

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة سعيدة مولاي الطاهر

Université de Saida MOULAY Tahar

كلية العلوم

Faculté des Sciences

قسم البيولوجيا

Département de Biologie

Laboratoire De Biotoxicologie, Pharmacognosie Et Valorisation Des Plantes

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master

Option : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie

Thème

**Effet thérapeutique de l'administration des huiles essentielles de *Syzygium aromaticum* (Clou de girofle) et *Mentha spicata* (la menthe) chez des rats Wistar intoxiqué par l'Ochratoxine A.
Etude neurocomportementale et histologique**

Présenté par :

- M^{lle} : KAOU DJ Imane
- M^{lle} : SOHBI Somia

Soutenu le : Lundi 20 Juin 2022

Devant le jury composé de :

Président	Mr. SLIMANI Miloud	Pr Université De Saida
Examineur	Mr. KAHOULA Khaled	Pr Université De Saida
Rapporteur	Mr. ADLI Djallale Eddine	MCA Université De Saida
Co-Rapporteur	Mr. BRAHMI Mustapha	MAB Université De Rilzane

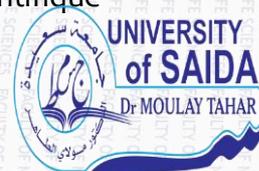
Année universitaire 2021/2022

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة سعيدة مولاي الطاهر

Université de Saida MOULAY Tahar



كلية العلوم

Faculté des Sciences

قسم البيولوجيا

Département de Biologie

Laboratoire De Biotoxicologie, Pharmacognosie Et Valorisation Des Plantes

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master

Option : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie

Thème

**Effet thérapeutique de l'administration des huiles essentielles de
Syzygium aromaticum (Clou de girofle) et *Mentha spicata* (la menthe)
chez des rats Wistar intoxiqué par l'Ochratoxine A.
Etude neurocomportementale et histologique**

Présenté par :

- M^{elle} : KAOU DJ Imane
- M^{elle} : SOHBI Somia

Soutenu le : Lundi 20 Juin 2022

Devant le jury composé de :

Président

Mr. SLIIMANI Miloud

Pr Université De Saida

Examineur

Mr KAHLOULA Khaled

Pr Université De Saida

Rapporteur

Mr. ADLI Djallal Eddine

MCA Université De Saida

Co-Rapporteur

Mr. BRAHMI Mustapha

MAB Université de Riizane

Année universitaire 2021 /2022

Dédicaces

Je dédie ce travail

A mon très cher papa qui est partie aussi vite le 23/12/2017 je dédie ce travail à mon papa SOHBI Madani.

*A ma maman qui m'encourager et m'a soutenue et a eu le meilleur soutien après mon père ce travail est réalisé grâce à toi
Mama.*

A mon oncle Bouelam qui m'a soutenue je te remercie pour ton encouragement.

A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire, et A mes amis spécialement ma binôme Imane qu'était une sœur et pas une amie.

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant collègues, et le fruit de votre soutien infailible, Merci d'être toujours la pour moi.

SOHBI Somia

Je dédie ce travail,

A mon père, pour son affection, pour la confiance qu'il m'a accordée. L'homme qui m'a toujours soutenue, et qui m'a doté d'une éducation digne, le précieux offre de Dieu à qui je dois ma vie, mon respect.

Mon bras droit, mon papa KAOUDJ Salah

A ma mère qui a souffert pour ne pas me laisser souffrir, pour son amour, pour ses sacrifices le long de ces années, son encouragement, ma source de vie, d'amour et d'affection Maman

A mes chères frères, Tarek, Toufik & Rafik qui m'ont toujours traité comme une princesse, ma source de protection, de fierté et de bonheur

A ma belle sœur Sara, pour son encouragement, sa tendresse et sa bonté. Ma grande sœur

A ma petite Elina, la petite princesse de notre royaume

A ma binôme Somia, avec qui j'ai réalisé ma première aventure dans la recherche scientifique

Et à ma meilleure amie qui me manque énormément Imane

CHAIB LAIN

KAOUDJ Imane

Remerciement

On remercie Dieu le tout puissant, de nous avoir donnée la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire

Nous tenons à adresser nos vifs remerciement pour notre encadrant Dr ADLI Djallal Eddine, qui nous a choisis parmi tout les étudiant pour réaliser cette recherche, pour la qualité de son encadrement exceptionnel, à notre encadrant qui nous a fait transféré le virus de la paillasse

A Dr BRAHMI Mustapha, qui n'a pas tenté de résoudre toute les difficultés, pour ses efforts, pour son soutien morale et pour son encouragement

A Pr SLIMANI Miloud d'avoir accepté d'être le président des jury et à Pr KAHLOULA Khaled d'avoir accepté d'examiner notre travail, et pour leur formation pendant toute ces années

A tout les laborantins KHALFALLAH Laaredj, NABI Othman & HAMADE Ahmed qui étaient toujours disponible pour nous aider et nous adresser leurs conseils professionnels

*A Doctorante SOUIDI Wadjila Sondous, à KHENIFER
Nour ElHouda, à Dr Arabi, à Dr HEMIDA Houari Chef de
département de Biomédecine de Tiaret à Mr Mostefai
Zakaria*

*A mes chères collègues qui m'ont toujours soutenue et
aidé, et à tout ceux qui ont contribué à réussir ce travail*

Liste des abréviations

OTA	Ochratoxine A
OTB	Ochratoxine B
OTC	Ochratoxine C
Phe	Phénylalanine
MAPK	Mitogen Activated Proteine Kinase
JNK	C-Jun N-terminales Kinases
ERK	Extracellular Regulated Kinase
BDNF	Brain Derived Neutrophic Factor
TH	Lymphocytes T helper
ERK1/2	Extracellular Regulated Kinase
AD	Alzheimer Decease
HE	Huiles essentielles
HEM	Huiles essentielles de <i>Mentha spicata</i>
HEC	Huiles essentielles de Clou de girofle
OMS	Organisation Mondiale de la santé
IARC	Centre international de recherche sur le cancer
SOD	Superoxyde dismutase
CAT	Catalase
NMDA	Acide N-méthyl-D-aspartique
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
AChE	Acétyle choline estérase
IUCPA	Union International de Chimie Pure et Appliqué
CAAD	Computer Aided Drug Design
HAT	Histone Acetyl Transferase
OAT	Organic Anion Transporter
DSBR	Double-Strand Break-Repair

Liste des tableaux

Tableau I Activité de l'eau A_w nécessaire pour le développement de quelques moisissures (Zinedine A, 2004) (OMS, 1990).....	11
Tableau II Principales mycotoxines faisant l'objet de seuils réglementaires, principales moisissures productrices associés, denrées fréquemment contaminées et effets toxiques majeurs (AFSSA, 2009; CAST, 2003; Krskaand et al., 2008). Et recommandations du JECFA, du SCF ou de l'EFSA concernant la dose journalière tolérable de certaines mycotoxines. (Brauchard G et al., 2009).....	13
Tableau III Caractéristiques de la croissance et de la toxigenèse des <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i> producteurs d'Ochratoxine A (ANSES, 2012).....	19
Tableau IV Les propriétés chimiques de l'Ochratoxine A (HSDB 2010, Akron 2010, SRC 2010)	21
Tableau V études <i>in vivo</i> réalisé sur le stress oxydatif (Yanfei et al., 2018).....	30
Tableau VI La composition chimique de l'huile essentielle de <i>Mentha spicata</i> (Mobinaet al., 2021).....	56
Tableau VII La classification botanique du <i>Syzygium aromaticum</i> (Solomon et al., 2019).....	65
Tableau VIII la composition chimique du Clou de girofle (ADLI, 2015)	67
Tableau IX Logiciels utilisés dans le Docking moléculaire et leurs caractéristiques.....	81
Tableau X Composition du régime d'entretien (régime standard).....	86
Tableau XI Techniques de déshydratation (inclusion) (AIT HAMADOUCHE, 2010).....	95
Tableau XII Batterie de coloration Helatoxylène-Eosine (AIT HAMADOUCHE, 2010).....	97

Tableau XIII Evaluation des valeurs moyennes des paramètres pondéraux des rats témoins, intoxiqué par l'OTA, intoxiqué et traité par les HEM & HEC et les traités non intoxiqués.....	101
Tableau XIV Interaction des molécules avec le récepteur NMDA.....	116
Tableau XV Interaction des protéines avec le récepteur NMDA.....	133

Liste des figures

Figure 1 Les différentes voies métaboliques des Mycotoxines (El Khoury, 2016).....	8
Figure 2 Répartition principale des mycotoxines selon l'organisation BIOMIN pour l'an 2013 (Gauthier, 2016).....	9
Figure 3 Structure chimique des Ochratoxines A,B,C (Gauthier, 2016)	15
Figure 4 La structure chimique de l'Ochratoxine A (Tamas et al., 2016).....	16
Figure 5 Schéma descriptive des souches productrices de l'OTA <i>Aspergillus carnarius</i> , <i>A ochraeus</i> et <i>Penicillium verrucosum</i> (ANSES, 2012).....	17
Figure 6 Voie de biosynthèse de l'OTA suggéré par Harris et Mantle	20
Figure 7 La voie métabolique de l'OTA chez l'homme et l'animal (Dieter et al., 2020)	23
Figure 8 Molécules réactives hypothétiques de l'OTA (Dieter et al., 2020).....	24
Figure 9 Effets du stress oxydatif induit par l'OTA (Kamal et al., 2020).....	32
Figure 10 un poil glandulaire épidermique (Menacer et al., 2011).....	41
Figure 11 Montage d'hydrodistillation (Lucchesi et al., 2005)	43
Figure 12 Montage de l'entraînement à la vapeur: (Goudjil et al.,2016).....	44
Figure 13 Montage de d'hydrodiffusion (Abderrahim et al., 2018).....	45
Figure 14 Montage d'extraction par CO ₂ (Fornari et al., 2012).....	46
Figure 15 procédés d'extraction des essences végétales par micro-onde (Abderrahim el al., 2018).	47
Figure 16 les différentes partie de la <i>Mentha spicata</i> (Douay, 2008).....	54
Figure 17 Feuille de <i>Mentha spicata</i> (Carlier et al. ,2015 ; François, 2020).....	55
Figure 18 Structure du Carvone (Ali Kargari et al.,2018)	57
Figure 19 Clou de girofle bourgeons flux séché (Solomon et al., 2019).	64
Figure 20 Clou de firofle pendant la periode de fleurisation (solomon et al., 2019).....	65

Figure 21 principaux composants de l'huile essentielle de <i>Syzygium Eugéol</i> (Mbaveng et al, 2017).	66
Figure 22 Structure chimique d'Eugenol (Yi-Ming et al., 2019).....	67
Figure 23 les activités biologiques du <i>Syzygium aromaticum</i> (Gaber et al., 2020)	68
Figure 24 Interaction Ligand-Protéine.....	74
Figure 25 Interaction Protéine-Protéine (Gainza et al., 2019).....	75
Figure 26 Le processus du docking moléculaire (Fan et al., 2019).....	78
Figure 27 Conception du logiciel du docking (Grosdidier et al., 2007).....	78
Figure 28 Les différentes applications du docking moléculaire	79
Figure 29 <i>Mentha spicata</i> fraîche et broyé	83
Figure 30 Bourgeons et poudre du Clou de girofle	84
Figure 31 Montage d'hydrodistillation et ampoule à décanter	84
Figure 32 Résumé de la chronologie du protocole expérimentale	88
Figure 33 Dispositif de la nage forcée (ADLI, 2014).....	90
Figure 34 Dispositif du open Field.....	91
Figure 35 la piscine de Morris (Chris, 2013).....	92
Figure 36 Automate à inclusion (modèle LEACA EG 11).....	95
Figure 37 l'appareil d'enrobage.....	96
Figure 38 Techniques de coupe par un microtome (LEICA RM 2235).....	97
Figure 39 Automate pour coloration Hématoxyline-Eosine (LEICA EG 4040).	98
Figure 40 Temps d'immobilité durant le test de la nage forcée des jeunes rats témoins, intoxiqués au OTA, intoxiqués et traités à l'HEM.	102
Figure 41 Temps d'immobilité durant le test de la nage forcée des jeunes rats témoins, intoxiqués à l'OTA, intoxiqués et traités à l'HEC.....	103

Figure 42 La comparaison des différents paramètres du test d'Open Field entre les rats témoins, intoxiqués par OTA, intoxiqués et traités à l'HEM.	104
Figure 43 : La comparaison des différents paramètres du test d'open Field entre les rats témoins, intoxiqués à l'OTA, intoxiqués et traités à l'HEC.....	105
Figure 44 : la comparaison de temps passé dans les deux compartiments de obscurité / lumière entre les rats témoins, intoxiqués au OTA, intoxiqués et traités à l'HEM, traité non intoxiqué.....	106
Figure 45 la comparaison de temps passé dans les deux compartiments de dark / light entre les rats témoins, intoxiqués au OTA, intoxiqués et traités à l'HEC, traité non intoxiqué.....	106
Figure 46 : la différence dans le temps de latence chez rongeurs : témoins, OTA, et OTA-HEM durant les quatre jours de la piscine de Morris.	107
Figure 47 : la différence dans le temps de latence chez rongeurs : témoins, OTA, et OTA-HEC durant les quatre jours de la piscine de Morris	108
Figure 48 : la différence dans le temps de latence chez rongeurs durant le probe Test : témoins, OTA, et OTA-HEM durant les quatre jours de la piscine de Morris (***) : $p < 0.001$	109
Figure 49 : la différence dans le temps de latence chez rongeurs durant le probe Test : témoins, OTA, et OTA-HE durant les quatre jours de la piscine de Morris (***) : $p < 0.001$	109
Figure 50 : la différence de temps de latence durant le test de vision chez les rats : intoxiqué (OTA), témoins, et intoxiqué traité par HEM.....	110
Figure 51 : Le dosage de la glycémie chez les rats témoins, intoxiqués par l'OTA, intoxiqués et traités à l'HEM.	111
Figure 52 : Le dosage de la glycémie chez les rats témoins, intoxiqués par l'OTA, intoxiqués et traités à l'HEC.	112
Figure 53 : le dosage de cortisol chez les rongeurs : OTA, OTA-HEM et témoins exprimé en terme de signification ($p < 0.05$)	112

Figure 54: représente le dosage de cortisol chez les rongeurs : OTA, OTA-HEM et témoins exprimé en terme de signification (***) : $p < 0.001$).	113
Figure 55 photomicrographie des lésions cérébrales, neurone de Purkinje éosinophile, congestion marquée et hémorragies du cerveau et des méninges .H&E. 100x	114
Figure 56 photomicrographie des lésions cérébrales, hippocampique, neurones pyramidaux légèrement éosinophiles, bourrelet péri vasculaire marqué .H&E. 100x	114
Figure 57 photomicrographie des lésions cérébrales, changement neurodégénératives, et une gliose. H&E. 100x	115
Figure 58 Vue au microscope photonique d'un tissu du cortex cérébelleux colorées à l'hématoxyline et de l'éosine G:(x 40).	116
Figure 59 le docking moléculaire de la molécule Ochratoxine A avec le récepteur NMDA.	117
Figure 60 le docking moléculaire de la molécule Eugénol avec le récepteur NMDA.	117

Résumé

L'objectif de notre travail a porté d'évaluer d'une part, les troubles induites par l'intoxication par l'Ochratoxine A (OTA) selon des différentes approches expérimentale : neurocomportementale, biochimique, et histologique chez des rats wistar adulte. D'autre part, l'effet prophylactique et l'efficacité de traitement par l'huile essentielle (HE) de *Mentha spicata* (HEM) et *Syzygium aromaticum* (HEC) dans la réparation des modifications et des altérations induites par l'OTA par une injection IP de 0.1 mg/kg/jrs durant une période de quinze jours.

L'extraction d'HE des deux plantes par hydrodistillation a permis d'obtenir un rendement de : HEM de 0.15%, et HEC un rendement de 12.70%, l'intoxication aigue par l'OTA avec une dose de 289µg/kg/p.c. toutes les 48 h par voie IP permis d'observé une baisse significative dans le poids corporel et cérébrale chez les rats intoxiqués par rapport aux celles des rats témoins.

En effet , l'approche neurocomportementale par l'utilisation de différentes techniques relatives aux tests de comportements essentiellement : la dépression (la nage forcé) , l'anxiété (obscurité /lumière) , la mémoire (piscine de Morris) et de l'open Field , révèlent clairement que l'OTA provoque des troubles neurocomportementaux qui se traduisent par une hypoactivité locomotrice , une réduction dans le désir d'exploration qui reflète l'installation d'un état de stress , d'anxiété , et de dépression , ainsi que des altération de la capacité de mémorisation et d'apprentissage .

Cependant, l'intoxication par l'OTA a révélé également une perturbation dans le taux de glycémie et de cortisol qui se réalise par une hyperglycémie et une hypercortisolémie. De plus, l'étude histologique montre des lésions aux niveaux de cerveau.

En outre , l'administration des deux huiles essentielles (HEM et HEC) séparé , a permis d'enregistré un gain de poids corporel et cérébral comparé aux rats témoins , des améliorations dans fonctions neurocomportementaux évalué par différentes tests de comportement telle que : l'open Field , la nage forcé , la piscine de Morris et l'obscurité/lumière dévoilent clairement que l'HEM et HEC répare l'état dépressive ,

améliore la capacité de mémorisation , réduire l'anxiété , le stress et répare l'hypoactivité locomotrice comparé aux rats intoxiqués. D'ailleurs, l'étude histologique rapporte la présence des lésions Tissulaires et des hémorragies avec des neurodégénérescences dans plusieurs régions du cerveau, L'Administration D'HEM et D'HEC montre un effet correctif sur les tissus cérébrales.

De plus, le docking moléculaire montre que l'OTA présente une affinité avec les récepteurs NMDA ce qui explique leurs impact sur l'état psychique (dépression) et la capacité de mémorisation . en outre, l'eugénol montre un effet sur l'OTA par la présence d'une interaction (affinité) avec les NMDA, par contre le carvone n'a montré aucune affinité avec les NMDA.

Les résultats montrés justifient la grande importance de la menthe verte et du clou de girofle dans la médecine traditionnelle et ces vertus thérapeutiques.

Mots clés : Ochratoxine A, Rats Wistar, Huile essentielle, *Mentha spicata*, *Syzygium aromaticum*.

Abstract

The objective of our work focused on evaluating, on the one hand, the disorders induced by intoxication by Ochratoxin A (OTA) according to different experimental approaches: neurobehavioral, biochemical, and histological in adult wistar rats. On the other hand, the prophylactic effect and the efficacy of treatment with the essential oil (EO) of *Mentha spicata* (HEM) and *Syzygium aromaticum* (HEC) in the repair of the modifications and alterations induced by OTA by a IP injection of 0.1 mg/kg/day for a period of fifteen days.

The extraction of HE from the two plants by hydrodistillation made it possible to obtain a yield of: HEM of 0.15%, and HEC a yield of 12.70%, acute intoxication by OTA with a dose of 289µg/kg/p.c. every 48 h by IP route observed a significant decrease in body and brain weight in intoxicated rats compared to those of control rats.

The objective of our work focused on evaluating, on the one hand, the disorders induced by intoxication by Ochratoxin A (OTA) according to different experimental approaches: neurobehavioral, biochemical, and histological in adult wistar rats. On the other hand, the prophylactic effect and the efficacy of treatment with the essential oil (EO) of *Mentha spicata* (HEM) and *Syzygium aromaticum* (HEC) in the repair of the modifications and alterations induced by OTA by an IP injection of 0.1 mg/kg/day for a period of fifteen days.

Indeed, the neurobehavioral approach through the use of different techniques relating to behavioral tests essentially: depression (forced swimming), anxiety (darkness / light), memory (Morris pool) and open Field, clearly reveal that OTA causes neurobehavioral disorders that result in locomotorhypoactivity, a reduction in the desire for exploration that reflects the onset of a state of stress, anxiety, and depression, as well as impaired memory and learning ability.

However, OTA intoxication also revealed a disturbance in the level of glycemia and cortisol which is carried out by hyperglycemia and hypercortisolemia. In addition, the histological study shows lesions in the brain.

In addition, the administration of the two essential oils (HEM and HEC) separately, made it possible to record a gain in body and brain weight compared to control rats, improvements in neurobehavioral functions evaluated by different behavioral tests such as:

Open Field, Forced Swimming, Morris Pool, and Dark/Light clearly show that HEM and HEC repair depression, improve memory capacity, reduce anxiety, stress, and repair locomotor hypoactivity compared to intoxicated rats. Moreover, the histological study reports the presence of tissue lesions and hemorrhages with neurodegenerations in several regions of the brain. The administration of HEM and HEC shows a corrective effect on the tissue architecture of the brain.

In addition, molecular docking shows that OTA has an affinity with NMDA receptors, which explains their impact on mental state (depression) and memory capacity. In addition, Eugenol shows an effect on OTA by the presence of an interaction (affinity) with NMDAs, on the other hand Carvone showed no affinity with NMDAs.

The results shown justify the great importance of spearmint and cloves in traditional medicine and these therapeutic virtues.

Keywords: Ochratoxin A, Wistar Rats, Essential Oil, *Mentha spicata*, *Syzygium aromaticum*.

ملخص

ركز هدف عملنا على تقييم الاضطرابات التي يسببها التسمم بالأوكراتوكسين أ (OTA) من ناحية ، وفقاً لمقاربات تجريبية مختلفة: السلوكية العصبية والكيميائية الحيوية والنسجية في فئران ويستار. من ناحية أخرى ، فإن التأثير الوقائي وفعالية العلاج بالزيت العطري (HE) من *Mentha spicata* (HEM) أو ما يسمى بالنعناع الأخضر و *Syzygium aromaticum* (HEM) أو ما يسمى بالقرنفل في إصلاح التغييرات والتعديلات التي يسببها OTA بحقن IP بمقدار 0.1 مجم / كغم / يوم لمدة خمسة عشر يوماً.

إن استخراج HE من النباتين عن طريق التكتيف المائي جعل من الممكن الحصول على عائد: HEM بنسبة 0.15% ، و HEC عائد 12.70% ، تسمم حاد بواسطة OTA بجرعة 289 ميكروغرام / كجم / قطعة. لاحظ كل 48 ساعة عن طريق IP انخفاضاً ملحوظاً في وزن الجسم والدماغ في الجرذان المسممة مقارنةً بالجرذان الضابطة .

في الواقع ، فإن النهج السلوكي العصبي من خلال استخدام تقنيات ميدانية مختلفة ، يكشف بوضوح أن OTA يسبب مشاكل سلوكية عصبية تؤدي إلى نقص النشاط الحركي ، والحد من الاستكشاف ، وحالة الضغط ، والقلق ، وكذلك الذاكرة الضعيفة و نقص القدرة على التعلم.

كذلك ، التسمم بالـ OTA أظهر أيضاً اضطراباً في نسبة السكر في الدم ومستويات الكورتيزول والذي يتجلى في ارتفاع السكر في الدم وفرط الكورتيزول في الدم. بالإضافة إلى ذلك ، أظهرت الدراسة النسيجية وجود آفات في مستويات الدماغ.

ومع ذلك ، فإن التسمم بالأوكراتوكسين OTA أظهر أيضاً اضطراباً في مستوى السكر في الدم والكورتيزول الذي يحدث بسبب ارتفاع السكر في الدم وفرط الكورتيزول في الدم. بالإضافة إلى ذلك ، أظهرت الدراسة النسيجية وجود آفات في الدماغ.

بالإضافة إلى ذلك ، فإن إعطاء الزيتين الأساسيين (HEM و HEC) بشكل منفصل ، جعل من الممكن تسجيل زيادة في وزن الجسم والدماغ مقارنة بالفئران الضابطة ، والتحسينات في وظائف السلوك العصبي التي تم تقييمها من خلال اختبارات سلوكية مختلفة مثل: Open Field ، Forced swimming test ، السباحة بالأجبار ، مسبح موريس ، والظلام / الضوء بوضوح أن HEM و HEC يصلحان الاكتئاب ، ويحسنان سعة الذاكرة ، ويقللان من القلق ، والإجهاد ، ويصلحان نقص النشاط الحركي مقارنة بالفئران المسممة. علاوة على ذلك ، تشير الدراسة النسيجية إلى وجود تلف في الأنسجة ونزيف مع تنكس عصبي في عدة مناطق من الدماغ ، لكن إعطاء HEM و HEC أظهرت تأثيراً تصحيحي على أنسجة المخ.

بالإضافة إلى ذلك ، يُظهر الالتحام الجزيئي أن OTA لها صلة بمستقبلات NMDA ، مما يفسر تأثيرها على الحالة العقلية (الاكتئاب) وسعة الذاكرة. بالإضافة إلى ذلك ، يظهر الأوجينول تأثيراً على OTA من خلال وجود تفاعل (تقارب) مع NMDAs ، من ناحية أخرى ، لم يظهر الكارفون carvone أي تقارب مع NMDAs.

النتائج المعروضة تبرز الأهمية الكبيرة للنعناع والقرنفل في الطب التقليدي وهذه الفضائل العلاجية.

الكلمات المفتاحية: أكراتوكسين ألف ، فتران ويستار ، زيت أساسي أو عطري ، النعناع الأخضر *Mentha*

Syzygium aromaticum القرنفل .

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	VIII
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES FIGURES	XI
RESUME	XV
ABSTRACT	XVII
ملخص	XIX
TABLE DES MATIERES	XXI
LES MYCOTOXINES	5
I.1. Etymologie et Définition	6
I.2. Historique et découverte des mycotoxines	6
I.3. Nature et origine des mycotoxines	7
I.4. Mycotoxinogénèse	7
I.5. Condition de la production des mycotoxines	9
I.6. Effet sur la santé	11
L'OCRATOXINE A	14
2.1 Définition & structure	15
2.2 Moisissures productrice	16
2.3 Biosynthèse	19
2.4 Toxicocinétique de l'OTA	21
2.5 Toxicité	25
2.6 Mode d'Action	27
2.7 Méthodes de détermination de l'OTA dans les denrées alimentaires	33
2.8 Prévention	34
2.9 Réduction du taux l'OTA des denrées alimentaires	34
LES HUILES ESSENTIELLES	36

3.1	Introduction sur Les huiles essentielles	37
3.2	Définition :	37
3.3	Aperçu historique	38
3.4	Aromathérapie	39
3.5	La différence entre l’Aromathérapie et la Phytothérapie	39
3.6	La localisation des Huiles essentiel dans la plante	39
3.7	Rôle des HE dans la plante	41
3.8	Les composants actifs dans les HE et les propriétés physiques.....	41
3.9	Les méthodes d’extractions des huiles essentielles	42
3.10	LES APPLICATIONS ET LES VOIES D’UTILISATIONS DE L’ESSENCE VEGETALE : 48	
3.11	La toxicité des essences végétaux	50
3.12	LA MENTHA SPICATA :.....	52
3.12.1	Généralités :.....	52
3.12.2	Origine :	53
3.12.3	Classification Taxonomique de la Mentha Spicata :.....	53
3.12.4	Caractéristique de la menthe et description de la plante	54
3.12.5	Description de la <i>Mentha spicata</i> :.....	54
3.12.6	Les compositions chimiques d’huile essentielle de <i>Mentha spicata</i>	55
3.12.7	Principe actif.....	57
3.12.8	L’utilisation de <i>Mentha spicata</i>	57
3.12.9	Les intérêts thérapeutiques de l’essence végétale de <i>Mentha spicata</i>	59
3.12.10	Toxicité de la menthe:	62
3.13	SYZYGIUM AROMATICUM :.....	63
3.13.1	Généralités sur le Giroflier (<i>Syzygium aromaticum</i>):	63
3.13.2	Origine de <i>Syzygium aromaticum</i> :.....	63
3.13.3	Description de la plante et classification botanique :.....	64
3.13.4	Classification botanique	65
3.13.5	Compositions chimique d’Huile essentielle de <i>Syzygium aromaticum</i>	65
3.13.6	Principe actif.....	67
3.13.7	Les intérêts d’utilisation de la Giroflier :.....	68

3.13.8	Les activités biologiques de <i>Syzygium aromaticum</i>	68
3.13.9	La toxicité de clou de girofle	71
LE DOCKING MOLECULAIRE		72
4.1	Introduction.....	73
4.2	DEFINITION ET PRINCIPE	73
4.3	TYPES DU DOCKING MOLECULAIRE	74
4.6	FONCTION DE SCORE.....	75
4.7	ALGORITHMES DE RECHERCHE	76
4.8	LES ETAPES DU DOCKING	77
4.9	LES APPLICATIONS.....	79
4.10	LES OUTILS DU DOCKING.....	80
MATERIELS ET METHODES		82
5.1.1	Matériel végétal	83
5.1.2	Extraction des huiles essentielles.....	84
5.2	Animaux d'expérimentation.....	85
5.3	Evaluation de poids corporel et poids de cerveau	89
5.4	Observation macroscopique	89
5.5	Tests Neurocomportementaux	89
5.6	Sacrifice	92
5.7	Dosage biochimiques	93
5.8	Etude histologique des organes.....	94
5.9	Expression et analyse statistique des résultats.....	98
5.10	Docking moléculaire	99
Résultats et interprétations		100
6.1	Rendement en huile essentielle	101
6.2	Effet d'Ochratoxine A sur le poids corporel et le cerveau.....	101
6.3	Tests Neurocomportementaux	102
6.4	Dosage Biochimique.....	111
6.5	Etude histologique :.....	113

6.6	Docking moléculaire	116
	DISCUSSION.....	118
	CONCLUSION	134
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	139

Introduction

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires sécrétés par certaines espèces des moisissures et des champignons principalement : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium* (Omotayo et al., 2019 ; Khodaei et al., 2021). Les mycotoxines sont généralement toxiques pour les organismes vivants. A nos jours, un nombre importants de ces métabolites a été identifiée, dont certaines, telles que les Aflatoxines, les Ochratoxines, les Trichothécènes, la Zéaralénone, les Fumonisines et la Patuline, sont considérées comme un risque important sur le plan agro-économique (Omotayo et al., 2019). L'exposition aux mycotoxines par les denrées alimentaires peut entraîner de graves risques pour la santé (par exemple, des cancers, des malformations et des mutations), ce qui constitue un problème de santé publique mondial (Yang et al., 2020).

L'Ochratoxine A (OTA), est l'une des mycotoxines les plus importantes, est principalement produite par des champignons principalement : *Aspergillus section nigri* et *Penicillium ochraeus*, et se trouve couramment dans les produits alimentaires et agricoles (Delgado-Ospina et al., 2022 ; Wang et al., 2022).

L'Ochratoxine, $C_{20}H_{18}ClNO_6$; est caractérisé par un poids moléculaire de 403,8g/mol, et par sa thermostabilité avec un point de fusion : 168–173 °C, ce qui la rend difficile à éliminer de la chaîne alimentaire, elle est peu soluble dans les solutions aqueuses et est le membre le plus toxique dans le groupe des Ochratoxines. L'analyse de la structure d'OTA révèle un métabolite secondaire dérivé de polycétide qui contient un groupement dihydrocoumarine couplé à une l-β-phénylalanine (Phe), dérivée de la voie de l'acide Shikimique, par une liaison amide (Tao et al., 2018 ; El Khoury et al., 2010 ; Malir et al., 2016). L'OTA est hautement néphrotoxique et carcinogénique. Les effets génotoxiques liés à l'OTA entraînent l'induction de la formation d'adduits à l'ADN, l'inhibition de la synthèse des protéines, la perturbation de la production d'énergie cellulaire, l'initiation du stress oxydatif, l'induction de l'apoptose, l'influence sur la mitose, l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire et l'interférence avec les voies des cytokines sont tous liés à ses effets de néphrotoxicité, hépatotoxicité, tératotoxicité, immunotoxicité et neurotoxicité (Niaz et al., 2020)

L'administration d'OTA active divers mécanismes tels que les dysfonctionnements de P38 Mitogen-activated protein kinases (MAPK), Les kinases c-Jun N-terminales (JNK) et Extracellular signal-regulated kinases (ERK), la perturbation du Facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF), la surexpression des Lymphocytes T helper (TH), l'activation des caspases-3 et 9 et la phosphorylation de ERK-1/2 qui conduisent finalement à la progression de la maladie d'Alzheimer (AD) **(Niaz et al., 2020)**

La phytothérapie est un domaine de la médecine qui utilise les plantes pour traiter des maladies. Elle est souvent appelée l'herboristerie en médecine occidentale. L'utilisation traditionnelle des phytothérapies préserve généralement la composition d'origine et l'intégrité de la plante source, de sorte que soit la plante entière, soit un pourcentage souhaité de ses composants est utilisé à des fins médicinales **(Falzon et al., 2017)**. L'attraction des plantes aromatiques et médicinales ne cesse pas de croître du fait de la demande croissante ainsi de l'intérêt des consommateurs pour ces plantes à des fins médicinales, c'est aussi pour le potentiel et les bienfaits des plantes aromatiques et médicinales et de leurs métabolites, comme les huiles essentielles **(Hanif et al., 2019)**

Les huiles essentielles sont un mélange de nombreux composés organiques, et leur activité biologique est conditionnée par leurs compositions chimiques **(Michalak et al., 2018)** Les composants présents dans les huiles essentielles ont de précieuses applications dans divers domaines comme l'agriculture, l'environnement et la santé humaine. Les huiles essentielles (HE) se révèlent aussi efficaces compléments aux composés synthétiques utilisés dans l'industrie chimique **(Hanif et al., 2019)**

Mentha spicata L. (Lamiaceae), communément appelée le Menthe verte, est largement cultivée dans le monde entier pour son arôme remarquable et sa valeur commerciale. *Mentha spicata* est bien connu pour ses utilisations médicinales traditionnelles, en particulier pour le traitement du rhume, de la toux, de l'asthme, de la fièvre, de l'obésité, de la jaunisse et des problèmes digestifs **(Mahendran et al., 2021)**

L'Huile essentielle de *Mentha spicata* (HEM) est largement utilisée comme agent aromatique dans de nombreux produits, la plante est considérée comme une source

d'HE qui s'est avérée d'être une source précieuse des composants phénoliques, d'antioxydants naturels, d'inhibiteurs du cholinestérase, d'inhibiteurs de la lipase pancréatique et de désinfection du biofilm, antifongique et agent antiprolifératif (**Ali-Shtayeh et al., 2019 ; Zheljazkov et al., 2010 ; Ali-Shtayeh et al., 2013 ; Ali-Shtayeh et al., 2014**).

Syzygium aromaticum (girofle) est une épice traditionnelle qui a été utilisée pour la conservation des aliments et possède diverses propriétés pharmacologiques. *Syzygium aromaticum* est riche en de nombreux composés phytochimiques comme suit : sesquiterpènes, monoterpènes, hydrocarbures et composés phénoliques (**Batiha et al., 2020**).

L'huile essentielle du Clou de girofle (HEC) possède diverses propriétés biologiques telles qu'antibactérien, antifongique, herbicide, nématocide, anti-tumoral et anti-inflammatoire (**Kaur et al., 2019**). HEC est aussi connue pour son effet antalgique, antiseptique, antispasmodique, antinévralgique, carminatif, anti-infectieux, désinfectant, insecticide, stimulant, stomachique, utérin et tonique (**Boughendjioua et al., 2018**)

A la lumière de ces données, on a réalisé une étude sur l'effet prophylactique de l'administration d'un extrait de *Mentha spicata* et *Syzygium aromaticum* sur des rats Wistar exposé à l'Ochratoxine A, une série d'expériences et d'études est réalisés :

- I. Une extraction des huiles essentielles du *Syzygium aromaticum* et la *Mentha spicata*
 - II. Une évaluation des effets de l'Ochratoxine A sur les rats Wistar par :
 - Une étude neurocomportementale
 - Des tests Biochimique
 - Etude histologique du cerveau
 - III. L'évaluation de l'effet des huiles essentielles de la *Mentha spicata* et *Syzygium aromaticum* par une administration par voie intrapéritonéale chez les rats intoxiqué par l'Ochratoxine A
-

- IV. Le Docking moléculaire entre le récepteur NMDA et l'Ochratoxine A, Carvone et Eugéno!

LES MYCOTOXINES

1.1. Etymologie et Définition

Le terme « Mycotoxines » vient du mot Grec ancien « Mykes » signifiant « Les moisissures » et « Toxicum » du Latin signifiant « Poison » (Iqbal., 2021). Les mycotoxines sont des métabolites secondaires toxiques produits par des espèces micro fongique filamenteuse plus particulièrement *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* et *Claviceps* (El Khoury, 2016) qui contaminent généralement les aliments de base et les aliments des animaux. Une seule micromycète peut produire plus d'une mycotoxine, plusieurs espèces de champignons peuvent proliférer dans la même plante - les deux circonstances conduisant à la cooccurrence de deux mycotoxines ou plus (J.Tolosa et al., 2021; Feijó Corrêa et al., 2018).

Ce sont des composés chimiques non protéiques d'un faible poids moléculaire (200 à 10 000 Dalton) hydrosoluble, peu volatile, stable en milieu acide et thermostable (jusqu'à 250°C) (Kska., 2009 ;Ruppel et al., 2004 ;Guezlane et al., 2016)

1.2. Historique et découverte des mycotoxines

En 9^e siècle, une épidémie nommée « Feu de Saint-Antoine » a été décrite durant l'antiquité dont le nom est lié à la sensation de la brûlure ressentie par les malades. Cette toxico infection est causée par la consommation d'un aliment ou des céréales infectés par des alcaloïdes sécrétés par une Ascomycète du genre *Claviceps purpure*. (Rkiba Z, 2020) ;hapeland-Leclerc F et al., 2005)

En 1900, au Japon la consommation du « Riz jaune » contaminé par une espèce du *penicillium* a entraîné des graves toxico- infections notamment hépatiques. (Lahouar A, 2016) (Pitt & Hocking, 1997)

Entre 1942 et 1947, dans l'EST de la Russie une forte toxico infection s'est apparue, l'Aleucie toxique alimentaire (ATA) provoquée par la consommation de la farine provenant des blés et céréales contaminés par Trichothécène, des mycotoxines synthétisées par les *Fusarium* et *Trichoderma*. (Rkiba Z, 2020 ; Chapeland-Leclerc et al., 2005)

A nos jours, les mycotoxines sont devenues un objet de recherche puisque certaines de ces métabolites secondaires représentent un danger pour la santé publique, et surtout qu'elles contaminent l'alimentation de base comme les céréales

1.3. Nature et origine des mycotoxines

La formation de métabolites toxiques dans un substrat à la suite de leur attaque par des moisissures peut être le résultat de trois mécanismes différents:

- a) Le champignon, en parasitant un végétal vivant, peut entraîner, soit une exacerbation de certaines réactions métaboliques de la plante, conduisant à des concentrations anormalement levées d'un constituant habituel, soit la formation par le végétal de produits toxiques n'existant pas dans la plante saine.
- b) Le champignon peut transformer un composé peu ou pas toxique en un produit toxique par le jeu des bioconversions. Ainsi, l'acide coumarique, présent en faible concentration peut être transformé par différentes moisissures en 4-hydroxycoumarine, puis en dicoumarol, anticoagulant puissant.
- c) La toxine est un métabolite propre de champignon: Aflatoxine, Zéaralène (Tabuc, 2007).

1.4. Mycotoxinogénèse

La production des mycotoxines peut se dérouler : avant (e.g : les espèces du genre *Fusarium*), pendant ou après la récolte (stockage) (e.g : les espèces du genre *Aspergillus* et *Penicillium*) (Zinedine A, 2004). Les mycotoxines sont issues du métabolisme secondaire fongique. Totalement différente du métabolisme primaire qui est nécessaire à la croissance (synthétisé au cours de la phase de croissance) et en commun entre toutes les espèces fongiques, les métabolites secondaires sont spécifiques aux souches impliqués dans leurs synthèses, indépendantes du cycle de croissance du champignon mais elles répondent à des signaux reçus de l'environnement et produites au cours de l'idiophase (phase stationnaire) (Lahouar A, 2016 ; Adams, 2002 ; Yannikouris et al., 2002)

Les mycotoxines sont classées en 3 classes selon leur voie de biosynthèse, selon Turner en 1971, Steyn en 1980 et Turner & Albridge 1983 :

1. Les composés dérivés des acides aminés (peptides) : l'alcaloïde de l'ergot (ergotamine), la roquefortine, l'acide cyclopiazonique, acide aspergillique, les

- fumitémorgènes, gliotoxines, sporidesmines, tryptoquivaline, dicéto-pipérazines etc.
2. Les composés dérivés des terpènes : la toxine T₂, déoxynivalénol, fusarénone, diacétoxyscirpénol, roridines, verrucarines, trémorgènes etc.
 3. Les composés dérivés des polycétoacides (polyacétates) : les ochratoxines, les aflatoxines, les zéaranélones, les fumonisines, la citrinine, l'acide pénicillique, la patuline, les rubratoxines, les stérigmatocystines etc.

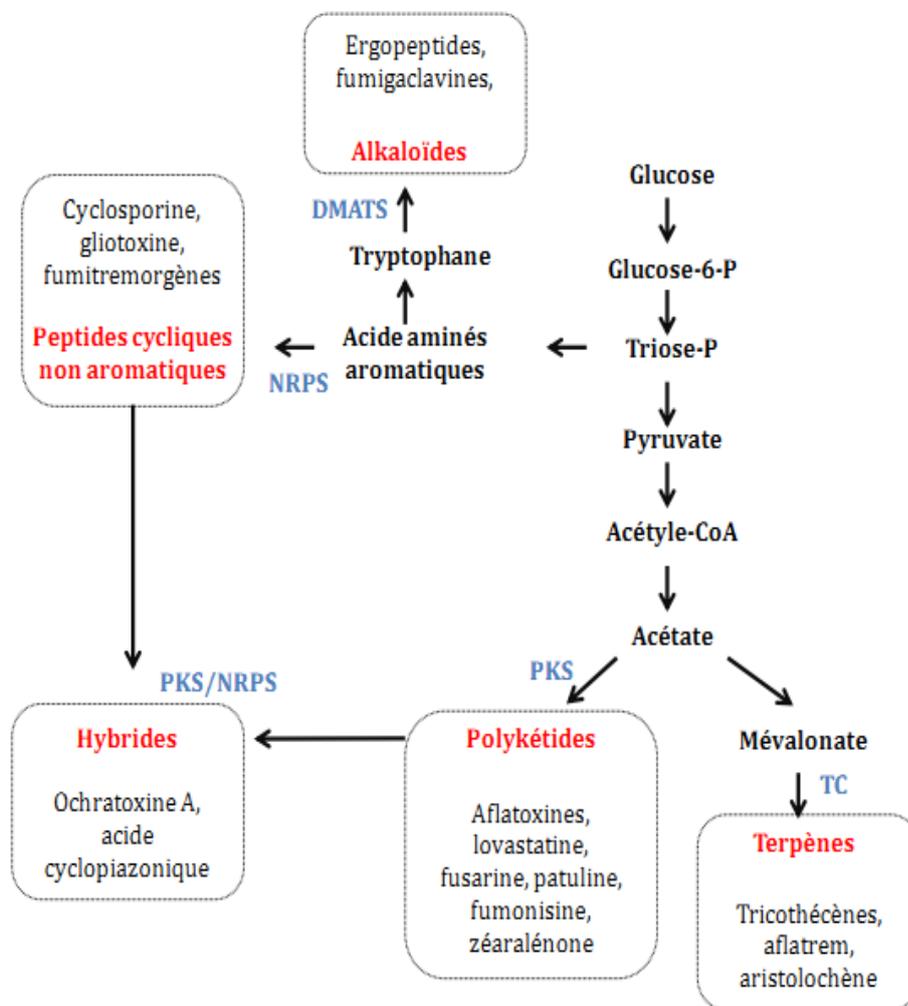


Figure 1 Les différentes voies métaboliques des Mycotoxines (El Khoury, 2016)

1.5. Condition de la production des mycotoxines

Généralement les aliments/récoltes exposés à de hautes températures ou un haut degré d'humidité et exposé aux moisissures peuvent fortement être contaminés par les mycotoxines. Certaines cultures sont très favorables à leurs production comme les céréales tandis que d'autres sont moins favorables pour ce processus, ça se peut être dus à des facteurs génétiques et à la teneur en nutriments suffisante pour cette synthèse (Zinedine A, 2004)

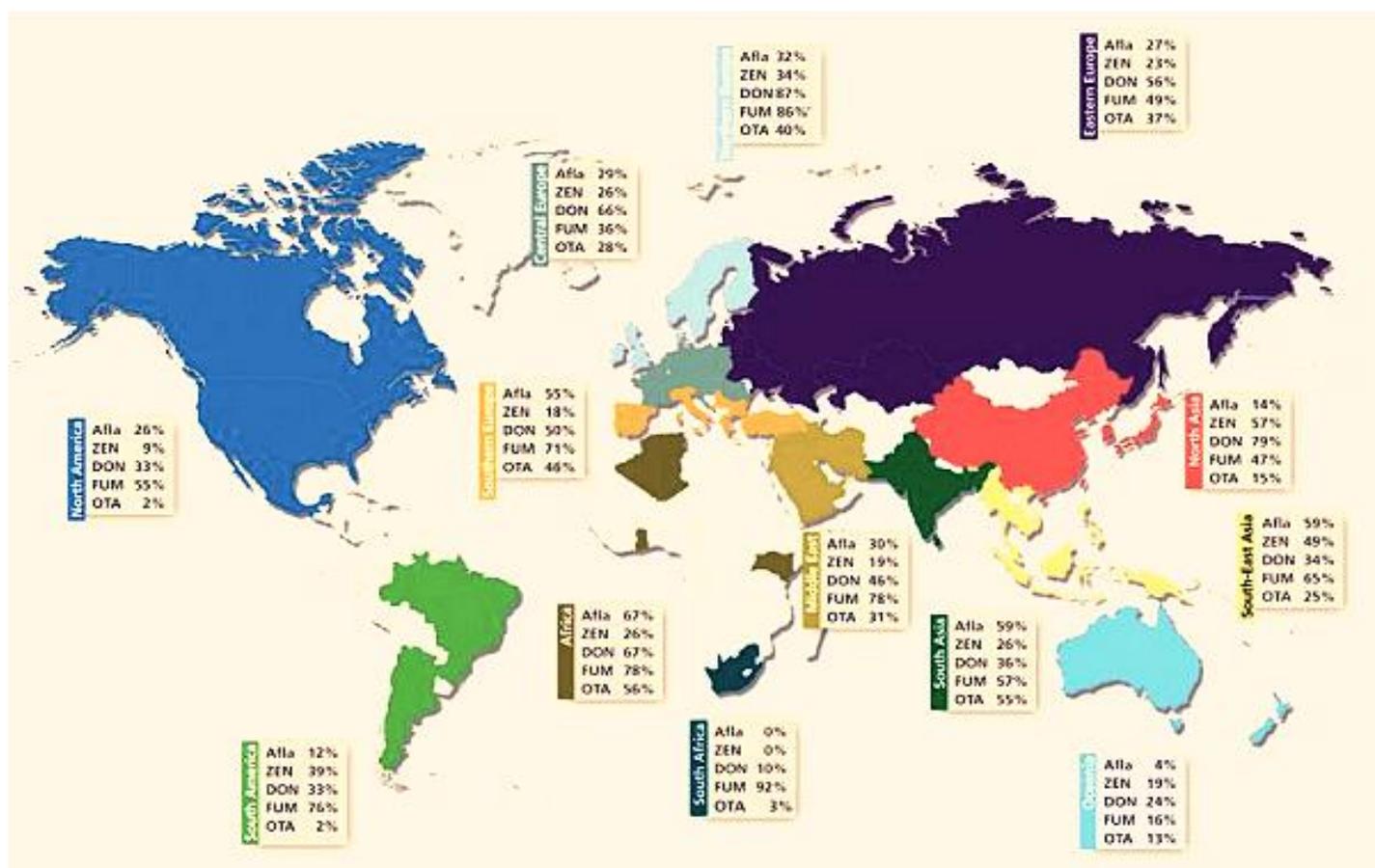


Figure 2 Répartition principale des mycotoxines selon l'organisation BIOMIN pour l'an 2013 (Gauthier, 2016)

La répartition des mycotoxines dans le monde entier n'est pas obtenue par un processus simple (Figure 2) (Gauthier A, 2016). La production des mycotoxines dépend de plusieurs facteurs qui peuvent être intrinsèque (concernent la nature de la souche) ou extrinsèque (concernent les conditions de l'environnement) (Zinedine A, 2004)

1.5.1. Facteurs intrinsèques

Concernent la nature de la souche et sa toxinogénéicité, eu sein d'une espèce toxinogène on peut trouver des souches fortement toxinogènes et d'autres qui présentent une faible toxinogénéicité. Ca peut dépendre sur le stade de développement de la souche productrice **(Zinedine A, 2004)**

1.5.2. Facteurs extrinsèques

Ce sont les facteurs environnementaux qui affect la croissance fongique et la toxinogénéicité de la souche à savoir :

L'activité de l'eau (Aw): qui joue un rôle principale dans la germination des spores et la croissance du mycélium. L'exigence des moisissures en eau varie d'une souche à une autre et elles sont classées en 3 groupes :

- Les espèces hygrophiles dont les spores germent à plus de 90% et leur croissance optimale située à 100% d'humidité relative (*Mucor*sp.).
- Les espèces mésophiles dont les spores germent entre 80 et 90% et leur croissance optimale se situe entre 95 et 100% d'humidité relative (*Alternaria*sp., *Penicillium* sp.).
- Les espèces xérophiles dont les spores germent à moins de 80% et leur croissance optimale se situe entre 95 et 100% d'humidité relative (*Aspergillus*., *Penicillium*). **(Zinedine A, 2004)**

Tableau I Activité de l'eau A_w nécessaire pour le développement de quelques moisissures (Zinedine A, 2004) (OMS, 1990)

Moisissures	A_w
A. <i>Ochraceus</i>	0,83-0,87
➤ <i>Flavus</i>	0,78
A. <i>Niger</i>	0,88
A. <i>Cyclopium</i>	0,87-0,90
<i>Fusarium</i>	0,80-0,92

Température et pH

La température peut agir directement sur la croissance des moisissures et la production des mycotoxines, dont la température idéale pour la croissance des moisissures est de 20°C à 30°C et qui peut croître en un vaste intervalle de 4°C à 40°C. Certaines espèces thermophiles peuvent croître en une température avoisine de 55°C e.g: *A. fumigatus*. En générale, la température requise pour la production des mycotoxines est inférieure à celle de la croissance des moisissures. (Zinedine A, 2004)

Le pH est un facteur important dans es deux processus, la plupart des moisissures croissent dans des pH acides et tolèrent les valeurs les plus basses (Zinedine A, 2004)

Le substrat

Les glucides présentent la source du carbone la plus utilisé par les moisissures pour la production des mycotoxines, la présence de quelque substances spécifique dans les aliments provoque la production de mycotoxines comme le saccharose et les acides aminés donc la contamination d'un denrée alimentaire par les moisissures dépend de la nature du substrat et des glucides disponibles (Zinedine A, 2004)

1.6. Effet sur la santé

Les mycotoxines provoquent des effets néfastes sur la santé suite à une exposition aigüe ou chronique, elles peuvent avoir des effets cancérrogènes,

mutagènes, toxiques pour la reproduction, immunomodulateurs, oestrogéniques, nécrosants, neurotoxiques, néphrotoxique, hépatotoxiques, hépatotoxiques (Tableau 2) **(Brauchard G et al., 2009)**

Les interactions entre des différentes mycotoxines au cas d'une co-exposition et ses impacts sur la santé humaine et animale n'est pas bien défini et pas suffisamment exploité, elles peuvent être synergiques, antagonistes ou additives. Toutefois, cet aspect toxicologique est peu documenté. **(Brauchard G et al., 2009)**

Tableau II Principales mycotoxines faisant l'objet de seuils réglementaires, principales moisissures productrices associés, denrées dréqquement contaminées et effets toxiques majeurs (AFSSA, 2009; CAST, 2003; Krskaand et al., 2008). Et recommandations du JECFA, du SCF ou de l'EFSA concernant la dose journalière tolérable de certaines mycotoxines. (Brauchard G et al., 2009)

Mycotoxines	Moisissures toxigènes	Denrées contaminées	Effets	Dose journalière tolérable
AflatoxineB1, M1	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>A.nomius</i>	Maïs, arachides, blé, graines de coton, noix, riz, fruits secs et épices.	Cancérogénicité, Génotoxicité, Immunotoxicité,	La consommation la plus faible possible
Ochratoxine A	<i>Penicillium verrucosum</i> , <i>A.ochraceus</i> , <i>A.carbonarius</i> .	Céréales, grains de cacao et de café, vin, jus de raisin, bière, épices, boudins et rognons.	Néphrotoxicité, Immunotoxicité, Tératogénicité,	120 ng/kg/semaine 100 ng/kg/semaine
Patuline	<i>P. expansum</i> , <i>A. clavatus</i> , <i>Byssochlamysnivea</i> .	Pomaceae (Pommes, poires) jus defruits.	Neurotoxicité, Génotoxicité, Cytotoxicité	0,4µg/kg/jour
Trichothécène(DON)	<i>F. graminearum</i> , <i>F.culmorum</i> , <i>F.sporotrichoides</i> <i>F.langsethiae</i> , <i>F.tricinatum</i> , <i>F.poa</i> , <i>F.solani</i> , <i>F.equiseti</i>	Céréales (blé, maïs, orge, sarrasin, seigle, millet, riz, avoine), fruits(bananes	Immunotoxicité, Effet hématopoïétique, Troubles digestifs	60ng/kg/jour
Trichothécène (T-2 et ToxineHT-2)	<i>Fusarium tricinctum</i> , <i>F.langsethiae</i> , <i>F.sporotrichoides</i> , <i>F.poa</i> , <i>F.solani</i> , <i>F.equiseti</i> .	Céréales (blé, maïs, avoine, orge, riz, fèves, soja)	Génotoxicité, Immunotoxicité,	60ng/kg/jour
Fumonisines B1,B2,B3	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>F.proliferatum</i> .	Céréales (maïs,riz).	Cancérogénicité, Neurotoxicité	2µg/kg/jour
Zéaralène	<i>F.gaminearum</i> , <i>F.culmorum</i>	Céréales (maïs, orge, soja,blé, riz).	Immunotoxicité	0,5µg/kg/jour 0,2µg/kg/jour
Alcaloïdesd'ergot	<i>Clavicepspurpurea</i> , <i>C.paspali</i> , <i>C.fricana</i> , <i>C.fusififormis</i>	Seigle, blé, triticale (croisement entre blé et seigle)	Neurotoxicité, Troubles digestifs, Vasoconstriction	–

L'OCHRATOXINE A

2.1 Définition & structure

Les Ochratoxines A, B et C est une famille des métabolites secondaires produites par des champignons dont l'Ochratoxine A est connue d'être la plus abondante et la plus toxique (Gauthier 2016) (Yanfei et al., 2018). L'OTA est produite par plusieurs champignons filamenteux : *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger* et *Penicillium verrucosum* (Travis et al., 2015). L'OTA s'est avéré être l'un des contaminants les plus courants des aliments comme les céréales, le café, le vin, les fruits secs, les noix et les produits à base de viande (Yanfei et al., 2018 ; Fink, 2005; Gagliano et al., 2006) et même dans les plantes médicinales et les bouteilles d'eau selon des études récentes (Yanfei et al., Chen et al., 2015; Shim et al., 2014; Veprikova et al., 2015)

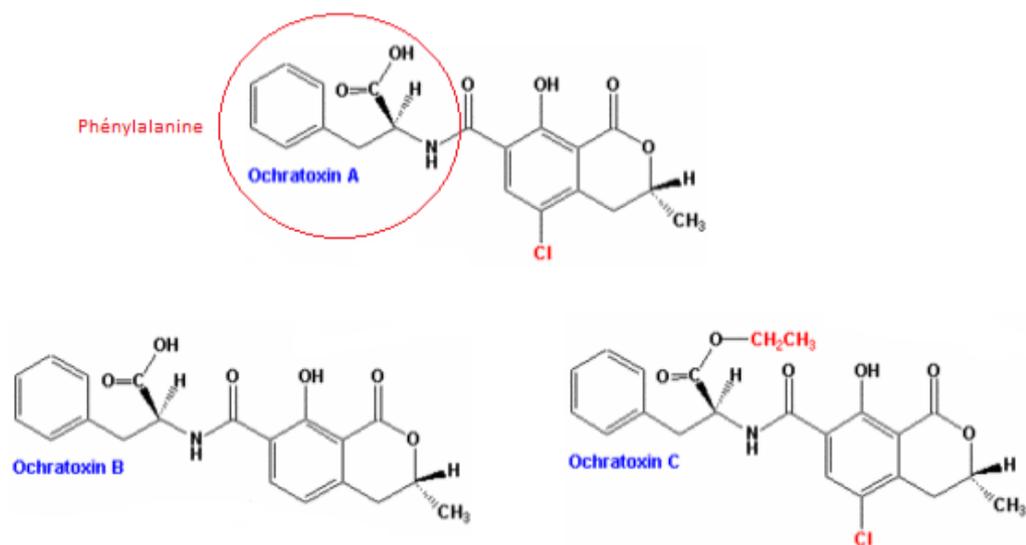


Figure 3 Structure chimique des Ochratoxines A,B,C (Gauthier, 2016)

L'Ochratoxine A a été isolée en 1965 pour la première fois par des chercheurs sud-africains à partir de la semoule de maïs contaminée par *Aspergillus ochraceus*, puis identifiée dans les États-Unis en 1969 (Frantisek et al., 2016)(Rouvrier, 2002 ; Wei den Burner, 2001)

Les Ochratoxines sont dérivées de l'acide aminé Phénylalanine. L'Ochratoxine A est constituée du 3-méthyl-5-chloro-8-hydroxy-3,5-dihydrocoumarine, couplée par une liaison peptidique (liaison covalente entre un groupement carboxy et une amine), sa formule brute est : C₂₀H₁₈ClNO₆, sa dénomination complète : L-Phénylalanine, N-((5-chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-méthyl-1-oxo-1H-2-benzopyran-7-yl)carbonyl)-(R)-isocoumarine

(Gauthier, 2016). Et sa domination selon l'Union International de Chimie Pure et Appliqué (IUCPA) : N-[[[(3R)-5-chloro-8-hydroxy-3-méthyl-1-oxo-3,4-dihydro-1H-isochromén-7-yl]carbonyl]-L-phenylalanine (Moez , 2019)

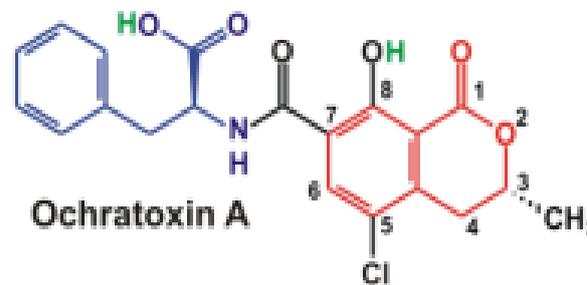


Figure 4 La structure chimique de l'Ochratoxine A(en Bleu : Phénylalanine, en Rouge : Déhydro-isocoumarine, en vert: Hydrogènes acides) (Tamas et al., 2016).

Des recherches on pourvût que l'OTA provoque une Néphrotoxicité, hépathotoxicité, embyotoxicité, Neurotoxicité, Immunotoxicité comme elle est tératogène et carcinogénique (Frantisek M et al., 2016 ;Weidenbach A et al.,2004 ; Sava V, 2006 ; Sava V, 2007 ; Pfohl-Leszkowicz A et al., 2007 ; Malir F et al., 2013a ; Malir F et al., 2013b). Elle est classée comme un agent carcinogène du groupe 2B (agent peut être cancérigène pour l'Homme) par l'Agence International de la Recherche sur le Cancer (IARC) et par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Yanfei et al., 2015 ; Boesch et al., 2008; Malir et al., 2016)

2.2 Moisissures productrice

2.2.1 *Aspergillus carbonarius*

Les conidiospores sont formés de stipes lisses de 2 à 3 µm de long, les vésicules sont sphériques d'un diamètre de 60 à 90 µm, les métules de 12 à 18 µm de long, les phialides de 9 à 15 µm de long, les conidies sont sphériques et de 6 à 8 µm de diamètre, noir et rugueux (et parfois couvert de pointes) de manière très caractéristique (ANSES, 2012)

2.2.2 *Aspergillus ochraceus*

Les conidiophores sont formés de stipes légèrement rugueux (cellules jaunâtres) de 1 à 1,5 µm de long, les vésicules sont sphériques de 25 à 50 µm de diamètre, les métules

de 15 à 0 μm de long, les phialides de 9 à 12 μm de long, et les conidies sont lisses, sphériques et de 2,5 à 3,5 μm de diamètre, lisses ou légèrement rugueuses (ANSES, 2012)

2.2.3 *Penicillium verrucosum*

Les conidiophores ont des stipes rugueux caractéristiques de 200 à 500 μm de long et se terminant en brosses, certains isolats ayant trois ou quatre verticilles et d'autres deux ou trois verticilles avec 1 ou 2 ramifications par stipe, les métules mesurent de 7 à 15 μm de long, le flaçon- en forme de phialides de 7 à 9 μm de long, et les conidies sont lisses, sphériques et de 2,5 à 3,5 μm de diamètre, ou plus rarement subsphériques à ellipsoïdales et de 3 à 3,5 μm de long. Les deutéromycètes responsables de contaminations se multiplient par un cycle végétatif dans le milieu et se propagent grâce aux conidies (formes asexuées) produites dans les conidiophores (ANSES, 2012)

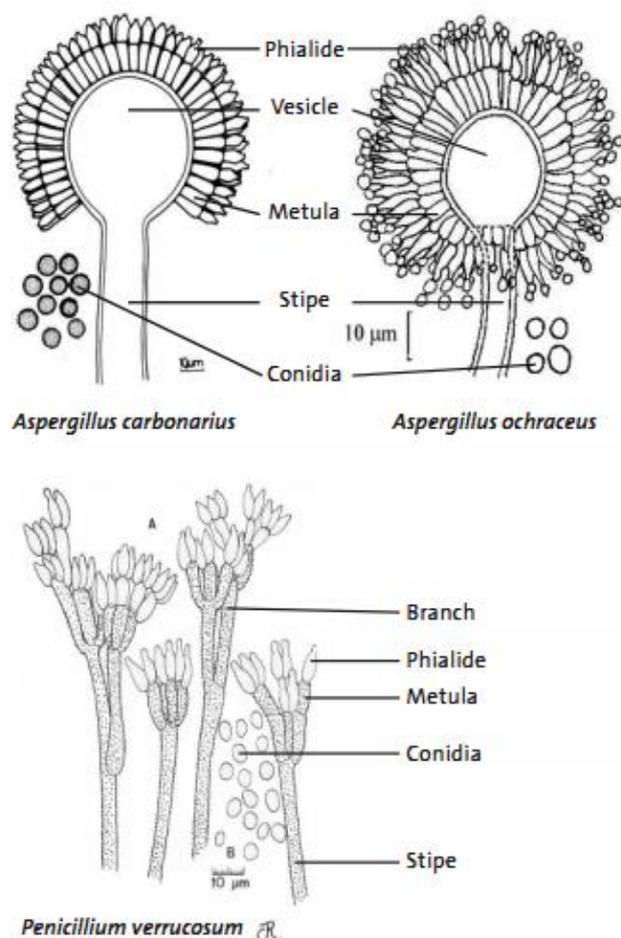


Figure 5 Schéma descriptive des souches productrices de l'OTA *Aspergillus carbonarius*, *A ochraceus* et *Penicillium verrucosum* (ANSES, 2012)

Aspergillus ochraceus est décrit comme étant mésophile xérotolérant. Sa croissance se manifeste entre 8 et 37 °C avec un maximum entre 24 et 31 °C. Les conditions d'activité en eau les plus favorables sont toutefois de l'ordre de 0,95 à 0,99 A_w . *A. ochraceus* est retrouvé dans divers produits alimentaires d'origine végétale comme les produits secs (haricots secs, graines de soja, épices, olives, fruits secs, noix de pécan, pistaches, cacahuètes et noisettes) et dans les céréales (riz, avoine, Maïs). *A. ochraceus* a aussi été retrouvé dans des produits d'origine animale comme des fromages, salaisons, poissons ou viandes séchées. *Penicillium verrucosum* croît lentement en présence d'activité en eau faible ($A_w < 0,80$) et à basse température (entre 0 et 31 °C, avec un maximum à 20 °C). Il est confiné aux zones tempérées ou froides. Les supports potentiels de développement de *P. verrucosum* sont les céréales en Europe centrale, en Europe du Nord et au Canada. *A. carbonarius* est la principale origine d'OTA dans les vignobles français, alors qu'en Espagne et en Italie, *A. niger* participait aussi, à un niveau relativement faible, à la production de l'OTA. Les *Penicillium* se développent au cours de la maturation du raisin, cependant ils n'ont aucune incidence sur la production de l'OTA (Sophie et al., 2006)

Tableau III Caractéristiques de la croissance et de la toxinogénèse des *Aspergillus* et *Penicillium* producteurs d'Ochratoxine A (ANSES, 2012)

Growth	<i>A. carbonarius</i>			<i>A. ochraceus</i>			<i>P. verrucosum</i>		
	Min	Opt	Max	Min	Opt	Max	Min	Opt	Max
Température	10	30	41	8	24 - 31	41	0	20	31
pH	2	5.6	10	2.2	5.6	10	2.1	5.6	10
a _w	0.85	0.96 - 0.99	/	0.77	0.95 - 0.99	/	0.80	0.95	/
% CO ₂	/	/	/	/	/	80 %	/	/	/
Toxinogénèse	Min	Opt	Max	Min	Opt	Max	Min	Opt	Max
Température	/	15 - 30	/	/	25 - 30	/	0	20	31
pH	/	/	/	/	/	/	/	5.6	/
a _w	0.87	0.93 - 0.98	/	0.85	0.95	/	0.86	0.92	/
% CO ₂	/	/	/	/	/	30 %	/	/	/

2.3 Biosynthèse

Plusieurs voies de biosynthèse ont été proposées pour OTA. Sa biosynthèse a été prédite à l'origine par sa composition structurale; ce consiste en une fraction dihydrocoumarine liée à la L-phénylalanine. Selon Huff et Hamilton (1979), Harris et Mantle ont émis l'hypothèse que le processus de biosynthèse dominant de l'OTA était l'Ochratoxine β \rightarrow Ochratoxine α \rightarrow Ochratoxine A, avec l'Ochratoxine β \rightarrow Ochratoxine B \rightarrow Ochratoxine A comme voie alternative (Yang et al., 2018; Harris et al., 2001). Cependant, Harris et Mantle ont proposé une voie différente pour la production d'OTA, ils ont proposé la biotransformation à partir d'OT β à OT α et enfin à OTA par liaison directe avec la phénylalanine. Dans cette voie de biosynthèse proposée, l'OTC n'était pas un précurseur dans la biosynthèse de l'OTA (Yang et al., 2018; Harris et al., 2001). Harris et Mantle ont également proposé une voie alternative dans lequel OT β était lié à la phénylalanine puis transformé en OTB, avec une finale étape de chloration pour produire de l'OTA. Dans cette voie, l'OTB était un intermédiaire important au cours de la

biosynthèse de l'OTA. (Yang *et al.*, 2018; Gallo *et al.*, 2012) ont suggéré une troisième voie de biosynthèse potentielle. Ils ont émis l'hypothèse d'une voie de biosynthèse de l'OTA similaire à la voie alternative proposée par Harris et Mantle, sauf qu'ils croyaient que L'OT α était un sous-produit de l'hydrolyse de l'OTA.

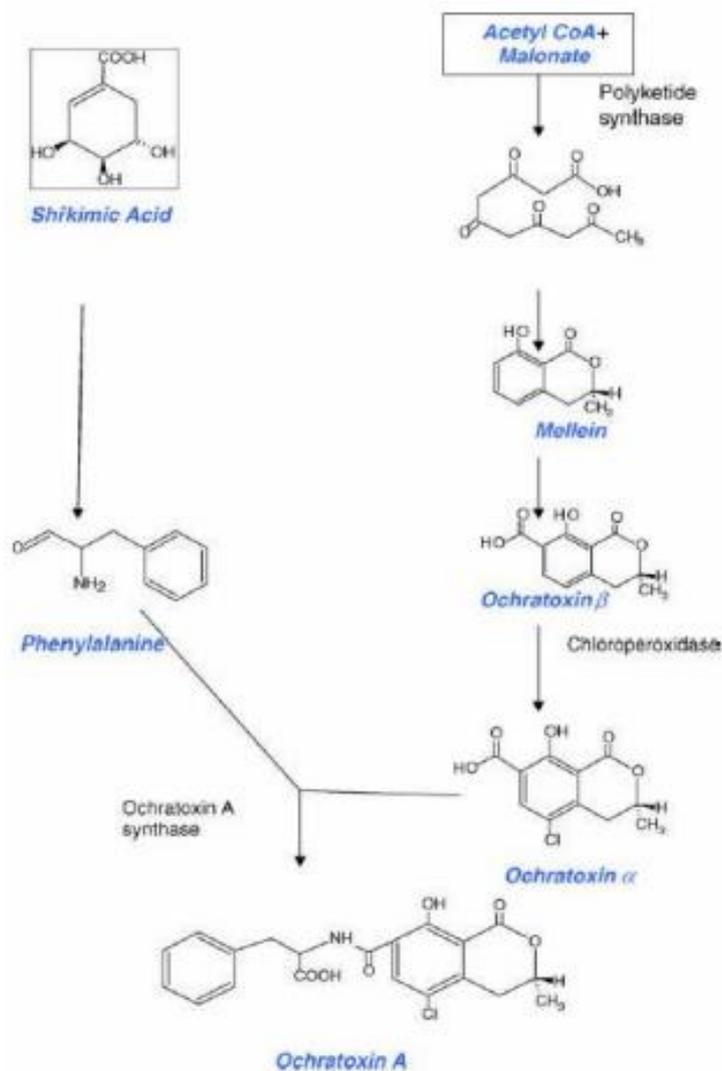


Figure 6 Voie de biosynthèse de l'OTA suggéré par Harris et Mantle Propriétés Physico-chimiques

L'OTA est un acide organique faible incolore, elle est soluble dans les solutions organiques polaires, peu soluble dans les solutions aqueuses et soluble dans les solutions aqueuses alcalines comme la solution du bicarbonate (Gauthier, 2016). Elle reflète une fluorescence sous les ultraviolets : bleu dans les milieux alcalines et verte en dans les

milieux acides, qui sont à l'origine des méthodes de détections (**Gauthier, 2016 ; Azemar, 2001**).

Les propriétés chimiques sont exprimées dans le tableau suivant :

Tableau IV Les propriétés chimiques de l'Ochratoxine A (**HSDB 2010, Akron 2010, SRC 2010**)

Propriétés	Informations
Poids moléculaire	403,8 ^a
Densité	1,366 g/mL ^b
Température de fusion	169°C ^a
Log Kow	4,74 ^a
Solubilité dans l'eau	1,31 mg/L à 25°C
Pression de vapeur	7,56×10 ⁻¹⁵ mm/Hg à 25°C
Constante de dissociation	3,46 ^b
Pka	7,1

2.4 Toxicocinétique de l'OTA

L'Ochratoxine A est une mycotoxine qui s'accumule facilement dans l'organisme, qui est doté d'une absorption et distribution rapide, mais d'une élimination lente, ça c'est due à sa haute capacité de se lier aux protéines plasmatiques particulièrement l'Albumine et à une métabolisation lente (**Dieter et al., 2020**) . La Toxicocinétique sera mieux détaillé dans les titres suivants

2.4.1 Absorption

L'OTA est rapidement absorbé après une ingestion orale dans plusieurs espèces animales et même chez l'homme (93% après 8h d'ingestion) (**Dieter et al., 2020 ; Studer-Rohr et al., 2000**) L'absorption de l'OTA se produit généralement au niveau de la partie proximal du Jéjunum via un transport passive, et l'absorption dans le Jéjunum (partie

centrale de l'intestin grêle, en aval du duodénum et en amont de l'iléon) se fait contre le gradient de concentration par l'intervention des transporteurs OAT (Organic Anion Transport). La biodisponibilité de l'OTA dépend de l'espèce, la dose et la présence des aliments dans l'estomac lors de l'administration (**Dieter et al., 2020**)

2.4.2 Distribution

L'Ochratoxine est caractérisé par son grande affinité avec les protéines plasmatiques particulièrement l'Albumine chez toutes les espèces humaines et animale. Après une administration orale de 50ng/g d'OTA, on remarque que 0,02% d'OTA se trouve sous forme libre dans le sang chez l'homme, 0,08% chez les singes, 0,01% chez les souris et les cochons, mais 20% chez les poissons (**Dieter et al., 2020**). Ce qui rend sa distribution facile, une élimination lente et la prolongation de son temps de demi-vie, selon des études et après la prise d'une dose orale, 395ng de l'OTA marqué par le Tritium par un volontaire male de 57 ans et 65Kg, ils ont remarqué que sa demi-vie a put atteindre les 20h les 6 premières doses et que son élimination est devenue plus lente avec une demi-vie de 35 jours et une clairance rénale de 0,1mL/min (**Dieter et al., 2020 ; Studer-Rohr et al., 2000**). L'Ochratoxine A se distribue dans tout l'organisme avec des concentrations différentes : Reins- Foies- Muscles- Tissus adipeux (**Sophie et al., 2006**). Selon **Woo et al. (2012)** dans une étude *in Vitro* ont remarqué qu'une dose minimal a put franchir la barrière du placenta.

2.4.3 Métabolisation

OTalpha est le métabolite majeur de l'OTA, elle subit une hydrolyse par les enzymes protéolytique : la carboxypeptidase et la α -chymotrypsine en aboutissant à la formation de l'OT α qui non-toxique et la phénylalanine OT α a été détecté pour la 1ere fois dans le caecum , le gros intestin et l'excrétion fécale après une administration orale de l'OTA, elle est générée par le microbiote intestinal chez les non ruminants et l'homme (**Gauthier , 2016**) (**Dieter et al., 2020 ; Ali et al., 2017**) et par le microbiote des ruminants comme chez les vaches et les moutons. L'OTalpha ne s'accumule pas dans les reins et est facilement excrété (**Dieter et al., 2020**).

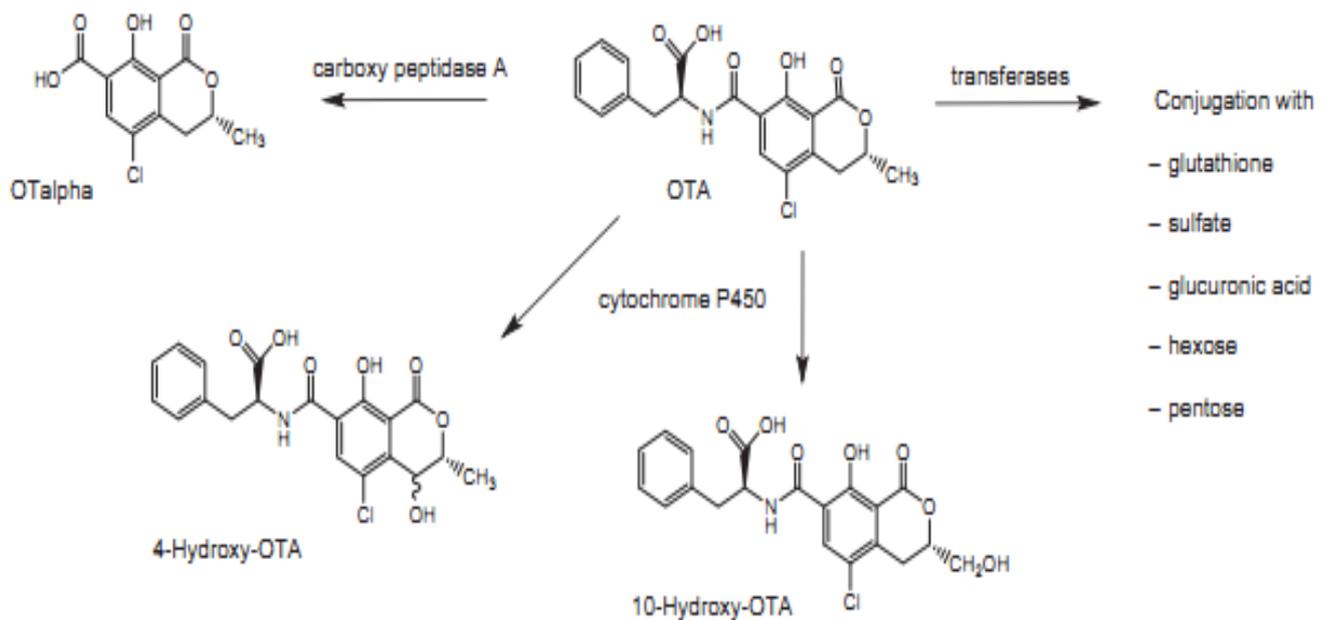


Figure 7 La voie métabolique de l'OTA chez l'homme et l'animal (Dieter et al., 2020)

Par l'intervention du Cytochrome P450, deux métabolites stéréo-isomères moins toxiques sont obtenues : 4-hydroxy-OTA et 10-hydroxy-OTA. Elles ont été détectées au niveau des urines des rats intoxiqués. (Dieter et al., 2020).

Un autre métabolite toxique peut être obtenu « Open-Lactone Ring » OP-OTA, sa haute toxicité est due à la réversibilité de l'ouverture du cycle lactone ce qui aboutira à l'OTA (Dieter et al., 2020).

Une réaction électrochimique et photochimique de l'OTA peut générer des métabolites Ochratoxine Hydroquinone (OTHQ) et Ochratoxine quinone (OTQ) un couple redox, cette réaction mène à la perte d'un atome de Chlore qui se procède par un radical Aryle ce qui aboutit à la formation de l'Ochratoxine B (OTB). OTB, OTQ et OTHQ avec l'intervention du GSH sous des conditions physiologiques peut indiquer la formation des métabolites qui peuvent influencer la Génotoxicité de l'OTA (Dieter et al., 2020 ; Manderville, 2005 ; Pfohl Leszkowics et al., 2012) (Dieter et al., 2020 ; El Adlouni et al., 2000 ; Faucet-Marquis et al., 2006 ; Yang et al., 2015)

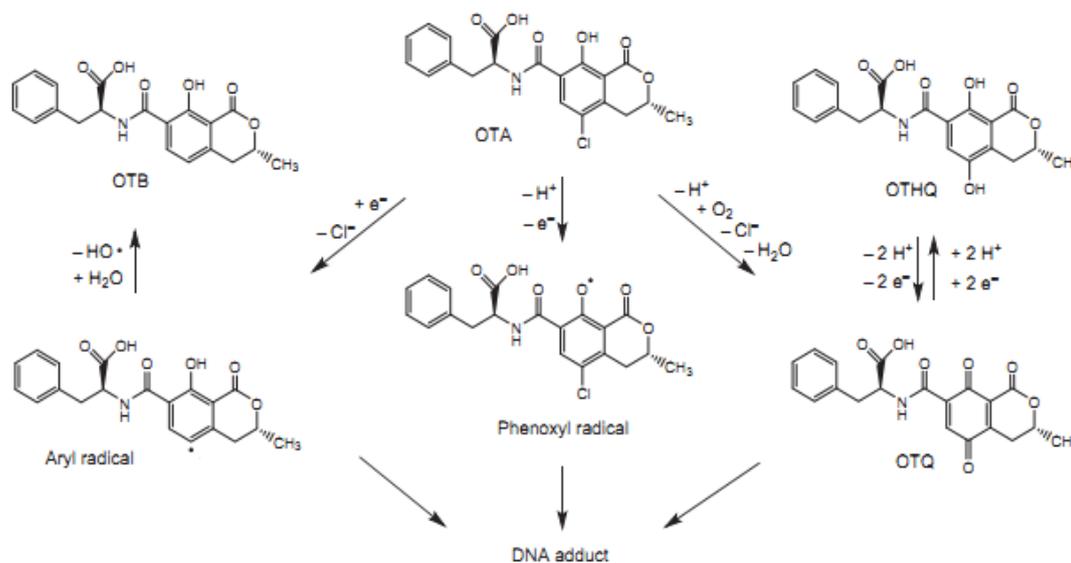


Figure 8 Molécules réactives hypothétiques de l'OTA (Dieter et al., 2020)

2.4.4 Excrétion

L'Ochratoxine A est excrétée à travers les urines et les selles. Chez l'homme la voie urinaire est la prédominante pendant que chez les rats c'est la voie biliaire et fécale (Dieter S et al., 2020 ; Dietrich et al., 2005). Les deux voies sont lentes à cause de la grande affinité de l'OTA avec les protéines plasmatiques et la métabolisation faible (Dieter et al., 2020). Selon Studer-Rrohr et al., (2000) 3% de la dose orale d'OTA marqué par le tritium, a été excrétée au quotidien par un volontaire male à travers les urines pendant les 6 premiers jours, et avec un totale de 62% de la dose prise après les 73 jours. D'autres expérimentations menées sur des rats ont démontré que l'OTA et ses métabolites peuvent rejoindre la circulation entéro-hépatique, et selon Fuchs et Hult, (1992) ont proposé que le degré de la circulation de l'OTA dans la circulation entéro-hépatique, soit responsable de la variation de son temps de demi-vie d'une espèce à une autre (Dieter et al., 2020).

L'excrétion rénale est particulièrement importante, car le rein est l'organe principalement ciblé par la toxine, l'OTA est fortement liée à l'Albumine ce qui rend son élimination par voie glomérulaire impossible, donc elle suit la sécrétion tubulaire. Des transporteurs interviennent dans cette voie : OAT1 et les Multidrug-resistance proteins

(MRP) 2 et NPT 4 . La réabsorption de l'OTA et ses métabolites est la cause principale de son accumulation dans les reins et aussi de sa lente excrétion. (Dieter et al., 2020).

Transfer de l'OTA au lait maternel

Les études ont montré que des taux élevés d'OTA ont été surveillés dans le lait maternel pendant les premiers jours de l'accouchement, et que la concentration de l'OT alpha était inférieure à celle de l'OTA (30 ± 40 ng/L Vs 106 ± 45 ng/L), malgré que le taux de l'OTalpha était plus élevé (840 ± 256 ng/L) (Dieter et al., 2020 ; Muñoz et al., 2014).

2.5 Toxicité

L'OTA est connue comme un agent : neurotoxique, immunotoxique, hépatotoxique, néphrotoxique, carcinogénique, tératogène (en association avec la toxicité maternelle) et provoque des lésions histopathologiques. En 1993 l'Ochratoxine A est classée par IARC dans la classe 2B comme agent qui peut provoquer des cancers chez l'homme en se basant sur des études réalisées, et par la NCI/NTP (National Cancer Institute/ National Toxicological Program) comme agent avec un potentiel cancérigène rénal le plus élevé, sa toxicité varie selon : le sexe, l'espèce et le type cellulaire (Tamas et al., 2016) (El Khoury et al., 2010)

2.5.1 Neurotoxicité

Selon des recherches, l'OTA provoque de malformations au niveau du système nerveux pour les nouveau-nés, et Solea et al ont reporté que la toxine peut être l'origine des lésions et des dégâts au niveau du système nerveux (El Khoury et al., 2010 ; O'Brien et al., 2001)

2.5.2 Immunotoxicité

L'OTA est reconnue comme un fort immunosuppresseur dans les fortes et faibles doses. Elle joue un rôle dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes B et T, et provoque l'arrêt de la synthèse des Interleukines 2 et leur suppression, comme elle provoque la régression du Thymus et une lymphopénie. et aussi elle bloque les cellules Natural Killers et la production des interférons (El Khoury et al., 2010 ; Petzinger et al., 2002)

2.5.3 Néphrotoxicité

Les reins sont les principaux organes cible de l'Ochratoxine A (Tao et al., 2016 ; Liang et al., 2015) Une exposition à l'OTA peut provoquer un tumeur rénale chez les rongeurs et les volailles (Tao et al., 2016 ; Bondy et al., 2015) en plus de nombreux chercheurs on déclaré qu'il peut y avoir une association entre l'exposition à l'OTA et la néphropathie endémique des Balkans (BEN), Chronique Intestinale Néphropathy (CIN) (Tao et al., 2016 ; Travis et al., 2015) une exposition aigue provoque une détérioration des fonction tubulaires post-proximales, augmentation de l'excrétion NaCl et diminution de H^+ K^+ , une exposition chronique entraine une réduction du débit sanguin rénale qui résulte en une diminution de la filtration glomérulaire (Sophie et al., 2006)

2.5.4 Hépatotoxicité

Certaines recherche ont démontré que le stresse oxydatif induit par l'OTA provoque une hépatotoxicité, il induit une Cytotoxicité et apoptose dans les hépatocytes (Hyee et al., 2019)

2.5.5 Génotoxicité

L'OTA est génotoxiques dans le test de répartition de l'ADN chez l'*Escherichia Coli*, elle augmente le taux d'échange de chromatides sœurs et induit la formation de micronoyaux dans les cultures cellulaires de vésicules séminales ovines. Elle induit des cassures monobrins d'ADN dans différents tissus ou cellules de souris in vivo et vitro (Sophie et al., 2006)

2.5.6 Cancérogène

L'OTA est un agent cancérogène, elle induit des tumeurs rénales, hépatiques, mammaires et testiculaires. La toxine est classé par l'IARC dans la classe 2B comme étant un produit peut être cancérogène pour l'homme (Sophie et al., 2006).

2.5.7 Tératogène

Pour son effet embryologique, un taux de mortalité prénatale élevé a était observé, en plus des anomalies au niveau du système nerveux, yeux et squelettes axiale chez des fœtus et la structure crâniofaciale. Chez des rats après 2 doses de 2,5 mg/kg p.c d'OTA par voix orale durant 8^e et 9^e jours de gestation, ils ont observé : une

augmentation de résorption des fœtus, diminution du nombre moyen de fœtus par femelles, baisse du poids du fœtus et du placenta (**Sophie et al., 2006**)

2.6 Mode d'Action

2.6.1 Inhibition de la synthèse des protéines

Un effet très important de l'OTA, c'est l'inhibition de la synthèse des protéiques (**Fahimeh et al., 2021 ; Weidenbach et al., 2000**). Par ce mécanisme, l'OTA inhibe et diminue la croissance et la prolifération cellulaire, Il a été démontré que l'inhibition de l'ARN-t de la phénylalanine est l'un des principaux mécanismes de l'OTA. Bien qu'il ait été démontré que la phénylalanine et un fragment chimique de l'OTA joue un rôle majeur en tant que compétiteur entre la phénylalanine et la toxine, la structure de l'isocoumarine est plus importante dans cette interaction que la fraction phénylalanine car la modification de la structure de l'isocoumarine a un impact significatif sur cette action (**Fahimeh et al., 2021 ; Xiong et al., 2020**). Des études, bien sûr, ont fourni des preuves à l'appui de l'importance des structures isocoumarines de l'OTA. Il est important de noter que des études menées par des chercheurs ont montré que les effets de l'OTA sur la phénylalanine hydroxylase et la phénylalanine t-RNA synthase se produisent après de fortes doses d'Ochratoxine. Bien que des méthodes non spécifiques d'inhibition de la synthèse des protéines aient été proposées, l'OTA est particulièrement efficace dans la transcription de nombreuses protéines (**Fahimeh et al., 2021 ; Hong et al., 2002**).

2.6.2 Apoptose

L'OTA peut directement provoquer la mort cellulaire par Apoptose et **nécrose (Lioi et al., 2004)**. L'Ochratoxine peut également induire des changements dans l'expression de différents gènes et peut être l'une des causes les plus probables d'Apoptose (**Gekle et al., 2000 ; Sorrenti et al., 2013**). Les modifications du niveau de transcription de nombreux gènes, tels que GADD153, GADD45, p53 et la clustérine, sont impliquées dans les dommages à l'ADN et contribuent également à la mort cellulaire (**Lühe et al., 2003 ; Qi et al., 2014**).

Des études sur des cellules hépatiques et rénales de rat ont identifié l'Ochratoxine comme l'un des promoteurs tumoraux les plus importants et ont également montré l'activation et l'expression de protéines impliquées dans l'Apoptose telles que MAPK,

ERK, p38 et JNK (**Horvath et al., 2002**). Une autre étude a suggéré la mort cellulaire apoptotique dans les cellules HT22 de l'hippocampe de souris (**Yoon et al., 2009**). Il est clair que la cytotoxicité induite par l'OTA et la réponse protéomique peuvent indiquer une neurodégénérescence. La neurotoxicité induite par l'OTA semble être, au moins en partie, médiée par l'apoptose, et l'OTA peut contribuer à la pathogenèse de maladies neurodégénératives (par exemple, la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson) dans lesquelles les processus apoptotiques sont impliqués de manière centrale (**Zhang et al., 2009**). On peut dire que l'Ochratoxine peut induire une nécrose, des lésions cellulaires, l'apoptose et finalement la mort des cellules cérébrales (**Weidenbach et al., 2000 ; Zhang et al., 2009**). La neurotoxicité dans les astrocytes humains par apoptose et surcharge de calcium intracellulaire a également été rapportée dans des recherches récentes (**Park et al., 2019**).

2.6.3 Impact sur la mitose

Bien que diverses études aient décrit la toxicité de l'OTA en tant qu'agent cancérogène, l'effet direct de la toxine sur l'ADN n'a pas été discuté. Des études sur des cellules rénales humaines suggèrent que l'OTA pourrait être un promoteur de la formation de tumeurs et un inducteur apoptotique en altérant la division. Il a été indiqué que l'OTA joue un rôle important en tant qu'inhibiteur de l'histone acétyl transférase (HAT) et de la division cellulaire (**Fahimeh et al., 2021 ; Adler et al., 2009**). De plus, l'OTA inhibe les THA avec un mécanisme épigénétique qui conduit à l'induction de tumeurs rénales et à la mutabilité génétique (**Fahimeh et al., 2021 ; Adler et al., 2009 ; Mally, 2012**).

Des résultats ont établi que l'OTA provoque des ruptures de brins d'ADN suite à des altérations de l'expression des gènes Rad18, Brip1, Brcc3 et chek1, il s'agit de gènes de réparation de rupture de double brin d'ADN (DSBR). Une autre étude qui a été réalisée afin de mettre en évidence les mécanismes moléculaires favorisant la néphrotoxicité de l'OTA a montré que l'OTA induit des dommages à l'ADN et un arrêt de la phase S dans les cellules rénales embryonnaires humaines, suite à la formation de queues de comètes à ADN (**Kamal et al., 2020 ; Hibi et al., 2013 ; Yang et al., 2014**).

2.6.4 Induction du stress oxydatif

Le stress oxydatif reflète un déséquilibre entre la manifestation systémique des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la capacité d'un système biologique à détoxifier facilement les intermédiaires réactifs ou à réparer les dommages qui en résultent. Les perturbations de l'état Redox des cellules peuvent provoquer des effets toxiques par la production de peroxydes et de radicaux libres qui endommagent tous les composants de la cellule, y compris les protéines, les lipides et l'ADN (Yanfei et al., 2018 ; Chandra et al., 2015). L'OTA a induit des perturbations biochimiques importantes accompagnées d'un stress oxydatif stress nitrosatif, des modifications histologiques et une fragmentation accrue de l'ADN dans les reins. (Yanfei et al., 2018 ; Abdel-Wahhab et al., 2016).

Le stress oxydatif induit par l'OTA et l'apoptose peuvent jouer un rôle clé dans le développement de la toxicité de l'OTA. Dans des études, l'OTA pourrait provoquer des modifications dégénératives des cellules épithéliales dans les cellules PT et hépatiques, ce qui pourrait avoir un effet négatif sur les performances de croissance des porcelets (Zhang et al., 2016). Il a été démontré que l'expression de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et la nitration des protéines sont marquées par l'exposition à l'OTA qui donne lieu à la production de ROS/RNS dans la lignée cellulaire rénale normale de rat et dans les cultures d'hépatocytes de rat (Kamal et al., 2020 ; Marin-Kuan et al. 2011).

L'OTA réduit les niveaux de glutathion réductase dans les lignées cellulaires, et l'épuisement des antioxydants. Ces réactions ont entraîné une diminution des défenses antioxydantes et une augmentation des niveaux d'oxydation de l'ADN, des lipides et des protéines. De plus, il a été remarqué que le stress oxydatif associé à l'OTA sous-estime la capacité de défense des cellules contre les antioxydants et induit une cytotoxicité dans les cellules, entraînant des dommages oxydatifs à l'ADN (Kamal et al., 2020 ; Marin-Kuan et al. 2011)

Tableau V études *in vivo* réalisé sur le stress oxydarif (Yanfei et al., 2018)

Animal	Durée	Dose	But d'étude	Résultat	Références
Rats male Sprague Dawley	3 semaines	OTA 3mg/kg	Evaluation du rôle de protection de nanoparticules du Chitosane (COS-NPs) seule ou avec Quercetine (Q) contre stresse oxydatif et génotoxicité rénale	L'OTA a diminué l'expression des gènes des GPX et SOD	(Abdel-Wahhabet <i>al.</i> , 2017)
Rats	1 semaine	0,1 ou 4 mg/kg d'OTA	Analyser la relation entre la néphrotoxicité de l'OTA et néphrotoxicité induite par une intoxication aigu par l'OTA	le poids corporel a diminué et l'expression de l'ARNm de certains gènes a augmenté en fonction de la dose. Certains indicateurs de stress oxydatif ont été altérés au niveau des reins (ROS et SOD) et du foie (SOD et GSH).	(Zhu et al., 2016)
Rats Sprague Dawley male adulte	2 semaines	0,5 mg/kg d'OTA 10mg/kg RMnSOD	Etude sur le rôle du stresse oxydatif dans le développement de la néphrotoxicité induite par l'OTA et l'effet d'un nouveau manganèse mitochondrial recombinant contenant du superoxyde dismutase (rMnSOD) pour prévenir les dommages rénaux induits par l'OTA	L'OTA induit une altération de la dégénérescence glomérulaire et tubulaire et des infiltrats interstitiels et que l'utilisation de rMnSOD associée à l'OTA prévient ces lésions histologiques rénales	(Ciarcia et al., 2016)
Rats Albino male et adulte	2 semaines	0,5 mg/kg d'OTA + MYR 100mg/kg	Étudier l'effet alleviative possible de la myricétine (MYR) contre les dommages induits par l'OTA dans le cortex rénal des rats	Le stress oxydatif était l'un des mécanismes impliqués dans la toxicité de l'OTA, MYR a partiellement amélioré les lésions rénales induites par l'OTA	(Abd El-Haleem et al., 2016)
Rats	6 semaines	AJR 150 & 300 mg/kg + 0,5 mg/kg d'OTA	Évaluer les effets curatifs du jus d'Aloe Vera (AVJ) sur la néphrotoxicité induite par l'Ochratoxine (OTA) A chez le rat	L'OTA a diminué la capacité antioxydante (GSH et vitamine E, SOD, CAT et gpX) des rats. AVJ a effet curatif bénéfique sur la néphrotoxicité induite par l'OTA chez le rat.	(El-Shafie et al., 2015)
Rats Sprague Dawley male adulte	2 semaines	0,5 mg/kg/jr d'OTA+ 5 mg/kg/jr Lycopene	Étudier l'effet du Lycopène contre les effets toxiques rénaux de l'OTA.	L'OTA a entraîné une diminution de l'activité CAT et des niveaux de GSH, mais une augmentation de l'activité SOD.	(Palabiyik et al., 2013)

Des concentrations significativement plus élevées de protéine carbonyle dues à la peroxydation lipidique des cellules rénales et hépatiques ont été observées, confirmant que le mécanisme de la toxicité médiée par l'OTA implique un stress oxydatif, non seulement en déclenchant la peroxydation lipidique, mais également en affectant les protéines (**Yanfei T et al., 2018 ; Sorrenti et al. 2013**). De même, il a été démontré que la production de ROS, à savoir l'anion superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyle (OH) et le peroxyde (ROO) stimule les dommages aux cellules du tubule proximal en réponse à l'exposition à l'OTA, induisant une large gamme des lésions dans la cellule. D'autres études ont suggéré que la toxicité de l'OTA pourrait également être attribuée à son isocoumarine tout en impliquant le groupe lactone carbonyle et en engageant les voies de mobilisation Fe^{2+} et Ca^{2+} , ce qui conduit au découplage de la phosphorylation oxydative et à l'augmentation du niveau de radical hydroxyle par la réaction de type Fenton tout en décrivant un comportement pro-oxydant de la cellule (**Yanfei et al., 2018 ; Sorrenti et al., 2013 ; Zheng et al., 2013**)

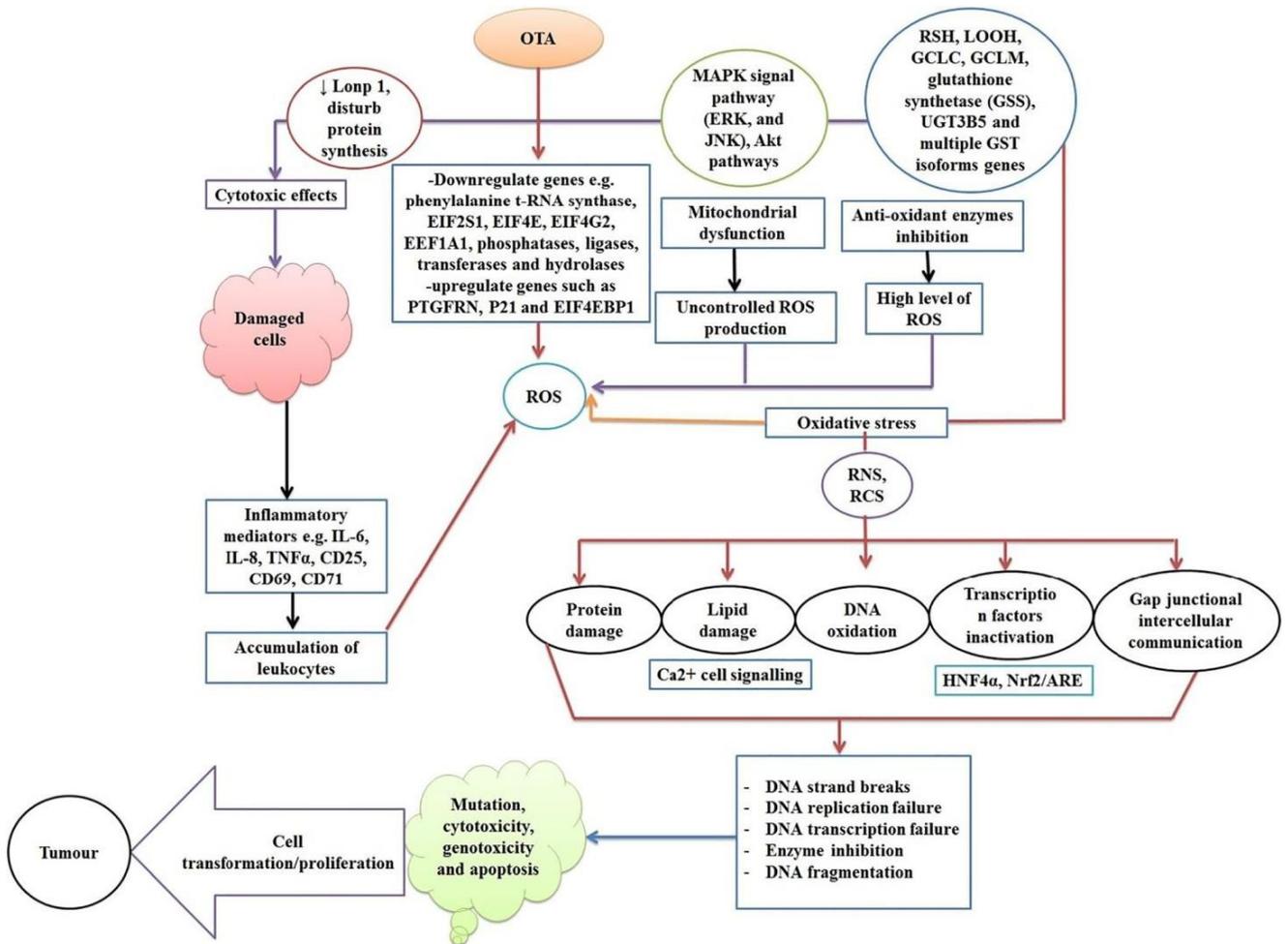


Figure 9 Effets du stress oxydatif induit par l'OTA (Kamal et al., 2020)

2.6.5 Inhibition de la production de l'énergie cellulaire

L'adénosine triphosphate (ATP) fournit l'énergie nécessaire aux réactions chimiques, à la locomotion et à la division cellulaire dans le métabolisme ou au transport actif d'espèces chimiques à travers les membranes biologiques (Kamal et al., 2020 ; Poór et al., 2014). Il a été découvert que l'OTA represses les protéines porteuses de phosphate de la membrane mitochondriale interne, ce qui freine le transit des électrons à l'intérieur des mitochondries et empêche les activités dépendantes des électrons soutenues par le succinate. La chaîne de respiration mitochondriale s'est avérée d'être bloquée et l'émission d'ATP a été largement affectée, ce qui a été remarqué comme le premier effet de l'OTA, suivi d'une altération morphologique de l'organite (Kamal et al., 2020 ; Poór et al., 2014). Des études ont démontré que cet état oxydatif des cellules a affecté le contrôle respiratoire et la phosphorylation oxydative des mitochondries isolées, entraînant une altération de la structure membranaire et

des fonctions bioénergétiques ainsi qu'une déplétion en ATP dans les mitochondries isolées du foie de rat (**Kamal et al., 2020 ; Poór et al., 2014**)

2.6.6 Perturbation de l'homéostasie calcique

Il est clair qu'une altération de l'homéostasie du calcium peut avoir des effets sur la cytotoxicité cellulaire. Diverses études de l'effet de la toxine OTA in vivo sur l'homéostasie du calcium ont été étudiées (**Benesic et al., 2000**). Certaines études ont montré que les cellules traitées avec l'Ochratoxine après peroxydation lipidique sont très prédisposés à la perméabilité au calcium. Certains auteurs ont indiqué que l'altération de la membrane du réticulum endoplasmique est directement liée à l'homéostasie calcique des cellules. Cela conduit à son tour à une prolifération cellulaire anormale (**Kamal et al., 2020**)

De plus, des études montrent que l'altération de l'homéostasie calcique induite par la toxicité de l'OTA est liée à une altération des membranes du réticulum endoplasmique et également à une augmentation de la peroxydation lipidique. Il a été indiqué que les effets de l'OTA affectent l'activité de la pompe à calcium du réticulum endoplasmique rénal et diminuent également la respiration mitochondriale rénale et l'absorption de calcium (**Kamal et al., 2020 ; Pagliassotti et al., 2016**). Conformément aux études précédentes, les auteurs ont indiqué que l'OTA peut affecter la modulation des niveaux de calcium intracellulaire dans le fibroblaste embryonnaire et en fin de compte, en perturbant le calcium extracellulaire, peut produire un signal durable de dommages aux canaux calciques (**Kamal et al., 2020; Park et al., 2019**).

2.7 Méthodes de détermination de l'OTA dans les denrées alimentaires

Le règlement CE n° 401/2006 de la commission du 23 février 2006, a fixé des méthodes de prélèvements d'échantillons et d'analyses pour le contrôle des teneurs des denrées alimentaires en mycotoxines (**Sophie et al., 2006**)

Des méthodes de dosages sont sélectionnées, pour pouvoir doser et déterminer l'OTA dans les céréales et ses produits dérivés, dans l'orge et le café, le vin et la bière (**Sophie et al., 2006**)

Les méthodes d'extraction sont identifiées, elles se basent sur l'extraction solide-liquide (échantillons solides), liquide-liquide (échantillons liquides), en association des solvants de natures variables Chloroforme-acide phosphorique, tert-butyl méthyl éther ou aussi méthanol-eau. L'utilisation de colonnes d'immuno-affinité représente l'état de l'art pour la purification dans les denrées alimentaires (**Sophie et al., 2006**).

Les immuno-essais, comme l'ELISA et la RIA sont des techniques appliqués en dépistage, la chromatographie couche mince est moins utilisée car elle est liée à des performances limitées surtout en ce qui concerne la spécificité et la précision de la mesure (**Sophie et al., 2006**).

La technique la plus utilisée en Europe et même en Amérique du nord est la chromatographie liquide haute performance couplée à la détection fluorimétrique (CLHP-FD) (**Sophie et al., 2006**).

2.8 Prévention

Pour prévenir la croissance fongique sur les grains, vous devez les sécher rapidement et complètement et les maintenir dans un endroit sec. Pour empêcher la formation d'OTA par *A. ochraceus*, l'activité du grain par l'humidité serait réduite à moins de 0,8. La méthode la plus influente de stockage des grains comprend ; cuisson à la vapeur, aération. Stockage scellé et atmosphère contrôlée, en particulier dans les régions tropicales et mi-tropicales dans lesquelles les dommages causés par les insectes sont un problème critique. Le stockage sous atmosphère contrôlée est basé sur l'application d'une atmosphère à faible teneur en oxygène ou à haute densité de dioxyde de carbone. L'utilisation d'une atmosphère améliorée pour contrôler les insectes aide à contrôler les champignons (**Gholampour et al., 2012 ; Srif et al., 2008 ; Amezqueta et al., 2009**)

2.9 Réduction du taux d'OTA des denrées alimentaires

Il existe de nombreuses stratégies pour réduire le taux d'OTA, Ces méthodes sont utilisées pour éliminer ou réduire le taux d'OTA. Ces différentes technologies sont classées selon des méthodes physiques, chimiques et biologiques (**Gholampour et al., 2012; Amezqueta et al., 2009**), microbiologiques (**Gholampour et al., 2012**)

2.9.1 Méthode physique

Les méthodes physiques comprennent la division, le tri, la purification ; peeling, le but de la procédure de peeling est d'éliminer le plus contaminé. Ils incluent l'utilisation de matériaux absorbants comme additif alimentaire lesquels seront absorbés par l'OTA, en réduisant ainsi la fréquence biologique (**Gholampour et al., 2012; Amezqueta et al., 2009**).

2.9.2 Méthode chimique

Ces méthodes nécessitent des composés pour éliminer l'OTA. Nous utilisons de l'ammonium, de l'hydrolysat alcalin, des bisulfites et de l'ozone dans certaines procédures, ils ont été signalés comme un composé efficace pour éliminer l'OTA et d'autres mycotoxines. Bien que certains résidus chimiques puissent subsister (**Gholampour et al., 2012 ; Abrunhosa, et al., 2006**)

2.9.3 Méthodes microbiologiques

À l'aide de micro-organismes décomposant, absorbant ou modifiant l'OTA, pour éliminer la toxine des produits contaminés ou lors de la consommation de mycotoxine (**Gholampour et al., 2012**). Une carboxypeptidase de *Phaffia rhodozyma* qui endommage plus de 90% de l'OTA (**Gholampour et al., 2012 ; Peteri et al., 2007**). En plus de cela, des bactéries spéciales appartiennent à *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Butyribrio* et *Acinetobacter* (**Gholampour et al., 2012 ; Reddy et al., 2010**) et un champignon spécial appartient à *Aspergillus*, (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. japonicus*, *A. versicolor*, *A. goneii*, *A. ochraceus*) et *Botrytis*, *Cladosporium*, *Phaffia*, *Penicillium*, *Rhizopus* (*R. stolonifer*, *R. oryzae*) (**Gholampour et al., 2012; Abrunhosa, L et al., 2002**) pourraient endommager plus de 95 % de l'OTA in vivo. En tout cas, certains d'entre eux présentent des dommages caractéristiques in vivo (**Gholampour et al., 2012 ; Fuchs et al., 2008**)

Les huiles essentielles

3.1 Introduction sur Les huiles essentielles

Le terme d'huile essentielle est connu depuis l'antiquité jusqu'à nos jours, son célébrité est dû à ces nombreux utilisations dans la vie quotidienne de l'homme, dont certains sont utilisés dans la médecine traditionnelle pour traiter quelques maladies et d'autres dans la cuisine grâce à son arôme et son odeur agréable.

Les plantes sont utilisées depuis des milliers d'années pour combattre les maladies. L'un des premiers « ouvrages », traitant de leurs propriétés, a été rédigé en Chine, environ 1 500 ans avant J.-C., intitulé Pen Tsao. Les plantes aromatiques étaient brûlées, ou mises à infuser ou à macérer dans des huiles végétales (**Franci et al., 2012**).

3.2 Définition :

Selon l'association française de Normalisation (AFNOR) une huile essentielle est définie comme un produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, après séparation de la phase aqueuse par des procédés physiques soit par : entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épiderme des Citrus, soit par distillation sèche. (**Hanif et al., 2019**)

Une HE c'est un extrait liquide aromatique (odorant) et lipophile, composé d'une part de molécules naturellement synthétisées par la plante et d'autre part, des molécules de réarrangement, lors de la distillation. Obtenue généralement par distillation à la vapeur d'eau à partir d'une plante ou d'une partie de la plante, et qui concentre les actifs volatils. Elle représente la quintessence de la plante, riche d'une grande variété de substances actives identifiées très précisément par analyse chromatographique. Elle peut être considérée aussi comme une substance aromatique d'origine naturelle. Liquide et volatile, ces substances sont de consistance huileuse mais sans corps gras, plus ou moins fluides voire résineuses, très odorante, volatile, souvent colorées et qui renferment des molécules aromatiques sécrétées par certaines plantes (feuilles, fleurs etc.) ou certains arbres (écorce, bois etc.). Il est possible également d'extraire des substances aromatiques de fruits, de graines etc. elle est séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition.

Pour simplifier l'huile essentiel ou essence aromatique c'est l'essence distillée de cette plante aromatique. (Hanifet *al.*, 2019 ; Brahmi, 2020 ; Clémence et *al.*, 2018).

Selon la pharmacopée européenne, elle définit l'HE comme un : « un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par extraction à la vapeur, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition » (Clémence et *al.*, 2018)

3.3 Aperçu historique

Le règne végétal, en tant que source naturelle d'énergie, offre à l'homme l'aliment, l'hygiène et la santé. Depuis longtemps, les parfums de ces végétaux sont associés à des rites mystiques, artistiques et esthétiques. Les Egyptiens, sont les premiers à tirer parti du règne végétal dans un souci esthétique et spirituel. Plus tard la civilisation Arabe dont Bagdad, Bassora et Damas était les principaux centres qui développent le commerce des épices et des aromates et donna une grande impulsion à l'art de distillation. Hermann Boerhave (1668_1738) fut l'un des premiers à décrire les huiles essentielles d'un point de vue chimique.

L'aromathérapie est ensuite tombée dans l'oubli ; il a fallu attendre le XXème siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. En 1928 il y avait l'apparaitre du terme "aromathérapie" grâce à un chimiste français appelé « René-Maurice Gatte Fossé » qui les redécouvre par hasard et qui avais publié un ouvrage décrivant la relation entre la structure biochimique des huiles essentielles et ces activités antimicrobiennes.

En 1929, le pharmacien Français Sevelinge, étudie les huiles essentielles en médecine vétérinaire en confirmant le potentiel antimicrobien élevé de ces substances aromatiques. En 1975, l'aromatologue Français, Franchomme, a mis en évidence l'importance du chémotype (signifier les composants majeurs ou distinctifs présent dans l'HE). ses études permit à l'aromathérapie de se positionner en tant que médecine de l'avenir et de sortir de son image d'utilisation issue de la traduction .Maintenant, Il existe approximativement 3000 huiles dont environ 300 sont

réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie des arômes et des parfums. (Brahmi Mostapha,2020) ; (Mébarki; Hartani,2015).

3.4 Aromathérapie

Le terme aromathérapie vient du latin « aroma » signifiant odeur et du grec « therapia » signifiant traitement (brahmi, 2020 ; Charles,2014), donc C'est l'utilisation des HE extraite à travers des plantes à des fin thérapeutique (Hervé ; Françoise, 2021)

3.5 La différence entre l'Aromathérapie et la Phytothérapie

Depuis longtemps, l'aromathérapie a été considérée comme une branche de la phytothérapie. Pour schématiser, il s'agissait alors des « méthodes naturelles » pour se soigner. Elle utilise également des plantes, mais sous une autre forme : **l'huile essentielle**. Il s'agit d'un liquide obtenu par entraînement à la vapeur lors de la distillation d'une plante, de sa distillation sèche, ou par expression à froid. De manière générale, les plantes contiennent très peu d'huile essentielle.

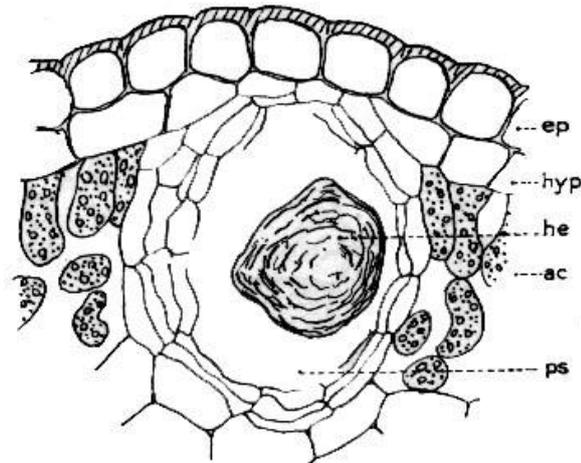
La phytothérapie utilise les plantes, souvent séchées, pour créer des tisanes et des gélules (compléments alimentaires) aux vertus thérapeutiques. Au contraire à la phytothérapie, l'aromathérapie ne s'utilise que par voie interne : elle peut aussi être utilisée en usage externe, ou en inhalation (Giphar et al., 2019).

3.6 La localisation des Huiles essentiel dans la plante

Les HE sont des sécrétions naturelles élaborées par la végétale et contenues dans les cellules ou parties de la plante .la capacité de s'accumuler les essences végétale est une propriété de certains plantes réparties au sein de l'ensemble du régné végétale (BOUKHATEM et al,2019). Les HE sont produites dans des cellules glandulaires spécialisées recouverte par une cuticule, elles se retrouvent dans tous les organes végétaux tige,feuille, Racines fruit, fleurs. Ils sont stockées dans :

- a. Les poches sphériques schizogènes: font partie des familles des Astéracées , Hypériacacées
- b. Les poils glandulaires épidermiques : ce type se retrouvent chez les familles des Lamiacées,Verbénacées

- c. Les canaux glandulaires lysigènes : retrouver chez Abiétacées et les Cupressacées ...
- d. Comme elles peuvent aussi être transporté dans l'espace intracellulaire lorsque les poches à huile sont localisées dans les tissus internes. (Abadli et *al.*, 2014 ; Mébarki et *al.*, 2015).



**Poche sécrétrice schizolysigène
de la feuille de Rue**

ep : épiderme ; *hyp* : hypoderme ;
he : huile essentielle ;
ac : cellules chlorophylliennes.

Figure 10 Une poche sécrétrice schizolysigène de la feuille de Rue (Gustave et *al.*, 2011)

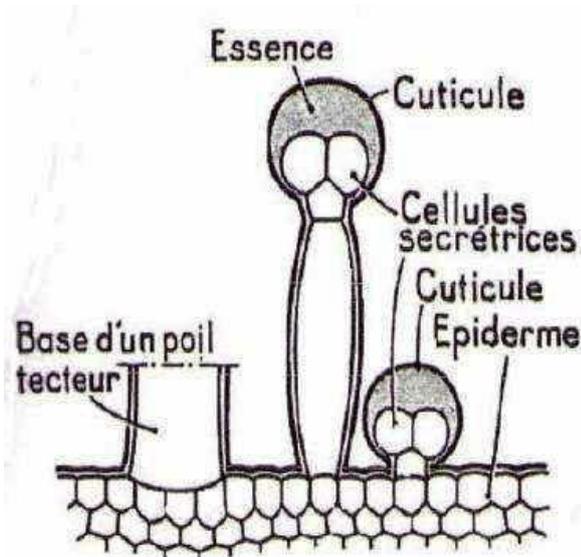


Figure 10 un poil glandulaire épidermique (Menacer et *al.*, 2011)

3.7 Rôle des HE dans la plante

Elles jouent un rôle très important dans la reproduction et la dispersion des espèces végétales par ce qu'elles permettent d'attirer les insectes pollinisateurs, aussi ce sont des messages chimiques qui permettent à la plante d'interagir avec son environnement.

Cependant elles sont produites pour soigner les maladies, et traiter les infections parasitaires. Et jouent un rôle protecteur face aux rayonnements du soleil. (Mébarki et *al.*, 2015).

3.8 Les composants actifs dans les HE et les propriétés physiques

3.8.1 Les composants actifs dans les HE

Les huiles essentielles sont le plus souvent composées de quelques molécules présentes en grande quantité et complétées par beaucoup d'autres, à l'état de traces de masse moléculaire relativement faible (Jesus, 2016). Les compositions chimiques des HE est un peu compliqué ils sont composées par deux fractions qui sont :

- a. Fraction volatile (COV: composées organique volatile): présente dans différentes organes de la plantes selon la famille , cette fraction est composées de métabolites secondaires à partir d'unité isoprénique plus les réactions d'addition de ces unités conduisent aux Terpènes , sesquiterpènes , diterpènes , et leurs produit d'oxydations tels que les alcool , cétones , aldéhyde , éthers et ester terpéniques et qui compose l'essence végétale .
- b. Fraction dite non volatile (CONV) : composées principalement par des coumarines , flavonoïdes , composés acétylénique , ainsi de lactones sesquiterpènes , phénols / polyphénols (**Abadlia ,Chebbour, 2014**)

3.8.2 Les propriétés physiques

Les essences végétaux composées par des molécules aromatiques avec une très faible masse moléculaire À température ambiante, elles sont liquides, rarement visqueuses et très inflammable, volatiles ce qui explique leurs caractère odorant, presque toujours plus légères que l'eau (densité < 1) et non miscibles à l'eau, sensible à la lumière (optiquement active), avec un pouvoir de réfraction élevé. (**Baudoux et al., 2017 ; Brahmi,2020 ; Taleb et al., 2015**)

3.9 Les méthodes d'extractions des huiles essentielles

Plusieurs méthodes d'extraction sont mise en œuvre pour extraire une essence végétale. Le choix de la technique dépendra de la nature de la matière première du plante (graines, feuille, racine,...), et son capacité de tolérer la chaleur.

On distingue trois principaux procédés qui sont :

3.9.1 Distillation

hydro distillation

C'est la méthode la plus simple et la plus ancienne figure 03. Donc il s'agit d'immerger tous la matière végétale dans l'eau sur un alambic chauffée par une source de chaleur pour amener son contenu à l'ébullition. Lorsque la substance condensée refroidit, l'eau et l'huile essentielle se séparent. L'eau résiduelle est parfois

commercialisée sous l'appellation « eau forale», « hydrosol » ou « hydrolat ». (Asbahani *et al.*, 2015).

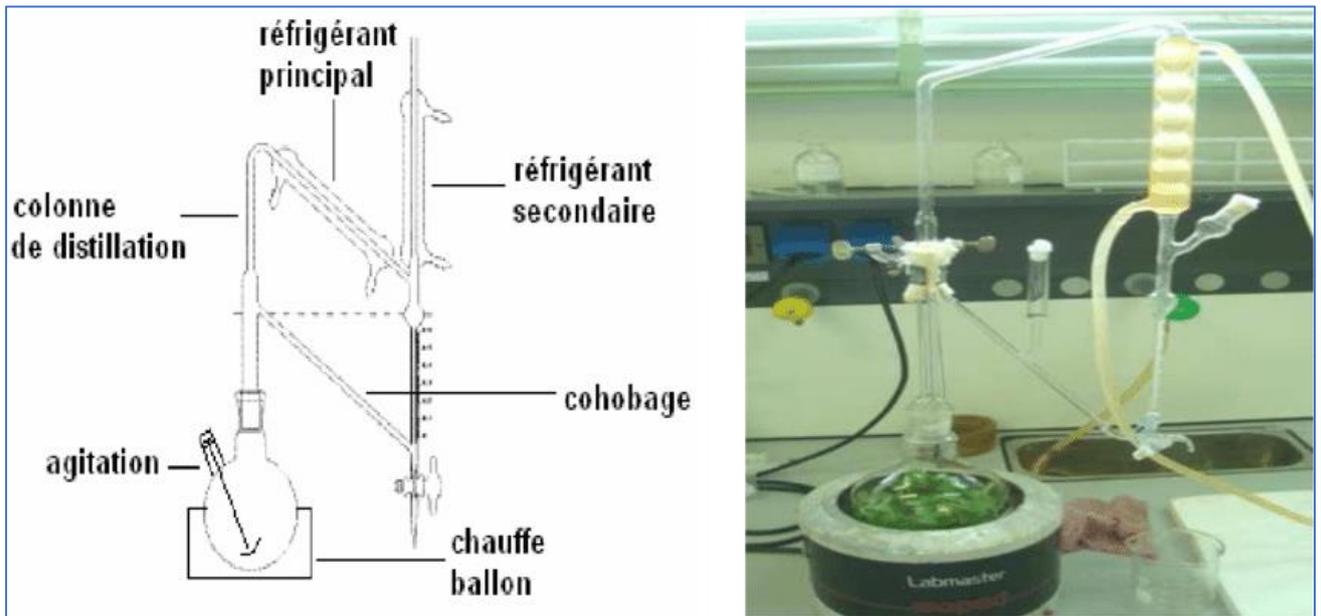


Figure 11 Montage d'hydrodistillation.(Lucchesi *et al.*, 2005)

Entraînement à la vapeur d'eau :

Dans ce montage (figure 04), la plante ne se place jamais directement dans l'eau, elle va traiter seulement à la vapeur d'eau qui va traverser la matière végétale et provoque par la suite l'ouverture des cavités de la plante qui **libèrent ainsi les molécules des huiles** volatiles qui sont entraînées vers le réfrigérant ou elle se liquéfie. La température doit être contrôlée et ajustée pour ne pas brûler la plante. Cette méthode permet l'amélioration de la qualité de l'essence végétale (Brahmi, 2020 ; Florence *et al.*, 2012)

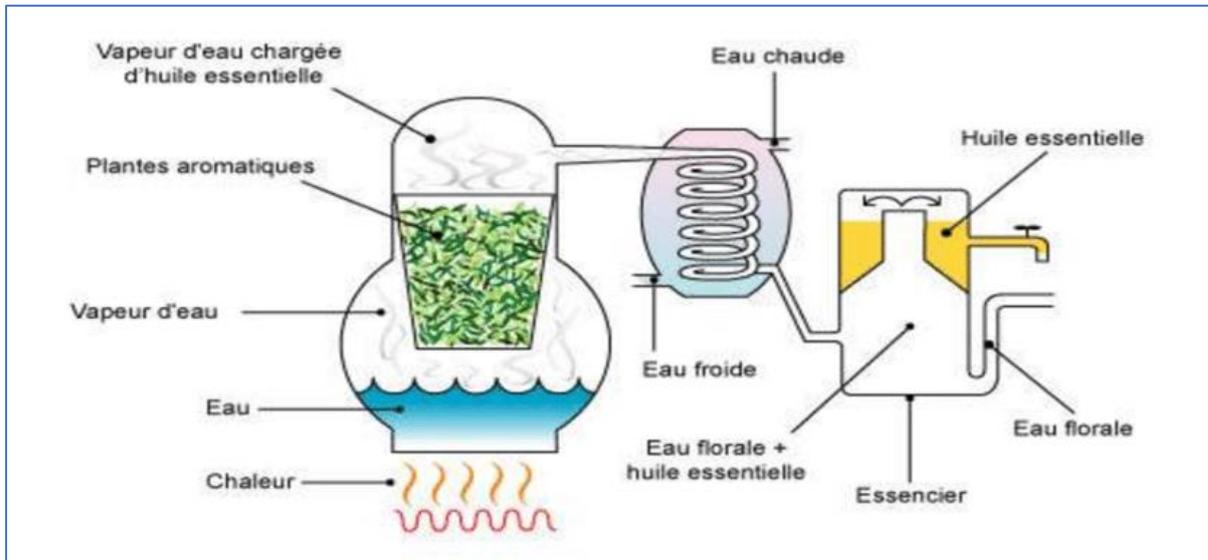


Figure 12 Montage de l'entraînement à la vapeur: (Goudjil et al.,2016)

L'HYDRO-DIFFUSION

Elle désigne un autre visage de la même forme de distillation à la vapeur (figure 05). Cette méthode utilise moins de vapeur, le processus d'obtention est plus court et le rendement en huile est meilleur. La vapeur est introduite par le haut pour passer à travers la matière végétale choisie. La condensation du mélange de vapeur contenant l'huile se produit sous la grille retenant la matière végétale. L'essence végétale obtenue contient des composés non volatiles donc l'appellation ça se différent « essence de percolation ». (Abderrahim , 2018)

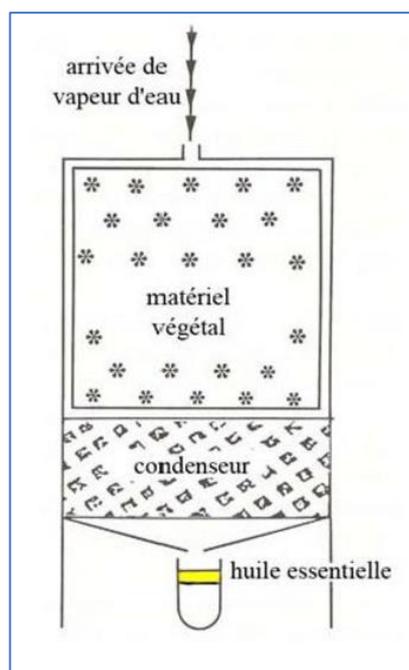


Figure 13 Montage de d'hydrodiffusion (Abderrahim et al., 2018)

3.9.2 L'extraction au dioxyde de carbone (CO₂) hypercritique

C'est une méthode récente, elle est très coûteuse, mais produit des HE. avec excellente qualité (Lucchesi et al., 2005). Elle fonctionne dans un circuit fermé (figure 07), il est non inflammable, non toxique, inerte vis-à-vis d'un composé réactif. Présente une faible polarité à pressions très élevées, il est parfois nécessaire d'ajouter un co-solvant polaire permet de pallier à la faible polarité du CO₂. Il nécessite une plante bien sécher et broyer pour détruire les cellules avec une température et pression bien déterminer. Le temps d'extraction est plus court (quelques minutes au lieu de quelques heures). L'augmentation de la pression augmente le rendement global mais ces pressions élevées favorisent l'extraction de composés lourds (lipides ou cires), la sélectivité de l'extraction des fractions volatiles (HE CO₂) est favorisée par une pression d'extraction peu élevée (90 bar) (christophe et al., 2018)

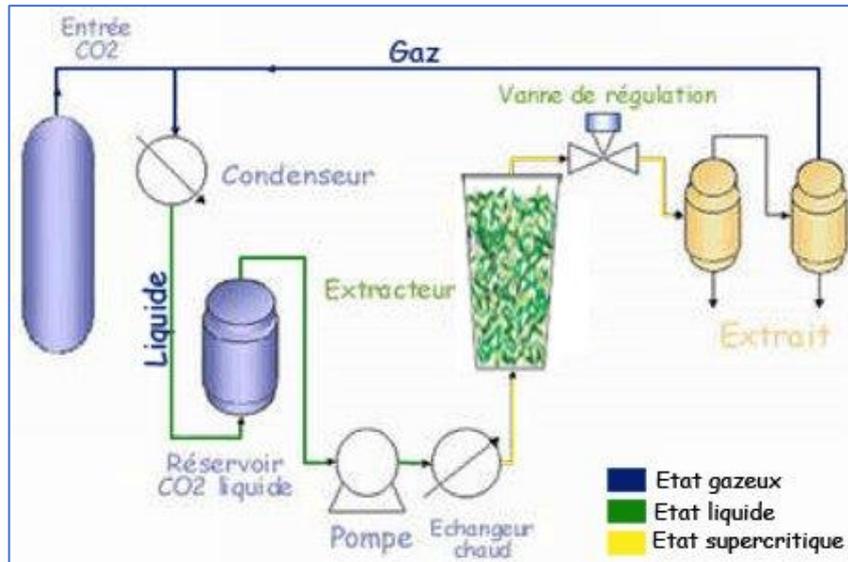


Figure 14 Montage d'extraction par CO₂ (Fornari et al., 2012).

3.9.3 Expression mécanique à froid

C'est un procédé mécanique visant à récupérer l'huile essentielle logée dans la peau (ou épicarpe) des agrumes, Cette technique consiste à gratter l'écorce du fruit frais. On presse sans aucun chauffage ensuite le zeste obtenu pour en recueillir l'huile essentielle de la matière qui est par la suite libérée par la force mécanique qui engendre la destruction des sacs oléifères de l'épicarpe des fruits (Louis et al., 2019)

EXTRACTION ASSISTEE PAR MICRO-ONDES

C'est une nouvelle technique qui combine entre l'utilisation des micro-ondes et d'autres méthodes traditionnelles. dans cette technique la source végétale est chauffée par micro-onde dans une enceinte fermée dans laquelle la pression est réduite du manière séquentielle ainsi que la matière végétale est traitée par la vapeur d'eau pour que les composants volatiles sont récupérer à l'aide des procédés classiques de condensation , de refroidissement , et de décantation (Mébarki et al.,2015)

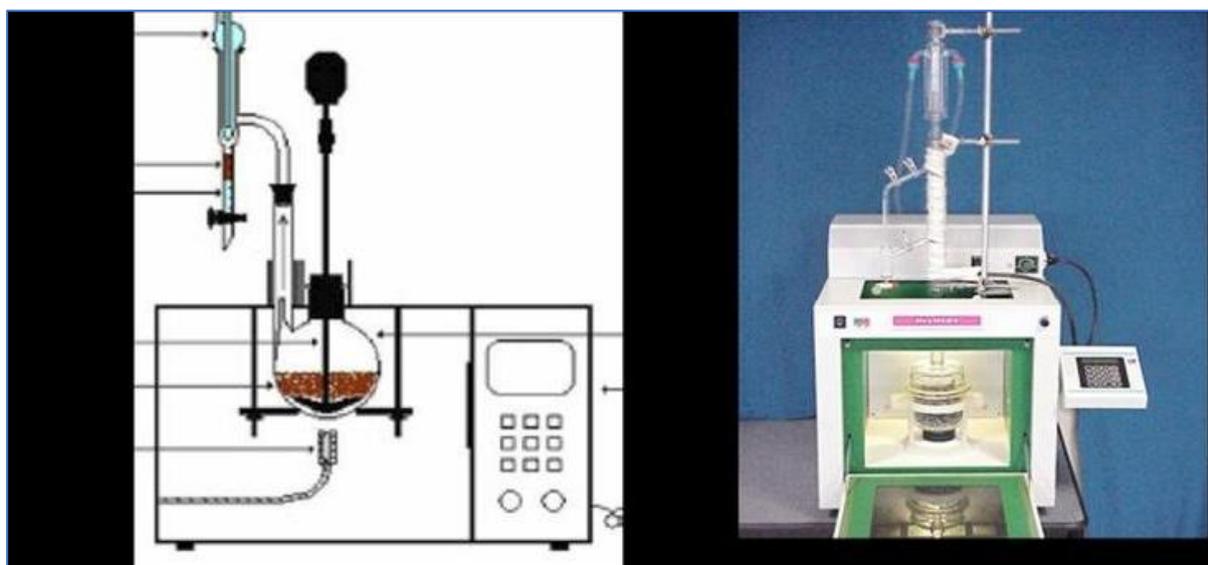


Figure 15 procédés d'extraction des essences végétales par micro-onde (Abderrahim *et al.*, 2018).

EXTRACTION PAR ULTRA-SON

L'extraction assistée par ultrasons est une méthode simple, efficace et peu coûteuse, est une technique privilégiée pour isoler les composés bioactifs des plantes. La sonication permet d'obtenir une extraction complète et donc des rendements d'extraction supérieurs dans un temps d'extraction très court produisant des extraits d'haute qualité. cette technique provoque la perturbation des cellules par ultrasons qui vont par la suite améliorer et augmenter le transfert de masse sous l'effet de la cavitation, tels que les différences de chaleur et de pression, les ondes de choc, les forces de cisaillement, les jets de liquide et les micro flux, et donc permet le transfert des matériaux intracellulaire dans le solvant. Les ultrasons peuvent faciliter les processus d'extraction à la fois par la rupture des cellules et par l'amélioration du transfert de masse dans la couche limite entourant la matrice solide. (Tiwari *et al.*, 2015)

La conservation

La bonne conservation des huiles essentielles nécessite dès lors : des flacons en verre propre et coloré ou en aluminium (estagnon) puis que le rayonnement UV pourrait modifier la composition biochimique des HE. Un stockage à

l'abri de la lumière avec des températures comprises entre 5°C et 40°C une fermeture étanche du flacon pour éviter la volatilisation progressive des HECT qui s'appauvriraient en principes actifs. Il existe des normes spécifiques sur l'emballage, les conditionnements de stockage et le marquage des récipients contenant des HE définies par AFNOR. (Dominique et al., 2017)

3.10 LES APPLICATIONS ET LES VOIES D'UTILISATIONS DE L'ESSENCE VÉGÉTALE :

Les domaines d'application des huiles essentielles sont divers dans la parfumerie, cosmétique, médicale, on mentionne quelque domaine :

L'aromathérapie / médecine

L'aromathérapie prépare le corps à lutter contre la maladie en stimulant le réflexe d'auto-guérison et en modifiant la structure chimique des liquides corporels (la salive, le sang, la lymphe). Les HE ont également une influence sur les sécrétions hormonales, sur l'équilibre endocrinien et sur les réactions neurovégétatives corporelles

Industrie agro-alimentaire :

Comme conservateurs et ceci est dû à la présence dans les HE de composés ayant des propriétés antimicrobiennes et antioxydants. On les retrouve presque dans tous les secteurs alimentaires: boissons non alcoolisées, confiseries, produits laitiers, soupes, sauces, produits de boulangerie, produits carnés... etc.

Se trouvent dans la formule d'un très grand nombre de produits pharmaceutiques : sirop, gouttes, gélules. Elles rentrent aussi dans la préparation d'infusion telle que : la verveine, le thym, la menthe et autres

Pharmacologie et cosmétique :

Les huiles essentielles se trouvent dans la formule d'un très grand nombre de produits pharmaceutiques : sirop, gouttes, gélules. Elles rentrent aussi dans la préparation d'infusion telle que : la verveine, le thym, la menthe et autres.

Ainsi que dans des produits cosmétiques grâce à leurs propriétés organoleptiques, spécialement ils odeur agréable et persistante utilisés dans les dentifrices, les bains de bouches, crème et les gels (**Kerbouche et al., 2010**)

Les voies d'utilisation des HE

Voie interne

Cette voie nécessite une intervention d'un professionnel de santé (**Z, 2016**) et qui consiste :

La voie orale

On utilise un support (sucre, miel, pain, comprimé neutre...) pour l'administration à raison de 1 goutte pour 25kg ou selon prescription médicale.

La voie rectale (suppositoires)

Très intéressante chez les enfants pour les affections bronchiques. Selon prescription médicale.

La voie vaginale (ovules).

Voie cutané :

Les huiles essentielles s'utilisent généralement diluées, les proportions sont variables en fonction de l'effet escompté. Certaines huiles essentielles sont dermo-caustiques (cannelle de Ceylan, girofle, origan...) ou photo sensibilisantes (bergamote, citron orange...). Elles sont à utiliser avec précaution, voir même contre indiquées, par cette voie.

Voie respiratoire :

- a. diffusion : On utilise un diffuseur ou une soucoupe sur un radiateur, mais jamais de brûle-parfum qui risque de les dégrader.
- b. inhalation : On les place dans de l'eau chaude non bouillante en utilisant un inhalateur (vendu en pharmacie) ou dans un bol, dans ce cas il faut impérativement se protéger les yeux. On peut aussi en imprégner un mouchoir. (**Claire, 2017**)

3.11 La toxicité des essences végétaux

La première règle de prudence qui nous doit respecter c'est de « mieux de l'utiliser diluée », car toutes les huiles essentielles ont des seuils toxiques qu'il ne doit jamais dépasser ou il va provoquer des dommages selon leurs voies d'administration.

Le test de La DL50 permet de se classer les essences végétales en 4 groupes :

- a. **Groupe A** : $DL_{50} < 1g/kg$: les huiles essentielles appartenant à ce groupe ne sont pas utilisées en aromathérapie et en parfumerie.
- b. **Groupe B** : $1g/kg < DL_{50} < 2 g/kg$: ce sont les huiles que l'on peut utiliser en aromathérapie mais en évitant la voie orale. C'est le cas du Tea tree et de la myrrhe.
- c. **Groupe C** : $2 g/kg < DL_{50} < 5 g/kg$
- d. **Groupe D** : $DL_{50} > 5g/kg$

Ces deux derniers groupes ne présentent pas de toxicité particulière. Ces sont toutes les huiles d'agrumes, de camphrier, marjolaine à coquille, lavande fine, lemongrass. (Camille et al., 2018).

Deux groupes de composants se révèlent dangereux :

- les phénols mono terpéniques et notamment le cavacrol : ils sont toxiques au niveau du foie.

- les cétones mono terpéniques (thuyone, pulégone, fenchone, bornéone) : ils sont toxiques au niveau du cerveau.

Par voie orale :

Un surdosage ou une fragilité particulière des voies digestives pourra amener des gastralgies, plus ou moins importantes qui s'amélioreront avec la prise d'huile végétale en quantité importante. A des doses subtoxiques par voie orale, le risque vital peut être en jeu (hémorragie digestive, atteinte hépatique ou altération du système nerveux) et un lavage d'estomac en centre hospitalier est obligatoire (Aude Maillard, 2020). En cas de surdosage par voie orale : risque d'épilepsie (huiles à cétone), excitation suivie de dépression (huile à menthol), dépression centrale (huile avec eugénol), convulsion (huile à camphre et à 1,8 cinéole). (Ariane et al., 2021)

Par voie cutané :

La peau et les muqueuses peuvent être irritées par les huiles essentielles. La réaction dépendra de la dose administrée, de la composition de l'huile essentielle et de la sensibilité de chacun. Les toxicités au niveau cutané sont : la dermocausticité, l'irritation cutanée, la photosensibilisation, l'allergie. **(Ariane et al., 2021)**

La toxicité selon la cible :

Au niveau du foie

Ce sont les huiles hépatotoxiques, lorsqu'on parle sur l'hépatotoxicité en parle alors sur les molécules et les composants de ces essences végétales qui devient toxique après certains seuils. Ce sont généralement les polyphénols qui agissent et altèrent les hépatocytes (cellule de foie).

Sont trouvés généralement dans les huiles essentielles suivantes : Le carvacrol présente dans l'origan et la sarriette, et l'eugénol retrouver dans le clou de girofle, Cannelle et le thymol.

Ses composants sont responsables au bon fonctionnement de foie mais à certains seuils deviendra toxique pour les cellules hépatiques. **(Ariane, Laure, 2021)**

Pour le système nerveux :

Ce sont les huiles épileptiques et neurotoxiques. Si elle atteint à forte dose les cellules neuronales vont provoquer des convulsions neuronales. La voie d'administration est importantes dans ce cas sur tous la voie orale présente un grand risque. Parmi ses molécules : les cétones mono terpéniques comme le Menthole, le carvone, la verbénone, le camphre. Ou encore du 1,8 cinéole, de l'alpha et du bêta-pinène et de l'alpha-terpinène. **(Charie, 2019).**

Au niveau des reins

Les composants des essences végétales qui sont à l'origine de la Néphrotoxicité pouvant enflammer et abîmer le système rénal. Parmi ces composants : les **monoterpènes** notamment l'**alpha-pinène**, leurs effets toxiques présente après une longue durée d'utilisation. Ainsi que le système rénal est un système de filtration donc

il est présente toute le temps à des fortes concentrations de déchets comme les molécules aromatiques. (Charie,2019).

3.12 La *Mentha Spicata* :

3.12.1 Généralités :

Le terme « menthe » est apparu dans la langue en 1275. Il vient du latin *Mentha*, qui l'a emprunté au grec *minthê* (Léa., 2021), Le genre *Mentha* c'est l'un des plus importants genres de la famille des lamiaceas, ce genre présente plus de 28 dérivés d'espèces (Gokhan et al., 2022). L'espèce du *Mentha spicata* est la variété classique de menthe et on l'appelle aussi la menthe verte, la menthe douce ou la menthe romaine, c'est une plante rhizomateuse herbacée vivace à souche traçante. (Binette et al., 2020). Elle a des fleurs tubulaires lilas à pourpre sont en épis et s'épanouissent en fin d'été. A un grand intérêt dans le système de médecine populaire (Gokhan et al., 2022).

Elle a plusieurs utilisation que ce soit leur huile ou leur feuille pour ces propriétés aromatique dans la cuisine comme une herbe aromatique qui donne une belle fraîcheur sur tous dans les pays méditerranéennes et asiatique, ou soit pour ces propriétés thérapeutique dans la thérapie traditionnelle comme un calmant pour les nerfs et soulageant de la douleur. (Binette et al., 2020) a une longue histoire de culture elle est largement connue pour ses propriétés culinaires, médicinales et aromathérapeutiques. Depuis l'Antiquité égyptienne, la menthe a été utilisée pour traiter l'indigestion. Les anciens Grecs et Romains l'utilisaient également pour apaiser l'estomac. Au Moyen Âge, la menthe poivrée était utilisée comme polisseur de dents et pour éloigner les rats et les souris des réserves en raison de sa forte odeur. La menthe est ensuite devenue populaire au XVIIIe siècle en Europe occidentale en tant que remède populaire contre les nausées, les vomissements, les nausées matinales, les troubles menstruels et les infections respiratoires. En 1721, il a été répertorié dans la pharmacopée de Londres comme remède pour traiter un large éventail de maux, notamment les plaies, les maladies vénériennes, les rhumes et les maux de tête. (Rodney et al., 2020).

3.12.2 Origine :

Elle est largement cultivé dans divers pays du monde ce qui le rend la plus célèbre dans nos plantes médicinales, (Paulen, 2015) à cause de sa valeur commercialisée et son arôme remarquable (Ganesan et al., 2021). On les retrouve dans les zones humides généralement le Nord de l'Afrique, le bassin méditerranéen, l'Europe et le Proche-Orient, elle est aussi introduite en Grande-Bretagne par les Romains ensuite elle diffuse sur l'ensemble du globe jusqu'en Amérique du Nord, Japon et en Australie, et elle pousse naturellement au Maroc (Brahmi, 2020) aussi cultivée en Algérie à des fins thérapeutiques pour traiter les troubles gastriques. (Abderrahim et al., 2018).

Certaines études démontrent que *Mentha Spicata* est un résultat d'hybridation entre *Mentha longifolia* et *Mentha suaveolens* (Brahmi, 2020). La menthe verte préfère principalement les terrains riches profonds et frais, elle n'aime pas les sols calcaires. On la trouve surtout en basse altitude dans les régions tempérées entre 400 et 1800 mètres. Elle préfère les lieux ensoleillés à semi ombragés. (Boudiaf et al., 2017). On cultive à grande échelle la menthe poivrée et la menthe verte, mais d'autres espèces sont produites de façon marginale (Léa Zubiria, 2021).

3.12.3 Classification Taxonomique de la *Mentha Spicata* :

Elle appartient également des plantes anti-moustiques (Binette et Jardin; 2020), Alors la *Mentha spicata* fait partie du : (Boudiaf et al., 2017)

Règne	Plantae
Embranchement :	Spermaphyte
Sous-embranchement	Angiosperme
Classe	Dicotylédones
Sous-classe	Gamopétale.
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	<i>Mentha</i>
Espèce	<i>Mentha spicata</i>

3.12.4 Caractéristique de la menthe et description de la plante

Caractéristiques de la menthe : (Léa, 2021)

- a) Source de fer
- b) Pouvoir antioxydant : l'acide rosmarinique c'est parmi les principaux composés antioxydant ainsi que différentes flavonoïde.
- c) Favorise la digestion et la santé cardiovasculaire.
- d) Très peu calorique

3.12.5 Description de la *Mentha spicata* :

C'est une plante robuste, vivace, de 50 cm à 1 mètre, d'un vert sombre, à odeur suave très pénétrante. (Boudiaf et al., 2017). La menthe douce ou verte fait partie de la famille des lamiacées qui dite une famille très homogène elle comprendre 6500 espèces dispersées sur un aire géographique très vaste (Brahmi, 2020).

Leurs tiges est glabre, rameuse de couleur pourpre avec une taille qui peut atteindre jusqu'à 1.20 mètre à la hauteur. Portant des feuilles oblongues, opposées, gaufrées, sans pétiole et très odorantes, avec un longueur de 5 à 10cm , ils sont de couleur verte sur les deux faces sa forme est opposées persistantes, ovale et dentées. Les racines dite pivotante qui dure plus de 3 ans. La menthe verte possède des fleurs en grappe à l'aisselle de la feuille, zygomorphe, hermaphrodite, pentamère oligostémone et ses pétales sont soudés. (Boudiaf et al., 2017 ; Binette et al., 2020) .



Figure 16 les différentes parties de la *Mentha spicata* (Douay, 2008)



Figure 17 Feuille de *Mentha spicata* (Carlier et al. ,2015 ; François, 2020)

3.12.6 Les compositions chimiques d'huile essentielle de *Mentha spicata*

L'analyse chimique de la composition d'huile essentielle a révélé 44 composés uniques avec des mono terpènes oxygénés (67,2%), suivis des hydrocarbures mono terpéniques (20,8%), comme composants chimiques les plus abondants (Sanaa, 2018).les compositions chimiques d'HE de cette plante ça se diffèrent d'une région vers une autre, par exemple l'analyse de *Mentha spicata* cultiver dans Palestine révèle 31 composants: mono terpèneoxyde (Mohammed et al., 2019).

Après l'identification des composés chimiques de l'essence végétale de *Mentha Spicata* par monsieur mobina eghbalian et al ont distingué que Les principaux composées chimiques qui compose essentiellement l'huile essentielle de la menthe verte sont : le limonène (25,44 %), D-Carvone (24,46 %) et pulegone (13,09 %). et selon Brahmi et al (Brahmi, F ,2016) ont également indiqué que les principales composantes du HE étaient le carvone avec un pourcentage de 48,5%, le limonène : 20,7% et le 1,8-cinéole avec un pourcentage de 5,4%. Le menthol de l'essence végétale en bon état (40%-90%) est le composant le plus important selon Doymaz et al., (2006).

IL a été rapporté que *M. spicata* contient divers métabolites secondaires, notamment des alcaloïdes, des composés phénoliques (tanins, acides phénoliques, flavonoïdes et leurs glycosides), des terpénoides, des résines, des coumarines et des stéroïdes, ect (Shahadet al.2021).

Tableau VI La composition chimique de l'huile essentielle de *Mentha spicata* (Mobinaet *al.*, 2021).

No	Nom du composé	Composition (%)	Temps de rétention	Kovats indice
1	α -Pinene	1.85	11.39	935
2	Camphene	0.21	12.27	953
3	Sabinene	1.40	13.45	976
4	β -Pinene	2.11	13.72	982
5	Myrcene	0.96	14.30	993
6	γ -Octanol	0.07	14.88	1005
7	Limonene	25.44	16.50	1036
8	Eucalyptol	6.54	16.64	103
9	Menthone	0.32	23.18	1168
10	L-Menthone	2.60	23.63	1177
11	Borneol	0.29	24.03	1185
12	Isopulegone	0.44	24.17	1188
13	α -Terpineol	0.11	25.18	1209
14	Neodihydrocarveol	11.73	25.36	1213
15	cis-Carveol	0.19	26.38	1234
16	Pulegone	13.09	27.30	1254
17	D-Carvone	24.46	27.73	1263
18	Piperitone	0.16	28.07	1270
19	trans-Bornyl acetate	0.20	29.16	1293
20	Piperitenone	0.80	31.98	1356
21	cis-carvyl acetate	0.15	32.56	1369
22	β -Bourbonene	0.51	33.51	1390
23	β -Caryophyllene	2.58	35.10	1428

24	α -Humulene	0.35	36.66	1465
25	Germacrene D	0.27	37.73	1491
26	Calamene	0.20	39.40	1532
27	Caryophyllene-oxide	0.35	41.95	1597
Total: 97.45				

3.12.7 Principe actif

Le composant actif de l'huile essentielle de cette plante est le **carvone** qui est le composant majeur détecté après une comparaison faite par **Mr. Jouault** entre 3 espèces de menthe, cela aussi montré par Laggoune et al qui rapporte que le constituant le plus dominant trouvé dans l'HE de la menthe verte dans le monde est le R(-)-Carvone (**Laggoune et al,2016**) ;(**Jouault, 2012**). Possédant plusieurs appellations le 2-méthyl-5 (1-méthylethényl)-2-cyclohexène-1-énone, ou le D-carvon. Le carvone fait partie de la famille des terpènes exactement les mono terpènes possèdent un carbone asymétrique il existe sous deux formes qui ont les mêmes propriétés physiques et chimiques mais un pouvoir rotatoire différent. (**Jouault. 2012**).

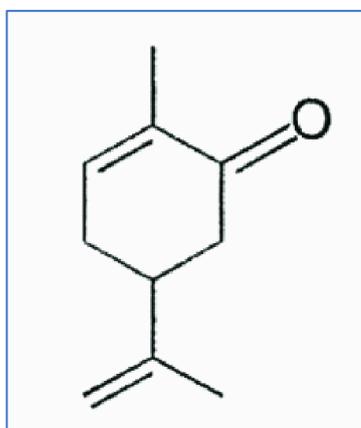


Figure 18 Structure du Carvone (**Ali Kargari et al.,2018**)

3.12.8 L'utilisation de *Mentha spicata*

Dans la cuisine :

Elle est utilisée comme : parfum agréable pour les salades, préparation de nombreuses boissons grâce à son odeur et son goût, dans le même contexte, la menthe est un ingrédient qui améliore le goût de plusieurs plats par exemple utiliser

comme un thé , ingrédients de sirop à la menthe , rentre aussi dans la préparation des sauces ,ses feuilles fraîches accompagnent les viandes, les poissons,(**Haddouch et al., 2020 ; Laurent et al.,2013**).

Dans la thérapie :

L'utilisation de la menthe dans l'aromathérapie ce différe selon l'espèce utiliser, mais ils possèdent presque les même effets thérapeutiques : La menthe verte fraîche peut utiliser comme un complément alimentaire aidant l'effet anticoagulant des médicaments car elle contient des quantités non négligeables de vitamine K (**Léa Zubiria,2021**), facilite la digestion en soulage les spasmes digestifs et stimule les sécrétions biliaires. Soulager les douleurs articulaires, inflammatoires, ou encore les piqûres d'insecte, aussi efficace pour dégager les voies respiratoires en cas de sinusite, rhinite et bronchite (**Lise Lafaurie, 2020**). Ils ont un effet **carminatif et digestif** (anti-nausée, mauvaise haleine, aérophagie), analgésique, calmante, **antispasmodique**. (**Isabelle et al., 2015**).

L'huile essentielle de la menthe renforcent tout le système denerfs, donnant de la vigueur à certains pour l'acuité à d'autres à ressentir, mais pas à souffrir, stimulant diffusible et aussi sédatif diffusible, la Menthe fait services éminents contre la nervosité et les diverses manifestations nerveuses, aussi s'utilisé pour traiter la fièvre, la faiblesse, la toux,nausées, maux d'estomac, mélancolie, maladie pulmonaire, hystérie, problèmes de vue (**M. KHIARI et al.,2018**).

D'autre étude montre que l'inhalation de l'huile essentielle de *Mentha Spicata* chez des patients présente une amélioration de l'état pulmonaire en augmentant le volume expiratoire et la capacité vitale (**Jaradat et al ,2016**).

DANS LE DOMAINE DE COSMETIQUE :

Elle implique dans la production des dentifrices , comme une ingrédient pour parfumer les produits d'hygiène buccale (**Aye kee et al., 2017**) , aussi utiliser dans la fabrication des produits cosmétiques, comme les crèmes, les shampoings, les lotions, et les savons (**Haddouch et al.,2020**) .

3.12.9 Les intérêts thérapeutiques de l'essence végétale de *Mentha spicata*

Ces derniers temps, le monde a connu une augmentation de l'utilisation des huiles essentielles pour traiter les maladies et promouvoir une meilleure santé (**James et al ,2016**). Ils sont également considérés comme l'une des branches les plus importantes de la médecine complémentaire et alternative, appelée aromathérapie, qui se concentre sur l'utilisation d'huiles essentielles pour le traitement de diverses maladies en utilisant des huiles essentielles naturelles. (**Baser et Buchbauer,2015**). Ces essences végétales(HE) et leurs polyphénols sont considérés comme les principaux groupes chimiques responsables du large éventail des bio activités de *Mentha* (**Kapp, 2015**), L'activité biologique des huiles essentielles est due principalement à leurs composés majoritaires tels que les phénols (thymol, carvacrol, eugénol), les alcools (α -terpinéol, terpinen-4-ol, linalool), les aldéhydes et les composés terpéniques et cétoniques (**Dorman et Deans, 2000**). Aussi les composés minoritaires jouent un rôle important en renforçant les effets des composés principaux (**Bassolé et Juliani, 2012**).

L'efficacité d'une huile essentielle dépend ainsi de sa richesse en composés phytochimiques ; plus elle est riche en substances actives, plus son activité est importante (**Zhiri, 2006 ; haddouch, 2020**).

Des études rapporte sur les activités biologiques du genre *Mentha* ont montré qu'elle possède une forte activité : antioxydant , anti-inflammatoire , anti-biofilm , anti-dermatophyte , anti-fongique , antibactérienne , et anti-cancéreuse (**brahmi , 2020 ; Snoussi, 2015 ; Niksicet al., 2018 ; Mohammed et al , 2019**).

anti-biofilm :

L'essence végétale de la menthe verte a une effet contre la formation des biofilm et que une dose de 5 μ l/ml capable d'éradiquer plus de 75% de la biomasse du biofilm préformé par l'inhibition de l'adhésion bactérienne pour réduire la colonisation bactérienne. (**Mohammed ,2019**).L'étude de **Snoussi et al(2015)** montre que l'huile essentielle de *Mentha Spicata* inhibe le *Vibrio spp.* Production de biofilm des souches de 11,5 % et 11,6 % pour *V. alginolyticus*, et de 28 % et 40 % pour *V. vulnificus* à 0,046 et 0,092 mg/mL, respectivement (Figure 1). En ce qui concerne la rupture du biofilm préformé *Vibrio* , l'huile essentielle de menthe verte a éradiqué plus de 50 % des biofilms préformés de *V. cholerae* et *V. alginolyticus* à 0,092 mg/mL (**Snoussiet al., 2015**)

Effet anti-fongique / antimicrobienne :

Les huiles essentielles obtenues à partir de plantes aromatiques sont des molécules naturels très vitaux qui ont des activités thérapeutique et biologique nombreux, et ils sont connues pour être inhibitrice ou mortelles pour les champignons et représentent une source potentielle de nouveaux agents antifongique (**Baindara ; Korpole ,2016**). La menthe présente un effet antimicrobien grâce à leurs compositions à activité antimicrobienne soutenue plus élevée pour augmenter la durée de conservation des denrées périssables. (**Mobina et al, 2021**), la menthe présente une activité biologique antimicrobienne qu'était tester sur plusieurs souches bactérienne (**Brahmi et al.,2020**).

Il a été récemment démontré que la nano formulation d'huile essentielle de menthe présente une activité larvicide élevée contre *Culex pipiens* et *Muscadomestica* (**Mohafrash et al.2020**). Les travaux de Carlier(**2015**) dite que l'activité antifongique de l'huile essentielle de la menthe verte pourrait être attribuée à la carvone qui est généralement le composant majeur de l'huile de la menthe verte (**Carlier, 2015**).

Tandis que le pouvoir antimicrobienne est dû à la présence des mono terpènes oxygénés et des hydrocarbures mono terpéniques dont la Carvone, le cis-dihydrocarvéol, le limonène et le 1,8-cinéole qui représentent généralement les composés principaux de l'huile essentielle de *Mentha spicata* (**Snoussiet al., 2015**) ; (**Niksic et al., 2018**) ; (**Haddoouch et al., 2020**) , D'ailleurs l'étude de Yasser (2015) évaluant l'activité antibactérienne contre des bactéries pathogènes :*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Escherichia coli* O157:H7 déclare que Les bactéries à Gram-positives étaient plus sensibles à l'huile essentielle de *Mentha spicata* que les bactéries à Gram-négatives aussi La monocytogènes était le plus sensible des microorganismes à l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Mentha spicata* (zone d'inhibition = 22 mm et MIC et MBC = 2,5 µL/ml)(**Yasser Shahbazi , 2015**) .

Effet anti-oxydante :

Le stress oxydatif est l'ensemble des réactions qui permis la libération et la formation des radicaux libre dans le corps provoquant des dommages cellulaires (**Léa et al., 2021**), la menthe présente un pouvoirantioxydant grâce à leurs composées

chimiques qui ont la capacité de réduire les radicaux libres et améliore le système anti-redox favorisant l'effet des enzymes : super oxyde dismutase(SOD) , catalase(CAT), et le glutathion peroxydase (GTX) (L.Boussouf , 2017).

Aussi **Biswas et al(2012)** indique que l'extrait aqueux de feuille de *Mentha spicata* ont présenté une activité DPPH et ABTS+ très élevée sur la viande de porc. (**Biswas et al., 2012**).

Effet anti-inflammatoire

L'extrait méthanolique de *Mentha spicata* a des propriétés anti-inflammatoires, ce qui soutient son utilisation comme médicament analgésique, anti-inflammatoire et antipyrétique dans la médecine populaire. (Patwary et al. ,2013). Elle permet aussi de moduler la réponse de l'organisme à une agression subie (inflammation) et calme les sensations de chaleur, et les rougeurs qui en découlent (**Charie, T, 2019 ; Haddouch et al., 2020**).

Par ailleurs, L'étude de Taghlili et al., (2021) Qui faites sur des patients afin d'évaluer l'effet anti-inflammatoire de *Mentha* (lotion CM), *Capsicum* (Capex Topicalcream) *Apiumgraveolens* trouve qu'il peut réduire l'inflammation et réduire la sévérité de la douleur et en raison de la diminution des effets secondaires et des complications telles que l'irritation cutanée lors de l'application de la solution combinée et une meilleure acceptation par les patients (**F. Taghlili et al., 2021**).

Anti-dermatophyte :

les infections dermiques sont conçue pour affecter environ 25% de la population mondiale (**Zimmermam , 2013**) , plusieurs études faites sur l'HE de *Mentha spicata* ont permis d'évaluer que le carvone qui se trouve majoritairement dans la menthe verte a une grande activité contre les infections dermique sur tous ce qui a cause de *microsporumcanis* , *Trichophyton rubrum* , *T. menthagrophytes* , et *Epidermophyton Floccosum*avec des doses bien précises et sous une supervision.(**Mohammed et al., 2019**).

Effet Anti- cancéreuses et la cytotoxicité :

L'étude de Sanaa et al qui faite in vitro évaluant l'effet de l'huile essentielle de *Mentha spicata* rapporte que cette huile présente un effet antiproliférative contre trois types de cancer chez l'homme, augmentant le pourcentage de la survie jusqu'aux 50% grâce à leur composant de 1.8-cenole et le limonène (Sanaa, 2018).

D'autre part, Les travaux de **Majid Tafrihi et al., (2021)** a montré une activité anticancéreuse contre différents types de cancers humains tels que le col de l'utérus, le poumon, le sein et bien d'autres , il a aussi indiqué que les espèces de *Mentha* présente un grand potentiel de cytotoxicité, en modulant les voies MAPK et PI3k/Akt ; ils induisent également l'apoptose, suppriment le potentiel d'invasion et de migration des lignées de cellules cancéreuses ainsi que l'arrêt du cycle cellulaire, la régulation à la hausse des gènes Bax et p53, la modulation du TNF, de l'IL-6, de l'IFN- γ , de l'IL-8 et l'induction du phénotype de sénescence (Majid et al.,2021).

3.12.10 Toxicité de la menthe:

Malgré l'utilisation historique des menthes, les études toxicologiques sur les extraits de menthe sont rares. Traitement des cellules de neuroblastome pendant 24 h avec jusqu'à 1280 $\mu\text{g/mL}$ d'extraits aqueux de méthanol à 50 % de *Mentha australis*, *Mentha diemenica*, *Mentha spicata*, *Mentha piperita*, *Mentha piperita var. officinalis* ou *Mentha requienii* n'ont eu aucun effet toxique sur la viabilité cellulaire (Hanafy,2020,), la menthe verte pourrait causer le reflux du contenu de l'estomac dans l'œsophage car elle contient des acides volatils qui diminuent la tension de repos du sphincter œsophagien inférieur(Léa Zubiria , 2021).

De toutes les huiles essentielles de menthe, c'est la plus douce en menthol. Elle est par contre très riche en Carvone, ce qui fait qu'il faut l'utiliser avec précaution (Haddouch et al.,2019).

3.13 SYZYGIUM AROMATICUM :

3.13.1 Généralités sur le Giroflier (*Syzygium aromaticum*):

Le clou de girofle est parmi le premier groupe d'épices connues pour être commercialisées par les humains, Sa culture mondiale a cependant dû attendre le 17ème siècle lorsque les nations européennes se disputent son accès avec d'autres épices. Les Portugais ont perdu le monopole du commerce des clous de girofle lorsqu'ils ont été contraints des îles aux épices d'Indonésie par les Hollandais .Ce n'est qu'à la fin du 18ème siècle quand les Français ont réussi à faire passer la plante en contrebande et à la cultiver ailleurs qui a conduit à la fin du monopole néerlandais et au début de la propagation de la culture du clou de girofle. Il a fallu un autre siècle pour que la nouvelle culture du girofle se façonne le marché mondial (**Solomon ,2019**).

Le nom *Syzygium* a été suggéré pour être introduit en 1756 et en tant que genre remplaçant *Caryophyllus*, qui représente maintenant une espèce différente groupe de plantes. Il y a eu beaucoup de discussions qui se sont même poursuivies à ce jour avec par rapport à la confusion entourant les genres *Eugenia* et *Syzygium*.

Plusieurs révisions sur la base des caractéristiques morphologiques classiques ont été faites mais le manque de discret des variations dans la floraison, la fructification et d'autres caractéristiques ou simplement l'absence de ligne de démarcation et d'interpolation les genres et les espèces apparentés ont été un sujet de division pour les botanistes. En fait, la similitude des caractéristiques florales des espèces de *Syzygium* est étonnante. (**solomon ett al., 2019**) ; (**Mbaveng et al., 2017**).

3.13.2 Origine de *Syzygium aromaticum* :

Le clou de Girofle originaire c'est les Îles Moluques (ou Moluques ou souvent appelées les îles aux épices) d'Indonésie (**Solomon, 2019**) , elle est récolté commercialement à Indonésie ,Inde, Pakistan, Sri Lanka, ainsi que dans des pays africains, comme les Comores terres, Madagascar, les Seychelles et la Tanzanie (**Mbaveng et al., 2017**) le genre et la famille du clou de girofle ont été l'un des sujets les plus intéressants des derniers siècles. Le genre *Syzygium Gaertn* comprenait d'environ 1200 espèces présentes dans les régions tropicales et subtropicales de l'Ancien Monde

Afrique, Asie, Australie, Nouvelle-Zélande et régions du Pacifique Sud-Ouest. Quelques estimations suggèrent même que jusqu'à 1800 espèces peuvent être représentées par le genre, ce qui en fait le plus grand est genres de plantes ligneuses à fleurs dans le monde (Solomon et al.,2019).

3.13.3 Description de la plante et classification botanique :

Les Clous de girofle sont les boutons floraux aromatiques qui appartiennent à la famille des Myrtacées et le nom botanique est *Syzygium aromaticum*(synonyme *Eugenia caryophyllata*) (Solomon et al., 2019) ;(Muthamizh et al, 2020) , c'est une arbre persistant au sommet pyramidal , elle atteindre aux moyenne de 8 à 12 mètres à la hauteur bien qu'il est un potentiel de croissance jusqu'à 20 m de haut .

Les feuilles pétiolées sont coriaces, elliptiques à lancéolées, de 9 à 12 cm de long, 3,5 cm à 4,5 cm de large. Leurs fleurs terminales sont disposées en panicules tripartites Corymbes atteind jusqu'à 10 à 14 mm de long, à 2 prophylls écailleuses, calice tubulaire de 1 à 1,5 cm de long, consiste : 4 sépales épais, 4 pétales, de couleur rose blanchâtre à rouge carmin, possédant nombreuses étamines, ovaire infère, qui est partiellement entouré par et fusionné avec un hypanthium tubulaire (structure en forme de coupe de l'axe de la fleur).

Le fruit est une baie rouge foncé, de 2,5 cm à 3 cm à la longueur, et de 1,3 à 1,5 cm de large, couronné par 4 sépales recourbés et contenant 1, rarement 2 graines. (Solomon et al., 2019).



Figure 19 Clou de girofle bourgeons flux séché (Solomon et al., 2019).



Figure 20 Clou de girofle pendant la période de floraison (solomon et al., 2019).

3.13.4 Classification botanique

Tableau VII La classification botanique du *Syzygium aromaticum* (Solomon et al., 2019)

Régne	Plantae - Plantes
Sous-Règne	Tracheobionta - Plantes vasculaires
Super division	Spermatophyta - Plantes à graines
Division	Magnoliophyta—Plantes à fleurs
Classe	Magnoliopsida—Dicotylédones
Sous-classe	Rosidés
Ordre	Myrtales
Famille	Myrtacées—famille des myrtes
Genre	<i>Syzygium</i> P. Br. ex Gaertn. — <i>Syzygium</i>
Espèce	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L.M. Perry- Clou de girofle

3.13.5 Compositions chimique d'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* :

La variation des composants et de la composition d'huile essentielle de clou de girofle dépend sur la variété, les conditions agro écologiques, les prétraitements, la transformation et les méthodes d'extraction (Mbaveng et al., 2017).

L'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* est composée par plusieurs composants chimiques qui sont majoritairement : l'Eugénole (2-Méthoxy-4-(2-propényl) phénol) avec un pourcentage de 87.03%, Eugénole acétate (4-Allyl-2-méthoxyphényl acétate) avec un pourcentage de 11.25%, (**Meryem et al, 2018**).

Avec d'autres constituants communs qui sont : le β -caryophyllène, le salicylate de méthyle, le pinène, la vanilline, et α -Humulène. (figure01).

D'autre part, selon **Santos et al (2019)** Les composants présents dans HE de *Syzygium aromaticum* sont l'eugénole (EUG; 68,38%), β -caryophyllène (β -CA ; 19,65 %) et acétyl eugénole (ACT ; 11,97 %) (**Santos et al., 2019**).

En outre, les travaux de **P. Maheswari, et al.** Étudiant les compositions chimiques de clou de girofle observe qu'il est composée par : l'eugénole (76,8%), le β -caryophyllène (17,4%), l' α -Humulène (2,1 %) et l'acétate d'eugényle (1,2 %) qui sont les principaux composants (**P. Maheswari, et al., 2020**).

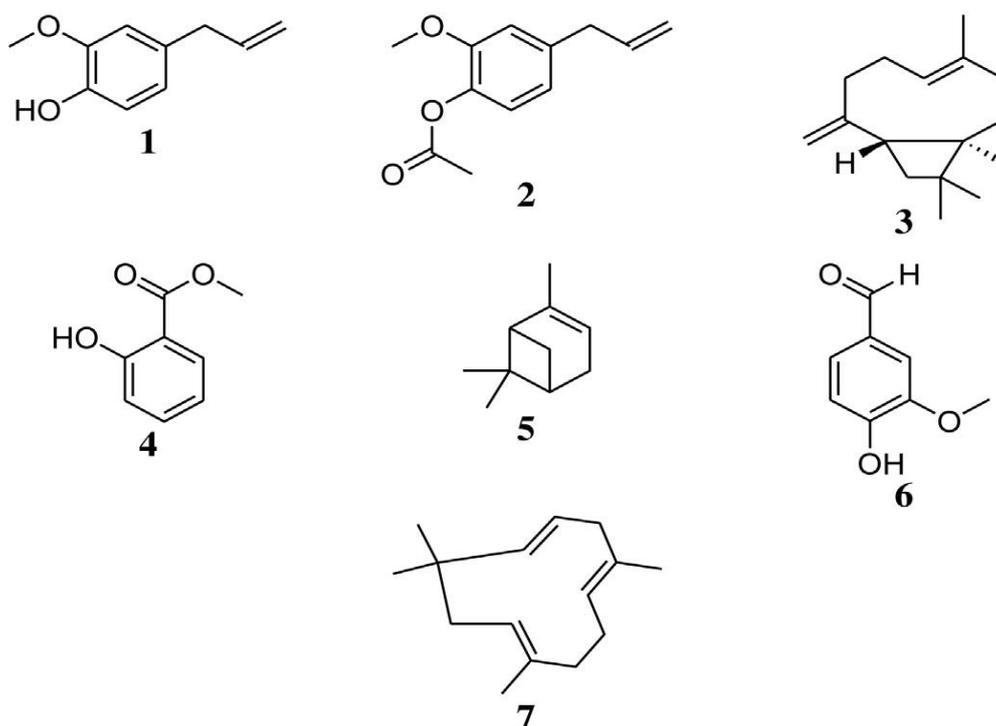


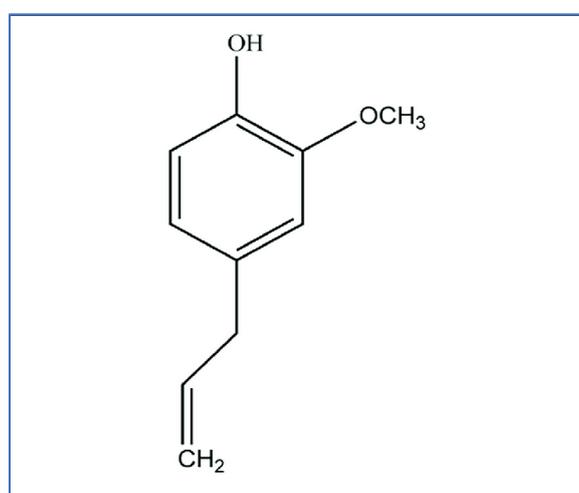
Figure 21 principaux composants de l'huile essentielle de *Syzygium* Eugénole (1), acétate d'eugényle (2), caryophyllène (3), salicylate de méthyle (4), pinène (5), vanilline (6) et humulène (7). (**Mbaveng et al, 2017**).

Tableau VIII la composition chimique du Clou de girofle (**ADLI , 2015**)

Famille de constituants	Détail des constituants
Huile essentielle	Eugénol (80 à 90%) Acétate d'Eugénol (5 à 10%), alpha et bêta caryophyllène (5 à 12 %), cétones aliphatiques
Tanins (12%)	Tanins galique et ellagique, acide gallique, acide protocatéchique, eugéniine, casuarictine, 1, 3-di-O-galloyl-4,6-(S)-hexahydroxydiphényloxy-bêta-D-glucopyranose, tellimagrandine
Flavonoïdes (0,4%)	Quercétine, kaempférol, rhamnétine, eugénitine
Chromones	Biflorine, isobiflorine, hétérosides de chromone
Corps gras	Stérols, glycosides stéroliques, huile grasse (10%)
Autres	Acides phénols, triterpènes

3.13.6 Principe actif

L'eugénol c'est le composé essentiel responsable de l'arôme du clou de girofle et constitue 72 à 90% de l'huile volatile de clous de girofle (**Mbaveng et al., 2017**); (**Frohlich et al., 2019**) , leurs structures chimique est présenté dans la figure 03 .

**Figure 22** Structure chimique d'Eugénol (**Yi-Ming et al., 2019**)

3.13.7 Les intérêts d'utilisation de la Giroflier :

L'utilisation de clou est connue depuis dixièmes d'années pour son arôme et son goût elle est utilisée dans plusieurs domaines soit pharmaceutique, cosmétique, dans la cuisine et même dans la thérapie, dans la cuisine elle est utilisée grâce à son très fort goût et son arôme concentrée afin d'ajouter des saveurs à la nourriture, et dans la conservation des aliments. Néanmoins, Depuis l'antiquité les anciennes utilisent l'HE de Giroflier dans la médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies : Traiter la mauvaise haleine et les soins dentaires (**solomon et al., 2019**). le clou de girofle a été utilisé dans les flatulences, les indigestions et la diarrhée, est utilisée dans une large gamme comme antiseptique dans les maladies bucco-dentaires et pour le traitement des maux de dents, des troubles allergiques, de l'asthme, de l'acné, des cicatrices et de la polyarthrite rhumatoïde, et ils ont montré des effets antispasmodiques et acaricides (**Gaber et al.,2020**).

3.13.8 Les activités biologiques de *Syzygium aromaticum*

L'HE de *Syzygium aromaticum* possède de nombreuses activités (figure 04) : anti-inflammatoire (**Sugihartini et al., 2020**), antibactérien (**Moemenbellah et al., 2020**), antifongique (**Carvalho et al., 2021**), insecticide (**El Gohary et al., 2021**) et antioxydant (**Teles et al., 2021**) et antivirale (**Mbaveng et al., 2017**).

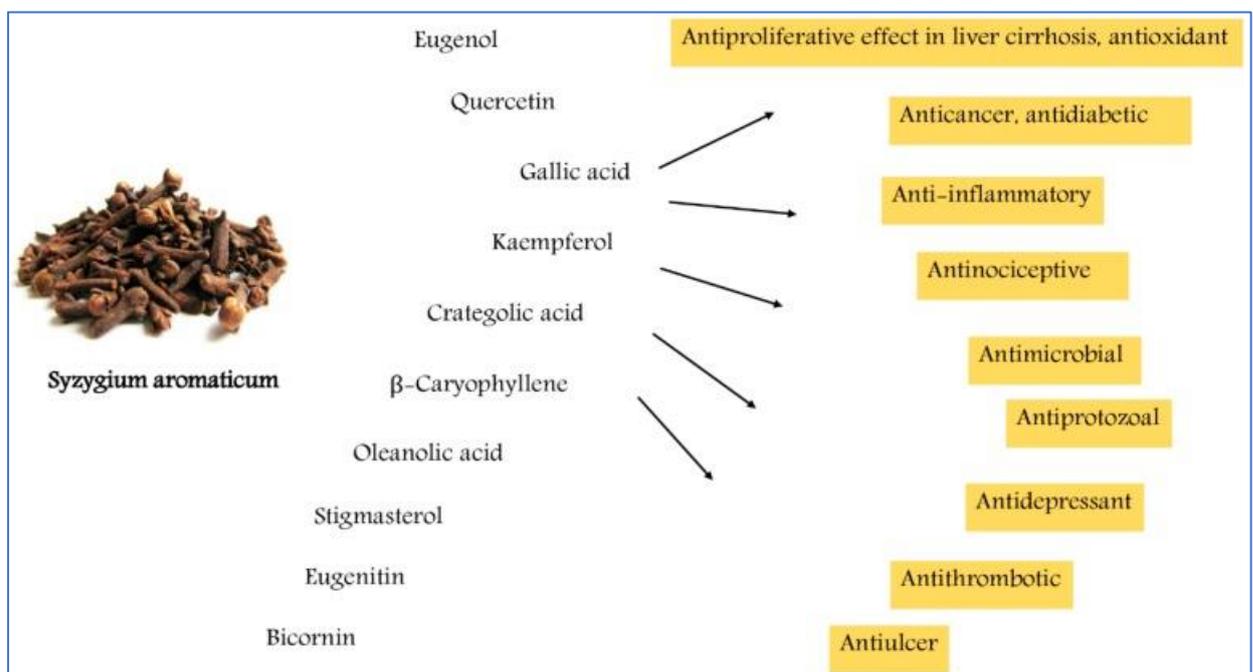


Figure 23 les activités biologiques du *Syzygium aromaticum*. (**Gaber et al., 2020**).

Anti-inflammatoire :

L'huile essentielle de cette plante présente un effet anti-inflammatoire très important grâce à son composé d'eugénol à des concentrations non cytotoxiques a présenté des effets immuno-modulateurs et des actions anti-inflammatoires sur la production de cytokines par les macrophages murins.

D'ailleurs, une autre étude indique que L'activité anesthésique locale du β -caryophyllène, l'un des principaux composants de l'huile de clou de girofle a également été démontrée, car le composé était capable de réduire l'électricité ont provoqué des contractions de l'hémidiaphragme phrénique du rat de manière drastique, de manière dose-dépendante manière (Mbaveng, Kuete ,2017).

Activité anti-oxydante :

L'effet antioxydant de *Syzygium aromaticum* est dû à ces composants qui ont la capacité de réduire les radicaux libres essentiellement l'eugénol (Bakouret *al.*, 2018).

Activité antibactérienne :

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'HE de *Syzygium aromaticum* sur des souches bactériens soit à Gramme positive ou négative présente que le clou de girofle détruit la paroi cellulaire bactérienne et la membrane. En même temps, il arrête le procédure normale pour l'activation de l'ADN et des protéines qui sont importantes pour la croissance des bactéries , aussi contre les souches de *Helicobacter pylori* sensibles et résistantes aux antibiotiques avec des CMI de 160~320 $\mu\text{g/ml}$, sans développer de résistance aux médicaments . (P. Maheswari *et al.*, 2020) ;(Chang *et al.*, 2022).

Les particules d'huile essentielle encapsulées avec de l'alginate de sodium et des émulsifiants ont montré une efficacité d'encapsulation élevée, une faible activité antioxydant et une forte inhibition antimicrobienne. (Marjana *et al.*, 2019).

Activité antifongique :

Les HE de *S. aromaticum* avaient un large spectre d'activités antifongiques contre les champignons pathogènes influençant la croissance de *P. notoginseng*, ce qui fournirait une base scientifique pour le contrôle écologique de P.maladie de

notoginseng (Yu-Nan et al, 2019). Des études récentes montre que l'HE de Giroffier présente un effet antifongique très élevées même avec une faible dose peut inhibe la croissance fongiques (Abhishek et al. ,2016).

Activité antivirale :

L'évaluation de l'effet antivirale de différent extrait de clou de girofle soit aqueux ou alcoolique présente une activité antivirale contre : HSV-1 dans les cellules d'une souris, aussi L'eugénine a également inhibé l'ADN viral et la synthèse tardive des protéines virales dans les cellules Véro infectées (Mbaveng et al., 2017).

Anti-cancer :

L'huile essentielle de clou de girofle a montré des effets cytotoxiques contre les lignées cellulaires cancéreuses, ainsi que des effets antimutagènes Activités (Mbaveng, Kuete ,2017); (P. Maheswari et al., 2020) , aussi que leur composants majeurs eugénol présente des effets anticancéreux qui sont accomplis par divers mécanismes tels que l'induction de la mort cellulaire, l'arrêt du cycle cellulaire, l'inhibition de la migration, la métastase et l'angiogenèse sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses. En outre, l'eugénol pourrait être utilisé comme remède d'appoint pour les patients traités par chimiothérapie conventionnelle (Ali et al, 2021).

Activité anti-nociception :

Des études biologiques faites sur l'HE de *Syzygium aromaticum* rapporte que l'eugénol qui est le composant majeur de cette essence végétale a un effet anesthésiant et la capacité de réduire les douleurs liée à des inflammations. (Karla et al,2017) , il faut l'utiliser avec une dose bien déterminer avec le poids corporel grâce à son effet bloquant les canaux voltage dépendant de Na⁺ qui sont responsables de l'initiation et de la propagation des potentiels d'action des cellules excitables du système nerveux périphérique et du système cardiaque (Hironori et al. , 2017) .

Autres activités :

Grâce à la richesse et la diversité des composés chimiques d'huile essentielle de clou , il présente d'autres propriétés pharmacologiques : effets molluscicides du bouton floral contre l'escargot *Lymnaea acuminata* , ainsi que la capacité d'eugénol à

traiter l'arthrite expérimentale (**Mbavenget *al.*, 2017**) , propriétés neuroprotecteur , effets anti-ischémiques , antihistaminiques , et anti-anaphylactiques (**Adli *et al.*,2015**) .

3.13.9 La toxicité de clou de girofle

L'HE de *Syzygium aromaticum* présente un seuil de toxicité ± élevée tous dépendra de la voie d'administration et la durée de traitement, l'étude de Liu B-B et al. Rapporte que après une étude histologique d'une sub-chronique dose de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* (100,200, 400 mg/kg/p.o) administrer chez des souris pendant 21 jours que le foies , cerveau, la rate , cœur , poumon sont été déshydratés, paraffinés et intégré selon l'échantillonnage .(**Bin-Bin *et al.* ,2015**) .

Le Docking moléculaire

4.1 Introduction

Les techniques appliquées au développement de médicaments sont très coûteuses et lentes quel que soit le progrès technologique utilisé dans la découverte de médicaments. Dans une telle situation pour réduire le temps et le coût pour une découverte de médicaments sûre et efficace, le concept de Computer-Aided Drug Design (CADD) est maintenant immensément utilisé dans la découverte de médicaments (Xiang et al., 2012)

L'objectif de CADD est de prédire un certain composé qui apporte un effet recherché après liaison à la cible biologique. Conventionnellement, le criblage à haut débit est utilisé pour tester de grands nombre de composés sur des dosages automatisés pour atteindre les effets recherchés. Dans ce cas, le développement de médicaments procédure prend non seulement du temps, mais nécessite investissement financier. Par conséquent, pour réduire ce fardeau, CADD est appliqué afin que les composés chimiques puissent être examinés virtuellement en premier, ce qui réduit le nombre de composés destinés à l'expérimentation (Yu & Mackerell, 2017).

4.2 Définition et principe

Le docking moléculaire est l'outil à haut débit le plus largement utilisé qui se base sur la structure et la nature de la molécule. Le docking permet de prévoir à grande échelle si et comment les petites molécules se lient à une cible macromoléculaire (Huang et al., 2010)

Il existe deux points importants dans cette technique :

- Prédire l'affinité du ligand par rapport à la protéine, qui est liée à une gamme de protéines parmi lesquels certains conviennent plus que d'autres
- Prédire la position du ligand, liée au ligand lui-même mais avec des orientations différentes (Ben Mohammed et al., 2019 ; C.R. Corbeil et al., 2007)

Le docking implique les conformations 3D générées par la (X-Ray cristallographie ou la RMN) du ligand et de la protéine pour prévenir orientation idéale du ligand au niveau du site actif de la protéine, ces positions sont élaborées et classées à la base des fonctions mathématiques 'Scoring Fonctions' (SF) (Yu & Mackerell, 2017).

4.3 Types du docking moléculaire

Il existe 3 types du docking moléculaire on site :

Docking rigide c'est la méthode la plus simple dans lequel la structure de la protéine et le ligand sont rigide, ce type se base sur la théorie de clef-cirure, que de la complémentarité structurale 3D est prise en compte dans ce type Il convient généralement aux interactions protéines-protéines et protéine-acide nucléique (Tao et al., 2019 ;Liu et al., 2016 ; Yan et al., 2013).

Docking flexible la flexibilité du ligand et le récepteur pendant ce processus est permis et la conformation de ce complexe peut être modifié. L'amarrage flexible est généralement utilisé pour étudier l'interaction entre les molécules avec une grande précision (Tao et al., 2019 ; Roy et al., 2018)

Docking semi-flexible durant ce processus la structure de la protéine est maintenue fixé et que la structure du ligand qui est maintenue flexible. Ce type est idéal pour le docking des petites molécules avec des macromolécules, Il prend en compte de l'influence des changements sur la structure du ligand et peuvent être utilisés dans une plus large gamme d'applications (Tao et al., 2019).

4.4 Le docking ligand- protéine

Le docking Ligand- Protéine nécessite une grande molécule ; la protéine est ainsi appelée « le récepteur » et la petite molécule « le ligand ». Il est un très utile dans le développement de médicaments. Il est comme « une clé dans une serrure » quand il est amarré dans la cavité de la protéine.

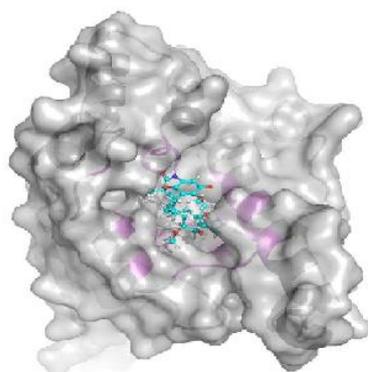


Figure 24 Interaction Ligand-Protéine

4.5 Le docking protéine- protéine

Le docking protéine- protéine nécessite deux protéines approximativement de même taille. Donc, souvent le site de fixation est une surface plus planaire que dans le docking ligand- protéine, et les cas où le docking se produit quand une des molécules est située à l'intérieur d'une cavité de l'autre molécule, sont très rares.

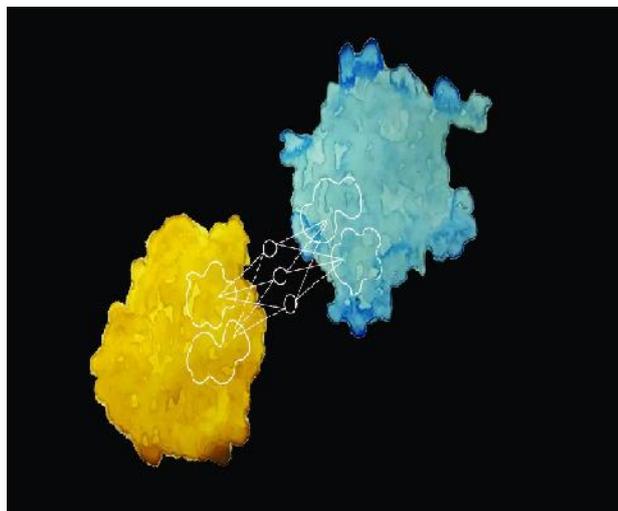


Figure 25 Interaction Protéine-Protéine.(Gainza et al., 2019).

4.6 Fonction de score

Les algorithmes du docking prédisent un certain nombre d'orientations (poses) pour le ligand à l'intérieur du site de liaison. L'évaluation et le classement des conformations de ligand prédites sont exécutées par des approximations des fonctions mathématiques appelées fonctions de score. La fonction de score est utilisée pour : l'identification du mode de liaison du ligand, la prédiction de l'affinité de liaison et le filtrage de base de données virtuelle. Généralement, l'estimation de l'énergie libre est utilisée dans le développement des fonctions de notation des complexes [ligand - protéine]. Effets enthalpiques et entropiques jouent également un rôle important dans les événements de liaison au ligand (Yadava, 2018)

Habituellement, il existe trois types de fonction de scoring: scoring basée sur le champ de force, scoring basée sur les connaissances et des fonctions de scoring empirique sont utilisées par des programmes de docking (Yadava, 2018).

➤ **Scoring basé sur le champ de force** exprime l'énergie issue de la formation du complexe [Ligand-Récepteur] en calculant l'énergie d'interaction et l'énergie interne

du ligand par exemple : énergie de Van der waals, interactions électrostatiques, les forces de bending

➤ **Scoring empirique** Les fonctions de scoring empiriques se composent de plusieurs termes d'énergie dont les coefficients sont basés sur des observations expérimentales valeurs obtenues à partir de l'analyse estimant l'affinité des complexes protéine-ligand en se basant sur le nombre des interactions entre le ligand et la protéine

➤ **Scoring basée sur les connaissances (Knowledge-based)** Les fonctions de scoring basées sur les connaissances sont dérivées de statistiques observations d'interactions intermoléculaires reconnus à partir des bases de données. Ils sont conçus pour reproduire des structures plutôt que énergies de liaison.

➤ **Fonctions de score consensus** En raison des imperfections des fonctions de notation, de nos jours, un autre type de fonction de notation connue sous le nom de notation consensuelle est utilisée qui combine les informations de différents systèmes de notation pour surmonter les limites de la notation. Cela peut être très utile, car il combine les avantages et atténue simultanément les défauts de chacun méthode.

4.7 Algorithmes de recherche

Les applications du docking peuvent être classées par leur Algorithmes de recherche, qui sont définies par un ensemble de règles et de paramètres appliqués pour prédire les conformations. Lorsque l'on considère la flexibilité du ligand et/ou de récepteur, l'algorithme de docking peut être classé en deux grands groupes: corps rigide et docking flexible (**Dias et al., 2008**)

La méthode d'amarrage (docking) à corps rigide ne prend pas en compte ni de la flexibilité du ligand ni du récepteur, elle limite la spécificité et l'exactitude des résultats, en tenant compte des complémentarités essentiellement géométriques entre deux molécules. Simulation d'amarrage à corps rigide est capable d'identifier les sites de liaison du ligand pour plusieurs différentes protéines même sans prendre en compte la flexibilité (**Dias et al., 2008**)

Les méthodes d'amarrage flexibles peuvent envisager plusieurs possibilités conformations du ligand ou du récepteur, ainsi que pour les deux molécules en même temps (Dias *et al.*, 2008)

4.8 Les étapes du docking

1. Obtenir ou générer le fichier de coordonnées du ligand. La structure tridimensionnelle d'un ligand peut soit être obtenue par coordonnées expérimentales à partir des bases des données par exemple PDB. (de Azevedo, 2019)
2. Obtenir la structure tridimensionnelle du récepteur cible. Les structures peuvent être aussi disponibles au niveau du PDB (de Azevedo, 2019)
3. Préparation des structures de ligand et de récepteur. Cette préparation implique la suppression des conformations alternatives des résidus, co-facteurs et molécules d'eau indésirables, ajoutant des atomes d'hydrogène et charges atomiques partielles si nécessaire, et aussi identification du site actif (de Azevedo, 2019)
4. Le docking moléculaire commence par rapprochement des molécules et l'application d'algorithmes de recherche qui posent des petites molécules dans le site actif. Ces algorithmes sont complétés par des fonctions de scoring conçues pour prédire l'activité biologique via l'évaluation des interactions entre les composés et les cibles potentielles (de Azevedo, 2019)
5. Visualisez les résultats d'amarrage (appelés poses) avec logiciel de visualisation moléculaire. On s'attend à ce que la meilleure pose est notée plus haut que toute autre conformation échantillonnée par la fonction de scoring. Cependant, un grand nombre de poses résultantes doivent être examiné ou réévalué (de Azevedo, 2019)

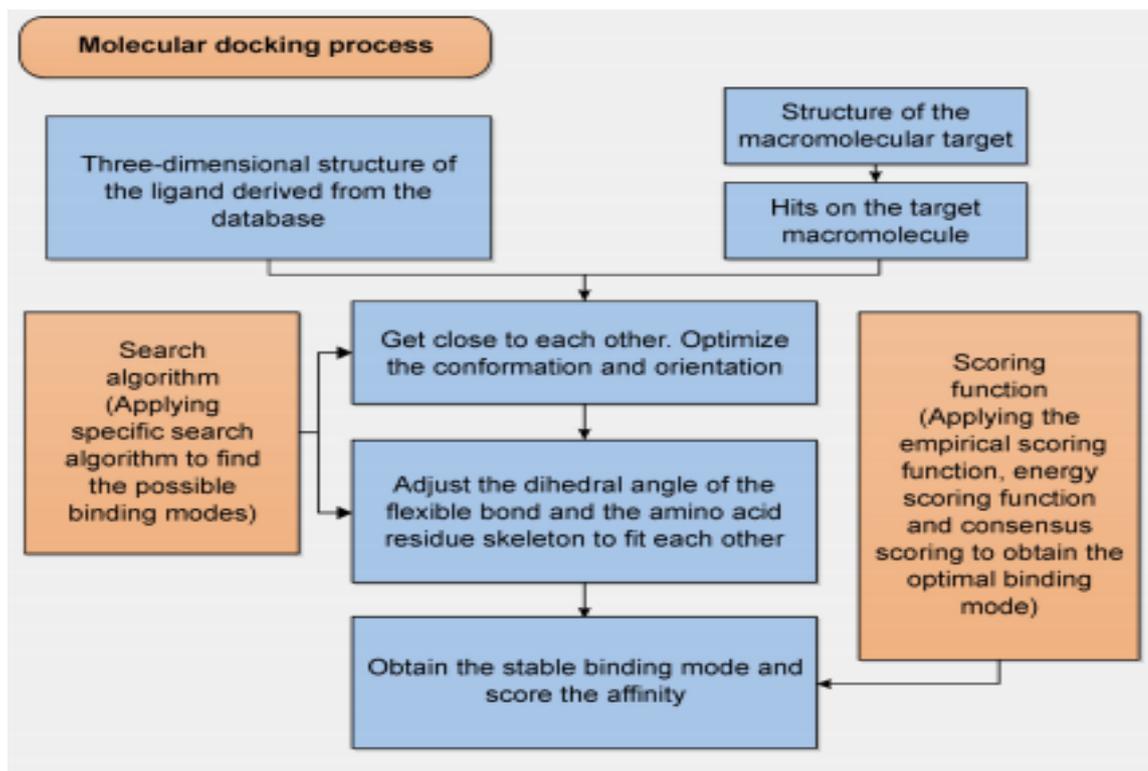


Figure 26 Le processus du docking moléculaire (Fan et al., 2019)

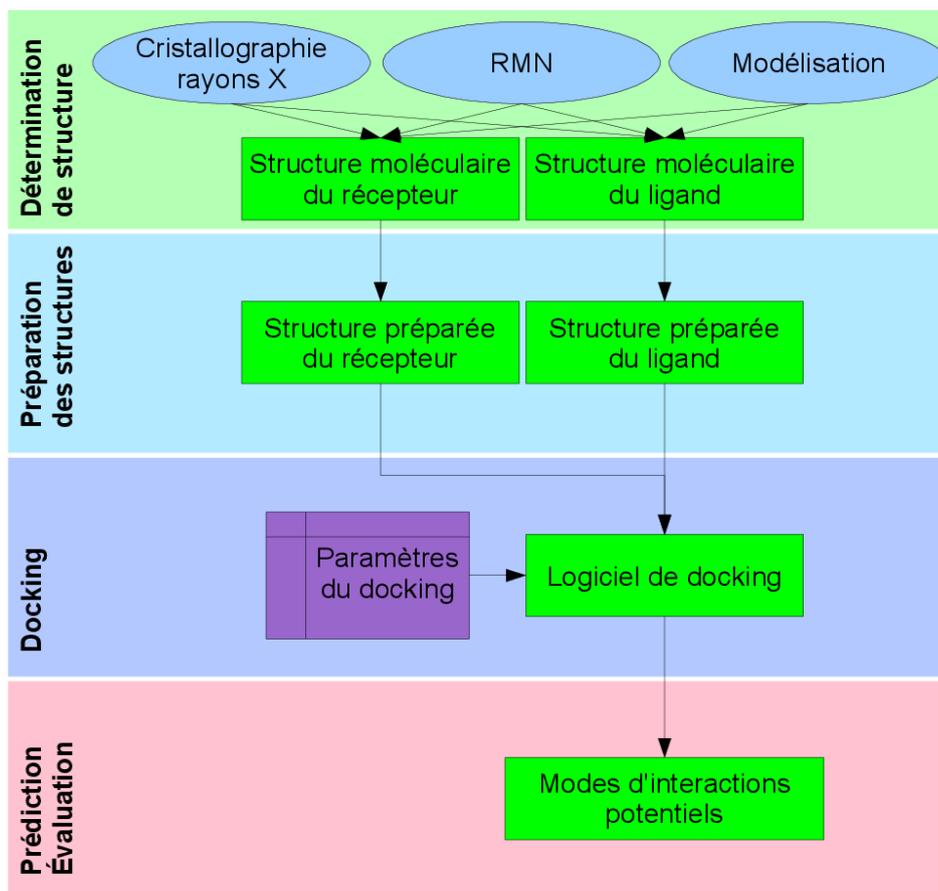


Figure 27 Conception du logiciel du docking (Grosdidier et al., 2007).

4.9 Les applications

Le docking moléculaire a plusieurs applications dans le but de conception d'un médicament. On prend par exemple, le screening virtuel et l'optimisation des composés lead et hit. Cette technique consiste à placer virtuellement une collection de milliards de composés dans une cible biologique (protéine) et d'évaluer leur affinité. L'évaluation est effectuée par un classement des ligands (par fonctions de scoring) en termes d'affinité dans le complexe ligand-récepteur (**Pachoulide, 2021 ; Śledź et al., 2018**); (**Pachoulide, 2021 ; Kontoyianni et al., 2017**). Cette procédure *in silico* est importante car elle permet, l'évaluation rapide de composés, ce qui permet de diminuer le nombre de composés à tester expérimentalement *in vitro* (**Pachoulide, 2021 ; Kontoyianni et al., 2017**).

Hazuda et al (2004) ont réalisé une étude sur un exemple des inhibiteurs de l'intégrase du VIH-1. Les chercheurs ont créé une librairie de 50 conformères (isomères de conformation) de ligands inhibiteurs, par un screening virtuel, introduits dans le site de liaison de l'enzyme. Ils ont ainsi pu déterminer la meilleure orientation du ligand qui présente la meilleure affinité avec le récepteur, quel était le groupement pharmacophore responsable de l'activité inhibitrice et quels groupements pouvaient être remplacés pour améliorer cette affinité (**Pachoulide, 2021**).

Un autre exemple, un médicament indiqué dans le traitement de l'hypertension artérielle : l'aliskiren, (**Wood et al., 2003**). Le docking moléculaire a été utilisé pour l'optimisation des paramètres pharmacocinétiques du hit choisi (ligand-target binding rationalisation). **Wood et al(2003)**. ont associé les données de cristallographie par diffraction des rayons X avec les méthodes de modélisation moléculaire pour déterminer les groupements pharmacophores, importants pour la formation du complexe ligand-récepteur et les groupements donnant au ligand les propriétés pharmacocinétiques défavorables (**Pachoulide, 2021 ; Wood et al., 2003**). Ces données ont permis aux chercheurs de modifier la structure du composé en remplaçant les « mauvais » groupements par des groupements qui ont pu augmenter l'affinité et la sélectivité du ligand envers son récepteur (**Pachoulide, 2021 ; Wood et al., 2003**).

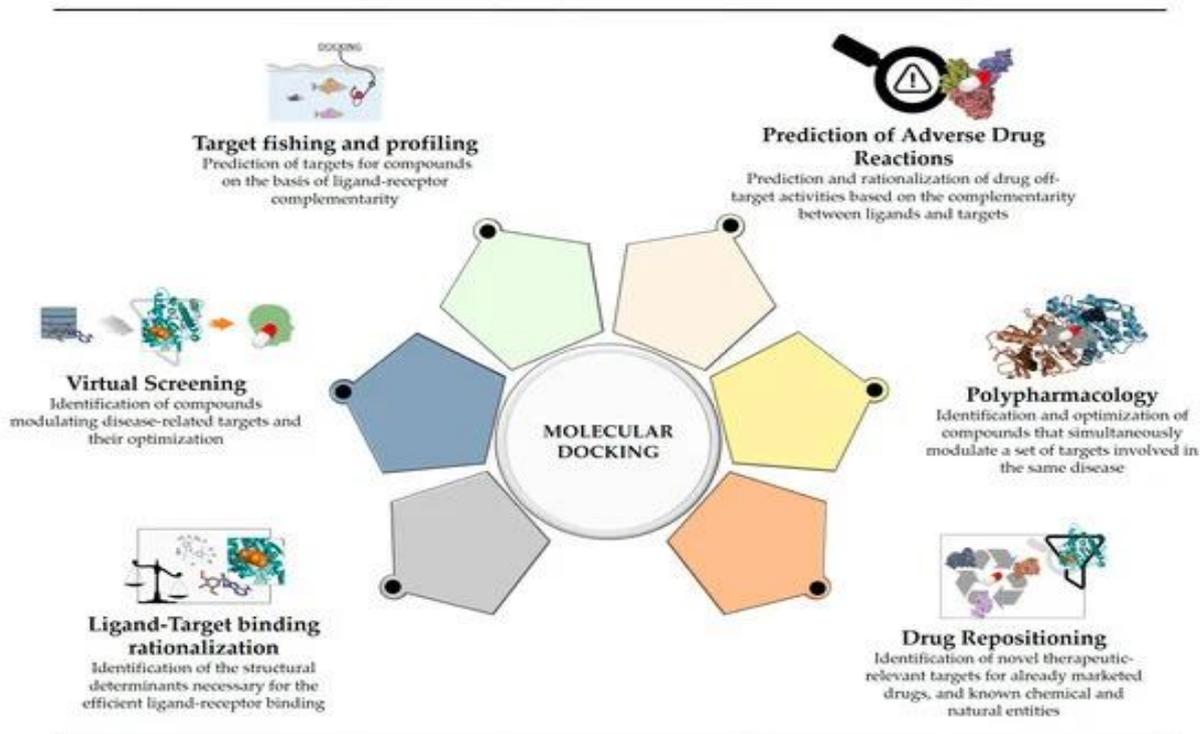


Figure 28 Les différentes applications du docking moléculaire

L'amarrage moléculaire est actuellement employé pour aider à rationaliser l'activité des ligands vers une cible d'intérêt et à effectuer campagnes de dépistage virtuel basées sur la structure. Outre, il peut également être utilisé pour identifier des séries de cibles pour lesquelles les ligands présentent de bonnes complémentarités, certains d'entre eux étant potentiellement responsables des effets indésirables inattendus. De plus, l'amarrage est également actuellement utilisé pour l'identification de ligands qui se lient simultanément à un ensemble de cibles sélectionnées d'intérêt (polypharmacologie) et pour identifier de nouvelles utilisations de composés chimiques (repositionnement des médicaments). (Pinzi et al., 2019)

4.10 Les outils du docking

Plusieurs programmes du docking ont été formulés et améliorés, le tableau suivant regroupe les programmes les plus utilisés en citant ses caractéristiques

Tableau IX Logiciels utilisés dans le Docking moléculaire et leurs caractéristiques

Programmes	entreprise de design	Termes de licence	Système d'exploitation tolérant	Approche du docking	Fonctions du scores
Auto Dock	D. S. Good sell, A. J. Olson The Scripps Research Institute	Gratuit pour usage académique	Unix, Mac OSX, Linux, SGI	Génétiq ue algorithme Lamarckien génétiq ue algorithme Simulé Recuit	Auto-Dock force-field
DOCK	I. Kuntz Université de Californie, San Francisco	Gratuit pour usage académique	Unix, Linux, Sun, IBM AIX, Mac OSX, Windows	Ajustement de forme (ensembles de sphères)	Chem Score, GB/SA Solvation Et autre méthodes
FlexX	T. Lengauer and M. Rarey Bio SolveIT	Commercial avec version d'essai de 6 semaines	Unix, Linux, SGI, Sun Windows	Incrémentale Construction	FlexXScore, PLP, Screen Score, Drug Score
FRED	Open Eye Scientific Software	Gratuit pour usage académique	Unix, Linux, SGI, Mac OSX, IBM AIX, Windows	Ajustement de forme	Screen Score, PLP, Gaussian shape score,
Glide	Schrödinger Inc.	commercial	Unix, Linux, SGI, IBM AIX	Échantillonnage Monte Carlo	Glide score Glide comp
GOLD	Cambridge Crystallographic Data Centre	Commercial avec version d'essai de 2 mois	Linux, SGI, Sun, IBM, Window	Génétiq ue algorithme	Gold Score, Chem Score
LigandFit	Accelrys Inc.	commercial	Linux, SGI, IBM AIX	Échantillonnage Monte Carlo	Lig score, PLP, PMF

Matériels et méthodes

Matériels biologiques

5.1.1 Matériel végétal

Le matériel végétal consiste deux types de plantes :

- **La menthe verte (*Mentha spicata*)** : a été récolté dans la région de Sidi Maamar de la Wilaya de Saida, l'identification de l'espèce est réalisé par docteur Aouadj, après le récolte de la plante on a enlevé l'impureté et fait un séchage complet dans un endroit ombre et sec pendant 15 jours, une fois la menthe est séchée on a fait un broyage juste une cassure des feuilles, puis stocké dans des boites pour l'extraction.



Figure 29 *Mentha spicata* fraîche et broyé

- **Le clou de girofle (*Syzygium aromaticum*)** : disponible en marché tout au long de l'année, on a bien choisir les graines de clou qui sont de couleur marron claire et une odora très fort. après un broyage complet à l'aide d'un broyeur électrique, puis la poudre de clou est stockée dans des boites bien fermées pour l'extraction.



Figure 30 Bourgeons et poudre du Clou de girofle

5.1.2 Extraction des huiles essentielles

L'extraction de l'huile essentielle de *Mentha spicata*

Elle est réalisé par la méthode d'Hydrodistillation : le protocole de cette technique consiste à immergé 30g de poudre de la menthe avec 500 ml d'eau distillé dans un fiole jaugée thermorésistante, avec une température non déterminer s'augmente successivement jusqu'au l'ébullition pendant 3 heures. La vapeur émise sera condensée grâce à un système de refroidissement à eau, puis elle sera collectée dans un flacon opaque. A la fin de l'expérimentation le liquide collecté est mis dans une ampoule a décanté afin de séparer les deux phases (aqueuse et organique) pour obtenir l'huile essentielle (Benayad, 2008 ; brahmi, 2020).

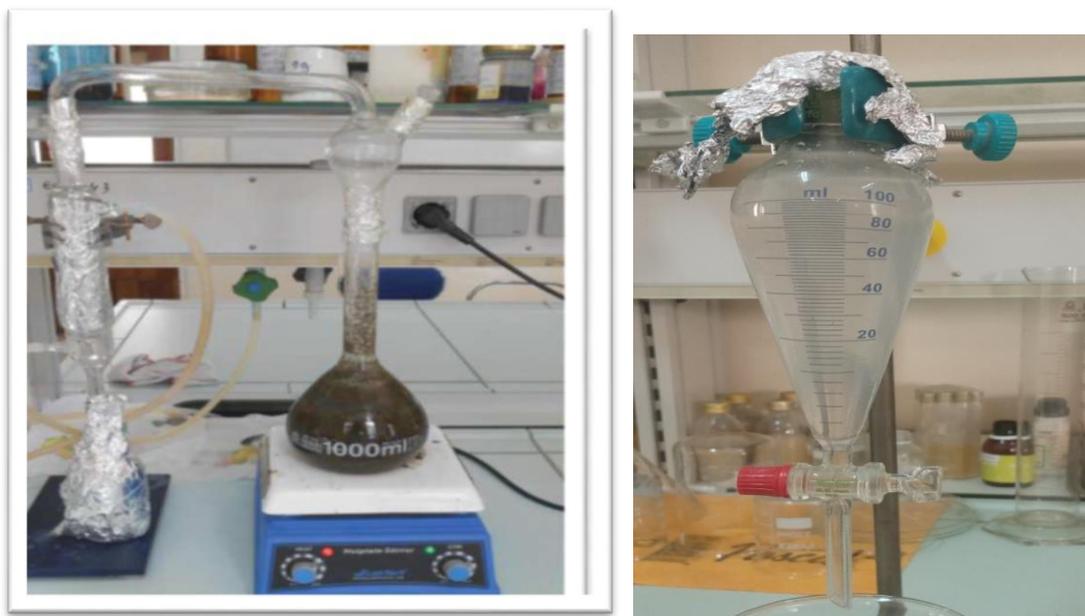


Figure 31 Montage d'hydrodistillation et ampoule à décanter

L'extraction d'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* :

Aussi la même technique d'hydro-distillation , le protocole consiste d'immerger 20g de clou de girofle (la partie utilisée de la plante sont les boutons floraux) broyés avec 250 ml d'eau distillé dans un ballon thermorésistante avec une température modérée qui augmente successivement jusqu'aux l'ébullition par un chauffe ballon , jusqu'à recueillir environ 80 ml de distillat , A la fin de l'expérimentation le liquide collecté est mis dans une ampoule a décanté afin de séparer les deux phases (aqueuse et organique) pour obtenir l'huile essentielle (Merve , Ilikay , 2019) .

5.1.3 La conservation des huiles essentielles

L'huile essentielle extraite est conservé dans un flacon en verre bien fermé et recouverte par un papier d'aluminium pour le protéger de la lumière et de l'aire dans une température de 4°C (à l'obscurité) (Shamas et al., 2011).

5.1.4 Détermination de rendement des deux huiles essentielles

Le rendement des huiles essentielles extraites est défini par le rapport entre la masse de l'huile extraite et la masse du matériel végétal utilisé (Bssaibis et al., 2009; ADLI, 2014). Ces taux sont de 0.15% pour *Mentha spicata* et de 12.70% pour *Syzygium aromaticum* .la formule est exprimé en pourcentage (%) est calculé par la formule suivante:

$$R (\%) = (M_1 / M_0) \times 100$$

R : rendement en huile essentielle.

M₁ : quantité d'huile extraite exprimé en gramme (g)

M₀ : quantité de la matière sèche utilisée pour l'extraction exprimée en gramme (g).

5.2 Animaux d'expérimentation

Dans notre expérience le modèle d'animaux choisi c'est les rats albinos de la souche *Wistar* reçu de l'institut Pasteur, pesant entre 200 à 300 g ±50 g, accueillir au niveau de l'animalerie du département de biologie (Université de Saida) et soumise un cycle de lumière constant 12 h (lumière/obscurité), dans une salle ventilée.

Les rats sont regroupés dans des cages avec un accès libre à la nourriture et l'eau et à une température de $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Tableau X Composition du régime d'entretien (régime standard)

Composition	Quantité (%)
Protéines	17
M. Grasses	3.3
Cellulose	5.5
Humidité	14
Cendre brute	7.5
Additifs	Vitamines

5.2.1 La répartition des groupes

En premier lieu nous avons divisé les 30 rats en 4 groupes selon leurs poids corporels :

Groupe 01 (consiste le Lot Témoins) :

Recueil 6 rats de poids corporel entre 300 à 350 g, qui ne reçoit que de l'eau et de la nourriture.

Groupe 02 (consiste le Lot intoxiqué par l'OTA) :

Les 6 rats sont de poids corporels entre $250 - 280 \text{ g} \pm 20 \text{ g}$, recevant de la solution d'OTA (a été acheté de SIGMA-ALDRICH ; PHR1537-1G, Lot : LRAC0364, pharmaceutical Secondary Standard-united states) avec une dose de : $289 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{p.c.}$ par voie intrapéritonéale solubilisé dans 1M de NaHCO_3 chaque 48 h pendant 12 doses (**Belmadani et al. 1998, Elling et al. , 1985**).

Groupe 03 : consiste les lots traités :

- **Lot ITM (OTA-HE de *Mentha spicata*)** recueil 6 rats de p.corporel entre 280 - 300g \pm 20g, qui sont intoxiqué par OTA et traité par l'huile essentielle de la menthe verte (0.1ml/Kg/p.c.) dilué dans 40 μ l d'eau physiologique avec des gouttes de TWIN 80 (**BRAHMI, 2020**).
- **Lot ITC (OTA-HE de *Syzygium aromaticum*)** : collecte 6 rats de poids corporel entre 300-315 g \pm 5g, intoxiqué par l'OTA et traités par L'HE de clou de girofle avec une dose de 0.1ml/Kg/p.c. dilué dans 40 μ l d'eau physiologique avec des gouttes de TWIN 80 (**ADLI, 2014**) .

Groupe 04 : consiste é lots témoins traités :

- **Lot TM (Témoins traité par l'HE de *Mentha spicata*)** collecte 6 rats de poids corporel entre 310-330 g \pm 5g, ces rats reçoivent l'HE de *Mentha spicata* par une injection intra-péritonéale (0.1ml/kg) dilué dans 40 μ l d'eau physiologique avec des gouttes de TWIN 80 .
- **Lot TC (Témoins traité par l'HE de *Syzygium aromaticum*)** recueil 6 rats avec de poids corporel entre 330-340 g \pm 5g, qui reçoivent de L'HE de Clou de girofle avec le même protocole.

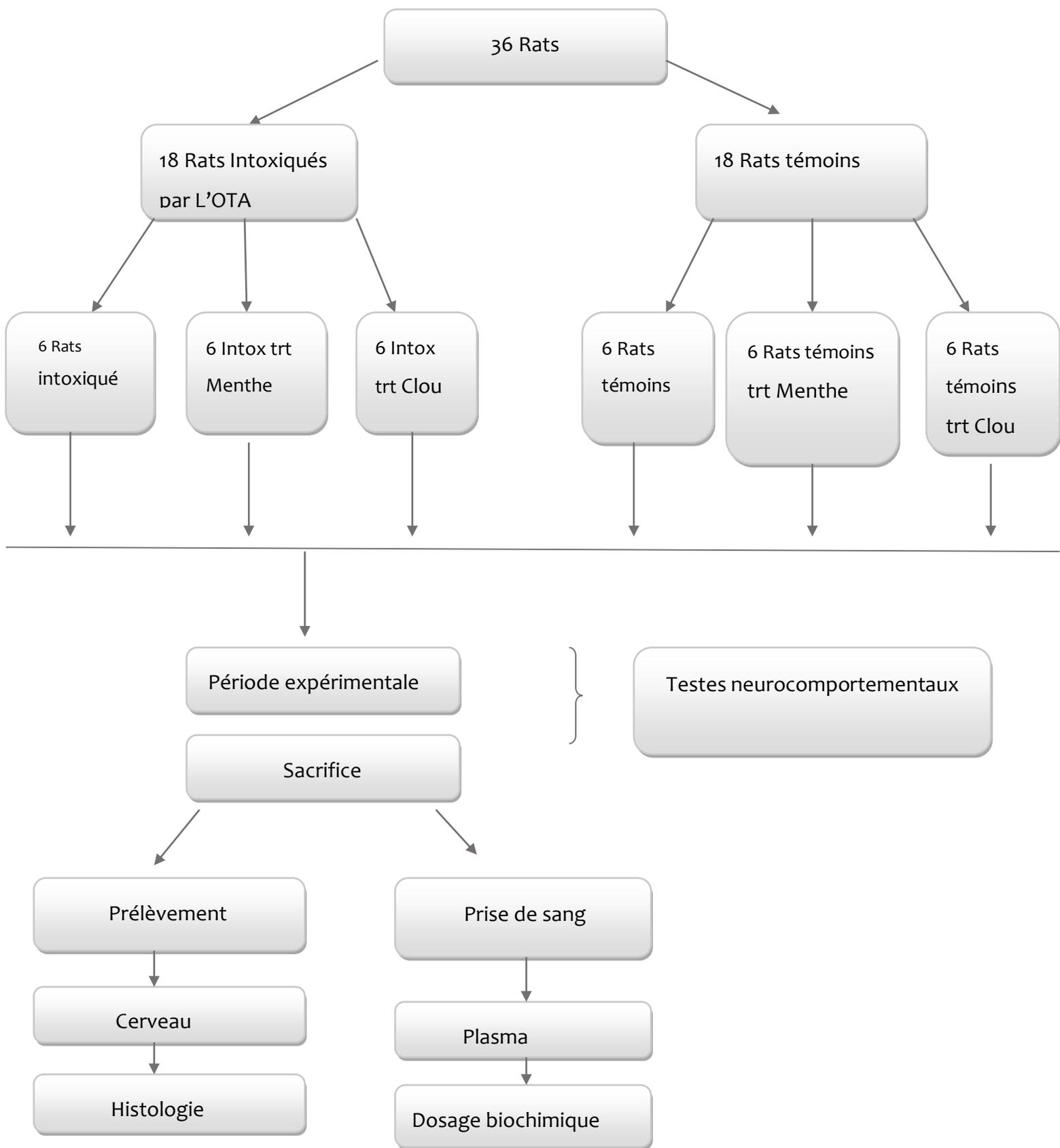


Figure 32 Résumé de la chorologie du protocole expérimentale

5.3 Evaluation de poids corporel et poids de cerveau

L'évaluation du poids corporel se réalise avec une pesée quotidienne des rats durant toute la période d'expérimentation, le poids de cerveau des Sinc lots a été enregistré après le sacrifice.

5.4 Observation macroscopique

Aucune mortalité n'a été enregistrée durant la période d'expérimentation, aussi une perte de poids très observable marqué chez les rats intoxiqués avec une baisse dans la prise alimentaire.

5.5 Tests Neurocomportementaux

Avant chaque test les cages des rats sont placées dans la salle d'expérimentation afin de s'habituent à cette nouvelle environnement.

5.5.1 L'épreuve de la nage forcée (Forced Swimming Test) (FST)

Il a été proposé premièrement par **Porsolt et al., (1977)** , utilisé pour l'évaluation de l'état dépressif chez des modèles animaux , il consiste de placer le rat (notre modèle d'animaux) dans un cylindre avec une diamètre de 20 cm et de 50 cm à la hauteur , remplie jusqu'au 30 cm d'eau avec une température de $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, pendant 6min (**Figure 01**) , l'eau est changé après chaque essaie et ont mesuré le temps dans l'aquelle le rat est nage activement est c'est le temps de la mobilité , et le temps d'immobilité quand le rat se flotte seulement de manière leurs têtes est exposé hors de l'eau est bougent ces pattes de temps à l'autre juste pour maintenir son équilibre et fixe son tête hors de l'eau , ce comportement est un indicateur présentant comme étant un comportement dépressif , après les 6 min le rat sera rapidement séché avec une serviette est placé dans sa cage. (**benabid et al., 2008 ; Brahmi , 2020) ; 5 ADLI , 2014) ; (B. Lecorps et al. , 2016) .**



Figure 33 Dispositif de la nage forcée_(ADLI, 2014).

5.5.2 Le test d'Open Field

Utilisé pour évaluer la locomotion spontanée, l'état d'anxiété et de découvrir un nouvel environnement (**B. Lecorps et al., 2016**).

Ce test est une large boîte rectangulaire ouverte avec une longueur de 75cm/75cm et d'hauteur de 35 cm, divisé au sol par des carreaux de 10 cm. le rat est placé dans le cadre des quatre coins d'Open Field leur tête est exposé aux coins (mur), et ont évalué leurs comportement pendant 6min (**Figure 02**).

Les 6 paramètres a évalué dans ce test sont :

- le temps de latence (en secondes), qui correspond au temps mis par le rat pour sortir des quatre carreaux formant le coin, le nombre total de carreaux traversés par le rat pendant la durée du test (6 min), qui reflète l'activité locomotrice, le nombre de visites dans les 9 carreaux du centre, le nombre total de redressements , le nombre total de toilettages ,et le nombre total de défécations.

Ainsi, ce test évalue les capacités exploratoires du rat dans un contexte stressant. Le nombre de carreaux traversés et le nombre de redressements reflètent son activité exploratoire et son état émotionnel. (**ADLI, 2014**).

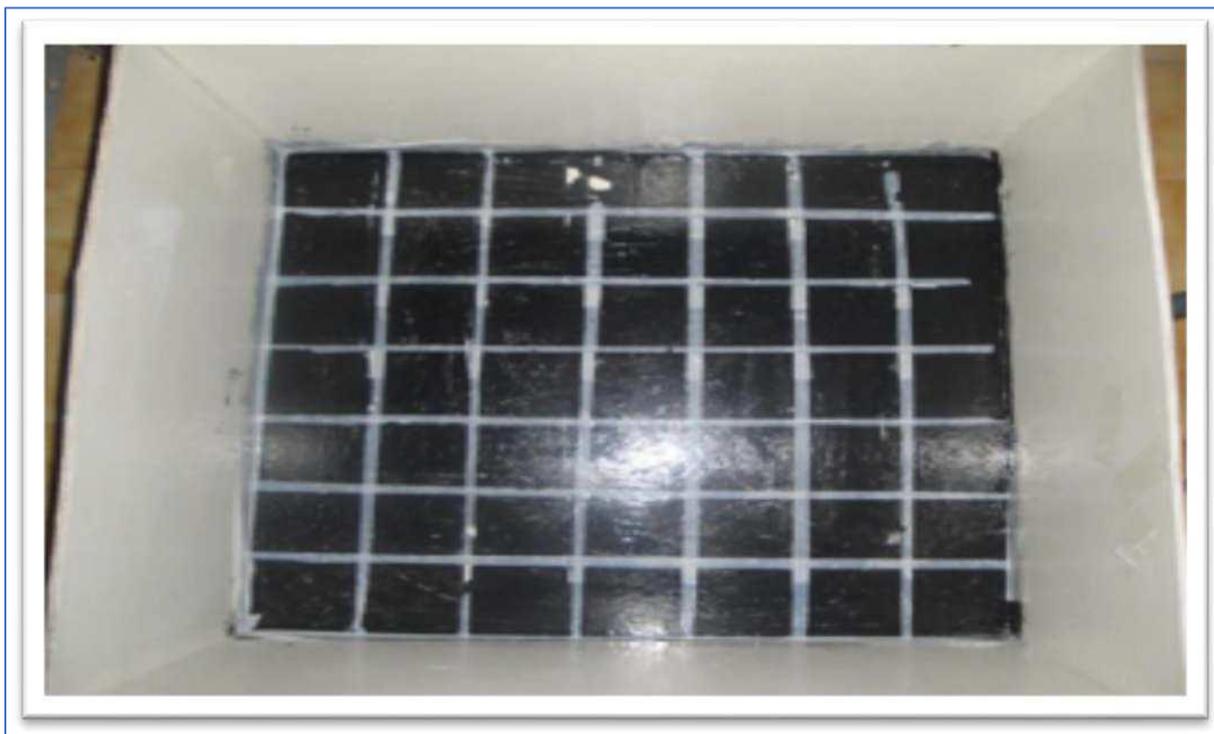


Figure 34 Dispositif du open Field

5.5.3 protocole de Piscine de Morris

Il a été attribué pour l'évaluation de la mémoire spatiale et l'apprentissage chez des modèles animales, ce test est une grande cylindre de 136 cm de diamètres et de 60 cm de haut, une plateforme circulaire (10 cm de diamètre et de 28cm de haut) qui se trouve dans le quadrant Nord-Ouest.

Le réservoir a été rempli d'eau ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) mélangé avec une matière blanche jusqu'à la plateforme est totalement immergée à 1 cm de la surface l'eau, dans la salle d'expérimentation : des repères visuels ont été placés à des divers endroits autour de la piscine, Les rats ont été entraînés pendant 4 jours. Chaque journée de formation comprenait un bloc composé de quatre essais (Nord , Ouest , Sud , Est) chaque essaie 60 seconde , entre chaque essaie 45 min à 1h de repos pour chaque rat, le rats se place sur le quadrant cible, la tête orientée vers le murs est se nage librement pendant 60 seconde jusqu'il trouve la plateforme cachée , s'il n'a pas trouvé on va le placé sur la PLT environ 20 seconde , et ainsi de suite jusqu'aux les quatre essaies sont réalisés .le 5ème jours possède deux tests : le probe test : ou Le test de la sonde (sortie de la plate-forme cachée) a été effectué 24 h après la fin de la formation (jour 5) en mesurant le temps

passé dans le quadrant cible sur 90 s , et le test visuel pour évaluer l'état de vision par l'attachement d'un

drapeau de couleurs claire dans la plateforme est ont enregistré les résultats . (Tabriz Ian et al., 2010); (Hosseini, et al., 2010) . Ce test permet d'évaluer non seulement leur capacité de mémorisation et d'apprentissage mais aussi son stratégie pour résoudre les problèmes (probe test, PLT cachée).



Figure 35 la piscine de Morris (Chris , 2013)

5.5.4 Le test de Lumière /obscurité (DARK/ LIGHT)

Ce test est composé par quatre chambres ; deux chambres qui sont sombre de couleur noire, et les deux autres chambres sont éclairé limuneux coloré par le blanc, afin de créer un environnement ambiante pour le rat.

Le rat est placé aux milieu de ces quatre chambres avec un accès libre qui permet le déplacement sur les deux côtés , le test est réalisé dans les 30 min , sachant que les rats sont des animaux nocturnes préfère les endroits sombres , dans ces 30 min à l'aide d'une caméra vidéo qui va enregistrer leurs déplacement et le temps passé dans chaque compartiment (limuneux/sombre), Si le temps d'enregistrement passé dans le compartiment éclairé est plus élevé, cela peut représenter un indicateur comportemental d'anxiété, dans des conditions normales, les rats ont enregistré un temps très faible dans le compartiment éclairé .(Zewdel et al , 2018).

5.6 Sacrifice

A la fin de l'expérimentation les rats sont sacrifié le matin par décapitation et cela après exposé les rats à le chloroforme avec une dose de (50 ml d'eau distillé avec 5ml de

chloroforme), le sang récupéré dans des tubes héparines afin d'effectuer les analyses biochimiques, ensuite le corps de l'animale est ouverte, les organes (cerveau, foie et rein) sont soigneusement prélevée, rincé avec du l'eau physiologique (NaCl à 0,9%) froid, sèche puis mesure et pesée. Lesorganes sont fixés dans du formol à 1/10ème pour but de les études ultérieurement par les techniques histologiques. (**Ait hamadouche, 2009 ; Brahmi, 2020**).

5.7 Dosage biochimiques

Dosage de la glycémie

La méthode utilisée pour le dosage de la glycémie est une méthode colorimétrique (Kit SPINREACT). Le glucose oxydase (GOD) catalyse l'oxydation du glucose sanguin en acide gluconique en formant le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce dernier est détecté par le phenol-aminophenazone avec la présence de la peroxydase (POD).



La densitéde la couleur formée est proportionnelle à la concentration du glucose dans l'échantillon, calculé par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 505nm.(**Adli, 2014**).

Dosage de cortisol

Le dosage du cortisol sanguin est essentiellement réalisé en routine par des techniques immunologiques. La limite de détection analytique est généralement de 1,00 nmol/L ou 0,36_g/L. Le principe du dosage repose sur la fixation du cortisol sur un anticorps spécifique, Dans le tube à essai, il y a donc une compétition de liaison entre les anticorps et les éventuelles protéines porteuses pour le cortisol. (**Szymanowicz, 2011**)

5.8 Etude histologique des organes

Les techniques histologiques ont été réalisées au niveau d'institut des sciences vétérinaires à l'université de Tiaret, L'organe prélevé le cerveau est soumis préalablement aux différentes étapes qui sont :

5.8.1 Fixation

La fixation est immédiate après le prélèvement pour empêcher une putréfaction (altération microbienne) du tissu ou par autolyse (destruction tissulaire par les enzymes qu'il contient en lui-même), ainsi garder les constituants cellulaires ou tissulaires dans un état aussi voisin que possible de l'état vivant. Le volume du fixateur doit être 20 à 50 fois celui du prélèvement. Les organes séjournent 24 à 48 heures dans le fixateur et doivent être totalement immergés (**Plenat et al., 2007**).

5.8.2 Inclusion

Le mode d'inclusion à la paraffine est le plus répandu. La paraffine est un mélange d'hydrocarbures saturés et quelquefois de cires. Elle n'est pas miscible à l'eau, les pièces fixées doivent être déshydratées. Le déshydratant le plus courant est l'alcool éthylique. Mais comme la paraffine n'est pas non plus miscible à l'alcool, celui-ci sera remplacé avant inclusion par un liquide intermédiaire miscible à l'alcool et à la paraffine. On utilise le xylène. Ce liquide est "éclaircissant" ce qui permet d'apprécier le degré de pénétration par la transparence acquise par la pièce (**Mark, 2010**). La succession de toutes ces étapes est facilitée par un automate à inclusion (Figure 26) (Tableau 10).



Figure 36 **Auomatte à inclusionn**(model LEACA EG 11)

Tableau XI Techniques de déshydratation (inclusion) (AIT HAMADOUCHE, 2010).

Etapes	Produits	Durée
1 ^{er} bain	Formol	1h30
2eme bain	Alcool 95%	1h30
3eme bain	Alcool 95%	1h30
4eme bain	Alcool 100%	2h
5eme bain	Acétone I	1h30
6eme bain	Acétone II	1h30

5.8.3 L'enrobage

L'enrobage ce fait grâce à un appareil comportant, trois compartiment (A, B, C), deux chauds et un compartiment froid. À l'aide de moules métalliques, les cassettes seront remplis par la paraffine chaude, puis refroidie au niveau du compartiment froid (Figure 27).



Figure 37 l'appareil d'enrobage, comportant deux compartiments chaud (A, B) et froid (C)

5.8.4 Coupes, étalement des coupes et coloration

Le microtome model (LEICA RM 2235) permet d'obtenir des coupes dont l'épaisseur est de 3 à 5 μ m. La coupe proprement dite s'obtient par passage régulier de la pièce à couper devant la lame du microtome. A chaque passage, celui-ci enlève une tranche d'épaisseur réglable. On peut effectuer des coupes isolées ou bien pour la reconstitution totale d'un prélèvement, réaliser des coupes sériées, disposées en forme de ruban. Les rubans de paraffine obtenus sont plissés et doivent être étalés sur un milieu liquide légèrement chauffé afin que les plis disparaissent et que la coupe acquière une planéité parfaite. Le collage des coupes se fait sur une lame de verre recouverte d'une solution d'albumine, qui maintient la coupe sur la lame. Les coupes égouttées et mises dans des portoirs sont ensuite séchées dans une étuve model (Sakura TK11) jusqu'au moment de la coloration.

La paraffine est hydrophobe tandis que les colorants sont hydrophiles. C'est pourquoi la coloration des coupes comporte une étape de déparaffinage et de réhydratation. Ces étapes (Tableau 11), sont assurées par une succession de bains dans un automate de model (LEICA EG 4040) démonter dans la (Figure 29).



Figure 38 Techniques de coupe par un microtome_(LEICA RM 2235).

Tableau XII Batterie de coloration Helatoxyline-Eosine (AIT HAMADOUCHE, 2010).

Réactions	Produits	Durées
Déparaffinage	Toluène I (ou xylène)	10min
	Toluène II (ou xylène)	10min
Réhydratation	Ethanol 100%	30 sec
	Ethanol 95%	30 sec
	Ethanol 75%	30 sec
Rinçage	Eau courante	5 min
Coloration	Hématoxyline Harris	1 min
	Eau courante	1min
	Acide chloridique	1 min
	Bicarbonate de Lithium	1min
	Eau	1min
	Alcool 95%	30sec
	Eosine alcoolique	1min
Déshydratation	Alcool 100%	30sec
Eclaircissement	Toluène (ou xylène)	10min

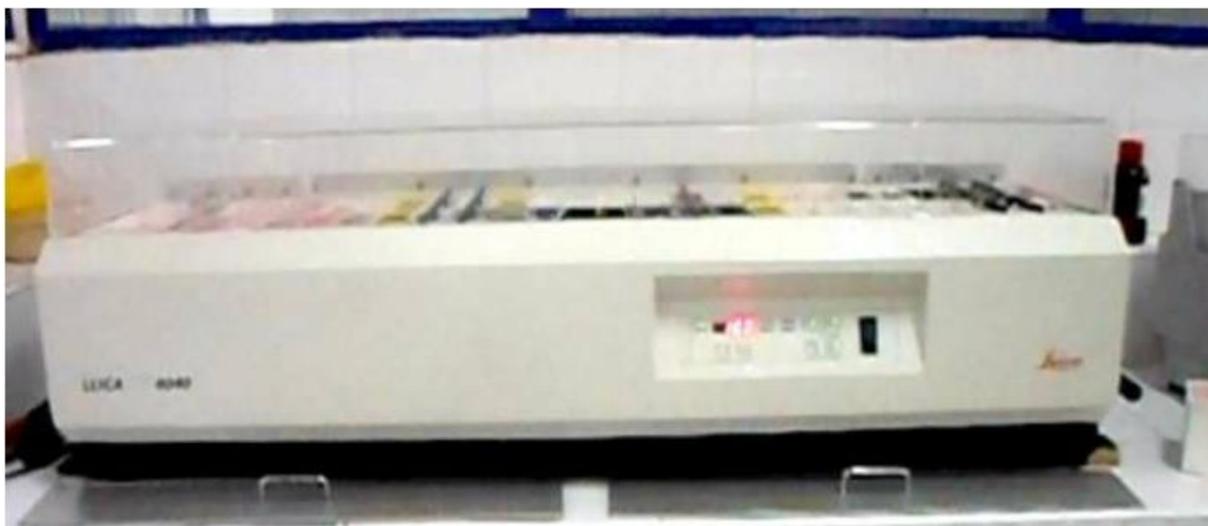


Figure 39 **Automate pour coloration Hématoxyline-Eosine (LEICA EG 4040).**

5.8.5 Montage des lames

Après coloration une goutte d'Eukitt de montage (colle à base de résine) est disposée sur la coupe, une lamelle est appliquée de façon à ce que la résine recouvre l'ensemble de la coupe. Lors de la manipulation, aucune bulle d'air ne doit s'insérer entre la lame et la lamelle. L'Eukitt polymérise en une vingtaine de minutes mais on peut accélérer le processus en plaçant la lame sur une plaque chauffante à 40°C.

5.8.6 Examen microscopique

L'analyse microscopique est généralement l'activité principale du pathologiste. Il a pour cela recours aux outils de la microscopie, principalement microscope optique ou photonique, mais également électronique. Cette étape permet d'apprécier les éventuelles lésions ou anomalies au sein des tissus analysés. Ainsi qu'à pouvoir identifier l'agent causal (LAQUET, 2007).

5.9 Expression et analyse statistique des résultats

Les résultats sont exprimés par la moyenne (M) des valeurs individuelles, affectées de l'erreur standard à la moyenne ($S.E.M$). La comparaison de deux moyennes est effectuée par un test t de Student. La comparaison de plusieurs moyennes est effectuée par une analyse de variance (ANOVA) avec le facteur intoxication (Pb/Mn, T) et/ou le facteur de traitement (HE, ED) suivie éventuellement du test Post-Hoc Student-Newman-Keuls.

Les ANOVA à mesures répétées ont été utilisées pour l'analyse du facteur temps. Une probabilité $p < 0,05$ est considérée significative. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SigmaStat (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

5.10 Docking moléculaire

Auto dock vina est un programme d'amarrage moléculaire et de criblage virtuel du médicament, il est utilisé dans de nombreuses études (**Trott et Olson, 2010 ; Sandeep, 2011; Jaghoori, 2016**). Les calculs d'ancrage nécessitent des représentations du récepteur et du ligand dans un format de fichier appelé pdbqt qui est un format de banque de données de protéines modifiées (**Berman et al., 2000**), contenant charges, définitions des types d'atomes et, pour les ligands, informations topologiques (liaisons rotatives). Ces préparations de fichiers sont effectuées à l'aide d'Autodock 1.5.4 MGL Tools (**Sanner, 1999**). Les ligands pour les cycles d'amarrage ultérieurs peuvent être préparés via PyMol (**Delano, 2002**) et Autodock 1.5.4 MGL Tools. Les conformations bioactives étaient simulées à l'aide d'Autodock vina (**Trott et Olson, 2010**). Les meilleures conformations des ligands ont été analysées pour leurs interactions de liaison ont été évaluées par les énergies libres de liaison (affinité d'amarrage, kcal / mol) les liaisons interactions entre l'atome de ligand les résidus des sites actifs. Les résultats ont ensuite été analysés en utilisant PyMol et LigPlot + (**Laskowski et Swindells, 2011**).

Résultats et interprétations

6.1 Rendement en huile essentielle

La méthode d'hydro-distillation de *Mentha spicata* a permis de récupérer un rendement d'huile essentielle de *Mentha spicata*(HEM) de 0.15%. Et l'extraction de *Syzygium aromaticum* a permis d'obtenir un rendement de 12.70%.

6.2 Effet d'Ochratoxine A sur le poids corporel et le cerveau

L'étude a porté sur la détermination du poids corporel, et le poids de cerveau, chez des rats adulte qui sont intoxiqués par OTA, comparés aux rats témoins. (Tableau1).

Les résultats ont montré une réduction abordable significative dans le poids corporel des rats intoxiqués par l'OTA par rapport aux rats témoins aussi une diminution significative dans le poids du cerveau, ainsi que l'administration d'HEM par voie intrapéritonéale avec une dose de 0.1mg/ml montre une augmentation significative dans le poids corporel et le poids de cerveau.

Cependant, l'injection d'HEC chez les rats intoxiqué et traités par cette huile avec la même dose, rapporte des résultats significativement positive sur le poids corporel et le poids des cerveaux par rapport aux celles des rats intoxiqués.

D'ailleurs, le poids de cerveaux chez les deux groupes des rats traités non intoxiqué (HEC et HEM) ne montre aucune différence dans le poids corporel et le poids de cerveaux comparant aux rats témoins.

Tableau XIII Evaluation des valeurs moyennes des paramètres pondéraux des rats témoins, intoxiqué par l'OTA, intoxiqué et traité par les HEM & HEC et les traités non intoxiqués

Le groupe des rats	témoins	Intoxiqué (OTA)	Intoxiqué traité HEM	Intoxiqué par HEC	Intoxiqué traité	Témoins clou	Témoins menthe
Le poids corporel des rats	385g (±0.48)	245g (±0.048)	340 (±1.091)	315g (±1.091)	400g (±0.48)	405 (±0.48)	g
Le poids du cerveau	2.19g (±0.0018)	1.47g (±0.05)	2.06g (± 0.004)	1.92g	2.19g (±0.004)	2.19g (±0.002)	

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM (***: p<0.001).

6.3 Tests Neurocomportementaux

6.3.1 L'épreuve de la nage forcée (Forced Swimming Test)

Temps d'Immobilité (TIM)

Les résultats relatifs au test de la nage forcée permettent d'observer un temps d'immobilité (TIM) significativement supérieur ($p < 0.050$) chez les rats intoxiqués au OTA comparé à celui des rats témoins. Cette augmentation explique l'incapacité de l'animal à nager, ceci est dû à une diminution du tonus musculaire et l'instauration d'un comportement de désespoir.

De plus, l'administration de HEM (Huile essentielle de la Menthe) par voie intrapéritonéale a montré une diminution significative ($p < 0.001$) de TIM des rats intoxiqués (OTA) et traité (HEM) comparé aux rats intoxiqués par OTA, aussi une augmentation dans le TIM des rats non intoxiqués traités par HEM par rapport aux rats témoins (Figure 40).

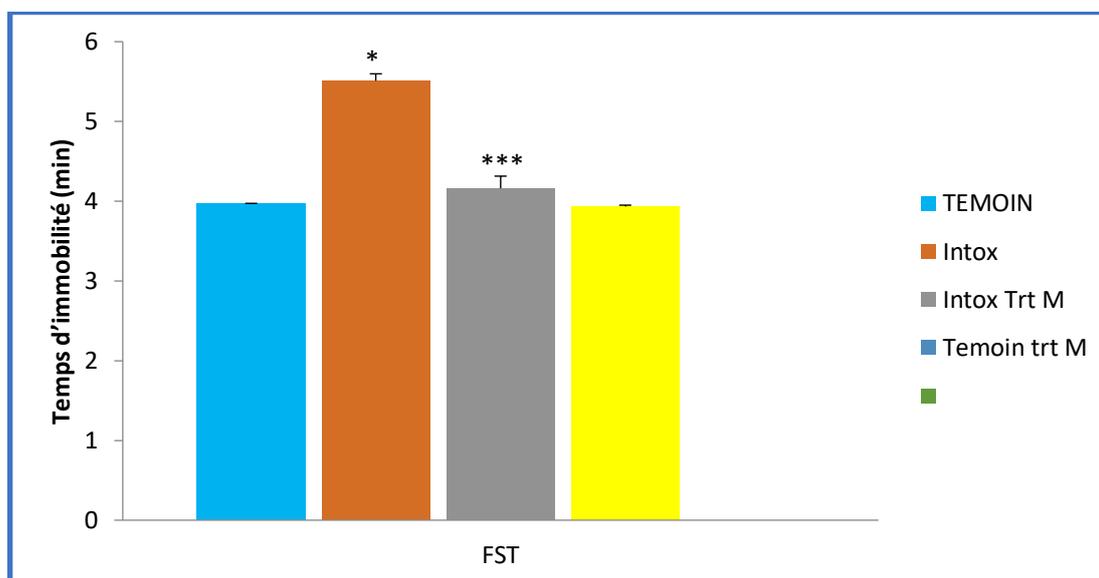


Figure 40 Temps d'immobilité durant le test de la nage forcée des jeunes rats témoins, intoxiqués au OTA, intoxiqués et traités à l'HEM.

Dans le même contexte, l'administration de HEC (huile essentielle de clou de girofle) a montré une diminution de TIM des rats intoxiqués et traités (HEC) par rapport aux rats intoxiqués. De plus, nous avons observé une diminution significativement supérieure ($p < 0.001$) de TIM des rats intoxiqués traités par l'HEC (OTA-HE) à celui des rats intoxiqués, ce qui pourrait s'expliquer par une réduction dans le comportement de désespoir (Figure 41).

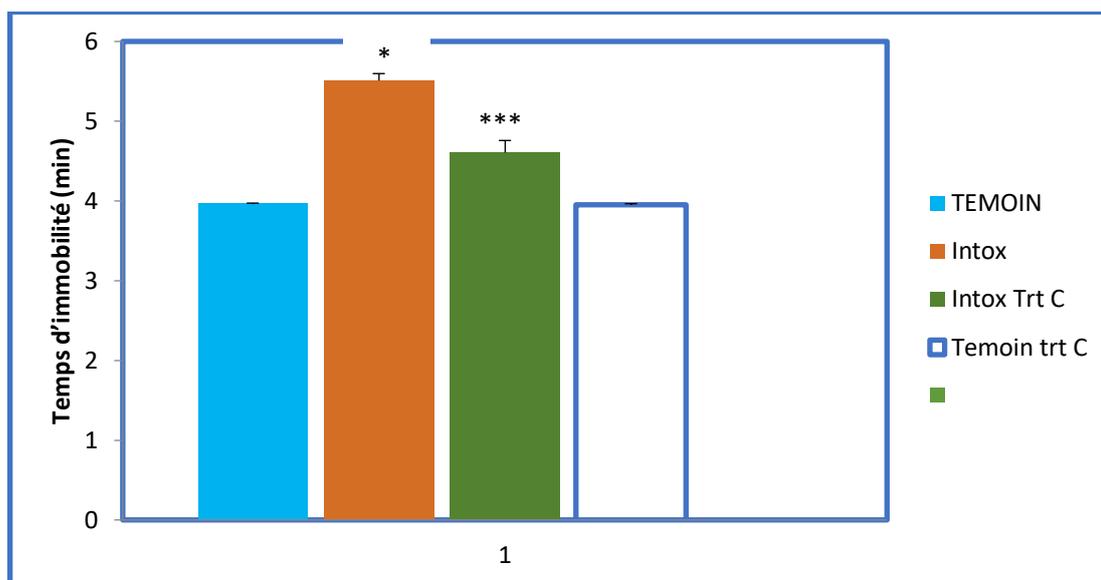


Figure 41 Temps d'immobilité durant le test de la nage forcée des jeunes rats témoins, intoxiqués à l'OTA, intoxiqués et traités à l'HEC.

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM (***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$).

6.3.2 Test d'Open Field

Ce test permet d'évaluer la réaction de l'animal vis-à-vis d'un nouveau et spécial environnement, ainsi que son envie d'explorer les espaces.

Les résultats enregistrés permettent d'observer que les rats intoxiqués (OTA) présentent une hypoactivité locomotrice (horizontale et verticale) qui est représentée par le nombre de carreaux traversés et le nombre de redressement respectivement ($p < 0.001$; $p < 0,001$) par rapport aux rats témoins, en outre, les résultats ont montré l'installation d'un état d'anxiété chez le groupe intoxiqué (OTA) qui est observé par une baisse significative du nombre de visites du centre comparé aux rats témoins ($p < 0.001$), Aussi une augmentation significative dans le temps de latence ($p < 0.001$).

Par ailleurs, l'injection de 0.1mg/kg de HEM montre une légère amélioration significative ($p < 0.001$) de l'activité locomotrice chez les rats intoxiqués et traités par rapport aux rats intoxiqués OTA. On évalue une augmentation dans les nombres des carreaux traversés et le nombre de visites de centre et de redressement, une diminution très significative ($p < 0.001$) dans le temps de latence chez les rats traités par rapport aux rats intoxiqués, d'ailleurs, aucune différence dans le nombre de défécation et de toilettage chez les rats traités par rapport aux rats intoxiqués ($p < 0.001$) (figure 42).

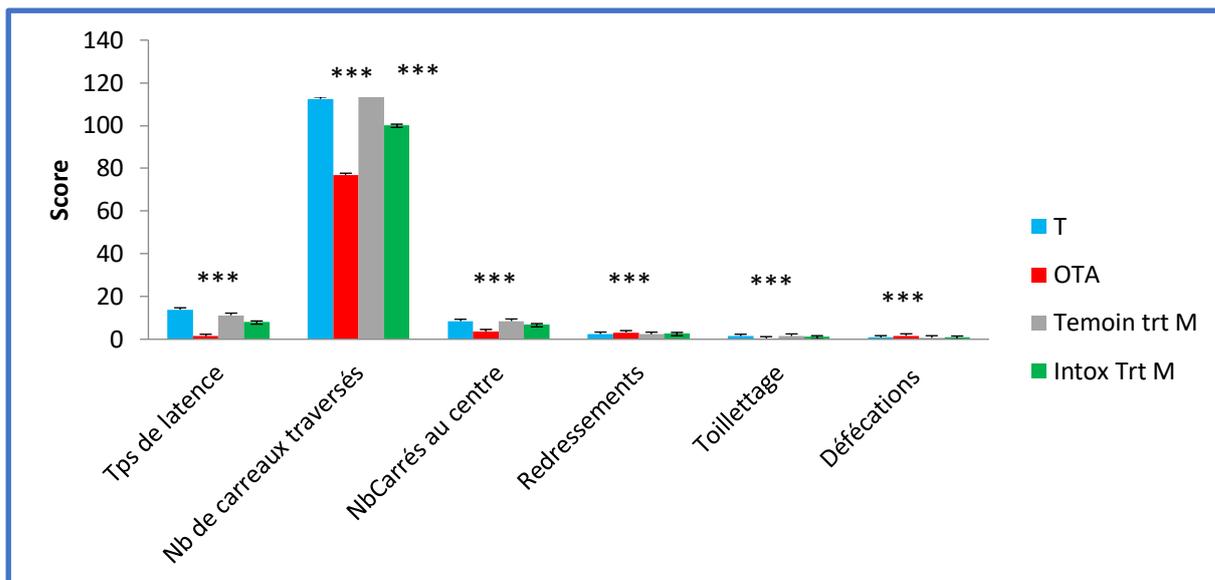


Figure 42 La comparaison des différents paramètres du test d’Open Field entre les rats témoins, intoxiqués par OTA, intoxiqués et traités à l’HEM.

D’ailleurs, l’administration d’HEC par voie intrapéritonéale chez des rats intoxiqués traités par cette huile reflète sur l’augmentation significativement supérieure ($p < 0.001$) dans l’activité locomotrice des rats intoxiqués (OTA) et traités en terme de redressement et de nombre des carreaux traversés aussi une diminution significative ($p < 0.001$) dans l’état d’anxiété de ces rats évaluant par le nombre de visites au centre, et par la suite aucune différence significative n’a été remarquée dans le nombre de toilettes et de défécations ($p < 0.001$); ($p < 0.001$). (Figure 43).

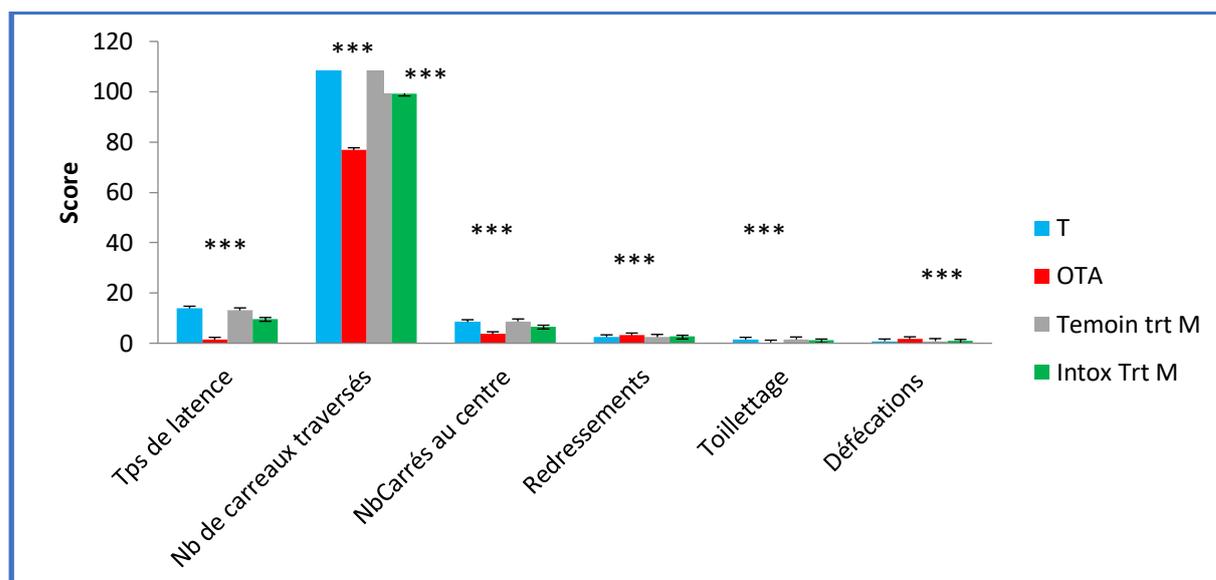


Figure 43 : La comparaison des différents paramètres du test d'open Field entre les rats témoins, intoxiqués à l'OTA, intoxiqués et traités à l'HEC.

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM ; OTA vs T (***: $p < 0.001$); OTA-HEM vs OTA-HEC (***: $p < 0.001$) ; (*: $p < 0.001$).

6.3.3 Test de Dark/Light

Les résultats enregistré nous permet d'observé que le temps passé dans les compartiments éclairé est significativement supérieur ($p < 0.050$) chez les rats intoxiqués (OTA) par rapport aux rats témoins qui présente un temps très important dans le compartiment sombre, ce qui montre un comportement d'anxiété chez les rats intoxiqué (OTA).

En outre, L'administration de HEM par voie intrapéritonéale rapporte une diminution significativement supérieur ($p < 0.050$) en terme de temps passé dans le compartiment éclairé, ainsi que les rats non intoxiqué traité par HEM présente un temps élevé dans le compartiment sombre que le compartiment éclairé par rapport aux rats témoins. (Figure 34)

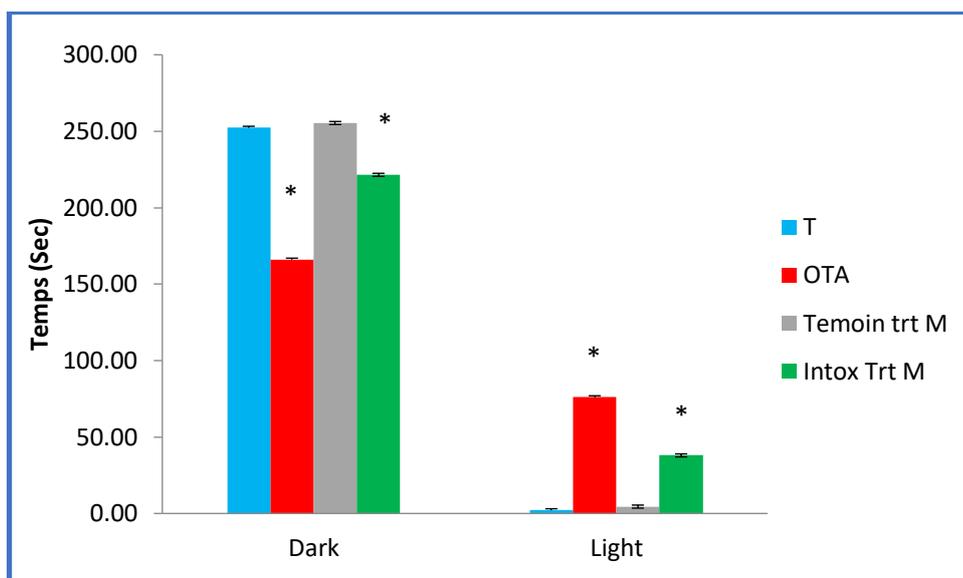


Figure 44 : la comparaison de temps passé dans les deux compartiments de obscurité / lumière entre les rats témoins, intoxiqués au OTA, intoxiqués et traités à l’HEM, traité non intoxiqué.

Par ailleurs, l’injection d’HEC par voie intrapéritonéale permet d’observé une réduction significative ($p < 0.050$) au terme de temps passé dans le compartiment éclairé chez les rats intoxiqués (OTA) et traité par HEC par rapport aux rats intoxiqués. Ainsi que les rats non intoxiqué traité par HEC présente un résultat positif comparant aux rats témoins.

Figure 35

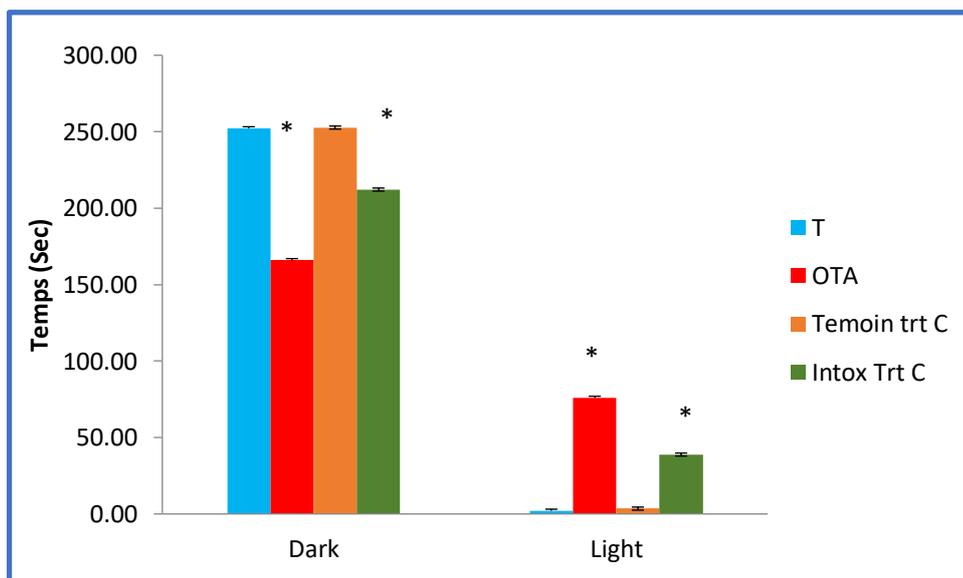


Figure 45 la comparaison de temps passé dans les deux compartiments de dark / light entre les rats témoins, intoxiqués au OTA, intoxiqués et traités à l’HEC, traité non intoxiqué.

6.3.4 Test de Piscine de Morris

Ce test permet d'évaluer la capacité de mémorisation spatiale et l'apprentissage, y compris l'acquisition des données spatiales visuelles, aussi joue un rôle important dans la validation des modèles de rongeurs pour les troubles neurocognitifs.

Les premiers jours du test : aucune différence n'a été observée chez les rongeurs ce qui pose que tous les rongeurs sont capables de voir la plate-forme et le pavillon-repères dans le milieu environnant, et peut nager de façon acceptable,

Pendant les quatre jours où la plateforme est cachée, on a observé une différence dans la latence d'échappement et la longueur du trajet et le temps de latence, ce qui montre que les rats intoxiqués (OTA) présentent un temps de latence significativement ($p < 0.001$) élevé par rapport à celle des rats témoins. Et les deux groupes des rats intoxiqués traités (OTA-HEM-HEC) présentent une amélioration dans la capacité de mémorisation et d'apprentissage spatiale représentée par une réduction dans le temps de latence et ont montré une latence plus courte pour échapper sur la plate-forme cachée sur le 3^{ème} et le 4^{ème} jour aussi une longueur plus courte de natation avant de s'échapper vers la plate-forme cachée. (Figure 46); (Figure 47).

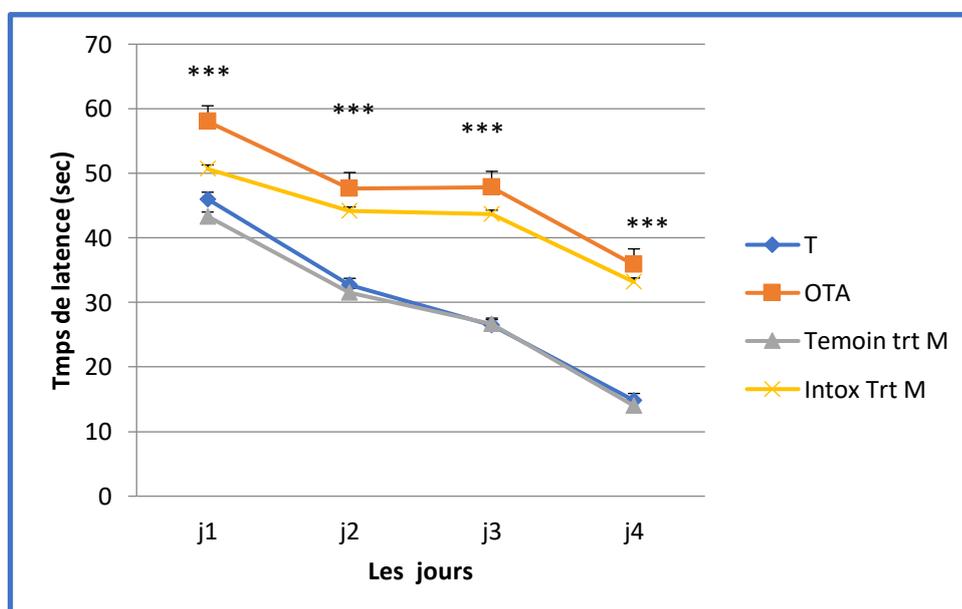


Figure 46: la différence dans le temps de latence chez rongeurs : témoins, OTA, et OTA-HEM durant les quatre jours de la piscine de Morris.

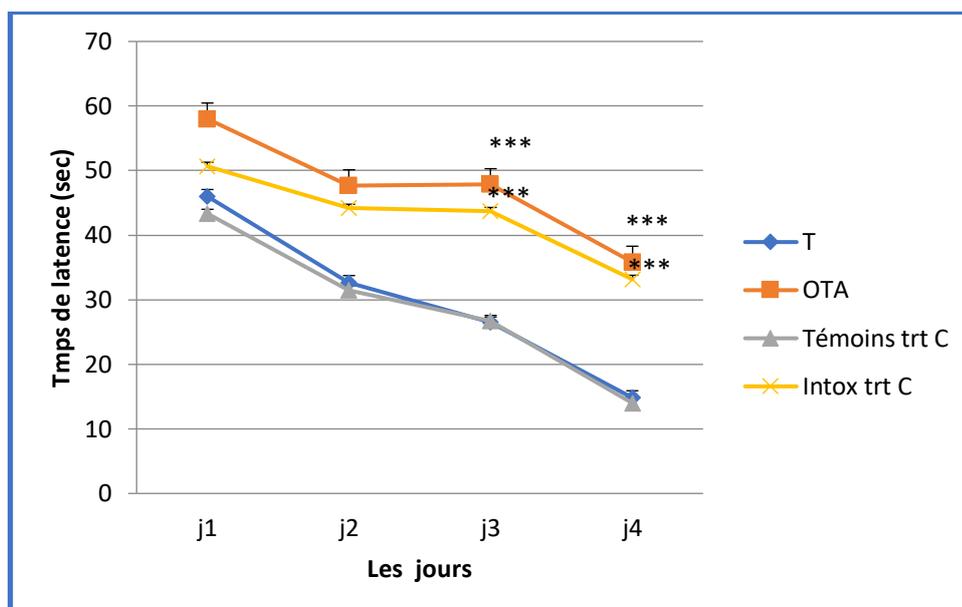


Figure 47: la différence dans le temps de latence chez rongeurs : témoins, OTA, et OTA-HEC durant les quatre jours de la piscine de Morris

D'ailleurs, le probe test permet d'évalué la capacité de mémorisation, les rats intoxiqués (OTA) passe un temps significativement réduit ($p < 0.001$) dans le quadrant cible (NO : où la plate-forme cachée était auparavant placé) par rapport aux rats témoins.

De plus, Les résultats montrent que le nombre de fois où le rats a voyagé dans le troisième quadrant (NO) était significativement supérieure ($p < 0.001$) avec le traitement par HEM par rapport aux celle intoxiqués par l'OTA, ce qui indiquent que le traitement améliore significativement les déficits de mémoire vu dans les rats intoxiqué (OTA). (Figure 48)

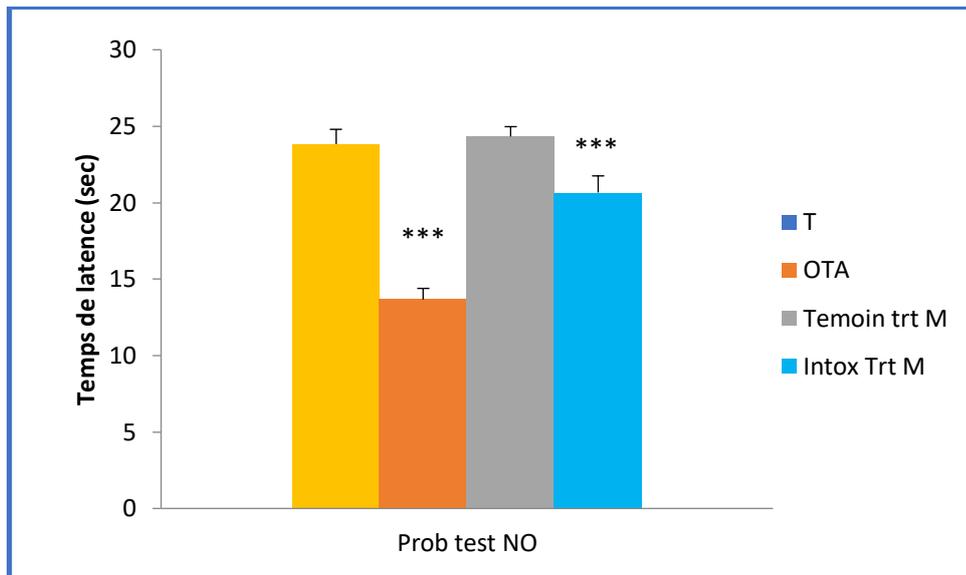


Figure 48: la différence dans le temps de latence chez rongeurs durant le probe Test : témoins, OTA, et OTA-HEM durant les quatre jours de la piscine de Morris (***: $p < 0.001$).

De plus, l'injection de HEC chez les rongeurs intoxiqués(OTA) et traités par cette huile présente une augmentation significativement supérieur ($p < 0.001$) dans la capacité de mémorisation présentée par une augmentation dans le temps passé dans le quadrant cible (NO) par rapports aux rats intoxiqués (Figure 49).

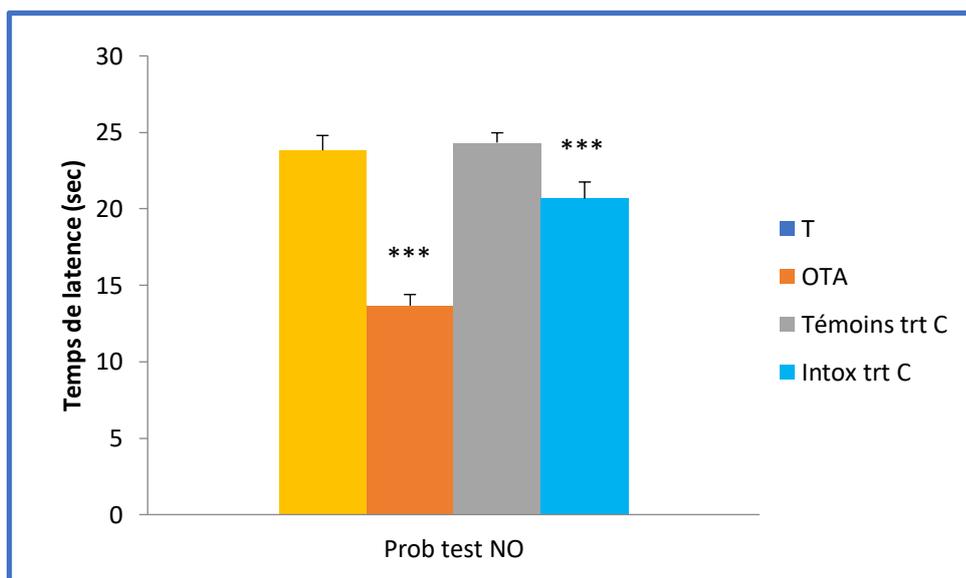


Figure 49 : la différence dans le temps de latence chez rongeurs durant le probe Test : témoins, OTA, et OTA-HE durant les quatre jours de la piscine de Morris (***: $p < 0.001$)

Par ailleurs, les résultats de test de vision permet d'évalué que tous les rats soit intoxiqué ou témoins ou témoins traités sont capable de voire le drapeau et par la suite la plateforme fixé. (Figure 50) (Figure 51)

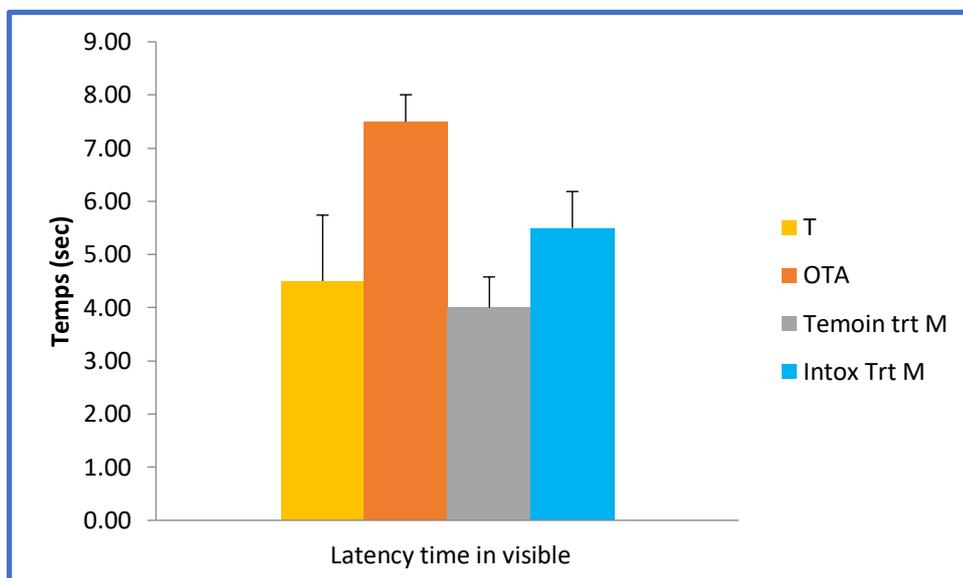


Figure 50 : la différence de temps de latence durant le test de vision chez les rats : intoxiqué (OTA), témoins, et intoxiqué traité par HEM.

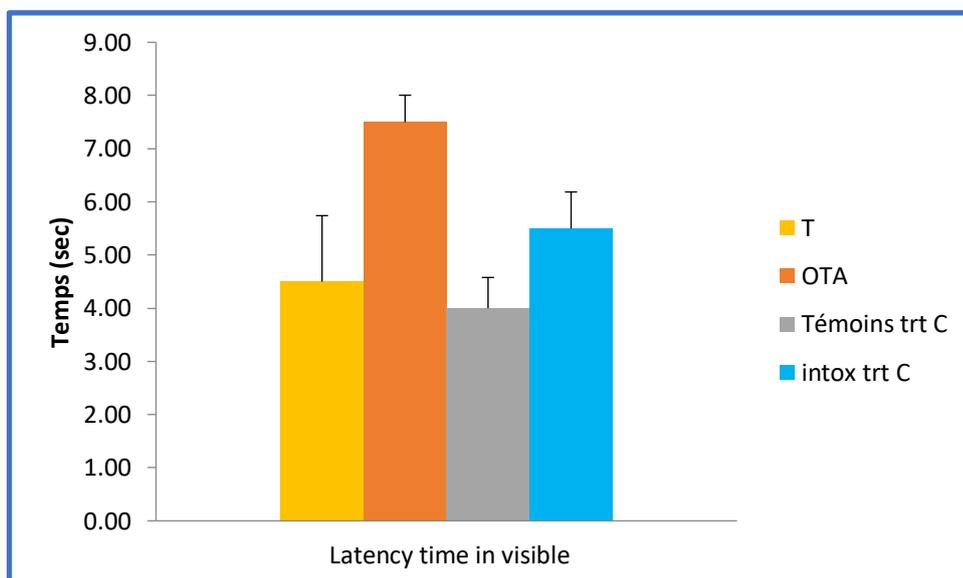


Figure 44 : la différence de temps de latence durant le test de vision chez les rats : intoxiqué (OTA), témoins, et intoxiqué traité par HEC.

6.4 Dosage Biochimique :

Taux de glycémie

Les résultats montrent une augmentation significative ($p < 0.05$) du taux de la glycémie chez les rats intoxiqués (OTA) par rapport aux rats témoins. D'ailleurs, le traitement par HEM rapporte une diminution significative ($p < 0.05$) dans le taux de glycémie chez les rats intoxiqués traités par HEM par rapports aux celles des rats intoxiqués (OTA). (Figure 51)

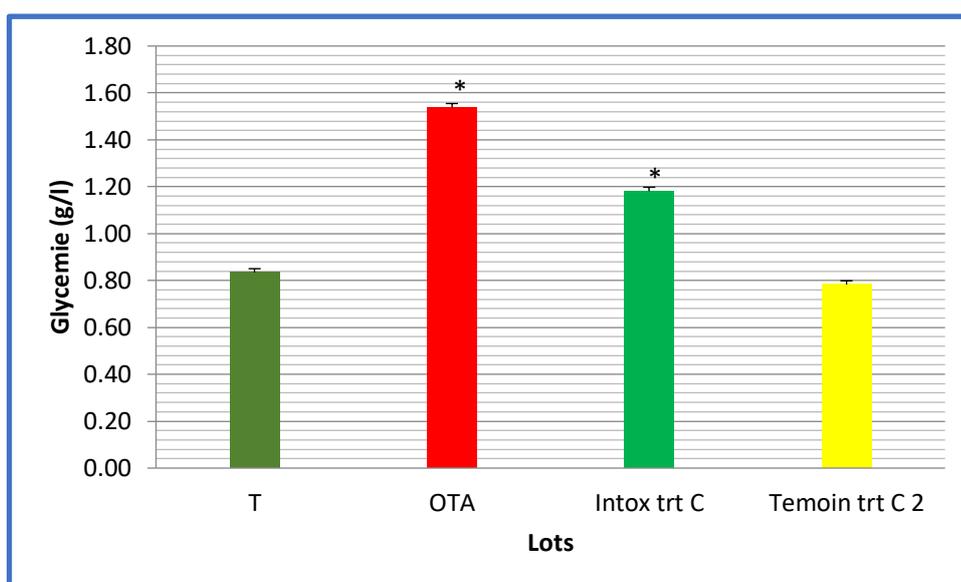


Figure 51 : Le dosage de la glycémie chez les rats témoins, intoxiqués par l'OTA, intoxiqués et traités à l'HEM.

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM ; OTA vs T (*: $p < 0.05$), OTA vs OTA-HEM (*: $p < 0.05$).

Cependant l'administration de HEC a permis d'enregistrer une baisse significative ($p < 0.05$) dans le taux de glucose chez les rats traités par cette huile (**Figure 52**)

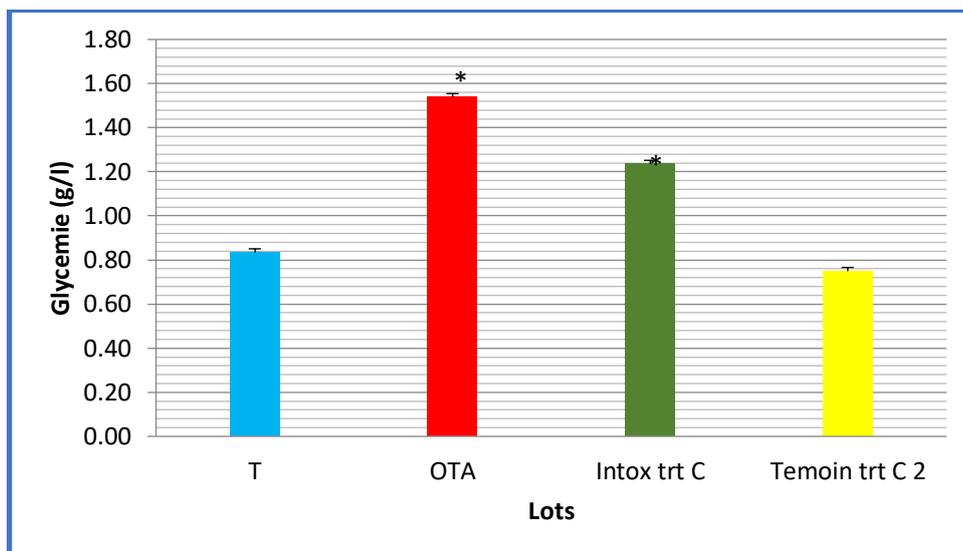


Figure 52 : Le dosage de la glycémie chez les rats témoins, intoxiqués par l’OTA, intoxiqués et traités à l’HEC.

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SEM ; OTA vs T (*: $p < 0.05$), OTA vs OTA-HEC (*: $p < 0.05$).

Taux de Cortisol

Les résultats montrent une augmentation significative ($p < 0.05$) du taux de cortisol chez les rats intoxiqués(OTA) par rapport aux rats témoins , cependant l’administration de HEM a permis d’enregistré une baisse significative ($p < 0.05$) dans le taux de cortisol chez les rats intoxiqué traité OTA-HEM par rapport aux celle des rats intoxiqués (OTA) . (Figure 53)

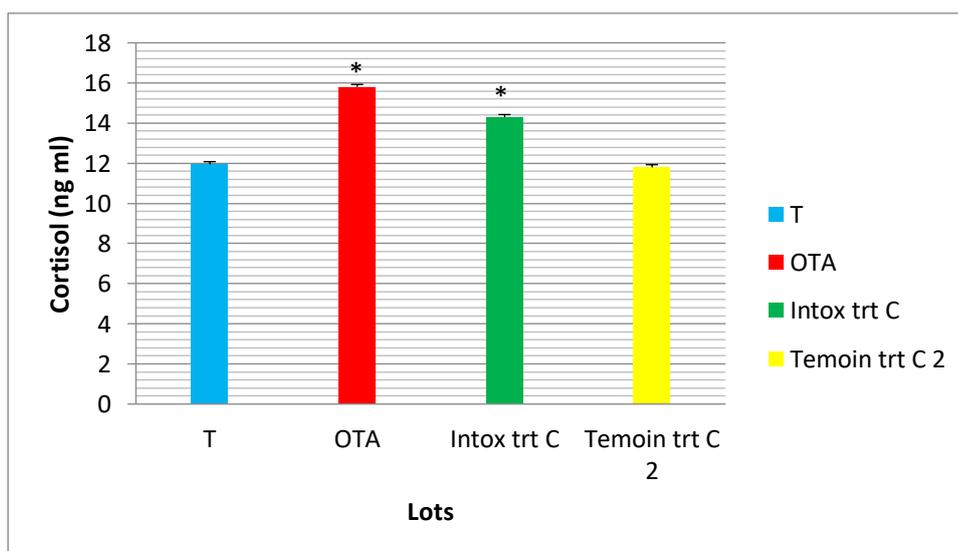


Figure 53 : le dosage de cortisol chez les rongeurs : OTA, OTA-HEM et témoins exprimé en terme de signification ($p < 0.05$)

Cependant, l'injection de HEC chez les rats intoxiqué traité par HEC présente une diminution significativement supérieur ($p < 0.001$) dans le taux de cortisol par rapport aux rat intoxiqué(OTA) ce qui montre leurs effet anxiolytique. (Figure 54).

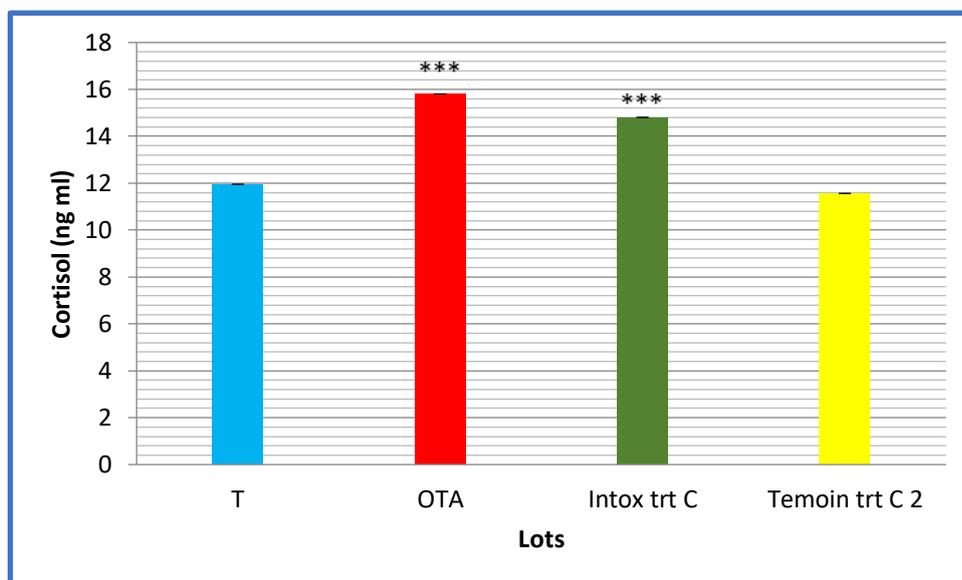


Figure 54: représente le dosage de cortisol chez les rongeurs : OTA, OTA-HEM et témoins exprimé en terme de signification (***) : $p < 0.001$).

6.5 Etude histologique :

L'étude histologique du tissu de cerveau a montré que l'OTA provoque plusieurs lésions cérébrales principalement des hémorragies dans différentes régions du cerveau,(**Figure.b**)

Les Neurones dans la plus part des parties de toutes les groupes des rats avait tout à fait normale, en effet, dans certains régions on a remarqué des changements neurodégénératives avec un gonflement des Astrocytes et une gliose focale. (**Figure .c**)

Dans le même contexte, dans le cervelet on a observé un très petite nombre de neurone de Purkinje éosinophile (**Figure .a**) , Ainsi que une congestion marqué et des hémorragies dans le cerveau et les méninges .

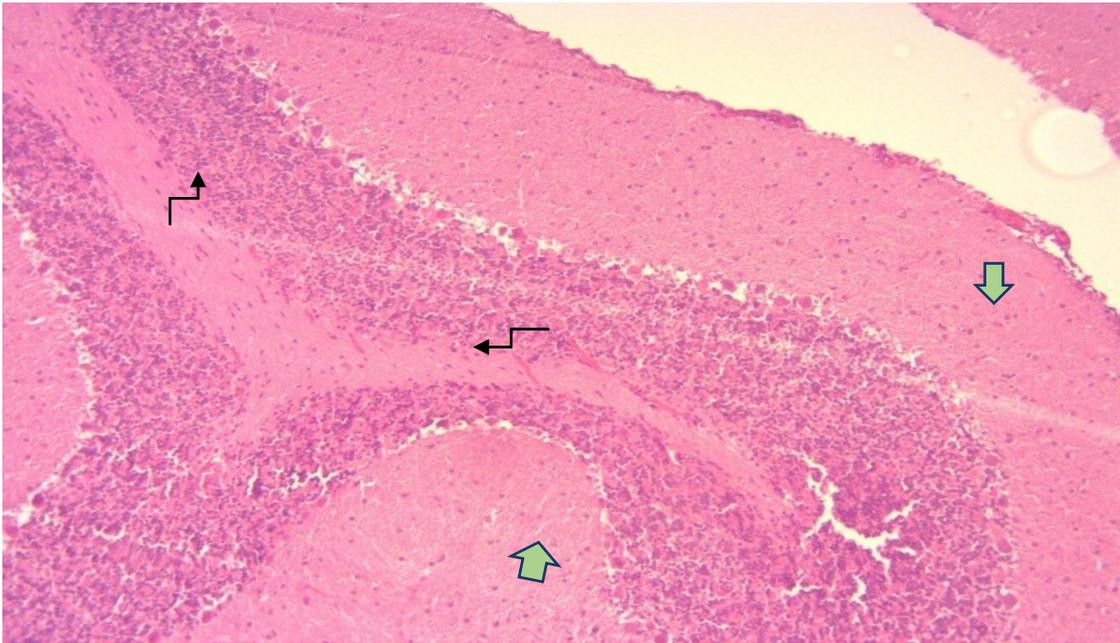


Figure 55 photomicrographie des lésions cérébrales, neurone de Purkinje éosinophile, congestion marquée et hémorragies du cerveau et des méninges .H&E. 100x

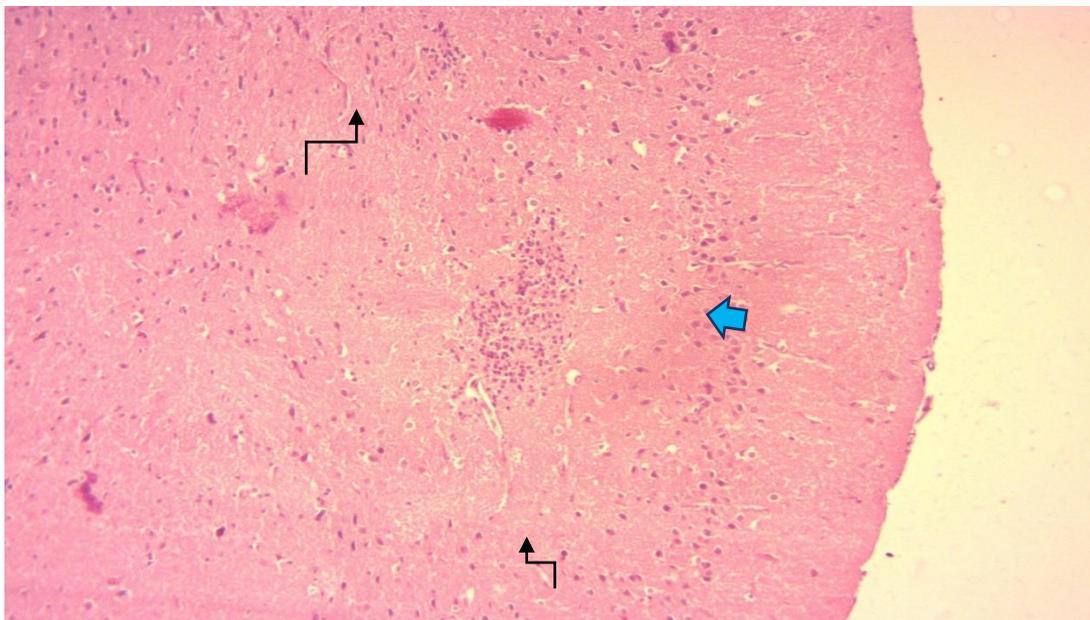


Figure 56 photomicrographie des lésions cérébrales, hippocampique, neurones pyramidaux légèrement éosinophiles, bourrelet péri vasculaire marqué .H&E. 100x

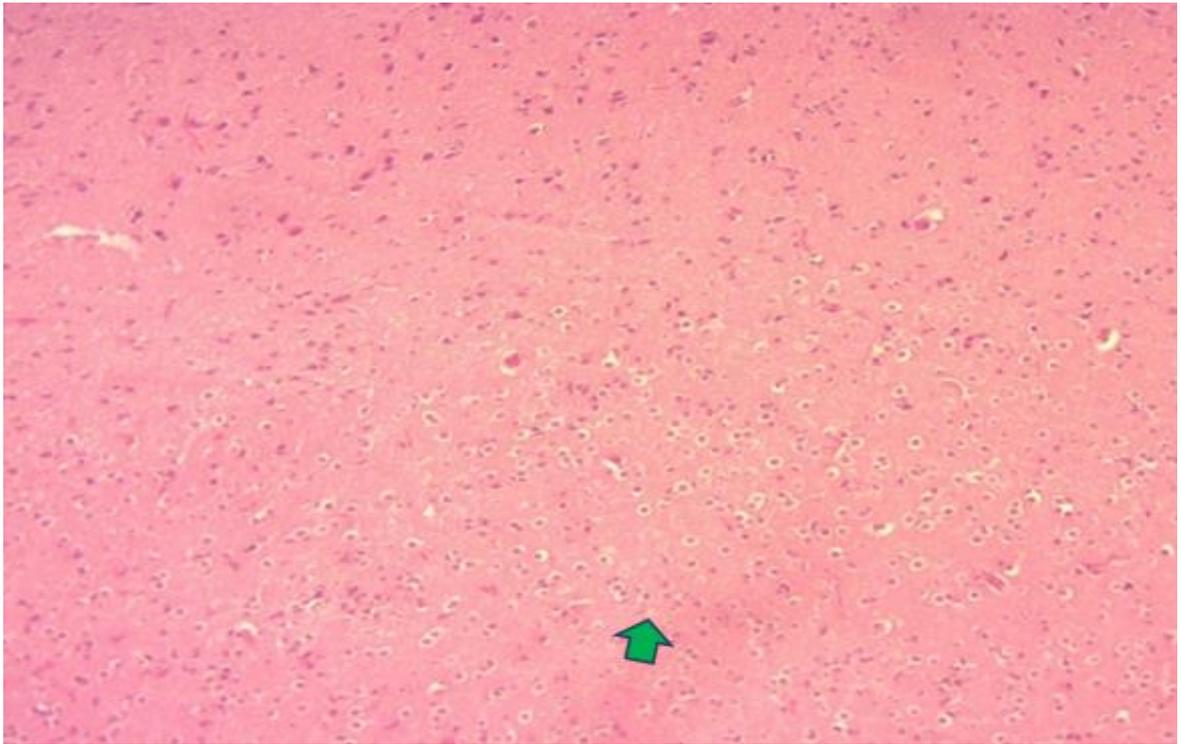


Figure 57 photomicrographie des lésions cérébrales, changement neurodégénératives, et une gliose. H&E. 100x

Le traitement par l'HEM et l'HEC présente le même effet sur les tissus cérébrale réparant et montrent une structure plus ou moins normale de l'aspect tissulaire

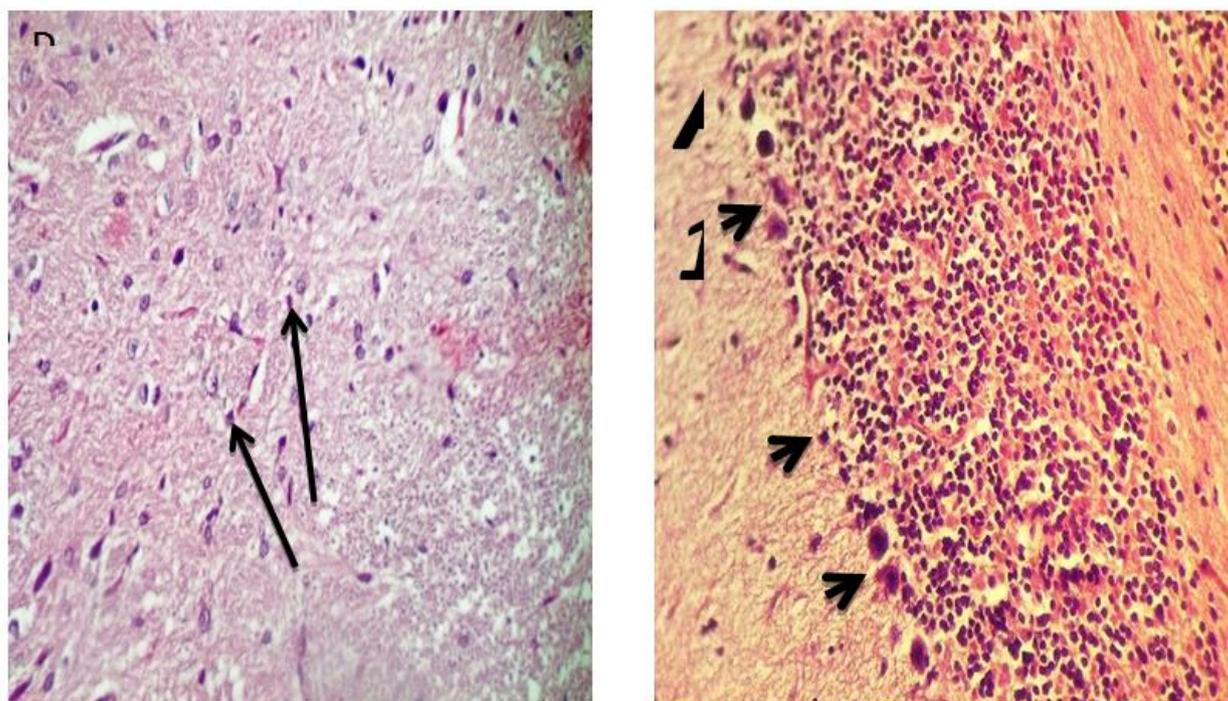


Figure 58 Vue au microscope photonique d'un tissu du cortex cérébelleux colorées à l'hématoxyline et de l'éosine G:(x 40). A la droite : sections du cortex cérébelleux des rats témoins et à la gauche des rats traités avec l'HEC et HEM sont apparus avec une architecture normale des rats intoxiqués aux OTA et traités avec l'HEC et HEM.

6.6 Docking moléculaire

Les résultats indiquent qu'il y a une affinité entre l'Ochratoxine A et les récepteurs d'NMDA et que l'eugénol qui est le composant actif dans l'HEC montre un effet sur la fixation de l'Ochratoxine A sur les NMDA, tandis que le Carvone ne présente aucune affinité avec les NMDA. (Tableau).

Tableau XIV Interaction des molécules avec le récepteur NMDA

Ligand	Amarrage Kcal/mol	Meilleur mode rmsd u.b.	Bande d'interaction d'hydrogène	Distance (Å)
Ochratoxine	- 8.1	0	Ile 548 (C)	2.89
Egeunol	- 5.4	0	Lys 458 (D)	2.84
Carvone	-4.9	0	-	-

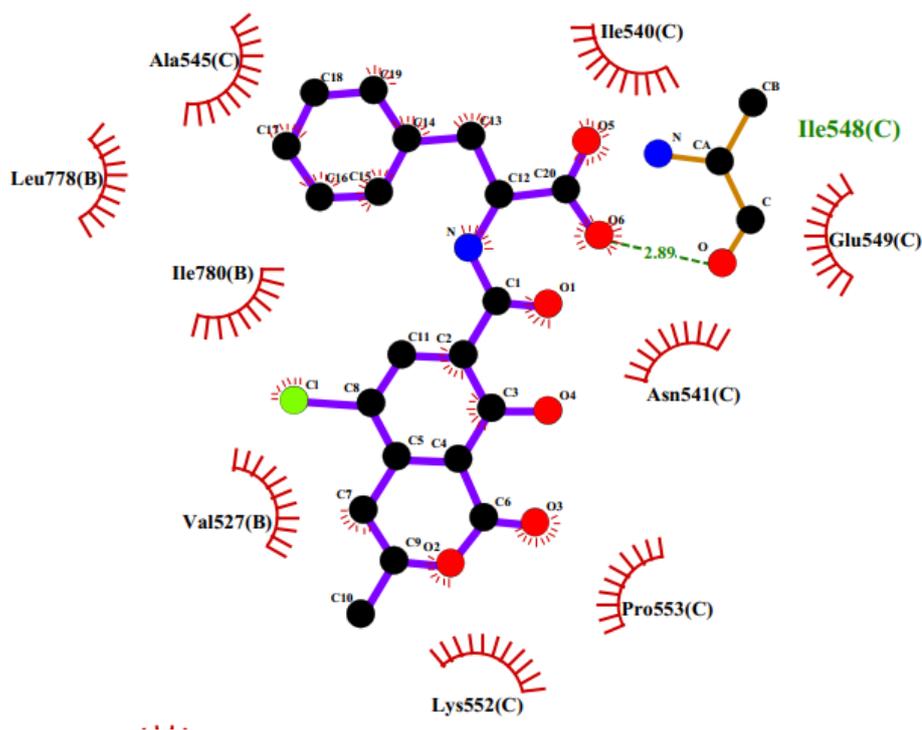


Figure 59 le docking moléculaire de la molécule Ochratoxine A avec le récepteur NMDA

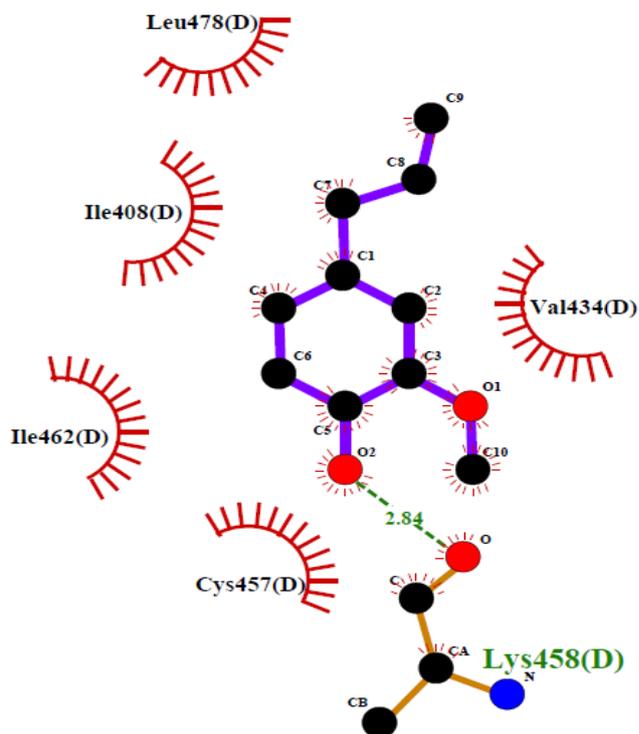


Figure 60 le docking moléculaire de la molécule Eugénol avec le récepteur NMDA

DISCUSSION

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits par diverses espèces de champignons. Ces métabolites sont hautement toxiques, on les trouve couramment dans les aliments et se transmettent aux humains et aux animaux. Les mycotoxines représentent un problème sérieux en raison de leurs impact sur la santé humaine, car elles peuvent causer à un patient de nombreux troubles cliniques divers et non spécifiques, puisqu'elles sont connues par leurs induction de : toxicité, inflammation, cancer et dommages dans divers organes tels que cerveau, rein, foie comme ils peuvent altérer l'immunité (Iqbal et al., 2021)

L'Ochratoxine A est la mycotoxine majeur qui contamine les aliments, elle est produite par les espèces *Aspergillus* et *Penicillium*. Elle peut être introduite à l'homme par les aliments contaminés comme : les céréales, le porc et le café (Sueck et al., 2019). L'Ochratoxine A peut agir comme agent cancérigène et neurotoxine, elle provoque une neurotoxicité avec une forte affinité avec le cerveau (Paradells et al., 2015)(Sunwoo Park et al.,2019). Comme il est déjà cité, l'OTA est un agent néphrotoxique, hépatotoxique, tératogène et immunotoxique (O'Brien et al, 2005; Pfohl- Leszkowicz et al, 2007; Ringot et al., 2006 ; Pfohl-Leszkowicz et al., 2002).

On a réalisé une administration par voie intrapéritonéale d'une dose de 289µg/kg/48h d'OTA. Cependant, l'OTA est détectable dans la plupart des échantillons de sang, même à de faibles niveaux, sa nature lipophile lui permet de franchir toutes les barrières par une diffusion transcellulaire (Kholová et al.,2021 ; Behrens et al.,2021) elle est également connue comme la cause de néphropathie endémique des Balkans (Agarwal et al., 2020). Le Centre international de recherche sur le cancer a classé l'OTA comme agent cancérigène de type 2B, et il a aussi été découvert qu'elle est également capable de causer des dommages à l'ADN (Sueck et al., 2019).

Le système nerveux central (SNC) est l'un des organes les plus exposés à différents types de blessures et d'altérations telles que celles induites par des agents toxiques capables de traverser la barrière hémato-encéphalique (Sara et al., 2014 ; Abbott et al., 2010). il a été rapporté que la mycotoxine Ochratoxine A (OTA), produite par un certain nombre d'espèces fongiques *Aspergillus* et *Penicillium*, peut provoquer des troubles neuropsychologiques ou des troubles mentaux et émotionnels, mais le mécanisme de la neurotoxicité reste inconnu (Babayan et al.,2020). Comme Il a été

déjà trouvé que l'OTA peut traverser la barrière hémato-encéphalique et s'accumule dans le cerveau comme elle provoque des neuro-inflammations, une neurotoxicité et des dommages au niveau du cerveau, elle provoque également l'apoptose et des dommages à l'ADN (Nourbakhsh et al., 2021), mais il manque encore des études sur ses effets sur le SNC, et à quel niveau ces effets peuvent atteindre, et aussi des recherches pour pouvoir réduire sa neurotoxicité et protéger cet organe de cette toxine.

La nature représente une grande diversité de plantes dont certaines peuvent être utilisées dans le but de guérir de nombreuses maladies, ce que l'on appelle la phytothérapie. Les huiles essentielles, sont des composés phénoliques secondaires produits par les plantes aromatiques (Aswir et al., 2021; Osbourn et al., 2009). Les huiles essentielles sont de nature volatile, elles peuvent être obtenues à partir de différentes parties de la plante (Esposito et al., 2014)(Hsieh et al., 2000). Ils sont largement utilisés pour leurs multiples effets bénéfiques tels que: antiviral, antibactérien, antifongique, amélioration de la mémoire, remède médicinal, conservation des aliments, en cosmétique, aromathérapie, antioxydant et bien d'autres applications (Cioanca et al., 2015).

La *Mentha spicata* fait partie de la famille des lamiacées, c'est l'un des populaires espèces de son genre, elle contient 27 composés phénolique identifié par la chromatographie (HPLC) (Gokhan Zengin et al ,2022). Nous avons ciblé la menthe verte cultivée dans la wilaya de Saida comme objet de notre étude, elle a été obtenue par hydro distillation.

Le clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) appartient à la famille Myrtacées originaires des îles Moluques, dans l'Est d'Indonésie. Le composant majeur de l'huile essentielle est l'Eugénol, un phénylpropanoïde volatil largement utilisé dans l'industrie pharmaceutique, Il contient également de l'acétate d'eugénol, du β -caryophyllène et humulène (Teles et al., 2021; Cortés-Rojas et al., 2014 ; de Mello et al., 2014) *Syzygium aromaticum* a démontré activité antivirale contre les virus d'origine alimentaire, activité anti microbienne, et l'efficacité dans le traitement des infections bactériennes (Faujdar et al., 2020 ; Aboubakr et al., 2016 ; Oliveira et al., 2014). En plus l'étude de Moghadam et al (2019) a démontré l'activité anti-fongique de l'huile essentielle du

Clou (HEC) contre l'*Aspergillus ochraeus*, et aussi l'étude de Dixit et al (2022) a montré un effet anti-fungi du HEC contre l'*Aspergillus ochraeus* et *Penicillium verrucosum*.

7.1 Le rendement des huiles essentielles

L'huile essentielle de la *Mentha spicata* a été extraite par hydrodistillation, avec un rendement de 0,15%. **Brahimi et al (2020)** ont obtenu un rendement de 0,83% tandis que **Lucchesi et al.,(2004)** et **Priscilla et al.,(2010)** ont obtenu une valeur de (0,23±0,04%) et (0, 60±0,06-%) respectivement. Aussi **Boukenna et al (2007)** ont obtenu un rendement de 1,04%. Cette différence de rendement peut être attribuée à plusieurs facteurs dont, la météo et l'origine géographique de l'espèce, la période de récolte, le temps de séchage et la technique d'extraction des huiles essentielles (**Brahimi et al., 2020 ; Karousou et al., 2005**)

L'huile essentielle du *Syzygium aromaticum* a été extraite par une hydrodistillation, un rendement de 12,70% a été enregistré. **Adli et al (2017)** ont obtenus un rendement de 10,60%, pendant que **Souidi. (2020)** a enregistré un rendement de 10,18%. **Selles et al.,(2020)** ont obtenues un rendement de (11.6% ± 0.7). Les résultats d' **Alfikri et al. (2020)** ont montré que les bourgeons floraux des jeunes arbres produisaient un rendement plus élevé (16,73 %) que celui des arbres matures ceux (14,93%), et aussi que la quantité de la molécule la plus abondante du *Syzygium aromaticum* qui est l'Eugénol a augmenté avec la maturité des stades de floraison.

7.2 Effet de l'Ochratoxine A sur la croissance des rats

L'exposition des rats Wistar à une dose de 289µg/Kg d'OTA pendant 2 semaines par une voie intrapéritonéale, nous a fait observer une diminution significative du poids corporel et du poids du cerveau des rats par rapport aux rats témoins, nos résultats sont en accord avec **Nogaim et al., (2020)**, qui a observé une diminution dans le poids des rats qui ont reçu une dose de (20mg/kg) d'OTA administré par une voie orale.nos résultats sont aussi en accord avec **Izco et al. (2021)**, qui ont remarqué une diminution dans le poids des rats et dans le poids du cerveau après une administration de 0.21, 0.5, 1.5 mg/Kg par voie orale. Cela est dû à la réduction de l'apport alimentaire. En fait l'OTA est connue pour son effet d'inhibition de la synthèse des protéines qui

peut conduire à la perturbation du métabolisme des protéines. Ce mécanisme peut être attribué à son effet de perte de poids (**Abdel-Wahhab et al., 2017**);(**Nourbakhsh et al., 2021**) Pendant que la diminution du poids du cerveau peut être attribué du aux dommages induits par l'Ochratoxine A

D'autre part, nous avons enregistré une augmentation significative du poids corporel et celui du cerveau des rats traités avec l'huile essentielle de *Mentha spicata* par injection intrapéritonéale, par rapport au groupe traité à l'OTA. Nos résultats sont en accord avec **Saad et al (2019)** qui ont remarqué une augmentation du poids corporel et du cerveau de leurs rats expérimentaux après l'administration d'un extrait de la *Mentha spicata*.

Cette augmentation peut être due aux effets correctifs de l'huile essentielle des dommages induits par l'Ochratoxine A, et aussi selon **Amal, (2012)** l'addition de l'huile essentielle de la *Mentha spicata* augmente significativement l'apport alimentaire chez les poussins de chair, comme il peut être attribué aux composés terpénoïdes qui agissent en stimulant le transport du glucose dans les cellules (**Brahmi, 2020 ; Vinay Dwivedi et al., 2011**)

L'administration d'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* comme un traitement montre des résultats significative en augmentant le poids pondérale et du cerveau des rats traités par cette huile par rapport aux rats intoxiqués. Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Meryem et al. (2018)**, qui indiqué que l'administration d'HE de *Syzygium aromaticum* augmente le poids de cerveau qu'était diminué sous l'effet de H₂O₂.

7.3 Tests neurocomportementaux

Pour une meilleure étude de certaines maladies neuro-psychotiques, différents tests comportementaux sont réalisés. Ils sont si utiles pour trouver de nouveaux composés anxiolytiques, pour les tester et les évaluer sur des animaux avant leurs utilisations par l'homme (**Himanshu et al., 2020**). Les tests de neurocomportement son réalisé à partir de la 6^e dose (289µg/Kg/48h) de l'OTA administré au rats et aussi à

partir du 6^e jour du traitement par l'huile essentielle de la *Mentha spicata* et du *Syzygium aromaticum*

7.3.1 Effet de l'OTA HEM et HEC sur la performance d'anxiété et de locomotion évalué par les tests Open-field et Dark/Light

Le test Open-field, est un test largement utilisé pour l'évaluation de la locomotion et l'anxiété chez les rongeurs (**Kraeuter et al., 2018**). Nos résultats ont montré que l'exposition des rats Wistar à l'OTA a induit une hypoactivité, qui était reflété par une diminution du nombre des carreaux traversé et du nombre des visites du centre, pendant qu'une augmentation dans certains comportements stéréotypés (défécation, toilettage, redressement) avec un temps de latence élevé a été enregistré, qui reflètent un état anxieux du rat intoxiqué.

La recherche de **Tanaka et al (2016)** consiste à une exposition à l'OTA a montré une diminution dans le nombre des interneurons GABAergique, comme il faut mentionner que les interneurons GABAergiques jouent un rôle important dans la prolifération et la maturité des neurone dans le gyrus denté adulte (**Tanaka et al 2016 ; Masiulis et al., 2011**). Des troubles de fonction GABAergique peuvent provoquer des comportements anxieux et dépressifs parmi d'autres troubles neuropsychiatriques (**Rosell-Valle et al., 2021**) dans le même contexte, **Zhu et al (2019)** ont démontré qu'une diminution des GABAergiques interneurons a été accompagné par un état d'anxiété chez des souris. Le GABA est connues pour son effet anxiolytique en inhibant l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS) par l'Hippocampe à travers une projection neuronale GABAergique aux noyaux paraventriculaires de l'Hypothalamus, sa fixation sur son récepteur spécifique qui conduit à une entrée massive du Cl⁻ qui résulte en une hyperpolarisation et ensuite l'inhibition du neurone cible (**Tafet et al., 2020**). Ces recherches consolident et justifient nos résultats qui montrent l'état d'anxiété des rats intoxiqués.

Des auteurs ont mentionné que l'OTA provoque une perte de dopamine striatal, ce qui induit la réduction de ce neurotransmetteur (**Izco et al., 2021**) Le système dopaminergique a été impliqué dans de nombreux aspects différents du fonctionnement du cerveau, y compris la locomotion (**Grace et al., 2016**). Cependant la baisse du taux de Dopamine influe sur la locomotion en induisant un

disfonctionnement et un déficit de locomoteur (**Ryczko et al., 2017**). Nos résultats qui ont déterminé qu'une exposition des rats Wistar à l'OTA avec une dose de 289µg/kg a résulté en une perturbation locomotrice et hypoactivité, corroborent avec les travaux de **Izco et al., 2021**, **Ryczko et al., 2017** et **Grace et al., 2016**.

L'état d'anxiété était aussi reflété par le test Obscurité/Lumière, qui est communément utilisé pour l'évaluation de l'état d'anxiété chez les rongeurs, il se base sur la tendance des rats à se diriger vers les endroits d'obscurité dans leurs état normale (**Arrant et al., 2013**). Donc selon ce test, on a enregistré un temps de séjour plus long dans le compartiment lumineux chez le groupe traité par l'OTA, tandis que les résultats enregistré montrent un temps de séjour long dans le compartiment d'obscurité dans le groupe témoin. Cela reflète l'état anxieux dans lequel se trouvait le groupe traité par l'OTA. Cet état psychique peut être traduit par les perturbations engendré par l'Ochratoxine A au niveau du SNC car, **Bhat et al (2018)** ont démontré que l'OTA inhibe le métabolisme des monoamines qui inclus la voie de synthèse de certain neurotransmetteurs comme : la Sérotonine, Dopamine, Adrénaline, Noradrénaline et aussi une diminution du niveau des neurotransmetteurs. En parallèle à cette étude, **Rommelfanger et al (2007)** ont reporté qu'une diminution des neurotransmetteurs comme la sérotonine, et la Norépinephrine.

Les rats intoxiqués ont subit un traitement par l'huile essentielle de *Mentha spicata*, injectée par voie intrapéritonéale. Ils ont montré une amélioration de l'état psychologique. Cela est traduit par l'augmentation des carreaux traversés et du nombre de visites au centre, à l'inverse des rats intoxiqué par l'OTA. Nous avons également enregistré une diminution des comportements stéréotypés qui reflète l'état d'anxiété. Le Carvone la molécule la plus abondante dans l'huile essentiel de la *Mentha spicata* regroupe plusieurs effets sur le cerveau on site son effet d'inhibition de l'Acétylcholine estérase, et un modulateur allostérique des récepteurs GABA_A (**David et al., 2018**).

Un autre traitement par l'huile essentielle du *Syzygium aromaticum*, qui a exprimé un état d'amélioration des rats intoxiqués, qui se manifeste par une augmentation nombre des carreaux traversés et du nombre de visites de centre et même une réduction dans des comportements stéréotypés qui reflètent un état

d'anxiété. En parallèle, l'activité de l'Eugénol a été comparé par le propofol à des niveaux sédatifs évaluant l'effet anti-anxiété sur des poissons (**Luciane et al., 2021**). De plus, es travaux de **Sahin et al.(2017)** montre que l'extrait de *Syzygium aromaticum* a potentialisé de manière significative et spécifique les courants induits par le GABA (γ -Amino butyrique acide) par un mécanisme allostérique de manière concentration-dépendante (0,5–5 $\mu\text{g/ml}$; jusqu'à $426 \pm 23 \%$), GABA implique dans La potentialisation de la transmission synaptique GABAergique est utilisée comme cible bien établie pour le traitement de l'insomnie, des troubles anxieux et de l'épilepsie. En outre, l'administration de l'essence végétale de Giroflier nano-encapsulée dans des β -cyclo dextrines rapporte une réduction et diminution dans la réponse aux stress (**Amanda et al., 2020**). Par conséquent, l'eugénol est considéré comme une thérapie neuroprotectrice dans le stress maladies apparentées (**Khalil et al., 2017**)

7.3.2 Effet de l'OTA HEM et HEC sur la performance de dépression évaluée par le test de nage forcée (FST)

Le test de la nage forcée (FST) est largement impliqué dans l'évaluation des médicaments antidépresseurs chez les rongeurs (**Can A et al, 2012**). Les résultats ont montré que les rats intoxiqués par l'OTA ont présenté une augmentation significative du temps d'immobilité qui reflète un état de désespoir, cela signifie que l'animal perd l'espoir d'échapper à l'environnement stressant et nous pouvons interpréter cela comme un état de dépression et l'incapacité à maintenir les efforts pour se sauver. Alors que les rats témoins, ont montré un comportement de fuite, et une augmentation du temps de mobilité.

Ce comportement peut être du à des perturbations au niveau du système nerveux central, et comme c'est déjà mentionné l'Ochratoxine A provoque une altération et une perturbation des taux de neurotransmetteurs certains d'entre eux sont impliqué au développement de la dépression comme la sérotonine et la dopamine. La Dopamine stimule la production de la sérotonine, pendant que la sérotonine a un effet inhibiteur sur la production de la dopamine. Ceci explique la réduction du taux de la sérotonine après l'administration des neurotoxines qui altèrent la sécrétion de la dopamine (**Lee et al., 2015**). En outre l'OTA s'accumule dans plusieurs régions du cerveau y compris : hippocampe, le cortex, la substance grise et le striatum

qui regroupe un grand nombre des récepteurs dopaminergiques, la toxine γ exerce un effet neurotoxique qui en résulte en une déplétion de la dopamine qui sera impliqué dans le Parkinsonisme (**Sava et al., 2006**) ce qui aura comme effet d'un faible stimulus de la sérotonine ce qui résulte en une dépression.

Les rats intoxiqués par l'OTA ont reçu un traitement par l'huile essentielle de *Mentha spicata*, à travers le FST ils ont montré un comportement moins dépressif et une augmentation du temps de mobilité, comme on l'appelle un comportement d'échappement par rapport aux rats traités à l'OTA. La *Mentha spicata* a montré un effet antidépresseur sur les rats Wistar intoxiqué par l'Ochratoxine A. Nos résultats sont en accord avec les découvertes de **Jedi-Behnia et al., (2020)** qui ont aussi remarqué un effet antidépresseur de la *Mentha spicata* à travers le test FST qui s'est reflété par l'augmentation du temps de mobilité chez les rats traité par l'huile essentiel de la plante. Ceci peut être attribué à son effet de modulation du CNS et son effet antidépresseur (**Bouyahya et al., 2021**) et aussi que la *Mentha spicata* est également connue pour ses effets neuromodulateurs et neuroprotecteur ainsi que son effet d'inhibition de la dégradation induite par le peroxyde d'hydrogène de la dopamine et de la sérotonine (**Zengin et al., 2022**) Nos résultats sont accords avec l'étude de Behnam **Jedi-Behnia.(2017)** qui montre que l'essence végétale de la *Mentha spicata* possède une activité antidépressante probablement à cause de leurs composés (en particulier la Carvone) avec un mécanisme sérotoninergique ont induit leur effet (**Behnam Jedi-Behnia, 2017**).

Le traitement par l'HEC, a montré un effet anti dépresseur, les rats traité on présenté une amélioration de leurs état psychique à travers le FST en réduisant le temps d'immobilité qui reflète l'état de fuite du danger. Ces résultats sont en accord avec **Bin-Bin et al., (2015)** qui suite de l'administration d'HE de *Syzygium aromaticum* chez des rats avec une dose de 200 mg/kg par gavage a remarqué un effet antidépresseur évalué par deux tests : la nage forcé et la suspension de la queue qui donne des résultats significative. De plus, La même étude a confirmé que le Traitement à long terme de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* par gavage possède une propriété antidépresseur efficace qui améliore de manière significative la voie hippocampique par l'amélioration des niveaux de protéines extracellulaire signal-

regulated kinase (p-ERK) hippocampique, et les protéines Cyclic-AMP response element-binding protein (p-CREB) et facteur neurotrophique dérivé du cerveau chez des souris exposées à un stress léger chronique imprévisible. En plus, selon **Garabadu et al. (2011)** l'Eugénol améliore le niveau de sérotonine (5-HT) améliorés dans tous les SNC régions, avec réduction de la noradrénaline dans toutes régions du SNC à l'exception de l'hippocampe. L'eugénol a exercé son action par la régulation du cerveau monoaminergique et hypothalamo- systèmes hypophyso-surrénalien.

7.3.3 Effet de l'OTA HEM et HEC sur la performance de la mémoire et l'apprentissage évalué par le test du labyrinthe de Morris

Le labyrinthe de Morris a été réalisé pour but d'évaluer la mémoire spatiale et l'apprentissage chez les rongeurs, à travers ce test on a reporté un temps de latence élevé significativement pendant la période d'apprentissage chez les rats intoxiqué par l'OTA par rapport au groupe témoin, ils ont mal mémorisé l'endroit de la plateforme comme on a enregistré une diminution du nombre de visite du quadrant Nord-Ouest (NO). Ceci reflète une altération dans l'apprentissage et la mémoire chez les rats intoxiqué par la toxine

L'Ochratoxine A s'accumule dans divers régions du cerveau y compris l'Hippocampe, en provoquant le stress oxydatif qui peut induire le développement des neurodégénérescences grâce à inhibition de la synthèse protéique et son effets apoptotique, des études ont également montré que l'OTA induit l'apoptose dans le locus niger, le striatum, l'hippocampe et d'autres régions du cerveau (**Sava et al., 2006**); (**Sava et al., 2007**). **Delibas et al (2003)** ont reporté que l'OTA réduit les récepteurs NMDA au niveau de l'hippocampe, ce qui affecte les fonctions cognitives. Puisqu'il est déjà connu que l'hippocampe est la structure principale impliquée dans la mémoire, l'apprentissage, les fonctions cognitives et les émotions, toute altération ou blessure au niveau de sa structure peut entraîner des troubles de mémoire, la maladie d'Alzheimer et d'autres problèmes.

Encore, la transmission GABAergique est essentiel pour la formation et le fonctionnement corrects du cerveau, et régule la neurogenèse adulte dans la zone sous-granulaire (SGZ) du gyrus denté de l'hippocampe (**Watanabe et al., 2019**; **Tozuka et al., 2005**) L'hippocampe est l'une des rares régions du cerveau adulte, y compris la zone ventriculaire (chez les rongeurs), et récemment montrée chez l'homme le

striatum, qui continuent à produire de nouveaux neurones (**Ernst et al., 2014**). La neurogenèse hippocampique adulte est impliquée dans la mémoire et l'apprentissage, et la neurogenèse perturbée est impliquée dans les troubles cognitifs et les troubles de l'humeur, y compris l'anxiété et la dépression (**Tanokashira et al., 2017**)

Le traitement des rats exposés à l'OTA avec l'huile essentielle de *Mentha spicata*, a montré des améliorations significatives de l'apprentissage et la mémoire par rapport aux rats intoxiqués. Les rats ont mieux mémorisé la zone de la plateforme par rapport aux rats intoxiqués. Ceci reflète un effet correctif de l'huile essentielle de *Mentha spicata*, et une amélioration de la mémoire et l'apprentissage. Selon **Ali-Shtayeh, M. S et al (2019)**, l'huile essentielle de *Mentha spicata*, a montré son inhibition de l'enzyme Acétylcholine estérase (AChE) qui est responsable de l'hydrolyse de l'acétylcholine en choline et en acide, comme ils proposent d'utiliser l'HE extraite des parties aériennes de *Mentha spicata* pour lutter contre les maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer, en utilisant son activité d'inhibition de la cholinestérase pour améliorer la signalisation nerveuse pourraient être dues à la fortes concentrations en mono terpènes comme le Carvone. Ce qui explique et justifie nos résultats.

Le traitement par l'huile essentielle du *Syzygium aromaticum* a montré des effets significativement amélioratifs, de l'apprentissage et de la mémoire par rapport aux rats intoxiqués, et une bonne mémorisation e lieu de la plateforme, ceci reflète un effet correctif de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* envers les dommages causés par l'OTA au niveau de l'Hippocampe (**Sava et al., 2007**).

Dans le même contexte, l'étude de **Bachiri et al. (2020)** montre que l'administration de *Syzygium aromaticum* chez des souris atteintes par l'Alzheimer présente une amélioration dans cognition et comportementaux cela est confirmé que l'exercice de natation qui a augmenté de manière significative le BDNF dans l'hippocampe des souris traitées. Et aussi, une étude de **Fatemeh et al. (2022)** montrent que la consommation d'huile de girofle peut être une bonne stratégie thérapeutique pour prévenir la progression de la maladie d'Alzheimer en réduisant l'apoptose et améliore l'homéostasie mitochondriale, aussi Huile de clou de girofle à des effets cholinergiques et glutaminergiques (**Kumar et al., 2016**). **Latiful Akbaret al (2021)** indique que l'eugénol augmentait le nombre de cellules souches neurales (NPC)

et de cellules granulaires (GC) putatives, et diminuait également la mort des cellules neuronales dans la gyrus denté DG, Aussi une augmentation dans la complexité dendritique des neurones dans la région gyrus denté (DG); alors que dans la corne d'ammonis 1 (CA1), l'eugénol n'a donné qu'un effet positif que sur la surface terrière.

Latiful Akbar et al (2021) ont indiqué aussi que l'Eugénol a un effet neuroprotecteur y compris la mémoire et l'apprentissage qu'était testé sur des souris évaluant par le test de labyrinthe en Y et la piscine de Morris ou l'eugénol a augmenté et amélioré la mémoire spatiale et de reconnaissance chez la souris.

7.4 Paramètres biochimiques

8.3.1 Dosage du Cortisol dans le sang

Nos résultats ont démontré une augmentation significative dans le dosage du Cortisol dans le sang du rongeur par rapport au groupe témoin. Nous avons réalisé le dosage du taux de Cortisol dans le sang du rat, puisqu'il représente un biomarqueur de stress psychologique. Dans un état de stress, l'amygdale qui est impliquée dans l'évaluation de la réponse comportementale dans l'état de peur et d'anxiété envoie un signal de stress à l'hypothalamus. Il active le système nerveux sympathique (SNS), la glande surrénale pour provoquer une augmentation des catécholamines, comme l'épinéphrine qui entraîne l'augmentation des fréquences cardiaques et provoque également l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS). D'abord la libération de la Corticolibérine (CRH) par l'hypothalamus, elle agit en signalant la glande pituitaire qui libère ensuite l'hormone adrénocorticotrope (ACTH), elle descend vers les glandes surrénales au-dessus des reins, puis l'ACTH se lie à la récepteurs du cortex surrénalien, la zona fasciculata où et enfin un glucocorticoïde appelé le Cortisol sera produit (**King et al., 2015**). Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Kumar et al (2011)** car il a constaté que l'OTA provoquait un déséquilibre du taux sanguin d'une gamme d'hormones dont le Cortisol.

Le traitement par l'huile essentielle de la *Mentha spicata*, a montré une réduction significative dans le taux du cortisol par rapport à lot intoxiqué par l'OTA. Nos résultats sont en accord avec **Mazandarani et al. (2018)** car il a trouvé que l'administration de l'extrait *Mentha piperita* résulte une diminution dans le taux de

cortisol. En parallèle de **Lorena et al. (2021)** qui indiquent que l'utilisation d'essence végétale des plantes influence sur le système nerveux et ont la capacité de diminuer le niveau de cortisol sanguine et par la suite diminue le niveau de stress

Après l'administration d'HE de Clou de girofle le résultat biochimique de cortisol subi une réduction observable dans le taux de cortisol sanguine chez les rats intoxiqués traiter par cette huile. Nos résultats sont en accord avec l'étude de **Crislaine et al (2019)** indiquent que l'administration d'eugénol présente une diminution dans le taux de cortisol sanguine comparant par les poissons témoins

8.3.2 Dosage du taux de Glycémie dans le sang

Le test réalisé a montré une augmentation significative dans le taux de glycémie dans les échantillons du groupe intoxiqué par l'OTA par rapport aux témoins. Ce dosage est réalisé en tant qu'un précurseur de stress psychologique. Car en état de stress la glycémie et la pression artérielle augmentent sous l'effet de l'Adrénaline pour but d'assurer le transport du glucose et de l'oxygène à tout les organes du corps. Nos résultats sont en accord avec **Eeza et al (2022)**, qui on remarqué une augmentation dans le taux du glucose après une administration de 1 μM d'OTA. Le dosage de taux de glycémie sanguine chez les rats intoxiqués par l'OTA présente un taux très élevée de glucose sanguine comparant avec des rats témoins cela pourrait signifier L'hyperglycémie est un facteur de risque de dysfonctionnement neuronal, en particulier d'altération des mécanismes de signalisation (**Sathya et al., 2016**).

L'administration du l'huile essentielle de la *Mentha spicata* nous a permis de remarqué une diminution dans le taux du glucose par rapport aux rats intoxiqués par l'OTA. L'effet hypoglycémique du HEM est déjà prouvé, selon **Bayani et al, (2017)** la *Mentha spicata* a un effet antidiabétique qui peut être due à son effet antioxydant, comme ils ont aussi remarqué que le taux de glucose a diminué chez des rats diabétiques, nos résultats sont donc en accord avec ceux de **Brahmi et al. (2019)** qui ont aussi remarqué que l'HEM a put réduire l'hyperglycémie induite par le Pd et Mn. Certaines études ont prouvé que les propriétés antidiabétiques de ces plantes sont liées à des composés tels comme polysaccharides, flavonoïdes, terpénoïdes, tanins et stéroïdes (**Hooda et al., 2014**)

Après l'administration d'HE de *Syzygium aromaticum*, les résultats montre une diminution dans le taux de glycémie sanguine chez les rats intoxiqué traiter comparant avec celle des rats intoxiqués, alors ces résultats repose que le clou diminue la réponse aux stress. Plusieurs résultats sont en accord avec nos résultats. L'étude de **Crislaine et al (2019)** montre que l'administration d'eugénol présente une diminution dans le taux de glucose sanguine (**Crislaine et al.,2019**), et une dose de 50 mg /l d'eugénol capable de réduire le glucose sanguine (**andre et al., 2021**). Une autre étude d'**Amanda et al. (2020)** rapporte qu'après l'administration de l'HE de clou nano-encapsulée présente une diminution dans le taux de glycémie sanguine. En plus les travaux de **Solomon (2019)** chez des rats diabétiques sont constatés que l'Eugénol extrait de l'HEC présente un effet antidiabétique qui régule le taux de glucose sanguin à travers l'inhibition de glycogène phospholipase et stimule le glycogène synthase.

8.4 Histopathologie

L'étude histologique a montré qu'une exposition aiguë à l'OTA a induit des lésions et des hémorragies dans des différentes régions du cerveau, en plus quelques neurones de Purkinje éosinophile et des changements dégénératifs on aussi était détectés. Nos résultats sont en accord avec **Bhat et al. (2018)**, qui ont trouvé que l'OTA induit diverses lésions cérébrales comme les hémorragies méningées, corticales cérébrales et sous-épendymaires et provoque des stratifications dans la région du cervelet. Nos résultats ont aussi permis de distinguer une gliose, qui est un processus de prolifération des cellules gliales suite à des dommages induit au niveau des tissus cérébrale (**Noristani et al., 2018**) Ceci reflète les perturbations induites par l'Ochratoxine A au niveau du cerveau. Selon **Fahimeh et al. (2021)** et **Sava et al. (2006)**. Les dommages induits par l'OTA sur le tissu cérébrale est provoqué par son effet sur le statu oxydatif (peroxydation lipidique et activité SOD), car ça affecte toutes les régions du cerveau et fait augmenter la toxicité aussi sont effet génotoxiques et son effet sur le cycle cellulaire provoque un dysfonctionnement et un déséquilibre et même affecte l'adhésion cellulaire en interagissant avec les protéines. L'accumulation de l'OTA au niveau des différentes régions du cerveau, et son pouvoir apoptotique en altérant la signalisation cellulaire et aussi en provoquant un stress oxydatif au niveau du cerveau

qui génère des radicaux libre capables d'altérer les fonctions cellulaires, sont l'unes des principaux mécanismes de la toxicité de l'Ochratoxine A **Fahimeh et al . (2021)**. En plus elle est connue pour son effet sur l'ADN qui peut toucher la production protéique ce qui induit un perte de l'homéostasie cellulaire et des altération tissulaires (**Nourbakhsh et al., 2021**).

L'administration de l'HEM a reflété un effet correctif sur les dommages induit par l'OTA dans le cerveau. La *Mentha spicata* est connue pour sont fort effet antioxydant grâce à ses composants phénolique qui interagissent pour diminuer le tresse oxydatif et en revanche une diminutions des dommages tissulaire et une protection (**Zengin et al., 2022**) et aussi pour son effet neuroprotecteur et neuromodulateur et la stimulation de la signalisation neuronale (**Hanafy et al., 2020**) grâce à ses activité on a remarqué une diminution des dommages induit par l'OTA au niveau du cerveau,

Le traitement par l'HE du *Syzygium aromaticum* a présenté un effet bénéfique au niveau du cerveau des rats intoxiqués par l'OTA. L'HEC es riches en composants poly-phénolique, tannins et flavonoïdes qui attribuent dans sont effet antioxydant, pour mener un effet protecteur pour la structure cérébrale, comme il exerce une neuromodulation en inhibe l'activité de l'ACHe pour une meilleur signalisation et activité cérébrale (**Amir et al. 2022**)

8.5 Le docking moléculaire

Nous avons réalisée le docking moléculaire de 3 molécules qui sont ; l'Ochratoxine A, le Carvone et l'EugénoI pour investir leurs affinité avec le récepteur acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA) qui se trouve au niveau de l'hippocampe. Les structures et leurs donnés sont récupéré à partir des bases des données PubChem et Swiss-Prot.

A l'aide du programme AutoDock nous avons pu simuler la formation de ces complexes et évaluer leurs affinités Les résultats ont ensuite étaient analysés en utilisant PyMol et LigPlot+ (**Laskowski et al., 2011**). Parmi les 3 molécules, seulement 2 molécules ont une affinité avec le récepteur NMDA, les meilleures conformations des

ligands ont été analysées pour leurs interactions de liaison ont été évaluées par les énergies libres de liaison (affinité d'amarrage, kcal / mol). Les résultats sont exprimés dans e tableau suivant :

Tableau XV Interaction des protéines avec le récepteur NMDA

Ligand	Amarage Kcal/mol	Meilleur mode rmsd u.b.	Bande d'interaction d'hydrogène	Distance (Å)
Ochratoxine	- 8.1	0	Ile 548 (C)	2.89
Eugénol	- 5.4	0	Lys 458 (D)	2.84
Carvone	-4.9	0	-	-

Selon le tableau et parmi ces protéines l'Ochratoxine A a la meilleure affinité avec le récepteur NMDA, son interaction avec le récepteur est avec une interaction de liaison hydrogène au niveau de l'acide aminé Ile 548 avec une distance de 2.89 Å. L'OTA est déjà mentionné d'avoir un effet sur les récepteur NMDA en réduisant leur nombre au niveau de l'Hippocampe, ceci est mentionnée par le auteurs : **Delibas et al. (2003)**, **Okutan et al. (2004)** et **Yoon et al (2009)**

Suivis par l'Eugénol, avec une interaction de liaison Hydrogène au niveau du l'Acide aminé Lys 458 avec une distance de 2.84Å. Selon la littérature l'Eugénol a une action inhibitrice des récepteurs NMDA pour induire l'effet anesthésique et analgésique (**Dal Bó et al., 2013**) ce qui montre qu'une fixation est possible de l'Eugénol et récepteur NMDA, ce qui est reflété par le résultat du docking réalisé comme il est exprimé dans la figure suivante.

Conclusion

L'intérêt principale de notre travail en premier lieu est d'évaluer le risque lié à l'intoxication par l'Ochratoxine A sur le cerveau et par la suite le système nerveux central (SNV) et les mécanismes impliqués dans son pouvoir toxique, ainsi que l'effet prophylactique, et l'efficacité de traitement par deux huiles essentielles qui sont l'HE de *Mentha spicata* (la menthe verte) et l'HE de *Syzygium aromaticum* (le clou de girofle) administré par voie intrapéritonéale avec une dose de 0.1 ml/kg durant une période de 15 jours évaluant leurs pouvoirs thérapeutiques dans la réparation des dommages induites par l'Ochratoxine A (OTA) sur des rats Wistar, en utilisant diverses approches expérimentales : neurocomportementales, biochimique et histologiques.

D'une part, des travaux qui mènent sur les animaux ont montré que l'OTA à une faible dose se présente dans le sang avec un pourcentage de 83% à 90%, et grâce à sa nature lipophile l'OTA pourrait traverser toutes les barrières avec une diffusion simple ainsi que la barrière hémato-encéphalique et induit des altérations et des dommages au niveau cérébral même avec une faible dose.

Nos résultats ont montré que l'administration de 289 µg/kg/p.c. d'OTA par voie intrapéritonéale durant toutes les 48h pendant deux semaines, entraîne une réduction du poids corporel et une baisse significative de poids de cerveau chez les rats intoxiqués par l'OTA, et induit des altérations et des troubles neuro-comportementaux. De plus, les résultats relatifs aux tests de comportement nous ont permis d'observer et d'enregistrer un état d'anxiété par le test de : obscurité/lumière et l'open Field, l'installation de l'état dépressif a été évalué par le test de la nage forcée, ainsi que la perte de la capacité de mémorisation et d'apprentissage évalué par le test de piscine de Morris et la perte de désir d'explorer un nouvel environnement estimé par le test d'open Field et la piscine de Morris qui montre l'installation d'un état de stress, aussi une hypoactivité locomotrice évalué par le test d'open Field et la nage forcée, ces résultats remarquables sont la conclusion de la perturbation provoquée par l'intoxication à l'OTA et qui entraîne une perturbation des voies de transmissions sérotoninergique, GABAergique, et cholinergique impliquées dans le contrôle de ces comportements.

L'état de stress observé chez les rats intoxiqués par l'OTA a été aussi confirmé par des résultats biochimiques : le dosage de taux de glycémie a révélé une

augmentation significative dans le taux de glycémie sanguine qui est dû probablement à l'intoxication par l'OTA, cette hyperglycémie pourrait être due à la glycolyse hépatique et musculaire pour parvenir aux besoins énergétiques au niveau cérébral.

Dans le même contexte, l'OTA a influencé sur le taux de cortisol sanguin et qui est un bio marqueur de stress, leurs dosage révéla une augmentation dans le taux de cortisol sanguin et cette hypercortisolémie pourrait être due à des altérations hypophysaire, surrénalienne.

Les résultats de l'étude histologique au niveau de cerveau rapporte la présence des lésions au niveau cérébrale, des traces de neuro-dégénérescence et d'une gliose

D'autre part, l'administration de l'HE de *Mentha spicata* avec une dose de 0.1ml/kg/p.c. Par voie intrapéritonéale (IP) pendant quinze jours reflète des résultats positives chez les rats intoxiqués (OTA) et traité par l'HEM comparant aux celles des rats intoxiqués.

Ce traitement nous a permis d'observé un gain de poids corporel observable, et une augmentation dans le poids de cerveau, aussi des améliorations significativement supérieur dans les fonctions cognitifs et neurocomportementaux selon les tests neurocomportementaux qui sont réalisés à partir de sixième jours de traitement, ainsi que les tests biochimiques montre une diminution de taux de glycémie et de cortisol.

Tout fois, l'étude histologique montre l'effet neuroprotecteur de la menthe verte qui a permis de réduire les lésions provoqué par l'OTA au niveau cérébrale ce qui montre leurs pouvoirs thérapeutique et neuroprotecteur grâce à son composées qui constitue leurs HE principalement le Carvone.

En revanche, le traitement par l'HEC (0.1ml/kg/p.c.) par voie IP pendant quinze jours a permis d'induire une nette amélioration des perturbations entraîné par l'OTA, ce qui observé par une augmentation dans le poids corporel, aussi le poids de cerveau, réduire les taux de glycémie et de cortisol sanguin et par la suite réduire l'état de stress.

D'ailleurs, les résultats des rats intoxiqué traités par HEC présente une amélioration dans leurs capacité de mémorisation ainsi que leurs pouvoirs et leurs

désirs d'explorer un nouvel environnement, aussi une amélioration dans leurs état psychique, avec une amélioration locomoteurs.

En termes d'histologie, l'administration d'HEC illustre un effet correctif grâce à son composant actif qui est l'eugénol

La technique de Docking moléculaire, nous a permis d'estimer l'impact de l'OTA sur les récepteurs d'NMDA (acide N-méthyl-D-aspartique) qui résulte qu'il y a une affinité entre l'OTA et les NMDA, ce qui montre les altérations induites au niveau cérébral, en effet l'interaction entre l'eugénol (le composé actif de clou) et les NMDA et le Carvone (le composé actif de menthe) avec les NMDA résultent que seulement l'eugénol a une affinité avec les récepteurs d'NMDA ce qui explique le pouvoir anesthésique du clou de girofle. Pendant que le Carvone ne représente aucune affinité avec les récepteurs NMDA.

A la lumière des résultats trouvés, le traitement par ces deux HE (HEM, HEC) montre un pouvoir prophylactique et leur capacité de réparer les troubles causés par l'intoxication aiguë de l'OTA chez des rats adultes.

En terme de perspective, il serait envisageable d'entreprendre un ensemble de protocoles expérimentaux plus approfondis portant sur différents volets :

- Elargir la batterie de test comportemental afin de mieux clarifier l'effet neurotoxique de l'OTA et leurs mécanismes d'action.
- Le dosage de l'OTA au niveau cérébral.
- Réaliser des travaux sur le stress oxydatif induit par l'OTA au niveau de cerveaux et d'autres organes.
- Évaluer l'effet neurotoxique sur des jeunes rats aux cours de développement.
- L'évaluation de l'effet antioxydant de traitement par la *Mentha spicata* et *Syzygium aromaticum* et quel composant est le responsable de cette activité.
- Réaliser des travaux sur l'effet d'eugénol (composé actif de clou de girofle) contre l'OTA, et la neurotoxicité.
- Réaliser des travaux sur l'effet de Carvone (composé actif de la menthe verte) contre la neurotoxicité induite par l'OTA.
- Réaliser l'HPLC de clou de girofle et de menthe.

- Réaliser des nouvelles expérimentations sur la définition des mécanismes d'action de *Mentha spicata* sur l'amélioration dans le tissu cérébrale selon une étude biochimique et histologique.
- Réaliser des nouvelles expérimentations sur la définition des mécanismes d'action de sur *Syzygium aromaticum* l'amélioration dans le tissu cérébrale selon une étude biochimique et histologique.

Références bibliographiques

-
- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. 2010. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiol. Dis.* 37:13–25.
 - Abd Rashed A, Abd Rahman AZ, Rathi DNG. Essential Oils as a Potential Neuroprotective Remedy for Age-Related Neurodegenerative Diseases: A Review. *Molecules.* 2021; 26(4):1107. <https://doi.org/10.3390/molecules26041107>
 - Abdel-Wahhab, M.A., Aljawish, A., El-Nekeety, A.A., Abdel-Aziem, S.H., Hassan, N.S., Jan 2017. Chitosan nanoparticles plus quercetin suppress the oxidative stress, modulate DNA fragmentation and gene expression in the kidney of rats fed ochratoxin A contaminated diet. *Food Chem. Toxicol.* 99, 209–221
 - Abdel-Wahhab, M.A., Aljawish, A., Kenawy, A.M., El-Nekeety, A.A., Hamed, H.S., Abdel-Aziem, S.H., Jan 2016. Grafting of gallic acid onto chitosan nano particles enhances antioxidant activities in vitro and protects against ochratoxin A toxicity in catfish (*Clarias gariepinus*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 41, 279–288 Epub 2016/01/17
 - Abdullah Zinedine." Détermination des mycotoxines dans les aliments étude sur la réduction des Aflatoxines par les bactéries lactiques isolées des fermes panaires traditionnels", thèse de doctorat en microbiologie, Université de Sidi Mohammed Ben Abdellah, 2004, 162p.
 - Aboubakr, H. A., Nauertz, A., Luong, N. T., Agrawal, S., El-Sohaimy, S. A., Youssef, M. M., & Goyal, S. M. (2016). In vitro antiviral activity of clove and ginger aqueous extracts against feline calicivirus, a surrogate for human norovirus. *Journal of food protection*, 79(6), 1001-1012.
 - Abrunhosa, L., L. Santos and A. Venancio, 2006. Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*. *Food Biotechnol.*, 20: 231-242.
 - Abrunhosa, L., R. Serra and A. Venâncio, 2002. Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. *J. Agr. Food Chem.*, 50: 7493-7496.
 - Adams M R, Moss M O, *Toxingenic fungi*, Food microbiology, RSC, UK, 2002, 282-301pp
 - Adler, M., Müller, K., Rached, E., Dekant, W. and Mally, A., 2009. Modulation of key regulators of mitosis linked to chromosomal instability is an early event in ochratoxin A carcinogenicity. *Carcinogenesis* 30: 711–719.

<http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgp049>

- Adli · K. Kahloula · M. Slimani · M. Brahmi · M. Benreguieg. Effets prophylactiques de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* chez les rats wistar en développement coexposés au plomb et au manganèse Phytothérapie.2017
- Agarwal, S., & Mehrotra, R. J. J. C. (2016). An overview of molecular docking. *JSM chem*, 4(2), 1024-1028.
- Ait-hamadouche N. (2009). Effets de l'exposition chronique au plomb sur le système reproducteur et l'axe hypothalamo-hypophysaire chez le rat mâle wistar. Etude histologique et biochimique.
- Akron. 2010. The Chemical Database. The Department of Chemistry at the University of Akron. <http://ull.chemistry.uakron.edu/erd> and search on CAS number.
- Alban Gauthier, "Mycotoxines dans l'alimentation et leurs incidence sur la santé", thèse de doctorat en pharmacie, Université de Bordeaux, 2016, 132p.
- Alban Gauthier. Les mycotoxines dans l'alimentation et leur incidence sur la santé. Sciences pharmaceutiques. 2016. dumas-01315198
- Alfikri, F. N., Pujiarti, R., Wibisono, M. G., & Hardiyanto, E. B. (2020). Yield, quality, and antioxidant activity of clove (*Syzygium aromaticum* L.) bud oil at the different phenological stages in young and mature trees. *Scientifica*, 2020.
- Ali N, Muñoz K and Degen GH, 2017. Ochratoxin A and its metabolites in urines of German adults -an assessment of variables in biomarker analysis. *Toxicology Letters*, 5, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.04.013>
- Ali-Shtayeh, M. S., Jamous, R. M., Abu-Zaitoun, S. Y., Khasati, A. I., & Kalbouneh, S. R. (2019). Biological properties and bioactive components of *Mentha Spicata* L. essential oil: Focus on potential benefits in the treatment of obesity, Alzheimer's disease, dermatophytosis, and drug-resistant infections. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019.
- Amal, O. A. A., 2012. Use of oils in broiler Nutrition- thesis submitted in Accordance with the requirements of the Sudan University of Science and Technology for the degree of Doctor Philosophy.
- Amezqueta, S., E. Gonzalez-Penas, M. Murillo-Arbizu and A.L. De Cerain, 2009.

Ochratoxin A decontamination: *Food Control*, 20: 326-333.

- ANSES, 2012. French agency for food, environmental and occupation health & safety. Datasheet on foodborne biological hazards. Ochratoxin A, producing *Aspergilli* & *Penicillia*.
 - Arrant AE, Schramm-Sapyta NL, Kuhn CM. Use of the light/dark test for anxiety in adult and adolescent male rats. *Behav Brain Res.* 2013 Nov 1;256:119-27. doi: 10.1016/j.bbr.2013.05.035. Epub 2013 May 27. PMID: 23721963; PMCID: PMC4119594.
- Ashenafi Mebratu Zewde¹, Frances Yu , Sunil Nayak, Christopher Tallarida, Allen B. Reitz, Lynn G. Kirby , Scott M. Rawls ,2018, PLDT (planarian light/dark test): an invertebrate assay to quantify defensive responding and study anxiety-like effects , Published in final edited form as: *J Neurosci Methods*; 293: 284–288. doi:10.1016/j.jneumeth.2017.10.010
- Azemar B. Etude du rôle de l'Ochratoxine A, une mycotoxine alimentaire, dans l'induction des cancers des voies urinaires chez l'homme. Mécanismes moléculaire impliqué. Thèse universitaire Toulouse, 2001.
 - Azizi, I. G., Rahimi, K., & Shateri, S. (2012). Ochratoxin: Contamination and toxicity (A review). *Glob Vet*, 8, 519-524.
 - Bayani, M., Ahmadi-Hamedani, M., & Javan, A. J. (2017). Study of hypoglycemic, hypocholesterolemic and antioxidant activities of Iranian *Mentha spicata* leaves aqueous extract in diabetic rats. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 16(Suppl), 75.
 - Behrens, M., Hüwel, S., Galla, H.-J., & Humpf, H.-U. (2021). Efflux at the Blood-Brain Barrier Reduces the Cerebral Exposure to Ochratoxin A, Ochratoxin α, Citrinin and Dihydrocitrinone. *Toxins*, 13(5), 327. <https://doi.org/10.3390/toxins13050327>
 - Belmadani , A., Tramu G., Betbeder , A. M , and Creppy , E. E (1998) . Subchronic effects of ochratoxin A on young adult rat brain and partial prevention by aspartame , a sweetener .*Hum.Exp. Toxicol* , 17, 380-386.
 - Benayed N. (2008) : Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines. Moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires

stockées. Laboratoire des substances naturelles et Thermolyse Eclair. Département de chimie, Faculté des Sciences de Rabat – Université Mohamed 6 – Agdal. Page : [9-36] .

- Benjamin Lecorps *, Heiko G. Rödel, Christophe Féron, 2016 , Assessment of anxiety in open field and elevated plus maze using infrared thermography , *Physiology & Behavior* , 157 , 209–216 , <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.02.014> .
- Benjamin Lecorps , Heiko G. Rödel, Christophe Féron , Assessment of anxiety in open field and elevated plus maze using infrared thermography , , *Physiology & Behavior* , 157 , (2016) , 209–216 , <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.02.014>
- Bhat, P.V., Anand, T., Mohan, M.T., Khanum, F., Restorative effect of L-Dopa treatment against Ochratoxin A induced neurotoxicity, *Neurochemistry International* (2018), doi: 10.1016/j.neuint.2018.04.003
- Bhat, P.V., Anand, T., Mohan, M.T., Khanum, F., Restorative effect of L-Dopa treatment against Ochratoxin A induced neurotoxicity, *Neurochemistry International* (2018), doi: 10.1016/j.neuint.2018.04.003.
- Boesch-Saadatmandi, C., Loboda, A., Jozkowicz, A., Huebbe, P., Blank, R., Wolffram, S., Dulak, J., Rimbach, G., Aug 2008. Effect of ochratoxin A on redox-regulated transcription factors, antioxidant enzymes and glutathione-S-transferase in cultured kidney tubulus cells. *Food Chem Toxicol. Int. J. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 46, 2665–2671 Epub 2008/06/13.
- Bondy GS, Caldwell DS, Aziz SA, Coady LC, Armstrong CL, Curran IH, Koffman RL, Kapal K, Lefebvre DE and Mehta R, 2015. Effects of chronic ochratoxin A exposure on p53 heterozygous and p53 homozygous mice. *Toxicologic Pathology*, 43, 715–729.
- Bouyahya, A., Mechchate, H., Benali, T., Ghchime, R., Charfi, S., Balahbib, A., ... & Omari, N. E. (2021). Health benefits and pharmacological properties of carvone. *Biomolecules*, 11(12), 1803.
- Brahmi, M., Adli, D. E. H., Slimani, M., Arabi, W., Taibi, N., & Kahloula, K. (2019). EVALUATION OF THE THERAPEUTIC EFFECTS OF MENTHA SPICATA ESSENTIAL OIL AT THE LIVER LEVEL IN DEVELOPING WISTAR RATS CO-EXPOSED TO LEAD AND MANGANESE. *Carpathian Journal of Food Science & Technology*, 11(2).

-
- Brahmi, M., Djallal, E. H., Ziani, K., Houari, H., Slimani, M., & Kahloula, K. (2020). Beneficial effect of *Mentha spicata* essential oil on lead and manganese induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney. *Notulae Scientia Biologicae*, 12(3), 578-591.
 - Brochard G, Le Bâcle C, "Mycotoxine en milieu de travail", Dossier médico-technique, N° 119, 2009, 299-393pp.
 - C.R. Corbeil, P. Englebienne, N. Moitessier. Docking Ligands Into Flexible and Solvated Macromolecules-1. Development and Validation of Fitted 1.0. *Journal Of Chemical Informatic Modelling*, 2007, 47, 435-449.
 - Can, A., Dao, D. T., Arad, M., Terrillion, C. E., Piantadosi, S. C., & Gould, T. D. (2012). The mouse forced swim test. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (59), e3638. <https://doi.org/10.3791/3638>
 - Caro, D. C., Rivera, D. E., Ocampo, Y., Franco, L. A., & Salas, R. D. (2018). Pharmacological Evaluation of *Mentha spicata* L. and *Plantago major* L., Medicinal Plants Used to Treat Anxiety and Insomnia in Colombian Caribbean Coast. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2018, 5921514. <https://doi.org/10.1155/2018/5921514>
 - Chandra, K., Salman, A.S., Mohd, A., Sweetey, R., Ali, K.N., 2015. Protection against FCA induced oxidative stress induced DNA damage as a model of arthritis and in vitro anti-arthritic potential of *Costus speciosus* Rhizome extract. *Int. J. Pharmacognos. Phytochem. Res.* 7, 383–389.
 - CHAUDHARY, Kamal Kumar et MISHRA, Nidhi. A review on molecular docking:
 - Chen, Amanda J., Xiaolin Jiao, Yongjian Hu, Xiaohong Lu, and Weiwei Gao. 2015. "Mycobiota and Mycotoxins in Traditional Medicinal Seeds from China" *Toxins* 7, no. 10: 3858-3875. <https://doi.org/10.3390/toxins7103858>
 - Chris Janus, 2013, Ph.D. Assistant Professor Department of Neuroscience, Center for Translational Research in Neurodegenerative Disease (CTRND) at University of Florida College of Medicine.
 - Ciarcia, R., Damiano, S., Squillacioti, C., Mirabella, N., Pagnini, U., Florio, A., Severino, L., Capasso, G., Borrelli, A., Mancini, A., et al., Jun 2016. Recombinant mitochondrial manganese containing superoxide dismutase

- protects against ochratoxin A-induced nephrotoxicity. *J. Cell Biochem.* 117, 1352–1358.
- Cioanca, O.; Mircea, C.; Hritcu, L.; Trifan, A.; Marius, M.; Aprotosoiaie, A.C.; Robu, S.; Gille, E.; Hancianu, M. In vitro—In vivo correlation of the antioxidant capacity of *Salviae aetheroleum* essential oil. *Farmacia* 2015, 63, 34–39.
 - Cortés-Rojas, D. F., de Souza, C. R. F., & Oliveira, W. P. (2014). Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 4(2), 90-96.
 - Cryan JF, Holmes A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression an anxiety. *Nature reviews. Drug discovery.* 2005;4:775–790. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 - Dal Bó, W., Luiz, A. P., Martins, D. F., Mazzardo-Martins, L., & Santos, A. R. (2013). Eugenol reduces acute pain in mice by modulating the glutamatergic and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) pathways. *Fundamental & clinical pharmacology*, 27(5), 517-525.
 - de Azevedo, W. F. (Ed.). (2019). *Docking screens for drug discovery*. Humana Press.
 - de Mello, V., Prata, M. C., da Silva, M. R., Daemon, E., da Silva, L. S., Guimarães, F., de Mendonça, A. E., Folly, E., Vilela, F. M., do Amaral, L. H., Cabral, L. M., & do Amaral, M. (2014). Acaricidal properties of the formulations based on essential oils from *Cymbopogon winterianus* and *Syzygium aromaticum* plants. *Parasitology research*, 113(12), 4431–4437. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4121-4>
 - Delibas, N., Altuntas, I., Yonden, Z., & Ozcelik, N. (2003). Ochratoxin A reduces NMDA receptor subunits 2A and 2B concentrations in rat hippocampus: partial protective effect of melatonin. *Human & experimental toxicology*, 22(6), 335-339.
 - Delibas, N., Altuntas, I., Yonden, Z., & Ozcelik, N. (2003). Ochratoxin A reduces NMDA receptor subunits 2A and 2B concentrations in rat hippocampus: partial protective effect of melatonin. *Human & experimental toxicology*, 22(6), 335-339.

-
- Dias, R., de Azevedo, J., & Walter, F. (2008). Molecular docking algorithms. *Current drug targets*, 9(12), 1040-1047.
 - Dieter S ,Bodin L, Chipman JK, del Mazo J, Grasl-Kraupp B, Hogstrand C, Hoogenboom L, Leblanc J-C, Nebbia CS,Nielsen E, Ntzani E, Petersen A, Sand S, Schwerdtle T, Vleminckx C, Wallace H, Alexander J, Dall’Asta C Mally A, Metzler M, Binaglia M, Horváth Z, Steinkellner H and Bignami M, 2020. Scientific Opinion on the risk assessment of ochratoxin A in food. EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), *Journal* 2020;18(5):6113, ISSN: 1831-4732.150 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6113>
 - Dixit, N. M., Kalagatur, N. K., Poda, S., Kadirvelu, K., Behara, M., & Mangamuri, U. K. (2022). Application of *Syzygium aromaticum*, *Ocimum sanctum*, and *Cananga odorata* essential oils for management of Ochratoxin A content by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum*: An in vitro assessment in maize grains.
 - Eeza, M. N., Bashirova, N., Zuberi, Z., Matysik, J., Berry, J. P., & Alia, A. (2022). An integrated systems-level model of ochratoxin A toxicity in the zebrafish (*Danio rerio*) embryo based on NMR metabolic profiling. *Scientific reports*, 12(1), 1-15.
 - Eeza, M., Bashirova, N., Zuberi, Z., Matysik, J., Berry, J. P., & Alia, A. (2022). An integrated systems-level model of ochratoxin A toxicity in the zebrafish (*Danio rerio*) embryo based on NMR metabolic profiling. *Scientific reports*, 12(1), 6341. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09726-4>
 - EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), Schrenk D, Bodin L, Chipman JK, del Mazo J, Grasl-Kraupp B, Hogstrand C, Hoogenboom L, Leblanc J-C, Nebbia CS,Nielsen E, Ntzani E, Petersen A, Sand S, Schwerdtle T, Vleminckx C, Wallace H, Alexander J, Dall’Asta C, Mally A, Metzler M, Binaglia M, Horváth Z, Steinkellner H and Bignami M, 2020. Scientific Opinion on the risk assessment of ochratoxin A in food. *EFSA Journal* 2020;18(5):6113, 150 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6113>
 - El Adlouni C, Pinelli E, Azemar B, Zaoui D, Beaune P and Pfohl-Leszkowicz A, 2000. Phenobarbital increases DNA adduct and metabolites formed by ochratoxin A: Role of

CYP 2C9 and microsomal glutathione-S-transferase. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35, 123–131.

- El Khoury Rhoda, "Maitrise du risque Aflatoxine : Utilisation d'extraits naturels et mise en évidence de leurs mécanisme", thèse de doctorat en pathologie toxicologie génétique et nutrition, Université de Toulouse, 2016, 199p.
- el Khoury, A., & Atoui, A. (2010). Ochratoxin a: general overview and actual molecular status. *Toxins*, 2(4), 461–493. <https://doi.org/10.3390/toxins2040461>
- El-Shafie, M., Elmasry, H.G., Elsadek, M.F., AlMajwal, A.M., Jun 2015. Curative effect of orally consumed Aloe vera juice on Ochratoxin A-induced nephrotoxicity in rats. *Prog. Nutr.* 17, 128–136.
- Esposito, E.R.; Bystrek, M.V.; Klein, J.S. An Elective Course in Aromatherapy Science. *Am. J. Pharm. Edu.* 2014, 78, 79.
- Fahimeh, Nourbakhsh., & Tajbakhsh, E. (2021). Neurotoxicity mechanism of Ochratoxin A. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 13(2), 34-45.
- Fan, J., Fu, A., & Zhang, L. (2019). Progress in molecular docking. *Quantitative Biology*, 7(2), 83-89.
- Faucet-Marquis V, Pont F, Stormer FC, Rizk T, Castegnaro M and Pfohl-Leszkowicz A, 2006. Evidence of a new dechlorinated ochratoxin A derivative formed in opossum kidney cell cultures after pretreatment by modulators of glutathione pathways: correlation with DNA-adduct formation. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50, 530–542.
- Faujdar, S. S., Bisht, D., & Sharma, A. (2020). Antibacterial activity of *Syzygium aromaticum* (clove) against uropathogens producing ESBL, MBL, and AmpC beta-lactamase: Are we close to getting a new antibacterial agent?. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 9(1), 180.
- Feijó Corrêa, J.A., Orso, P.B., Bordin, K., Hara, R.V., Luciano, F.B., Toxicological effects of fumonisin B₁ in combination with other *Fusarium* toxins, *Food and Chemical Toxicology* (2018), doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.043>.
- Florence Chapeland-Leclerc, Nicolas Papon, Thierry Noël, Jean Villard, "Moisissures et risque alimentaire : Mycotoxicose", *Revue française de*

laboratoires, N°373, 61-66p, 2005, doi: [https://doi.org/10.1016/S0338-9898\(05\)80236-7](https://doi.org/10.1016/S0338-9898(05)80236-7)

- FolmerElling, Jens PeterNielsen, Eivind B.Lillehøj, Magny S.Thomassen, Fredrik C.Størmer , , 1985, Ochratoxin A-induced porcine nephropathy: Enzyme and ultrastructure changes after short-term exposure , *Toxicon* , **Volume 23, Issue 2**, Pages 247-254 , [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(85\)90147-3](https://doi.org/10.1016/0041-0101(85)90147-3) .
- Frantisek, Malir., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Malir, J., & Toman, J. (2016). Ochratoxin A: 50 Years of Research. *Toxins*, 8(7), 191. <https://doi.org/10.3390/toxins8070191>
- Fuchs, S., G. Sontag, R. Stidl, V. Ehrlich, M. Kundi and S. Knasmuller, 2008. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food Chem. Toxicol.*, 46: 1398-1407.
- Gallo A, Bruno KS, Solfrizzo M, Perrone G, Mulè G, Visconti A, Baker SE. 2012. New insight into the ochratoxin A biosynthetic pathway through deletion of a nonribosomal peptide synthetase gene in *Aspergillus carbonarius*. *Appl Environ Microbiol* 78:8208 – 8218. <https://doi.org/10.1128/AEM.02508-12>
- Garabadu, D., Shah, A., Ahmad, A., Joshi, V. B., Saxena, B., Palit, G., & Krishnamurthy, S. (2011). Eugenol as an anti-stress agent: modulation of hypothalamic–pituitary–adrenal axis and brain monoaminergic systems in a rat model of stress. *Stress*, 14(2), 145-155.
- Gargiulo, Augusto Pascual Ítalo; Marquez Herrero, Santiago; Romanowicz, Esteban Alejandro; Guevara, Manuel Alejandro; Landa, Adriana Inés; et al.; Sedative-like effect of intraperitoneal GABA administration in the open field test; Rede Brasileira de Informações Biológicas - Rebibio; Brazilian Journal of Biological Sciences; 03; 06; 12-2016; 257-262
- Gekle, M., Schwerdt, G., Freudinger, R., Mildenerger, S., Wilflingseder, D., Pollack, V., et al. 2000. Ochratoxin A induces JNK activation and apoptosis in MDCK-C7 cells at nanomolar concentrations. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 293: 837–844

- Guezlane Tebibel N, Bouras N, Ould El Hadj M D, "Les mycotoxines : un danger de santé publique", Algerian journal of arid environment, vol 6 n°1, 2016, 32-49 pp, ISSN : 2170-1318.
- Gulyaeva, N.V. Functional Neurochemistry of the Ventral and Dorsal Hippocampus: Stress, Depression, Dementia and Remote Hippocampal Damage. *Neurochem Res* **44**, 1306–1322 (2019) <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2662-0>
- Harris, J. P., & Mantle, P. G. (2001). Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry*, *58*(5), 709-716.
- Hazuda DJ, Anthony NJ, Gomez RP, Jolly SM, Wai JS, Zhuang L, et al. A naphthyridine carboxamide provides evidence for discordant resistance between mechanistically identical inhibitors of HIV-1 integrase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 3 août 2004;101(31):11233-8
- Hibi D, Kijima A, Kuroda K et al (2013) Molecular mechanisms underlying ochratoxin A-induced genotoxicity: global gene expression analysis suggests induction of DNA double-strand breaks and cell cycle progression. *J Toxicol Sci* *38*(1):57–69
- Himanshu; Dharmila, Sarkar D; Nutan. A Review of Behavioral Tests to Evaluate Different Types of Anxiety and Anti-anxiety Effects. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 2020 Aug 31;18(3):341-351. doi: 10.9758/cpn.2020.18.3.341. PMID: 32702213; PMCID: PMC7382999.
- Hong, J.T., Lee, M.K., Park, K.S., Jung, K.M., Lee, R.D., Jung, H.K., et al. 2002. Inhibitory effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist on ochratoxin A-induced cytotoxicity and activation of transcription factors in cultured rat embryonic midbrain cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* *65*: 407–418. <http://dx.doi.org/10.1080/15287390252808073>
- Hooda MS, Pal R, Bhandari A and Singh J. Antihyperglycemic and antihyperlipidemic effects of *Salvadora persica* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharm Biol*. (2014) *52*: 745–9.
- Horvath, A., Upham, B.L., Ganev, V. and Trosko, J.E., 2002. Determination of the epigenetic effects of ochratoxin in a human kidney and a rat liver epithelial cell line. *Toxicol* *40*: 273–282. [http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00219-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00219-7)

-
- HSDB. 2010. Hazardous Substances Data Bank. National Library of Medicine. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB> and search on CAS number.
 - Hsieh, M.T.; Peng, W.H.; Wu, C.R.; Wang, W.H. The ameliorating effects of the cognitive-enhancing Chinese herbs on scopolamine-induced amnesia in rats. *Phytother. Res.* 2000, 14, 375–377.
 - Huang S-Y, Grinter SZ, Zou X (2010) Scoring functions and their evaluation methods for protein-ligand docking: recent advances and future directions. *Phys Chem Chem Phys* 12:12899–12908
 - Iqbal S Z. Mycotoxins in food, recent development in food analysis and future challenges; a review, *Current Opinion in Food Science* (2021), doi: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.07.003>
 - J. Fink-Gremmels (2005) Conclusions from the workshops on Ochratoxin A in Food: Recent developments and significance, organized by ILSI Europe in Baden (Austria), 29 June–1 July 2005, *Food Additives & Contaminants*, 22:sup1, 1-5, DOI: [10.1080/02652030500358415](https://doi.org/10.1080/02652030500358415)
 - J. Tolosa , Y. Rodríguez-Carrasco , M.J. Ruiz , P. Vila-Donat. Multi-mycotoxin occurrence in feed, metabolism and carry-over to animal-derived food products: A review, *Food And Chemical Toxicology*, vol 158, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112661>
 - Jedi-Behnia B, Abbasi Maleki S, Mousavi E. The antidepressant-like effect of *Mentha spicata* essential oil in animal models of depression in male mice. *JABS.* 2017; 7 (1) :141-149
 - K. Tabrizian, S. Najafi, M. Belaran, A. Hosseini-Sharifabad, K. Azami, Effects of Selective iNOS Inhibitor on Spatial Memory in Recovered and Non-recovered Ketamine Induced-anesthesia in Wistar Rats, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 9 (2010), pp. 313-320 .
 - Kamal Niaz,, Shah, S.Z.A., Khan, F. et al. Ochratoxin A–induced genotoxic and epigenetic mechanisms lead to Alzheimer disease: its modulation with strategies. *Environ Sci Pollut Res* 27, 44673–44700 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08991-y>

- Khalil, A. A., ur Rahman, U., Khan, M. R., Sahar, A., Mehmood, T., & Khan, M. (2017). Essential oil eugenol: sources, extraction techniques and nutraceutical perspectives. *RSC advances*, 7(52), 32669-32681.
- Kholová, A., Lhotská, I., Erben, J., Chvojka, J., Švec, F., Solich, P., & Šatínský, D. (2021). Comparison study of nanofibers, composite nano/microfiber materials, molecularly imprinted polymers, and core-shell sorbents used for on-line extraction-liquid chromatography of ochratoxins in Tokaj wines. *Microchemical Journal*, 170, 106680.
- King, S. L., & Hegadoren, K. M. (2002). Stress Hormones: How Do They Measure Up? *Biological Research For Nursing*, 4(2), 92–103. doi: 10.1177/1099800402238334
- Kontoyianni M. Docking and Virtual Screening in Drug Discovery. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2017;1647:255-66
- Kraeuter AK., Guest P.C., Sarnyai Z. (2019) The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. In: Guest P. (eds) Pre-Clinical Models. *Methods in Molecular Biology*, vol 1916. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_9
- Kska R, Molinelli A, Rapid test strips for analysis of mycotoxins in food and feed, *Anal Bioanal Chem*, 396 : 67-71pp, 2009, Doi: 10.1007/s00216-008-2424-y
- Kumar SN, Telang AG, Singh KP, Jain AK, Afroz M and Patil RD, 2011. Experimentally induced toxicity of ochratoxin A and endosulfan in male wistar rats: a hormonal disorder. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10, 1750–1755. <https://doi.org/10.3923/javaa.2011.1750.1755>
- Kumar, S.N.; Gopal, A. Toxic manifestation of endosulfan and ochratoxin-A in adult male rats. *MOJ Toxicol*. 2015, 1, 1–6
- Lahouar A, "Mycotoxines et champignons mycotoxinogènes dans les graines de sorgho commercialisé en Tunisie : Incidence et profils ecophysiologiques", thèse de doctorat en sciences biologiques et biotechnologie, Institut supérieur de biotechnologie de Monastir, 2016, 225p.
- Lee, M., Ryu, Y. H., Cho, W. G., Kang, Y. W., Lee, S. J., Jeon, T. J., Lyoo, C. H., Kim, C. H., Kim, D. G., Lee, K., Choi, T. H., & Choi, J. Y. (2015). Relationship

- between dopamine deficit and the expression of depressive behavior resulted from alteration of serotonin system. *Synapse (New York, N.Y.)*, 69(9), 453–460. <https://doi.org/10.1002/syn.21834>
- Lin, S.Y., Zhang, G.W., Liao, Y.J. & Gong, D.M. (2016). The inhibitory kinetics and mechanism of dietary vitamins D-3 and B-2 on xanthine oxidase. *Food & Function*, , 2849–2861
 - Lioi, M., Santoro, A., Barbieri, R., Salzano, S. and Ursini, M., 2004. Ochratoxin A and zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 557: 19–27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2003.09.009>
 - Lühe, A., Hildebrand, H., Bach, U., Dingermann, T. and Ahr, H.-J., 2003. A new approach to studying ochratoxin A (OTA)-induced nephrotoxicity: expression profiling in vivo and in vitro employing cDNA microarrays. *Toxicological Sciences* 73: 315–328. <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfg073>
 - Malir F, Ostry V, Novotna E (2013b) Toxicity of the mycotoxin ochratoxin A in the light of recent data. *Toxin Rev* 32(2):1933
 - Malir F, Ostry V, Pfohl-Leszkowicz A, Novotna E (2013a) Ochratoxin A: developmental and reproductive toxicity-An overview. *Birth Defects Res. B Dev Reprod Toxicol* 98(6):493–502
 - Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Malir, J., Toman, J., Jul 2016. Ochratoxin a: 50 Years of research. *Toxins (Basel)* 04, 8.
 - Mally, A., 2012. Ochratoxin A and mitotic disruption: mode of action analysis of renal tumor formation by ochratoxin A. *Toxicological Sciences* 127: 315–330. <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfs105>
 - Manderville R, Pfohl-Leszkowicz A (2008) Bioactivation and DNA adduction as a rationale for ochratoxin A carcinogenesis. *World Mycotoxin J* 1(3):357–367
 - Marin-Kuan, M., Nestler, S., Verguet, C., Bezencon, C., Piguet, D., Mansourian, R., et al. 2005. A toxicogenomics approach to identify new plausible epigenetic mechanisms of ochratoxin A carcinogenicity in rat. *Toxicological Sciences* 89: 120–134. <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfj017>

- Merve Tuğçe Tunç, İlkay Koca, Ohmic heating assisted hydrodistillation of clove essential oil , , Industrial Crops & Products 141 (2019) 111763 , <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111763>.
- Moez El Saadani. “Detection des ochratoxines dans la production alimentaire par l’utilisation d’aptacapteur capacitive”. These de doctorat en sciences des aliments et nutrition biotechnologie et microbiologi. Université de Montpellier
- Moghadam, Z.A.; Hosseini, H.; Hadian, Z.; Asgari, B.; Mirmoghtadaie, L.; Mohammadi, A.; Shamloo, E.; Javadi, N.H.S. Evaluation of the Antifungal Activity of Cinnamon, Clove, Thymes, Zataria Multiflora, Cumin and Caraway Essential Oils against Ochratoxigenic Aspergillus ochraceus. J. Pharm. Res. Int. 2019, 26, 1–16
- Mor, F., Sengul, O., Topsakal, S., Kilic, M. A., & Ozmen, O. (2017). Diabetogenic Effects of Ochratoxin A in Female Rats. *Toxins*, 9(4), 144. <https://doi.org/10.3390/toxins9040144>
- Mun~oz K, Blaszkewicz M, Campos V, Vega M and Degen GH, 2014. Exposure of infants to ochratoxin A with breast milk. *Archives of Toxicology*, 88, 837–846.
- Nicoletta Gagliano, Isabella Dalle Donne, Carlo Torri, Massimiliano Migliori, Fabio Grizzi, Aldo Milzani, Cristina Filippi, Giorgio Annoni, Piergiuseppe Colombo, Francesco Costa, Giorgia Ceva-Grimaldi, Alberto A.E. Bertelli, Luca Giovannini, Magda Gioia, Early cytotoxic effects of ochratoxin A in rat liver: A morphological, biochemical and molecular study, *Toxicology*, Volume 225, Issues 2–3, 2006, Pages 214-224, ISSN 0300-483X, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.06.004> (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X06003994>)
- Nogaim, Q. A., Bugata, L. S. P., Prabhakar, P. V., Reddy, U. A., Kumari, I., & Mahboob, M. (2020). Protective effect of Yemeni green coffee powder against the oxidative stress induced by Ochratoxin A. *Toxicology reports*, 7, 142-148.
- novel tool for drug discovery. Database, 2016, vol. 3, p. 4.
- O'Brien, E., Dietrich, D.R., Jan 2005. Ochratoxin A: the continuing enigma. *Crit. Rev. Toxicol.* 35, 33–60
- O'Brien, E.; Heussner, A.H.; Dietrich, D.R. Species-, sex-, and cell type-specific effects of

- ochratoxin A and B. *Toxicol Sci.* **2001**, *63*, 256–264
- Okutan, H., Aydin, G., & Ozcelik, N. (2004). Protective role of melatonin in ochratoxin a toxicity in rat heart and lung. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, *24*(6), 505-512.
 - Oliveira, T. L. C. D., Cardoso, M. D. G., Soares, R. D. A., Ramos, E. M., Piccoli, R. H., & Tebaldi, V. M. R. (2013). Inhibitory activity of *Syzygium aromaticum* and *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. essential oils against *Listeria monocytogenes* inoculated in bovine ground meat. *Brazilian Journal of Microbiology*, *44*(2), 357-365.
 - Osbourn, A.E.; Lanzotti, V. *Plant-Derived Natural Products: Synthesis, Function, and Application*; Springer Science & Business Media: New York, NY, USA, 2009; p. 612.
 - Pachoulide, C. (2021). *Les méthodes in silico dans la recherche pharmaceutique: exemple d'application pour l'étude pharmacocinétique post-autorisation de mise sur le marché des β -bloquants utilisés pour le traitement du glaucome* (Doctoral dissertation).
 - Palabiyik, S.S., Erkekoglu, P., Zeybek, N.D., Kizilgun, M., Baydar, D.E., Sahin, G., Giray, B.K., Sep 2013. Protective effect of lycopene against ochratoxin A induced renal oxidative stress and apoptosis in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* *65*, 853–861.
 - Paradells, S., Rocamonde, B., Llinares, C., Herranz-Pérez, V., Jimenez, M., Garcia-Verdugo, J. M., ... & Garcia-Esparza, M. A. (2015). Neurotoxic effects of ochratoxin A on the subventricular zone of adult mouse brain. *Journal of Applied Toxicology*, *35*(7), 737-751.
 - Park, S., Lim, W., You, S. and Song, G., 2019. Ochratoxin A exerts neurotoxicity in human astrocytes through mitochondria-dependent apoptosis and intracellular calcium overload. *Toxicology Letters* *313*: 42–49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.05.021>
 - Park, S., Lim, W., You, S., & Song, G. (2019). Ochratoxin A exerts neurotoxicity in human astrocytes through mitochondria-dependent apoptosis and intracellular calcium overload. *Toxicology Letters*, *313*, 42-49.

- Peteri, Z., J. Teren, C. Vagvolgyi and J. Varga, 2007. Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. *Food Microbiol.*, 24: 205-210.
- Petzinger, E.; Weidenbach, A. Mycotoxins in the food chain: The role of ochratoxins. *Livest.Prod. Sci.* **2002**, 76, 245–250.
- Pfohl-Leszkowicz A, Manderville RA (2007) Ochratoxin A: an overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Mol NutrFood Res* 51(1):61–99
- Pfohl-Leszkowicz, A., & Manderville, R.A., 2012. An update on direct genotoxicity as molecular mechanism of ochratoxin A carcinogenicity. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 252–262.
- Pfohl-Leszkowicz, A., Hadjeba-Medjdoub, K., Ballet, N., Schrickx, J., Fink-Gremmels, J., 2015. Assessment and characterisation of yeast-based products intended to mitigate ochratoxin exposure using in vitro and in vivo models. *Food Addit Contam A* 32(4), 604–616
- Pfohl-Leszkowicz, A., Manderville, R.A., Sep 2007. Ochratoxin A: an overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans (vol 51, pg 61, 2007). *Mol. Nutr. Food Res.* 51 1192–1192.
- Pfohl-Leszkowicz, A., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I.N., Castegnaro, M., Mar 2002. Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. *Food Addit. Contam.* 19, 282–302.
- Pinzi, L., & Rastelli, G. (2019). Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4331. <https://doi.org/10.3390/ijms20184331>
- Pitt J I, Hocking A D, 1997, *Fungi and food spoilage*, 2nd edition, London : Blackie academic and profesional.
- Poo’r M, Veres B, Jakus PB, Antus C, Montsko’ G, Zr’inyi Z, Vladimir-Kne’zevi’c S, Petrik J and Ko}szegi T, 2014. Flavonoid diosmetin increases ATP levels in kidney cells and relieves ATP depleting effect of ochratoxin A. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 132, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.01.016>
- Qi, X., Yu, T., Zhu, L., Gao, J., He, X., Huang, K., et al. 2014. Ochratoxin A induces rat renal carcinogenicity with limited induction of oxidative stress responses. *Toxicology and Applied Pharmacology* 280: 543–549. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2014.08.030>

- Reddy, K.R.N., N.I. Farhana, B. Salleh and C.A.F. Oliveira, 2010. Microbiological Control of Mycotoxins: Present Status and Future Concerns, Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology A.Mende Z- Vilas.
- Rkiba Z, "Les mycotoxines alimentaires", thèse de doctorat en pharmacie, Université de Mohamed V de Rabat, 2020, 164p.
- Rommelfanger, K. S., Edwards, G. L., Freeman, K. G., Liles, L. C., Miller, G. W., & Weinshenker, D. (2007). Norepinephrine loss produces more profound motor deficits than MPTP treatment in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(34), 13804-13809
- Rouvier Marion. « L'Ochratoxine A : nature, origine et toxicité », Thèse de doctorat en Vétérinaire, Université de Paul-Sabatier de Toulouse, 2002, P145.
- Roy, S., Narang, B.K., Gupta, M.K., Abbot, V., Singh, V. & Rawal, R.K. (2018). Molecular docking studies on isocytosine analogues as xanthine oxidase inhibitors. *Drug Research*, 68. 395–40
- Ruppel P, Delfosse Ph, Hornick J, "La contamination de la filière laitière par les mycotoxines : un risque sur la santé publique en Afrique subsaharienne", *Ann Med Vet*, 2004, 141-146pp.
- Sava, V., Reunova, O., Velasquez, A., Harbison, R. and Sanchez- Ramos, J., 2006. Acute neurotoxic effects of the fungal metab- olite ochratoxin-A. *Neurotoxicology* 27: 82–92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2005.07.004>
- Sava, V., Reunova, O., Velasquez, A., Harbison, R., & Sanchez-Ramos, J. (2006). Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite ochratoxin-A. *Neurotoxicology*, 27(1), 82-92.
- Sava, V., Reunova, O., Velasquez, A., Sanchez-Ramos, J., 2006. Can low level exposure to ochratoxin-A cause parkinsonism? *J. Neurol. Sci.* 249, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2006.06.006>. PMID: 16844142.
- Sava, V., Velasquez, A., Song, S. and Sanchez-Ramos, J., 2007. Adult hippocampal neural stem/progenitor cells in vitro are vulnera- ble to the mycotoxin ochratoxin-A. *Toxicological Sciences* 98: 187–197. <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfm093>

- Sava, V., Velasquez, A., Song, S., & Sanchez-Ramos, J. (2007). Adult hippocampal neural stem/progenitor cells in vitro are vulnerable to the mycotoxin ochratoxin-A. *Toxicological Sciences*, 98(1), 187-197.
- Selles, S.M.A., Koudri, M., Belhamiti, B.T. et al. Chemical composition, in-vitro antibacterial and antioxidant activities of *Syzygium aromaticum* essential oil. *Food Measure* **14**, 2352–2358 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00482-5>
- Shamas HMIRI , Mohamed RAHOUTI, Zakaria Habib , Badr SATRANI , Mohamed GHANMI , Mustapha AJJOURI , 2011 , Evaluation du potentiel antifongique des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et d'*Eucalyptus camaldulensis* dans la lutte biologique contre les champignons responsable de la détérioration des pommes en conservation ,Bulletin de la société Royale des sciences de Liège , vol :80 , pages :824-836 .
- Shim, WB., Ha, KS., Kim, MG. et al. Evaluation of the transfer rate of ochratoxin a to decoctions of herbal medicines. *Food Sci Biotechnol* **23**, 2103–2108 (2014). <https://doi.org/10.1007/s10068-014-0286-y>
- Shin, H. S., Lee, H. J., Pyo, M. C., Ryu, D., & Lee, K. W. (2019). Ochratoxin A-induced hepatotoxicity through phase I and phase II reactions regulated by AhR in liver cells. *Toxins*, 11(7), 377.
- Shrif, S.O., E.E. Salama and M.A. Abdel-Wahhab, 2008. Mycotoxins and child health: The need for health risk assessment. *Int. J. Hyg. Environ. Health*. doi: 10.1016/j.ijheh.2008.08.002.
- Śledź P, Cafilisch A. Protein structure-based drug design: from docking to molecular dynamics. *Curr Opin Struct Biol*. 2018;48:93-102.
- Sophie Gallotti et Jean Marc Fremy. 2006. Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. France. Agence française de sécurité sanitaire des aliments. 82p
- Sorrenti, V., Di Giacomo, C., Acquaviva, R., Barbagallo, I., Bognanno, M. and Galvano, F., 2013. Toxicity of ochratoxin a and its modulation by antioxidants: a review. *Toxins* 5: 1742– 1766. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins5101742>

- Souidi Sendous Wadjila ; Contribution à l'évaluation de l'effet de l'huile essentielle de clou de girofle sur la neurotoxicité des rats exposés à l'aluminium et infectés par *Candida albicans* Etude neurocomportementale ; mémoire de Master 2 en Biochimie ; université Dr Moulay Tahar Saida ; 2020 ; 180 p
- SRC. 2010. Interactive PhysProp Database Demo. Syracuse Research Corporation. <http://www.syrres.com/what-we-do/databaseforms.aspx?id=386> and search on CAS number.
- Studer-Rohr, I., Schlatter, J. and Dietrich, D.R., 2000. Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans. *Archives of Toxicology* 74: 499–510. <http://dx.doi.org/10.1007/s002040000157>
- Subramanian, S.; Kanthasamy, A.; Balasubramanian, N.; Sekar, N.; Govindasamy, S. Ochratoxin A toxicity on carbohydrate metabolism in rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1989, 43, 180–184. [CrossRef] [PubMed]
- Sueck, F., Cramer, B., Czeschinski, P., Humpf, H.U., 2019. Human study on the kinetics of 2'R-ochratoxin A in the blood of coffee drinkers. *Mol. Nutr. Food Res.* 63, e1801026.
- Szymanowicz ,2011, PROFILS IMMUNO-ANALYTIQUES EN BIOLOGIE MÉDICALE ,Caractéristiques immunoanalytiques du cortisol , *Immunoanalytical characteristics of cortisol* , 26, 147—157 , doi:10.1016/j.immbio.2011.03.002 .
- Tabuc C, "Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines", thèse de doctorat en pathologie mycologie génétique et nutrition, Université de Bucarest, 2007, 190p.
- Tamás Kőszegi ., & Poór, M. (2016). Ochratoxin A: Molecular Interactions, Mechanisms of Toxicity and Prevention at the Molecular Level. *Toxins*, 8(4), 111. <https://doi.org/10.3390/toxins8040111>
- Tao, X., Huang, Y., Wang, C., Chen, F., Yang, L., Ling, L., ... & Chen, X. (2020). Recent developments in molecular docking technology applied in food science: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(1), 33-45.
- Tao, Y., Xie, S., Xu, F., Liu, A., Wang, Y., Chen, D., Pan, Y., Huang, L., Peng, D., Wang, X.,

- & Yuan, Z. (2018). Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 112, 320–331. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.002>
- Teles, A. M., Silva-Silva, J. V., Fernandes, J. M. P., Abreu-Silva, A. L., Calabrese, K. D. S., Mendes Filho, N. E., ... & Almeida-Souza, F. (2021). GC-MS Characterization of Antibacterial, Antioxidant, and Antitrypanosomal Activity of *Syzygium aromaticum* Essential Oil and Eugenol. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021.
 - Thase ME. Managing depressive and anxiety disorders with escitalopram. Expert opinion on pharmacotherapy. 2006;7:429–440. [PubMed] [Google Scholar]
 - Travis R. Bui-Klimke & Felicia Wu (2015) Ochratoxin A and Human Health Risk: A Review of the Evidence, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55:13, 1860-1869, DOI: [10.1080/10408398.2012.724480](https://doi.org/10.1080/10408398.2012.724480)
 - Veprikova Z, Zachariasova M, Dzuman Z, Zachariasova A, Fenclova M, Slavikova P, Vaclavikova M, Mastovska K, Hengst D and Hajslova J, 2015. Mycotoxins in plant-based dietary supplements: hidden health risk for consumers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29, 6633–6643.
 - Wang, Y., Wang, L., Wu, F., Liu, F., Wang, Q., Zhang, X., ... & Liu, Y. (2018). A consensus ochratoxin A biosynthetic pathway: Insights from the genome sequence of *Aspergillus ochraceus* and a comparative genomic analysis. *Applied and environmental microbiology*, 84(19), e01009-18.
 - Weidenbach A., Petzinger E. Ochratoxin A: Toxicology of an abundant mycotoxin. *Curr. Top. Pharmacol.* 2004;8:235–250.
 - Weidenbach, A., Schuh, K., Failing, K. and Petzinger, E., 2000. Ochratoxin A induced TNF α release from the isolated and blood-free perfused rat liver. *Mycotoxin Research* 16: 189–193. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02940035>
 - Weidenburner M, 2001, *Encyclopedia of food mycotoxins*, edit : Springer-Berlin (DEU), 296P
 - Woo CS, Partanen H, Myllynen P, Vaehäkangas K and El-Nezami H, 2012. Fate of the teratogenic and carcinogenic ochratoxin A in human perfused placenta. *Toxicology*

Letters, 208, 92–99.

- Wood JM, Maibaum J, Rahuel J, Grütter MG, Cohen N-C, Rasetti V, et al. Structure-based design of aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* 5 sept 2003;308(4):698-705.
- Xiang, M., Cao, Y., Fan, W., Chen, L., & Mo, Y. (2012). Computer-aided drug design: Lead discovery and optimization. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening.* <https://doi.org/10.2174/138620712799361825>
- Xiong, K., Zhi, H.-W., Liu, J.-Y., Wang, X.-Y., Zhao, Z.-Y., Pei, P.-G., et al. 2020. Detoxification of ochratoxin A by a novel *aspergillus oryzae* strain and optimization of its biodegradation. *Revista Argentina de Microbiología* 53:48-54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2020.06.001>
- Yadava, U. (2018). Search algorithms and scoring methods in protei-ligand docking. *Endocrinol Int J*, 6(6), 359-367
- Yan, Z.Q. & Wang, J. (2013). Optimizing scoring function of protein-nucleic acid interactions with both affinity and specificity. *PLoS ONE*, , e74443.
- Yanfei Tao, Shuyu Xie, Fanfan Xu, Aimei Liu, Yanxin Wang, Dongmei Chen, Yuanhu Pan, Lingli Huang, Dapeng Peng, Xu Wang, Zonghui Yuan, Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism, *Food and Chemical Toxicology*, Volume 112, 2018, Pages 320-331, ISSN 0278-6915, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.002> (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691518300024>)
- Yanfei Tao, Shuyu Xie, Fanfan Xu, Aimei Liu, Yanxin Wang, Dongmei Chen, Yuanhu Pan, Lingli Huang, Dapeng Peng, Xu Wang, Zonghui Yuan, Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism, *Food and Chemical Toxicology*, Volume 112, 2018, Pages 320-331, ISSN 0278-6915, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.002> (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691518300024>)
- Yang Q, He X, Li X et al (2014) DNA damage and S phase arrest induced by Ochratoxin A in human embryonic kidney cells (HEK 293). *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen* 765:22–31
- Yang S, Zhang H, De Saeger S, De Boevre M, Sun F, Zhang S, Cao X and Wang Z, 2015. *In vitro* and *in vivo* metabolism of ochratoxin A: a comparative study using ultra-

performance liquid chromatography-quadrupole/ time-of-flight hybrid mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407, 3579–3589.

- Yankelevitch-Yahav, R., Franko, M., Huly, A., & Doron, R. (2015). The forced swim test as a model of depressive-like behavior. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (97), 52587. <https://doi.org/10.3791/52587>
- Yiannikouris A, Jouany J P, "Mycotoxins in feed and their fate in animals : a review", INRA EDP sciences, 2002, 81-99 pp, Doi : 10.1051/animres:2002012
- Yoon, S., Cong, W. T., Bang, Y., Lee, S. N., Yoon, C. S., Kwack, S. J., ... & Choi, H. J. (2009). Proteome response to ochratoxin A-induced apoptotic cell death in mouse hippocampal HT22 cells. *Neurotoxicology*, 30(4), 666-676.
- Yu, W., & Mackerell, A. D. (2017). Computer-Aided Drug design methods. *Methods in Molecular Biology*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6634-9_5
- Zengin, G., Ak, G., Ceylan, R., Uysal, S., Llorent-Martínez, E., Di Simone, S. C., ... & Chiavaroli, A. (2022). Novel Perceptions on Chemical Profile and Biopharmaceutical Properties of *Mentha spicata* Extracts: Adding Missing Pieces to the Scientific Puzzle. *Plants* 2022, 11, 233.
- Zhang, X., Boesch-Saadatmandi, C., Lou, Y., Wolffram, S., Huebbe, P. and Rimbach, G., 2009. Ochratoxin A induces apoptosis in neuronal cells. *Genes & Nutrition* 4: 41. <http://dx.doi.org/10.1007/s12263-008-0109-y>
- Zhihong L, Kunlun H, Yunbo L. 2015. Ochratoxin A and ochratoxin-producing fungi on cereal grain in China: a review. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 32:461– 470. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.981763>
- Zhu, L.Y., Yu, T., Qi, X.Z., Gao, J., Huang, K.L., He, X.Y., Luo, H.S., Xu, W.T., Dec 2016. Limited link between oxidative stress and ochratoxin a-induced renal injury in an acute toxicity rat model. *Toxins* 8.