoxin method with possible pitfalls and solutions for patulin-producing isolates. *Mycotox. Res.* p: 1-11.

**167-Parent-Massin, D. & Parchment, R.E.** (1998). Haematotoxicity of mycotoxins. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 149, 591-598.

**168-Pedro D.F.,** Ramos A.A., Lima C.F., Baltazar F. & Pereira-Wilson C. (2016). Colon cancer chemoprevention by sage tea drinking: decreased DNA damage and cell proliferation. *Phytother Res.*30: 298-305.

**169-Petzinger E.,** Ziegler K. (2000). Ochratoxin A from a toxicological perspective. *J Vet Pharmacol Ther.* 23: 91–98.

**170-Pfohl-Leszkowicz A. & Castegnaro M.,** 1999b. L'ochratoxine A. In: Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. Conseil

supérieur d'hygiène publique de France - Section de l'alimentation et de la nutrition. Tec&Doc Ed., Paris, pp. 249-277.

**170-Pittet A. & Royer D.**, 2002. Rapid, low cost thin-layer chromatographie screening method for the detection of ochratoxin A in green coffee at a control level of 10 microg/kg. *J. Agric. Food Chem.*, 50 : 243-247.

**171-Porte, A.**, Godoy, R.L.O., Maia-Porte, L.H., 2013. Chemical composition of sage (*Salvia officinalis* L.) essential oil from the Rio de Janeiro State (Brazil). *Rev. Bras. Plantas Med.* 15, 438–441.

**172-Quezel P, Santa S.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, TomeII-ed., CNRS, Paris, (1963).

**173-Ramy, M.**, Sayed, F. & Gada Ibrahim, M. (2010). Chemical compositions, antiviral and antioxidant activities of seven essential oils. *Journal of Applied Science Research.* 6 (1), 50-62.

**174-Ravi, R., Prakash, M. & Bhat, K.K.** (2007). Aroma characterization of coriander (*Coriandrum sativum* L.) oil samples. *European Food Research and Technology.* 225, 367-374.

**175-Razzaghi-Abyaneh, M.**, Shams-Ghahfarokhi, M. & Perng-Kuang, C. (2010) Aflatoxins: Mechanisms of Inhibition by Antagonistic Plants and Microorganisms. *Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology*, 468 Pages.

**176-Rebey, I. B.**, Jabri-Karoui, I., Hamrouni-Sellami, I., Bourgou, S., Limam, F. & Marzouk, B. (2012). Effect of drought on the biochemical composition and antioxidant activities of cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds. *Industrial Crops Products.* 36, 238-45.

**177-Reinholds, I.**; Pugajeva, I.; Bartkevics, V. A reliable screening of mycotoxins and pesticide residues in paprika using ultra high performance liquid chromatography coupled to high resolution Orbitrap mass spectrometry. *Food Control* 2016, 60, 683–689. *Toxins* 2019, 11, 309; doi:10.3390/toxins11060309

**178-Ribelin W.E.**, Fukushima K. & Still P.E., 1978. The toxicity of ochratoxin to ruminants. *Can. J. Camp. Med.*, 42: 127-136

**179-Richard, J. L.** and LYON, R. L. 1986. Aflatoxins and their detection in animal tissues and fluides. *J. Toxicol.* 5 : 197-215.

**180-Robledo M.L.**, Marin S., Ramos A.J., (2001), Contamination natural con micotoxinas en maiz forrajero y granos de café verde en el Estado Nayarit (Mexico), *Rev. Iberoam. Micol.*, 18, 141-144

**181-Roma, A.D.;** Rossini, C.; Riteni, A. A survey on the aflatoxin M1 occurrence and seasonal variation in buffalo and cow milk from southern Italy. *Food Control* 2017, 81, 30–33. *Toxins* 2019, 11, 309; doi:10.3390/toxins11060309

**182-Roze, L. V.**, Arthur, A. E., Hong, S. J., Chanda, A., and Linz, J. E. (2007). The initiation and pattern of spread of histone H4 acetylation parallel the order of transcriptional activation of genes in the aflatoxin cluster. *Mol. Microbiol.* 66:713–726. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2011.563154>

**183-Ruhland M.**, Engelhardt G., Schafer W., Wallnoefer P. R. (1996). Transformation of the mycotoxin ochratoxin A in plants: 1. Isolation and identification of metabolites formed in cell suspension cultures of wheat and maize. *Natural Toxins.* 4: 254–260.

**184-Ruppol P.**, Delfosse Ph and Hornick, J.L., (2004 ) La contamination de la filière laitière par les mycotoxines : un risque pour la santé publique en Afrique subsaharienne. *Ann. Méd. Vét.* p: 141-146.

**185-Ruppol P.**, Delfosse Ph and Hornick, J.L., (2004 ) La contamination de la filière laitière par les mycotoxines : un risque pour la santé publique en Afrique subsaharienne. *Ann. Méd. Vét.* p: 141-146.

**186-Russo A.**, Formisano C., Rigano D., et al. (2013). Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions. *Food Chem Toxicol.* 55: 42-47.

**187-Russo, A.**, et al., Ochratoxin A-induced DNA damage in human fibroblast: protective effect of cyanidin 3-O-beta-d-glucoside. *J Nutr Biochem*, 2005. 16(1): p. 31-7.

**188-Saba I.**, Anwar F, 2018, Effect of harvesting regions on physico-chemical and biological attributes of supercritical fluid-extracted spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves essential oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21(2), 400-419p

**189-Saha, S.**, Walia, S., Kundu, A., Sharma, K., Singh, J., Tripathi, B. & Raina, A. (2016). Compositional and functional difference in cumin (*Cuminum cyminum*) essential oil extracted by hydrodistillation and SCFE. *Food Science and Technology*. 2, 1143-166 .

**190-Saldan,** N.C.; Almeida, R.T.R.; Avíncola, A. Development for an analytical method for identification of *Aspergillus flavus* based on chemical markers using HPLC-MS. *Food Chem.* 2018, 241, 113–121. *Toxins* 2019, 11, 309; doi:10.3390/toxins11060309

**191-Salhi.N.,**Goumni.Z., Salhi.A.,mehani .M.,Vleria et Terzi.( 2015).évaluation de l'activité antifongique in vitro des huile essentielles de *Laurus nobilis* L. sur la croissance mycélienne de *Fusarium sporotrichoide*. *Revue Elwihat pour les recherche et tude* ISSN vol :8.n :2. Sanago R., (2006). Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. Université Bamako(Mali): 53.

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

**193-Sargenat,** K.; Sheridan, A.; O’Kelly, J. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature* 1961, 192, 1096–1097. *Toxins* 2019, 11, 309; doi:10.3390/toxins11060309

**194-Schatzmayr G.,** Zehner F., Schatzmayr D., Täubel M., Binder E. M. (2005). Microbiologicals for deactivating mycotoxins in contaminated feed.

Communication orale, Symposium Euro-Magrebin sur les contaminants biologiques, chimiques et la sécurité alimentaire, Fez, Maroc

**195-Schererr.,** Fumiere L.,Coimbra M.,Lopes M J-D.,Siliva A-G.2013,Antioxidant and antibacterial activities and composition of Brazilian spearmint (*Mentha spicata*.)Industrial Cropsand products 50.P :408-413.

**196-Schilter,** B., et al., Ochratoxin A: potential epigenetic mechanisms of toxicity and carcinogenicity. *Food Addit Contam*, 2005. 22 Suppl 1: p. 88-93

**197-Schmidt,** F. R. and ESSER, K. 1985. Aflatoxins : medical, economic impact, and prospects for control. *Proc. Biochem.* 167-174.

**198-Schmidt-Heydt,** M. and Geisen, R. (2007). A microarray for monitoring the production of mycotoxins in food. *Int. J. Food Microbiol.* 117:131–140.  
<http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2011.563154>

**199-Searcy J.W.,** Davis N.D. & Diener U.L., 1969. Biosynthesis of ochratoxin A. *Appt. Microbiol.*, 18 : 622-627

**200-Selles S.M.A.,** Kouidri M., AitAmrane A., Belhamiti B.T., Hammoudi S.M., Boukrâa L, 2016, Etude de l'activité biologique de l'huile essentielle de *Mentha spicata* cultivée dans la région de Tiaret (Algérie). Cinquième Séminaire International : Les plantes aromatiques et médicinales. 16-18 Décembre 2016, Djerba, Tunisie, 1p

**201-Shams-ghahfarokhi,** M., Kalantari, S. & Razzaghi-abyaneh, M. (2013) Terrestrial Bacteria from Agricultural Soils: Versatile Weapons against Aflatoxigenic Fungi. In *Aflatoxins-Recent Advances and Future Prospects*, chapter 2, pp 23-39.

**202-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.

- 203-Silva**, J.F.M. da, Peluzio, J.M., Prado, G., Madeira, J.E.G.C., Silva, M.O., De Moraes, P.B., Rosa, C.A., Pimenta, R.S. & Nicoli, J.R. (2015) Use of Probiotics to Control Aflatoxin Production in Peanut Grains. *The Scientific World Journal*, 2015, 1–8.
- 204-Simiç**, A., Sokoviç, M. D., Ristiç, M., Grujiç-Jovanoviç, S., Vukojeviç, J. & Marin, P. D. (2004). The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. *Phytotherapy Research*. 18, 713-717.
- 205-Singh**, G. & Upadyay, R.K. (1991). Fungitoxic activity of cumaldehyde, main constituent of the *Cuminum cyminum* L. *Fitoterapia*. 62, 86.
- 206-Skaug M.A.**, Helland I., Solvoll K. & Saugstad O.D., 2001. Presence of ochratoxin A in human milk in relation to dietary intake. *Food Addit. Contam.*, 18: 321-327.
- 207-Snoussi M.**, Noumi E., Trabelsi N., Flamini G., Papetti A et De Feo V, 2015, *Mentha spicata* essential oil : chemical composition, antioxidant and antibacterial activities against planktonic and biofilm cultures of *Vibrio* spp.strains. *Molecules*, 20(8), 14402-14424p
- 208-Soleas**, G.J., J. Yan, and D.M. Goldberg, Assay of ochratoxin A in wine and beer by highpressure liquid chromatography photodiode array and gas chromatography mass selective detection. *J Agric Food Chem*, 2001. 49(6): p. 2733-40.
- 209-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.
- 210-Stander M. A.**, Steyn P. S., Van der Westhuizen F. H., Payne B. E. (2001). A kinetic study into the hydrolysis of the ochratoxins and analogues by carboxypeptidase A. *Chemical research and Toxicology*. 14: 302– 304.
- 211-Steele J.A.**, Davis N.D. & Diener U.L., 1973. Effect of zinc, copper, and iron on ochratoxin A production. *Appl. Microbiol.*, 25 : 847-849

**212-Steyn P.S.**, Holzapfel C.W. & Ferreira N.P., 1970. The biosynthesis of ochratoxins, metabolites of *Aspergillus ochraceus*. *Phytochem.*, 9 : 1977-1983

**213-Stoev S.D.**, Daskalov H., Radie B., Domijan A.M. & Peraica M., 2002. Spontaneous mycotoxic nephropathy in Bulgarian chickens with unclarified mycotoxin aetiology. *Vet. Res.*, 33 : 83-93.

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

**215-Sutour S**, 2010, Etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraits de menthes de Corse et de Kumquats. Thèse de Doctorat. Université de Corse, France, 222p

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

**217-Tabuti J.R.S.**, Lye K.A. & Dhillion S.S., 2003. Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda: plants, use and administration. *J. Ethnopharmacology*, 88, 19-44.

**218-Tajkarimi**, M.M., Ibrahim, S.A. & Cliver, D.O. (2010). Antimicrobial herb and spice compound in food. *Food Control*. 21(9), 1199-1218.

**219-Taoudiat, A.**, Djenane, D., Ferhat, Z., Spigno, G. (2018). The effect of *Laurus nobilis* L. essential oil and different packaging systems on the photo-oxidative stability of Chemlal extra-virgin olive oil. *Journal of Food Science and Technology*. 55(10), 4212-4222.

**220-Teixeira M.L.**,Cardoso M.D.G.,Figueiredo A.C.S.,Moraes J.C.,Assis F.A .,Andrade J.,Nelson D.L.,Souza Gomes M.,Souz J .,A.,Albuquerque

L.R.M.2014. Essential Oils from *Lippia origanoides* Kunth .and *Mentha spicata* L.Chemical composition, Insecticidal and Antioxidant Activities .American.Journal of plant Sciences,5.P :1181-1190.

**221-Telci I.,** Sahbaz N., Yilmaz G., Tugay M.E, 2004, Agronomical and chemical characterization of spearmint (*Mentha spicata* L.) originating in Turkey. Econ. Bot, 58, 721-728p

**222-Tian, J., Ban, X.,** Zeng, H., He, J., Huang, B. & Wang, Y. (2011). Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. International Journal of Food Microbiology. 145, 464-470.

**223-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.

**224-Tjamos S.E.,** Antoniou P.P., Tjamos E.C., (2006), *Aspergillus* spp., distribution, population composition and ochratoxin A production in wine producing vineyards in Greece, Int J Food Microbiol., 111 (1), 61-66

**226-Tong C.H. &** Draughon F.A., 1985. Inhibition by antimicrobial food additives of ochratoxin A production by *Aspergillus sulphureus* and *Penicillium viridicatum*. Appl. Environ. Microbiol., 49 : 1407-1411.

**227-Toyokuni S.** (2016). Oxidative stress as an iceberg in carcinogenesis and cancer biology. Arch BiochemBiophys. 595: 46-49.

**228-Tsitsigiannis, D.I.,** Dimakopoulou, M., Antoniou, P.P. & Tjamos, E.C. (2012) Biological control strategies of mycotoxigenic fungi and associated mycotoxins in Mediterranean basin crops. Phytopathologia Mediterranea, 51, 158–174.

**229-Uhl, S.R.** (2000). Handbook of Spices, Seasonings, and Flavorings. Technomic Publication, USA, pp. 329.

**230-Valenta H.** (1998). Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. *Journal of Chromatography A*. 815: 75–92.

**231-Van der Merwe K.J.,** Steyn P.S., Fourie L., Scott D.B. & Theron J.J., 1965. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*, 205 : 1112-1113.

**232-Varga J., Peteri Z.,** Tabori K., Teren J., Vagvolgvi C. (2005). Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. *International Journal of Food Microbiology*. 99: 321-328.

**233-Vekiari, S.A.,** Protopapadakis, E.F., Papadopoulou, P., Papanicolaou, D., Panou, C. & Vamvakias, M. (2002). Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a lemon variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 5(1), 147-153.

**234-Verdian-rizi, M. &** Hadjiakhoondi, A. (2008). Essential oil composition of *Laurus nobilis* L. of different growth stages growing in Iran. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung Tübingen*. 63(11-12), 785-788.

**235-Viuda-Martos, M.,** Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J. & Perez-Alvarez, J.A. (2007). Chemical composition of the essential oils obtained from some spices widely used in Mediterranean region. *Acta Chimica Slovaca*. 54, 921-926.

**236-Vukovic-Gacic B.,** Nikcevic S., Beric-Bjedov T., Knezevic-Vukcevi C. J. & Simic D. (2006). Antimutagenic effect of essential oil of sage (*Salvia officinalis* L.) and its monoterpenes against UV-induced mutations in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chem Toxicol*. 44: 1730-1738.

**237-Walker R.** (2002). Risk assessment of ochratoxin: current views of the European Scientific Committee on Food, the JECFA and the Codex Committee on Food Additives and Contaminants. *Adv Exp Med. Biol*. 504: 249–255.

- 238-Wei Y.H.**, Lu C.Y., Lin T.N., Wei R.D. (1985). Effect of ochratoxin A on rat liver mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation. *Toxicol.* 86: 119- 130.
- 239-Weidenbach A.**, Schuh K., Failing K., Petzinger E. (2001). Ochratoxin A induced TNF $\alpha$  release from the isolated and blood-free perfused rat liver. *Mycotoxin Research.* 16A: 189–193.
- 240-Wild, C.P. & Turner, P.C.** (2002). The toxicity of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis.* 17, 471-481.
- 241-Wild, C.P.**, Gaener, R.C., Montesano, R. & Tursi, F. (1986). Aflatoxin B1 binding to plasma albumin and liver DNA upon chronic administration to rats. *Carcinogenesis.* 6, 853-858
- 242-Woloshuk, C. P. and Prieto, R.** (1998). Genetic organization and function of the aflatoxin B1 biosynthetic genes. *FEMS.* 160:169–176.  
<http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2011.563154>
- 243-Xavier C.P.**, Lima C.F., Fernandes-Ferreira M. & Pereira-Wilson C. (2009). Salvia fruticosa, Salvia officinalis, and rosmarinic acid induce apoptosis and inhibit proliferation of human colorectal cell lines: the role in MAPK/ERK pathway. *Nutr Cancer.* 61: 564-571.
- 244-Xiao H.**, Marquardt R. R., Abramson D., Frohlich A. (1996 a). Metabolites of ochratoxins in rat urine and in a culture of *Aspergillus ochraceus*. *Applied and Environmental Microbiology.* 62: 648-655.
- 245-Yabe, K., and Nakajima, H.**, (2004). Enzyme reactions and genes in aflatoxin biosynthesis. *App. Microbiol. Biotechnol.* 64:745–755.  
<http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2011.563154>
- 246-Yakhlef. G.**, Laroui. S., Hambaba .L.,Aberkane .M.C., Ayachi .A.(2011).évaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et *Laurus nobilis*, plante utilisé en médecine traditionnelle.

- 247-Yesil-Celiktas O.**, Sevimli C., Bedir E. & Vardar-Sukan F. (2010). Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines. *Plant. Foods Hum Nutr.* 65: 158-163.
- 248-Yilmaz, E.S.**, Timur, M. & Aslim, B. (2013). Antimicrobial, antioxidant activity of the essential oil of bay laurel from hatay, Turkey. *Journal of Essential Oil Bearing Plants.* 16 (1), 108-116.
- 249-Yu, J.** (2003). Genetics and biochemistry of mycotoxins synthesis. In: *Handbook of fungal biotechnology (2nd Edition)*. Arora, D. K. Ed.,. New York, Marcel Dekker, In press.  
<http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2011.563154>
- 250-YUN TAN., XIA CHU., GUO-LI SHEN., RU-QIN YU.** (2009). A signal-amplified electrochemical immunosensor for aflatoxin B1 determination in rice. *Analytical Biochemistry.* 01-27.
- 251-Z.sroka,** (2005) Antioxidative and antiradical properties of plant phenolics. *Z.Naturforsch C.*
- 252-Zhao D.,** Xu W., Yanga G., Husainib A., Wua W, 2013 Variation of essential oil of *Mentha haplocalyx* Briq and *Mentha spicata* L. from China. *Industrial Crops and Products* 42,251– 260p
- 253-Zimmerli B,** Dick R, (1996), Ochratoxin A in table wine and grape juice : occurrence and risk assessment, *Food Addit. Contam.*, 13, 655-668.
- 254-Zinedine A,** Soriano JM, Juan C, Mojemmi B, Moltó JC, Bouklouze A, Cherrah Y, Idrissi L, El Aouad R, Mañes J., (2007b), Incidence of ochratoxin A in rice and dried fruits from Rabat and Salé area, Morocco, *Food Addit Contam.*, 24 (3), 285-291
- 255-Zöllner P.,** Mayer-Helm B. (2006). Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography–atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.* 1136: 123–169.