

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES

ALARA : As Low As Reasonably Achievable

ANOVA : Analysis of Variance

CEDEAO : Communauté Economique des Etats de l'Afrique de l'Oest

FAO : Organisation des Nations Unies pour l'Agriculture et l'Alimentation

IITA : Institut Internationale d'Agriculture Tropicale

PACA : Partnership for Aflatoxin Control in Africa

ppb : partie par billion

ppm : partie par million

TABLEAU DES MATIÈRES

Table des matières

DEDICACES	i
Remerciements	ii
Liste des abréviations et acronymes.....	iii
Tableau des matières	iv
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	vii
Liste des photos.....	viii
Résumé.....	ix
ABSTRACT.....	x
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	3
I.Généralité sur les moisissures.....	4
I.1 Les champignons du genre <i>Aspergillus</i>	4
I.1.1 Historique	4
I.1.2 Classification	4
I.1.3 Caractères culturels des <i>Aspergillus</i>	6
I.1.4 Caractères microscopiques des <i>Aspergillus</i>	7
I.1.5 Cycle de développement des champignons d' <i>Aspergillus</i>	8
I.1.6 Contaminations des cultures par les champignons d' <i>Aspergillus</i>	9
I.2 Les mycotoxines	10
I.2.1 Définition	10
I.2.2 Biogenèse des mycotoxines	10
I.2.3 Origine chimique des mycotoxines	10
I.2.4 Les mycotoxines dans les produits alimentaires.....	11

I.2.5 Exposition aux mycotoxines	11
I.3 Les Aflatoxines	13
I.3.1 Origine	13
I.3.2 Impact de l'aflatoxine.....	13
I.3.3 Règlementation sur l'aflatoxine	14
II Méthodes de lutte contre les champignons <i>d'Aspergillus</i>	15
II.1 Les fongicides chimiques	15
II.2 Alternative aux fongicides chimiques	15
III Les huiles essentielles	16
III.1 Définition des huiles essentielles	16
III.2 Les plantes aromatiques.....	16
III.3 Domaines d'utilisation et intérêt des huiles essentielles	16
III.4 Propriétés physiques des huiles essentielles	17
III.5 Propriétés chimiques des huiles essentielles	17
III.6 Les facteurs influençant la composition des huiles essentielles	17
III.7 Extraction des huiles essentielles	18
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	19
I Matériel	20
I.1 Les plantes aromatiques.....	20
I.2 Echantillons de maïs.....	21
I.3 Matériel fongique	21
II. Méthodes.....	22
II.1 Isolement et identification des champignons du genre <i>Aspergillus sp.</i>	22
II.1.1 Préparations des milieux de cultures	22
II.1.2 Isolement des champignons du genre <i>Aspergillus sp</i>	22
II.1.3 Identification des espèces.....	23
II.2 Extraction des huiles essentielles.....	23

II.2.1 Méthode d'extraction des huiles essentielles	23
II.2.2 Détermination du rendement des huiles essentielles obtenues	24
II.2.3 Conservation des huiles essentielles obtenues	24
II.3 Evaluation de l'efficacité antifongique <i>in vitro</i> d'huiles essentielles sur la croissance mycélienne des champignons.	24
II.4 Evaluation de l'efficacité antifongique <i>in vivo</i> des huiles essentielles sur les souches d' <i>Aspergillus flavus L</i>	25
II.5 Traitement des données	26
CHAPITRE III : RESULTATS	27
III.1 Identification des champignons	28
III.2 Rendement en huiles essentielles	31
III.3 Activité antifongique <i>in vitro</i> des huiles essentielles sur la croissance mycélienne ..	32
III.4 Analyse de variance du taux d'inhibition de la croissance mycélienne	35
III.5 Activité antifongique <i>in vivo</i> des huiles essentielles sur les souches <i>Aspergillus flavus L</i>	36
CHAPITRE IV : DISCUSSION.....	37
CONCLUSION.....	41
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	43
ANNEXES	I

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :Classification des champignons d' <i>Aspergillus</i> de la section flavi.	5
Tableau 2 : Caractéristiques des champignons : <i>Aspergillus parasiticus</i> et <i>Aspergillus flavus</i> .6	
Tableau 3 : Origine chimique des mycotoxines.	11
Tableau 4 : Les mycotoxines sous seuils de réglementions associés aux denrées.....	12
Tableau 5 : les Plantes aromatiques utilisées.....	20
Tableau 6 : Rendements en huiles essentielles extraites	31
Tableau 7 : Analyse de variance du taux d'inhibition de la croissance mycélienne	35
Tableau 8 : Taux de réductions des charges en <i>Aspergillus flavus</i> L	36

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Caractères microscopiques des <i>Aspergillus</i>	7
Figure 2 : Cycle naturel d' <i>Aspergillus</i> dans l'environnement.	8
Figure 3 : Dispositif expérimental de la méthode d'extraction par entrainement à la vapeur ..	18
Figure 4 : Effets des huiles essentielles sur la croissance mycélienne d' <i>A. parasiticus</i>	32
Figure 5 : Effets des huiles essentielles sur la croissance mycélienne d' <i>Aspergillus flavus</i> L .	33
Figure 6 : Effets des huiles essentielles sur la croissance mycélienne d' <i>Aspergillus flavus</i> S	34
Figure 7 : Charges en <i>A. flavus</i> L dans les différents échantillons traités.....	36

LISTE DES PHOTOS

Photo 1 : Caractères macroscopiques d' <i>Aspergillus flavus</i>	7
Photo 2 : Epi de maïs contaminé par <i>Aspergillus flavus</i>	9
Photo 3 : Clous d' <i>Eugenia caryophyllata</i>	20
Photo 4 : Feuilles de <i>Melaleuca quinquenervia</i>	21
Photo 5 : Un pied de <i>Cymbopogon citratus</i>	21
Photo 6 : Milieu de culture rose bengal (A) et milieu 5/2 agar (B).....	22
Photo 7 : Dispositif d'extraction des huiles essentielles par entrainement à la vapeur	23
Photo 8 : Mesure du diamètre de croissance mycélienne	25
Photo 9 : Dispositif de fumigation.....	25
Photo 10 : Aspect morphologique des isolats d' <i>Aspergillus parasiticus</i>	28
Photo 11 : Conidiophore d' <i>Aspergillus parasiticus</i> G X40	28
Photo 12 : Aspect morphologique des isolats d' <i>Aspergillus flavus</i> L	29
Photo 13 : Conidiophore d' <i>Aspergillus flavus</i> L G X40.....	29
Photo 14 : Aspect morphologique des isolats d' <i>Aspergillus flavus</i> S.....	30
Photo 15 : Conidiophore d' <i>Aspergillus flavus</i> S G X40.....	30

RÉSUMÉ

Les champignons aflatoxinogènes constituent un véritable problème de sécurité alimentaire à cause de la menace de l'aflatoxine dans certaines denrées de première nécessité telles que les céréales. Ces mycotoxines sont des métabolites secondaires reconnus cancérigènes car favorisant le développement de certaines maladies hépatiques comme le cancer du foie. A cet effet, il urge de mettre sur pied des stratégies de contrôle durable des champignons aflatoxinogènes. C'est dans ce cadre que s'inscrit cette présente étude qui a comme objectif de contribuer à la sécurité sanitaire des aliments et à l'augmentation des revenus des producteurs.

Ainsi, des souches d'*Aspergillus* ont été isolées à partir d'échantillons de grains maïs. Une caractérisation macroscopique et microscopique a permis d'identifier les espèces suivantes: *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus flavus* L et *Aspergillus flavus* S. Des tests d'efficacité antifongique *in vitro* ont été réalisés sur ces champignons avec des huiles essentielles extraites de trois plantes aromatiques : *Eugenia caryophyllata*, *Cymbopogon citratus* et *Melaleuca quinquenervia*. Les huiles essentielles d'*Eugenia caryophyllata* et de *Cymbopogon citratus* ont ensuite été utilisées pour réaliser des tests d'efficacité antifongique *in vivo* sur des échantillons de grains de maïs, par fumigation.

Les résultats des tests d'efficacité *in vitro* ont montré une bonne activité antifongique des trois huiles essentielles sur la croissance mycélienne des champignons. Cependant, cette efficacité varie en fonction du type d'huiles essentielles. Ainsi, l'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllata* s'est montrée la plus performante avec une inhibition totale de la croissance mycélienne des trois souches d'*Aspergillus* à la concentration de 500 ppm, elle est suivie de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* qui s'est également montré très efficace avec une inhibition de 100% de la croissance mycélienne des trois souches d'*Aspergillus* à 2000 ppm et enfin vient l'huile essentielle de *Melaleuca quinquenervia* qui a montré une réduction de la croissance mycélienne de $79,74 \pm 0,68$ % pour *Aspergillus parasiticus*, $73,80 \pm 5,52$ % pour *Aspergillus flavus* L et $82,27 \pm 0,13$ % pour *Aspergillus flavus* S à la concentration de 8000 ppm. Les résultats des tests d'efficacité *in vivo* avec les huiles essentielles d'*Eugenia caryophyllata* et de *Cymbopogon citratus* ont montré une bonne activité antifongique sur les souches d'*Aspergillus flavus* L. Ainsi, une réduction de 68,22% de la charge en *Aspergillus flavus* L a été notée avec l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus*. Pour l'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllata* cette réduction est de 59,08%

Mots clés : *Aspergillus*, mycotoxines, contrôle biologique, huiles essentielles maïs.

ABSTRACT

Aflatoxinogenic fungi are a real food safety problem because of the threat of aflatoxin in certain staple foods such as cereals. These mycotoxins are secondary metabolites recognized as carcinogenic because which promotes the development of certain liver diseases such as liver cancer. To this end, it is urgent to set up strategies for the sustainable control of fungi. aflatoxinogens. It is within this framework that this study is part of, with the following objectives to evaluate the antifungal effectiveness of essential oils for biological control mycotoxinogenic fungi of the genus *Aspergillus* of the flavi section.

For example, *Aspergillus* strains were isolated from corn samples. A macroscopic and microscopic characterization allowed the identification of the species *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus flavus* L and *Aspergillus flavus* S. Efficacy tests in vitro antifungal tests have been carried out on these fungi with essential oils extracted three aromatic plants: *Eugenia caryophyllata*, *Cymbopogon citratus* and *Melaleuca. quinquenervia*. The essential oils of *Eugenia caryophyllata* and *Cymbopogon citratus* have were then used to perform in vivo antifungal efficacy tests on samples of corn kernels by fumigation.

The results of in vitro tests showed good antifungal activity of the three oils essential on the mycelial growth of fungi. However, this efficacy varies depending on the type of essential oil. For example, the essential oil of *Eugenia caryophyllata* has been shown to be the most effective with total inhibition of mycelial growth of the three strains of *Aspergillus* at a concentration of 500 ppm, it is followed by the essential oil of *Cymbopogon citratus*, which has also been shown to be very effective with 100% inhibition of the mycelial growth at 2000 ppm and finally comes the essential oil of *Melaleuca quinquenervia* which showed a reduction in mycelial growth of $79.74 \pm 0.68\%$ for *Aspergillus parasiticus*, $73.80 \pm 5.52\%$ for *Aspergillus flavus* L and $82.27 \pm 0.13\%$ for. *Aspergillus flavus* S at the concentration of 8000 ppm. The results of the in vivo efficacy tests with the essential oils of *Eugenia caryophyllata* and *Cymbopogon citratus* showed a good antifungal activity on strains of *Aspergillus flavus* L. Thus, a reduction of 68.22% of the load in *Aspergillus flavus* L was noted with the essential oil of *Cymbopogon citratus*. For the essential oil of *Eugenia caryophyllata* this reduction is 59.08%.

Keywords: *Aspergillus*, mycotoxins, biological control, essential oils. maize

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires toxiques produites par certaines moisissures (champignons) et sont associées fréquemment aux contaminants naturels des denrées alimentaires. Parmi ces mycotoxines, les aflatoxines sont les plus redoutées et seraient responsables de la contamination de la plupart des produits destinés à l'alimentation humaine et animale telles que les céréales, les oléagineux, les épices, les noix et le lait (AFSSA, 2009).

En effet, près de 98% de la population Ouest-Africaine est en risque d'exposition aux aflatoxines à travers l'alimentation (Bankole et al. 2003). Au Sénégal, plusieurs études ont montré la présence d'aflatoxines dans les denrées alimentaires de première nécessité. Diedhiou et al. (2011) ont trouvé des concentrations d'aflatoxines allant jusqu'à 852 ppb au niveau d'échantillons de maïs collectés dans plusieurs zones agricoles du pays. Il en est de même pour l'arachide commercialisée sur le marché local avec des niveaux d'aflatoxines variant de 8,88 à 40,78 ppb (Ndong, 2011). Aussi, pour le riz local, les études menées par Ba (2017) ont montré des taux de contamination élevés avec des teneurs variant de 2,4 à 19 ppb.

Chez l'homme, les aflatoxines peuvent entraîner des retards de croissance, un affaiblissement du système immunitaire et favoriser le développement des maladies hépatiques comme l'hépatite B (PACA, 2017). En plus de ces problèmes sanitaires les aflatoxines ont de lourdes conséquences sur le plan économique. Elles sont responsables de pertes économiques majeures surtout dans les pays dont le PIB dépend fortement du commerce de l'exportation des produits alimentaires sujettes aux contaminations par les aflatoxines. Les pertes annuelles dues aux aflatoxines sont estimées à 1,2 milliard de dollars dans le monde dont 38% sont enregistrées dans le continent africain soit 450 millions de dollars (Marechera, 2015). Ces mycotoxines sont associées le plus souvent aux champignons appartenant au genre *Aspergillus* de la section flavi.

Les *Aspergillus* sont des champignons microscopiques qui contaminent les récoltes dans les champs ou dans les entrepôts de stockage (Barros et al., 2005). Lorsque les conditions climatiques sont favorables, certaines souches du genre *Aspergillus* produisent des mycotoxines (WHO, 2006). Les espèces telles que : *A. flavus*, *A. parasiticus* et *A. nomius* sont les plus connues et ont fait l'objet de plusieurs travaux de recherches qui ont démontré leur capacité de production d'aflatoxines (Ito et al., 2001 ; Johnsson et al., 2008).

Alors, pour faire face à ce fléau les fongicides chimiques sont souvent utilisés mais à cause de leurs effets néfastes sur la santé humaine et animale et la dégradation de l'environnement.

Ainsi, la recherche d'alternative s'impose et est orientée vers des méthodes de lutte beaucoup plus saines respectant les normes écologiques et environnementales d'où le concept de lutte biologique où les huiles essentielles occupent une place importante. Activité antifongique des huiles essentielles résulte non seulement de leurs composés majoritaires mais aussi de l'effet de synergie entre leurs composés minoritaires (Soumanou et Adjou 2016).

C'est dans ce cadre que cette étude a été menée et a pour objectif général de contribuer à la sécurité sanitaire des aliments et à l'augmentation des revenus des producteurs.

Les objectifs spécifiques sont :

- isoler et caractériser les champignons mycotoxinogènes du genre *Aspergillus* de la section flavi ;
- tester l'efficacité antifongique *in vitro* de trois huiles essentielles sur la croissance mycélienne;
- tester l'efficacité antifongique *in vivo* des huiles essentielles ayant montré les meilleures efficacités *in vitro*.

**CHAPITRE I : SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE**

I. Généralités sur les moisissures

Les moisissures sont des champignons eucaryotes uni ou pluricellulaires, de structure syncytiale, hétérotrophes. Leur appareil végétatif est un thalle composé de filaments (hyphes) ramifiés dont l'ensemble constitue le mycélium (Nicklin et *al.*, 2000). Leurs spores sont issues soit d'une reproduction sexuée dans le cas des champignons téléomorphes ou d'une multiplication asexuée chez les champignons anamorphes. Ces champignons sont appelés couramment "moisissures", véritables agglomérats de filaments mycéliens et d'organes fructifères capables de coloniser des substrats très divers (végétaux, papier, cuir, murs...) (Chabasse et al. 1999).

Les champignons sont bénéfiques pour la transformation de matières premières alimentaires, la production d'antibiotiques mais aussi d'enzymes pouvant être utiles en santé humaine et dans l'industrie agro-alimentaire. Cependant, ils sont souvent responsables de l'altération des denrées alimentaires, de l'apparition des mycoses et allergies mais aussi de la production de métabolites toxiques (mycotoxines) notamment les moisissures appartenant aux genres *Penicillium*, *Fusarium* et *Aspergillus* (Dupuy, 1994).

I.1 Les champignons du genre *Aspergillus*

I.1.1 Historique

Les *Aspergillus* ont été décrits pour la première fois en 1729 par Pier Antonio Micheli, un prêtre italien et biologiste qui a été le premier à tenter l'étude scientifique des champignons. Il donna le nom d'*Aspergillus* aux moisissures qu'il observe au microscope : il leur trouve une ressemblance très marquée avec le goupillon (« aspergillus » en latin) dont on se servait à l'église. L'histoire de ces microorganismes est surtout définie à travers les contaminations dont ils sont responsables comme celle des épisodes de la « maladie X du dindon » qui a sévi en 1960 en Angleterre et l'épidémie mortelle des maïs contaminés de 2004 au Kenya où les champignons *Aspergillus* étaient incriminés (CDC, 2004).

I.1.2 Classification

Les espèces liées au genre *Aspergillus* sont largement étudiées et plus de 300 espèces ont été décrites. Les critères d'identification sont principalement morphologiques. Cependant, l'application des outils de caractérisation moléculaire a montré que cette identification strictement phénotypique pouvait conduire à des erreurs d'identification et que certains regroupements d'espèces n'avaient pas de fondement (Balajee et *al.*, 2006).

Pour tenir compte des résultats de caractérisation moléculaire, des « sous genres » appelés «sections» ont été créés. Les sections regroupent toutes les espèces morphologiquement semblables mais génétiquement différentes. Les moisissures du genre *Aspergillus* (et des genres correspondant aux téléomorphes) sont actuellement réparties dans 6 sections principales : Usti, Flavi, Nigri, Circumdati, Clavati et Fumigati (Balajee et al., 2005).

Tableau 1 : Classification des champignons d'*Aspergillus* de la section flavi (Hibbett et al., 2007 ; Bennett, 2010).

Règne	Fungi
Embranchement	<i>Ascomycota</i>
Sous-embranchement	<i>Pezizomycotina</i>
Classe	<i>Eurotiomycetes</i>
sous-classe	<i>Eurotiomycetidae</i>
Ordre	<i>Eurotiales</i>
Famille	<i>Trichocomaceae</i>
Genre	<i>Aspergillus</i>
Sections	<i>Flavi</i>

➤ **Aspergillus de la section flavi**

Les espèces d'*Aspergillus* de la section flavi occupent des niches écologiques très diverses. Dans cette section, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* retiennent le plus d'attention car elles sont non seulement pathogènes pour certaines plantes (arachides, maïs et riz), mais elles produisent les aflatoxines (Smith et Moss, 1985). D'après Samson et al. (2006), il y a 18 espèces appartenant à la section flavi. Morphologiquement, les *Aspergillus* de la section flavi présentent des têtes conidiennes de couleur jaune vert à brun dont certaines produisent des sclérotés bruns foncés ou parfois jaunes. Parmi ces espèces *A. flavus* est une espèce génétiquement très complexe et a été subdivisée en deux catégories selon les caractères morphologique et génétique et le profil de production des mycotoxines. La première catégorie produit des sclérotés grands, de type « L » (Large) de diamètre supérieur à 400 µm.

La seconde catégorie produit de nombreux petits sclérotés, de type « S » (Small), de diamètre inférieur à 400 µm (Cotty, 1989). D’après Hua Sui-Sheng (2002), tous les isolats de type « S » sont aflatoxinogènes, alors que le type « L » comprend des producteurs et des non producteurs.

Tableau 2: Caractéristiques des champignons : *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus flavus* (Klich and Pitt 1988)

Souches	Caractéristiques
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Sur le plant biochimique ils produisent les aflatoxines de type B1, B2, G1 et G2. Sur le plan microscopique on peut observer des conidiophores relativement courts (24µm et 250µm) qui se terminent par une vésicule de diamètre moyenne (12µm et 19µm) avec des têtes unisériées plus fréquentes. Les conidies sont globuleuses et très échinulées voire épineuses.
<i>Aspergillus flavus</i>	Ils produisent uniquement les aflatoxines de type B1 et B2. Au microscope on peut observer des conidiophores relativement longue (300µm et 1200µm) qui se terminent par une vésicule de diamètre plus importante (20µm et 50µm) avec des têtes bisériées plus fréquentes. Les conidies sont lisses ou légèrement rugueuses.

I.1.3 Caractères culturels des *Aspergillus*

Les *Aspergillus* présentent une croissance rapide sur les milieux de culture classique (gélose au malt, Sabouraud). Après 48 heures d’incubation, on observe des colonies plates, formées de courts filaments aériens, blancs. Après 96 heures d’incubation, les colonies vont prendre leur teinte caractéristique, brune, verte, jaune ou noire selon les espèces. La majorité des *Aspergillus* poussent entre 22-25 °C. Les espèces thermophiles (*A. fumigatus*) se développent entre 37- 40 °C et parfois jusqu’à 57 °C (Morin, 1994 ; Badillet et al., 1987). Les *Aspergillus* forment des colonies souvent poudreuses ou granuleuses. La couleur des colonies permet une orientation rapide dans l’identification de l’espèce : gris-vert pour *A. fumigatus*, vert-jaune pour *A. flavus*, jaune puis noir pour *A. niger*.

Le revers de la colonie est incolore ou jaune, mais il peut brunir ou rougir avec l'âge (Chermette et Bussieras, 1993).

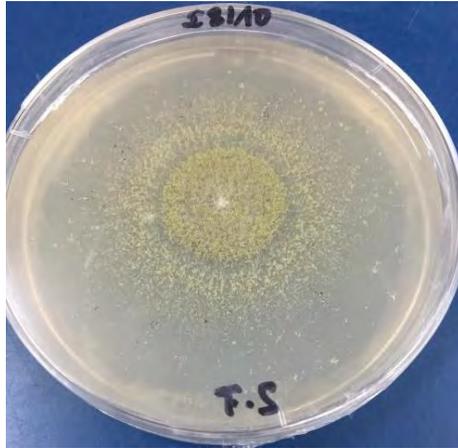


Photo 1 : Caractères macroscopiques d' *Aspergillus flavus*

I.1.4 Caractère microscopique des *Aspergillus*

Les *Aspergillus* sont caractérisés par un appareil végétatif (thalle) formé de filaments mycéliens hyalins, de diamètre fin et régulier, septes et ramifiés. Sur les filaments végétatifs, prennent naissance des filaments dressés, non cloisonnés (conidiophores) (figure1) qui se terminent par une vésicule de forme variable sur laquelle sont disposées les cellules conidiogènes ou phialides. Les phialides peuvent être insérées directement sur la vésicule (têtes unisériées) ou portées par des petites structures insérées sur la vésicule (têtes bisériées) nommées métules ou stigmates (Badillet et *al.*, 1987 ; Raper et Fennell, 1965). L'ensemble vésicule + métules + phialides + conidies constitue la tête aspergillaire.

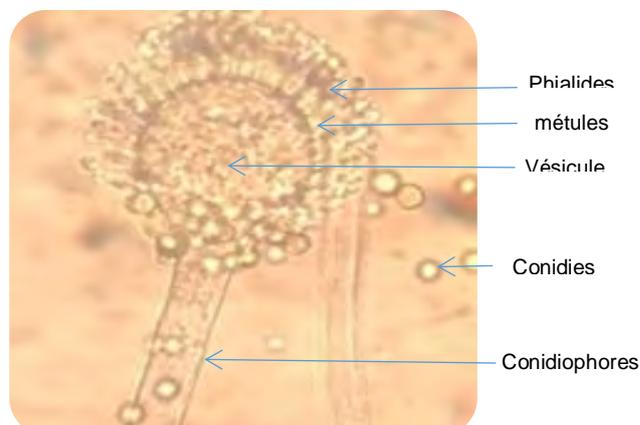


Figure 1: Caractère microscopique des *Aspergillus*

I.1.5 Cycle de développement des champignons d'*Aspergillus*

Dans l'environnement, les *Aspergillus* sont sous la forme de champignons filamenteux septes et ramifiés : cette forme végétative est appelée mycélium. En condition de stress, des structures spécialisées se développent à partir du mycélium : les conidiophores. Il s'agit d'organes de fructification au bout desquels les têtes aspergillaires ou vésicules terminales sont retrouvées. Les conidies, spores asexuées unicellulaires et uninucléées, sont produites au niveau des organes de fructification par les phialides. Les phialides sont des cellules conidiogènes fertiles, en forme de bouteille et qui prennent naissance sur la vésicule terminale. Ce sont les conidies, 2 à 3 μm de diamètre et très volatiles, qui sont responsables de la dissémination du champignon dans l'environnement. La germination des spores se déroule en deux étapes. Dans des conditions adéquates, les conidies gonflent. Après cette phase de gonflement, la croissance devient polarisée. En effet, on observe l'apparition d'un tube germinatif qui va s'allonger progressivement et produire un filament ramifié qui formera la colonie typique de tous les champignons filamenteux (Desoubeaux et Chandener,2010a).

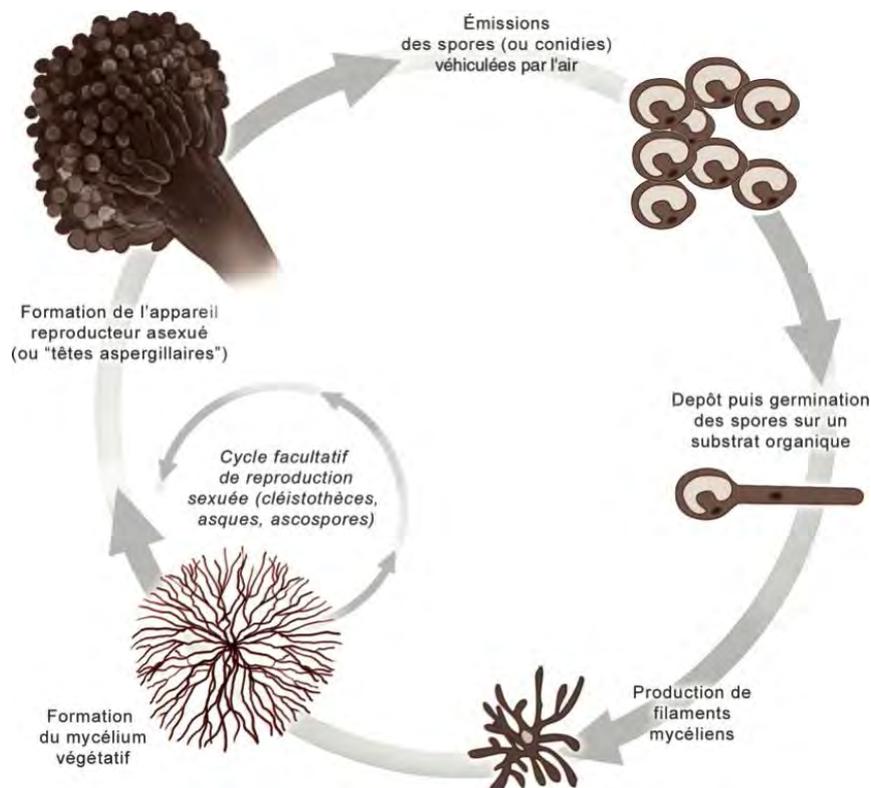


Figure 2 : Cycle naturel d'*Aspergillus* dans l'environnement.
Source : (Bouchara J.-P et al.;2013)

I.1.6 Contaminations des cultures par les champignons d'*Aspergillus*

Les *Aspergillus* ont une large répartition géographique, mais sont plus souvent associés aux régions à climat chaud et humide (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002). Ils se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol et le compost d'où des saprophytes. Cependant, ils peuvent aussi contaminer des plantes saines plus particulièrement les cultures. La présence d'*A. flavus* dans les cultures tels que les céréales se manifeste par une couleur vert-olive ou vert-gris sur les parties infectées (Photo 2), le risque de contamination par les aflatoxines est plus élevé sur les céréales gâtées et moisies que sur des grains présentant peu de moisissure (Akowuah et al., 2015). Parmi les facteurs qui exacerbent la contamination des céréales par les champignons d'*Aspergillus* et qui entraînent la prolifération des moisissures dans les grains on peut noter : l'entreposage des grains récoltés dont la teneur en humidité est >10% et pendant des périodes prolongées dans des installations inadéquates (Ahmed et al., 2009). Selon Alakonya et al. (2009), il est important de noter que le développement des champignons et la production d'aflatoxines se poursuivent à un rythme encore plus rapide lors des étapes post-récolte et de stockage.



Photo 2: Epi de maïs contaminé par *Aspergillus flavus*

Source : <https://observatoire-des-aliments.fr/dico-environnement/les-mycotoxines-familles>

I.2 Les mycotoxines

I.2.1 Définition

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires toxiques pour l'homme et les animaux produites par certaines souches de champignons qui se développent principalement dans les matières premières d'origine végétale (céréales, légumes, fruits) au champ et en cours de stockage. Elles ne sont pas nécessaires à la vie du champignon qui les synthétisent mais peuvent participer à son pouvoir pathogène (Hsieh, 1992 ; Watson, 1984). Plus de 300 métabolites secondaires ont pu être identifiées et environ une trentaine de ces molécules ont une véritable importance en terme de santé animale et humaine (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002).

I.2.2 Biogenèse des mycotoxines

Le métabolisme secondaire, très important chez les moisissures, aboutit à une grande diversité de molécules, dont les mycotoxines. La nature de ces produits très hétérogènes, dépend des caractères individuels de la souche et des conditions environnementales. Les voies de biosynthèse sont longues et complexes et les réactions sont catalysées par des enzymes de spécificités différentes de celles du métabolisme primaire (Luchese et Harrigan, 1993).

I.2.3 Origine chimique des mycotoxines

Selon la voie de leur biosynthèse, les mycotoxines présentent des origines chimiques très diverses (Tableau 3) : il s'agit de composés dérivés des acides aminés ou des polycétoacides ou encore des terpènes. Il convient de remarquer que dans un groupe structural de toxines, la toxicité peut varier considérablement d'une toxine à une autre et que le danger n'est pas toujours lié à la toxine elle-même, mais peut aussi venir de ses métabolites et de l'effet de synergie possible en cas de multi contamination (AFSSA, 2006). Le métabolisme secondaire n'est pas commun à toutes les espèces fongiques, mais spécifique d'une espèce, voire ou même d'une souche fongique et de ses caractéristiques génétiques (Tableau 3).

Tableau 3: Origine chimique des mycotoxines (Turner, 1983).

Mycotoxines dérivées des acides aminés	Mycotoxines dérivées des polycétoacides	Mycotoxines dérivées des terpènes
Alcaloïdes de l'ergot	Aflatoxines	Diacétoxyscirpénol (DAS)
Acide cyclopiazonique (CPA)	Acide pénicillique	Déoxynivalénol
Acide aspergillique	Citrinine	Fusarénone
Fumitrémorgines	Ochratoxines	Roridines
Gliotoxine	Patuline	Toxine T2

I.2.4 Les mycotoxines dans les produits alimentaires

Ces mycotoxines se retrouvent à l'état de contaminants naturels, dans de nombreuses denrées d'origine végétale, notamment les céréales (maïs, blé, riz), les graines oléagineuses (arachides, coton), les fruits et légumes secs (haricots et raisins secs), les épices, le café, le cacao, les produits de fermentation, les fourrages ainsi que les aliments composés et manufacturés issus de ces filières destinées à l'alimentation humaine et animale (Tableau 4). Comme elles sont peu métabolisées par les organismes vivants, les mycotoxines peuvent également se transmettre via les produits d'origine animale (lait et produits laitiers) (Pitt, 2000).

I.2.5 Exposition aux mycotoxines

Une fois produites, les mycotoxines peuvent être retrouvées dans toutes les parties de la colonie fongique : les hyphes, le mycélium, les spores mais aussi dans le substrat sur lequel le développement a eu lieu (Bhat *et al.*, 2010). Les mycotoxines ont, par définition, des effets néfastes sur la santé de l'homme et des animaux (Tableau 4). Ces effets peuvent néanmoins être très variables en fonction des toxines (et de leur structure), mais aussi de la dose et de la durée d'exposition (Bennett et Klich, 2003). L'exposition s'effectue essentiellement par voie alimentaire, cependant, une autre voie d'exposition aux mycotoxines peut être le milieu de travail pour l'homme par voie respiratoire et cutanée (Selim *et al.*, 1998)

Tableau 4 : Les mycotoxines sous seuils de réglementions associés aux denrées fréquemment contaminées et effets toxiques majeurs sur l'organisme (AFSSA, 2009; CAST, 2003).

Mycotoxines	Principales moisissures productrices	Denrées contaminées	Toxicité
Aflatoxines B1, B2, G1, G2	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>	Maïs, arachides, blé, graines de coton, noix, riz, fruits secs et épices	Hépatotoxicité, Cancérogénicité, Génotoxicité, Immunotoxicité, Téatogénicité
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, Téatogénicité
Patuline	<i>P. expansum</i> , <i>A. clavatus</i> , <i>Byssochlamys nivea</i>	Pomaceae (pommes, poires), jus de fruits	Neurotoxicité, Génotoxicité, Cytotoxicité
Fumonisines B1, B2, B3	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i>	Céréales (maïs, riz, sorgho)	Cancérogénicité Neurotoxicité
Trichothécène (DON)	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. sporotrichoides</i> , <i>F. langsethiae</i> , <i>F. tricinctum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. equiseti</i>	Céréales (blé, maïs, orge, sarrasin, seigle, millet, riz, avoine), fruits (bananes)	Immunotoxicité, Effets hémato-poïétiques, Troubles digestifs
Trichothécènes (T-2 et Toxine HT-2)	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. sporotrichoides</i> , <i>F. langsethiae</i> , <i>F. tricinctum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. equiseti</i>	Céréales (blé, maïs, avoine, orge, riz, fèves, soja)	Génotoxicité, Immunotoxicité, Reprotoxicité, Neurotoxicité
Zéaralénone	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> <i>F. crookwellense</i>	Céréales (maïs, sorgho, orge, soja, blé, riz, avoine)	Reprotoxicité, Immunotoxicité
Alcaloïdes d'ergot	<i>Claviceps purpurea</i> , <i>C. paspali</i> , <i>C. africana</i> , <i>C. fusiformis</i>	Seigle, blé, triticales (croisement entre blé et seigle)	Neurotoxicité, Troubles digestifs, Vasoconstriction

I.3 Les Aflatoxines

I.3.1 Origine

Les aflatoxines sont produites par des champignons d'*Aspergillus* se développant entre autres sur les céréales et les oléagineux dans des atmosphères chaudes et humides. Trois espèces d'*Aspergillus* sont connues pour leur capacité à synthétiser des aflatoxines. *A. flavus* produit principalement l'aflatoxine B1 et l'aflatoxine B2, *A. parasiticus*, produit les 4 aflatoxines (B1, B2, G1, G2) et *A. nomius*, une souche rare, proche de *A. flavus*, est capable aussi de produire des aflatoxines (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002).

I.3.2 Impact de l'aflatoxine

Les aflatoxines comptent parmi les substances naturelles ayant un potentiel cancérigène et mutagène le plus élevé. L'exposition à cette toxine induit à différents effets néfastes sur le plan sanitaire et économique.

➤ Sur le plan sanitaire

Dans les pays en voie de développement, l'impact sanitaire est prépondérant puisque l'exposition de ses populations à l'aflatoxine induit des problèmes récurrents de santé liés aux aflatoxicoses. En effet suivant la dose d'aflatoxine ingérée, on note deux types d'aflatoxicoses : une aflatoxicose aiguë ou une aflatoxicose chronique.

L'aflatoxicose aiguë est associée à des incidences sporadiques de la consommation d'aliments fortement contaminés par l'aflatoxine. Bien que la toxicité aiguë des aflatoxines soit rarement observée chez l'homme, des épidémies suite à l'ingestion d'aliments fortement contaminés ont été rapportées récemment dans les pays d'Afrique, en Inde et en Malaisie. La dernière épidémie d'intoxication par des aflatoxines a eu lieu en 2004 au Kenya et a été attribuée à l'ingestion de maïs très contaminé (CDC, 2004).

L'aflatoxicose chronique est liée à une ingestion modérée et répétée d'aflatoxine dans le temps. L'exposition chronique à des quantités faibles d'aflatoxine (l'aflatoxine B1 en particulier), est associée à un risque accru de développer le carcinome hépatocellulaire, ou cancer du foie, ainsi que les troubles de la fonction immunitaire, la malnutrition et une croissance ralentie chez les enfants. Il est estimé que plus de 5 milliards de personnes dans les pays en voie de développement dans le monde entier sont à risque d'exposition à l'aflatoxicose chronique (Strosnider et *al.*, 2006 ; Shephard, 2008).

➤ **Sur le plan économique**

Outre leur impact sanitaire, les aflatoxines sont aussi responsables de pertes économiques majeures. Ces pertes sont ainsi estimées entre 52,1 millions et 1,68 milliard de dollars chaque année aux Etats Unis (Mitchell et *al.*, 2016). Au niveau mondial, la FAO estime qu'environ 25% de la production agricole mondiale est contaminé par des mycotoxines. Selon l'IITA les pertes annuelles dues aux aflatoxines seules atteignent 1,2 milliard de dollars américains, les pays Africains subissant 38% de ces pertes, soit 450 millions de dollars (Marechera, 2015). En outre, il existe aussi des pertes indirectes, plus difficiles à évaluer et qui sont liées à la diminution de productivité des animaux recevant une alimentation contenant des aflatoxines (CAST, 2003)

I.3.3 Règlementation sur l'aflatoxine

Le principe ALARA est appliqué quand une substance ne peut être éliminée d'un aliment sans le rejet entier de ce dernier ou sans compromettre sévèrement la disponibilité de ses réserves nutritives majeures. Ce principe a été appliqué aux aflatoxines en 1998 (FAO/WHO, 1999). Il convient de limiter la teneur totale en aflatoxines des denrées alimentaires (somme des teneurs en aflatoxines B1, B2, G1 et G2) ainsi que la seule teneur en aflatoxine B1, cette dernière étant de loin le composé le plus toxique.

➤ **Au niveau de l'Union Européenne (UE)**

Les valeurs fixées par la Commission Européenne sont plus strictes en limitant les valeurs maximales d'aflatoxine dans différents aliments dans le règlement (UE) n°1881/2006 de la Commission (EFSA, 2009). Ainsi, les teneurs maximales (en µg/kg ou ppb) en aflatoxine pour les produits alimentaires destinés à l'alimentation humaine dans toutes les céréales et tous les produits dérivés des céréales, y compris les produits de céréales transformés est de 2 ppb pour l'aflatoxine B1 et de 4 ppb pour la somme des aflatoxines. Pour les aliments destinés aux bétails comme le fourrage en mélange la dose maximale pour les B1 est de 20 ppb.

➤ **Au niveau du continent Africain**

Pour protéger les consommateurs contre les risques liés aux mycotoxines, un grand nombre de pays dont 15 pays africains ont légiféré sur certaines mycotoxines notamment les aflatoxines. Les limites tolérables maximales pour les aflatoxines dans les aliments de consommation humaine en Afrique varient de 5 à 20 ppb alors que pour les aliments de consommation animale, elles varient de 5 à 300 ppb.

La réglementation est plus sévère pour les aliments pour nourrissons (0-10ppb) (Fellinger, 2006 ; Njobeh et *al.*, 2010). Au Sénégal ainsi que dans les pays de la zone CEDEAO les limites du codex alimentaire ou celles instaurées par des partenaires commerciaux sont utilisées (ECOWAS, 2015).

II Méthodes de lutte contre les champignons d'*Aspergillus*

II.1 les fongicides chimiques

Les fongicides sont des types spécifiques de pesticides capables de contrôler les maladies fongiques en inhibant ou en tuant spécifiquement le champignon responsable de l'infection. L'utilisation de fongicide chimique constitue le moyen le plus efficace pour lutter contre les champignons. Une large gamme de produits chimiques est utilisée pour inhiber le développement des champignons *Aspergillus* aux champs et dans les entrepôts de stockages en y limitant la prolifération des moisissures. Parmi ces produits, nous pouvons noter l'acide propionique (0,1–0,5 %), l'ammoniac (0,5%), le copper sulphate (0,5–1%) et l'acide benzoïque (0,1–0,5%) qui inhibent complètement la croissance de *A. parasiticus* et *A. flavus* ; le benzoate de sodium quant à lui, a un effet antimicrobien sur la croissance de *A. niger* et *A. flavus*. (Reddy et *al.*, 2009).

II.2 Alternative aux fongicides chimiques

L'utilisation de fongicides synthétiques a permis de lutter efficacement contre les champignons pathogènes. Ils peuvent toutefois avoir des effets secondaires, tels qu'une toxicité potentielle sur les plantes, les animaux et l'homme, et peuvent également avoir un impact négatif sur l'environnement. Soucieux de ces problèmes des recherches sont menées pour la mise au point de fongicides naturels, utilisés dans les procédés de lutte contre les moisissures. Depuis quelques années, une nouvelle technique de contrôle des souches *Aspergillus* toxigènes au champ par utilisation de souches locales atoxigènes est appliquée au Nigéria, au Kenya, au Sénégal et au Burkina Faso. Cette technologie dénommée Aflasafe est basée sur le principe d'exclusion compétitive qui atténue les effets négatifs des *Aspergillus* toxigènes (Marechera et Ndwiga, 2012). L'utilisation des huiles essentielles est aussi une option rentable non toxique et prometteuse pour lutter contre divers champignons y compris les *Aspergillus* (Chulze, 2010). Les huiles essentielles peuvent être aussi appliquées sous forme de vapeur, ce qui rend l'application particulièrement pratique et convenable pour une utilisation dans des entrepôts fermés (Chulze, 2010).

III Les huiles essentielles

III.1 Définition des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des complexes naturels de molécules volatiles et odorantes, synthétisées par les cellules sécrétrices des plantes aromatiques. Celles-ci les conservent dans les poches au niveau de certains organes (Duquenois, 1968). Ces produits odorants sont extraits le plus souvent par entraînement à la vapeur d'eau (Peyron et Naves, 1977). Le terme 'huile' vient de leur caractère hydrophobe et de leur propriété à se solubiliser dans les solvants, les lipides et les alcools, alors que le terme 'essentielle' fait référence à l'odeur dégagée par la plante productrice (Bouhdid et *al.*, 2012). Les essences végétales se diffusent à travers l'épiderme ou la cuticule et se répandent dans l'atmosphère. Ce caractère associé à l'odeur très prononcée et souvent agréable, est caractéristique des plantes aromatiques (Benayad, 2008).

III.2 Les plantes aromatiques

Certaines familles des plantes se caractérisent par le grand nombre d'espèces à essences qu'elles regroupent, en particulier les labiés (Thym, Menthe, Lavande, Origan, Sauge, etc.), les Ombellifères (Anis, Fenouil, Angélique, Cumin, Coriandre, Persil, etc.), les Myrtacées (Myrthe, Eucalyptus), les Lauracées (Camphrier, Laurier-sauce, Cannelle) (Benayad, 2008). Les huiles essentielles peuvent être stockées dans divers organes : fleurs (origan), feuilles (citronnelle), écorces (cannelier), bois (bois de rose), rhizomes (acore), fruits (badiane), ou grains carvi (Boudjemaa et Ben Guegua, 2010).

III.3 Domaines d'utilisation et intérêt des huiles essentielles

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses. Elles possèdent également des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent des désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre (Sivropoulou *et al.*, 1996). Dans les domaines phytosanitaires et agroalimentaires, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires (Mangena *et al.*, 1999). Traditionnellement, les huiles essentielles sont présentes dans le processus de fabrication de nombreux produits finis destinés aux consommateurs. Ainsi, elles sont utilisées dans l'agroalimentaire pour aromatiser la nourriture (gâteaux, biscuits, soupe, sauce, chewing gum). Elles sont également utilisées dans l'industrie de la parfumerie, du cosmétique, de la savonnerie

et de l'automobile ; dans la fabrication des adhésifs (colle, scotch etc...), et celle de la nourriture pour les animaux (El Haible, 2011). Les huiles essentielles jouent un rôle écologique dans les interactions végétales, végétale-animales (El Haible, 2011). En effet, elles contribuent à l'équilibre des écosystèmes, attirent des abeilles et des insectes responsables de la pollinisation, protègent les végétaux contre les herbivores et les rongeurs, possèdent des propriétés antifongiques, antibactériennes dans les régions arides et peuvent servir de solvants bioactifs des composés lipophiles (Kurt, 1983)

III.4 Propriétés physiques des huiles essentielles

Elles sont généralement sous forme liquides à température ambiante et leur grande volatilité les oppose aux "huiles fixes" (lipides). Lorsqu'elles viennent d'être préparées, leur teinte est généralement comprise dans une gamme allant de l'incolore à jaune pâle à l'exception du camomille romaine (*Anthemis nobilis*) qui possède une coloration bleu clair due à la présence du chama.zulène (Faye et *al.*, 1997). Leur densité est le plus souvent inférieure à l'unité. Seules trois huiles essentielles officinales ont une densité supérieure à celle de l'eau : il s'agit des huiles essentielles de cannelle, de girofle et de saffras. Peu solubles dans l'eau, elles lui communiquent cependant leurs odeurs (eaux distillées aromatiques). Elles sont solubles dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques. Le caractère odorant des huiles essentielles est lié à la volatilité des molécules qui les composent ce qui permet de les obtenir par entraînement à la vapeur d'eau (Faye et *al.*, 1997).

III.5 Propriétés chimiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles représentent un mélange complexe de molécules chimiques qui peuvent comporter plus de soixante composants différents, parmi lesquels deux ou trois sont des composants majeurs constituant de 20 à 70% du mélange comparativement aux autres qui se trouvent le plus souvent sous forme de traces. Généralement, ces composants majeurs déterminent les propriétés biologiques des huiles essentielles (Garnon, 1991).

III.6 Les facteurs influençant la composition des huiles essentielles

Il existe beaucoup de facteurs externes pouvant influencer la composition chimique de l'huile essentielle. La température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement, la composition du sol sont autant de facteurs d'ordre environnemental susceptibles d'exercer des modifications chimiques (Piochon, 2008).

III.7 Extraction des huiles essentielles

Il existe plusieurs méthodes pour extraire les huiles essentielles. Les principales sont basées sur l'entraînement à la vapeur, la solubilité et la volatilité. Le choix de la méthode la mieux adaptée se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter, des caractéristiques physico-chimiques de l'essence à extraire et l'usage de celle-ci (Samate Abdoul, 2001). Les principales méthodes d'extraction sont les suivantes :

➤ L'entraînement à la vapeur d'eau

Le matériel végétal dans ce cas n'est pas en contact avec l'eau, il est supporté par une grille ou une plaque perforée placée à une distance adéquate du fond de l'alambic, rempli d'eau (figure 3). Sous l'action de la chaleur, l'eau se transforme en vapeur et passe à travers les plantes en entraînant les molécules aromatiques vers un système de refroidissement. La vapeur d'eau chargée d'essence retourne à l'état liquide par condensation. Le produit de la distillation se sépare donc en deux phases distinctes : l'huile et l'eau condensée que l'on appelle eau florale ou hydrolat (Bendjilahi, 1999).

En fonction de sa densité, elle peut être recueillie à deux niveaux :

- au niveau supérieur du distillat, si elle est plus légère que l'eau, ce qui est fréquent ;
- au niveau inférieur, si elle est plus dense que l'eau.

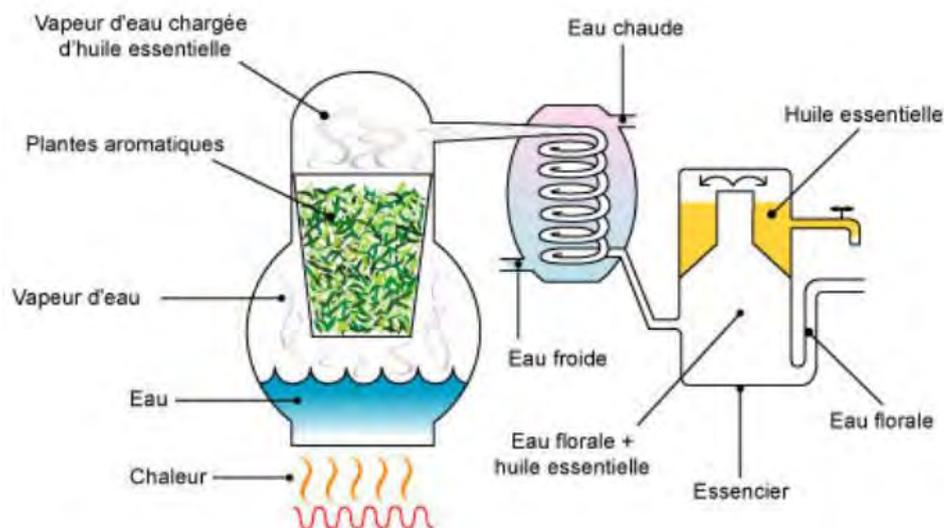


Figure 3: Dispositif expérimental de la méthode d'extraction par entraînement à la vapeur (Kingston et Hashwell, 1997).

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

I. Matériel

Le matériel biologique est constitué de plantes aromatiques, des échantillons de maïs et du matériel fongique.

I.1. Les plantes aromatiques

Les plantes aromatiques utilisées pour extraction des huiles essentielles sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 5: les Plantes aromatiques utilisées

Plantes aromatiques	Partie de la plante utilisée pour l'extraction
<i>Eugenia caryophyllata</i>	Bourgeons floraux
<i>Cymbopogon citratus</i>	Feuilles fraîches
<i>Melaleuca quinquenervia</i>	Feuilles fraîches

✓ *Eugenia caryophyllata* Thunb

Le giroflier, *Eugenia caryophyllata* ou *Syzygium aromaticum* est un arbre de 12 à 15m de hauteur appartenant à la famille des Myrtacées. Les clous de girofle sont des bourgeons non éclos et séchés du giroflier, utilisés principalement comme épices. L'huile essentielle de clou de girofle contient principalement de l'eugénol utilisé dans le domaine médical et dentaire en raison de ses propriétés antalgiques et antiseptiques (Gurib-Fakim, 2014).



Photo 3: Clous d'*Eugenia caryophyllata*

✓ ***Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake.**

Melaleuca quinquenervia est de la famille des Myrtaceae. L'arbre est caractérisé par une écorce grise. Les feuilles ont des pétioles rougeâtres. L'inflorescence est en forme d'épi, terminale ou parfois axillaire (Gurib-Fakim, 2014).



Photo 4: Feuilles de *Melaleuca quinquenervia*

✓ ***Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf**

Cymbopogon citratus est une herbe aromatique vivace sans ramification à odeur de citron poussant en touffes denses, Il appartient à la famille des *Poaceae*. Ces feuilles peuvent atteindre 90 cm de longueur et 1,25 cm de largeur. Elles sont isolées, vert-claires, fortement parfumées, longues, effilées et réunies en gaine sur une certaine portion de leurs longueurs. Bien que cette plante fleurisse rarement, elle possède une hampe florale pouvant atteindre 60 cm de longueur à nombreuses ramifications terminées par des épis agglomérés de couleur verdâtre.



Photo 5: Un pied de *Cymbopogon citratus*

I.2 Echantillons de maïs

Pour les tests in vivo 5 kg de grains de maïs ont été achetés au marché de Medina de Dakar.

I.3 Matériel fongique

Le matériel fongique est constitué d'isolats d'*Aspergillus* obtenus à partir d'un échantillon de maïs en provenance de la région de Kaolack plus particulièrement dans une parcelle de maïs de la commune de Ndrané escale.

II. Méthodes

II.1 Isolement et identification des champignons du genre *Aspergillus sp.*

II.1.1 Préparations des milieux de cultures

Pour obtenir une culture pure le milieu Rose Bengal modifié (Annexe 5) spécifique au genre *Aspergillus sp* a été utilisé. La préparation du milieu nécessite une solution de micronutriments (Annexe 7) et une solution de rose bengal (Annexe 4). Le rose bengal permet de limiter la taille des colonies. Des antibiotiques ont été rajoutés à la solution pour inhiber le développement bactérien. Le dichloran (aniline) a été utilisé pour ralentir la rapide propagation des mycètes. Pour le repiquage des différentes souches obtenues et le test antifongique, le milieu d'expression 5/2 agar (Annexe 6) a été également préparé. Ce milieu permet le développement rapide des souches individualisées.

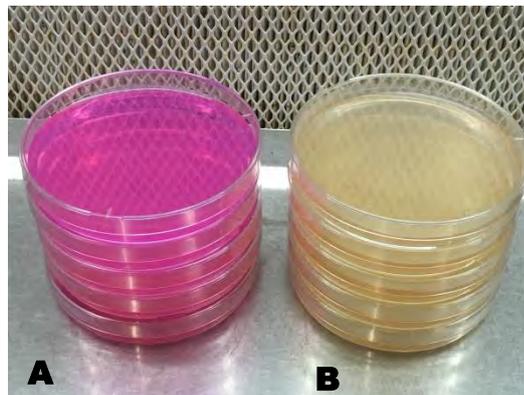


Photo 6 : Milieu de culture rose bengal (A) et milieu 5/2 agar (B)

II.1.2 Isolement des champignons du genre *Aspergillus sp*

Les champignons ont été isolés à partir de farine de maïs. Tout d'abord, 1g de farine de maïs est pesé et mis dans un tube préalablement stérilisé. Ensuite, 5ml d'eau distillée et quelques gouttes de Tween 80(0,1%) y sont ajoutés. Après agitation et sous une hotte à flux laminaire, 50 μ L du mélange sont prélevés à l'aide d'une micropipette et étalés dans le milieu Rose Bengal modifié avec des billes préalablement stérilisées. Les boîtes ainsiensemencées sont scellées au parafilm et incubées à l'étuve à la température de 25°C. Enfin, au bout de trois jours, les souches d'*Aspergillus* présentant un début de développement mycélien sont repiquées dans le milieu 5/2 agar afin d'avoir des isolats purs. Notons que c'est après 72h d'ensemencement en milieu de culture qu'il est plus probable d'avoir des isolats purs.

II.1.3 Identification des souches

L'identification des souches obtenues a été réalisée en utilisant la clé de détermination de Klich (2002). Elle est basée sur l'analyse des critères morphologiques. Ces derniers sont constitués de paramètres macroscopiques (l'aspect des colonies, la couleur,...) et microscopiques associés à des clés de détermination (l'aspect du mycélium, des spores, des conidiophores).

II.2 Extraction des huiles essentielles

II.2.1 Méthode d'extraction des huiles essentielles

La méthode d'entraînement à la vapeur a été utilisée avec un dispositif de type Clevenger pour l'extraction des huiles essentielles (Photo 7). Le dispositif est constitué d'une cocotte-minute contenant de l'eau à l'intérieur de laquelle le matériel végétal est déposé sur une plaque métallique perforée supportée par un tabouret en fer afin d'éviter son contact avec l'eau. L'appareil est fermé hermétiquement et l'ensemble est porté à ébullition. La vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur d'eau, les cellules végétales contenant les molécules aromatiques éclatent et libèrent les molécules qui sont vaporisées. Une source d'eau venant d'un robinet relié au système de réfrigération permet la condensation de la vapeur dès son contact avec l'eau. Une ampoule à décanter permet de séparer l'eau de l'huile essentielle en fonction de leur densité. L'huile essentielle ainsi obtenue est mise dans un flacon teinté pour éviter sa dénaturation.



Photo 7: Dispositif d'extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur

II.2.2 Détermination du rendement des huiles essentielles obtenues

Le rendement en huile essentielle est déterminé par le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue (Mhe) après extraction sur la masse du matériel végétal (Mmv), le tout multiplié par 100 (Laghouiter *et al.*, 2015).

$$\text{Rhe}\% = (\text{Mhe}/\text{Mmv}) * 100$$

Rhe : Rendement en huile essentielle (en %)

Mhe : Masse de l'huile essentielle obtenue (en g)

Mmv : Masse du matériel végétal utilisé (en g)

II.2.3 Conservation des huiles essentielles obtenues

La conservation des huiles essentielles exige certaines précautions indispensables. Les huiles essentielles obtenues ont été conservées dans un flacon teinté, fermé hermétiquement pour la préserver de l'air, et de la lumière, puis mis au réfrigérateur à une température voisine de 4°C

II.3 Evaluation *in vitro* de l'efficacité antifongique d'huiles essentielles sur la croissance mycélienne des champignons.

Les tests *in vitro* sont réalisés en milieu 5/2 agar avec différentes gammes de concentration. Ainsi la quantité d'huile essentielle à tester est mis dans un erlenmeyer puis mélangée avec 0,5 ml de tween 80 (0,1%). Du milieu 5/2 agar est ajouté à l'ensemble de sorte que le volume total de la solution soit égal à 60 ml pour chaque concentration à tester. Le milieu est coulé dans des boîtes de Pétri en raison de 3 boîtes par concentration. Les boîtes témoins ne contiennent que du tween et du milieu 5/2 agar. Après 24 h, une rondelle de 0,5 cm de diamètre issue d'une culture de souche âgée de sept jours estensemencée dans les boîtes de Pétri.

L'évaluation de la croissance mycélienne a été réalisée toutes les 24h par la mesure de la moyenne des diamètres perpendiculaires passant par le milieu de la rondelle (Photo 8). Sur la base de ces valeurs, le pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne a été calculé par la formule utilisée par Djordjevic *et al.* (2013).



Photo 8: Mesure du diamètre de croissance mycélienne

$$\text{TIC} = [(\text{DT}-\text{DE}) / \text{DT}] \times 100$$

TIC : Taux d'inhibition de la croissance (**en %**)

DT : Diamètre de croissance moyen du champignon dans la boîte témoin (**en cm**)

DE : Diamètre de croissance moyen du champignon dans les boîtes traitées (**en cm**)

II.4 Evaluation de l'efficacité antifongique *in vivo* des huiles essentielles sur la croissance mycélienne des souches d'*Aspergillus flavus* L

Le test d'efficacité *in vivo* a pour objectif d'étudier l'effet antifongique des huiles essentielles sur une population d'*Aspergillus flavus* L sur des échantillons de maïs. Pour cela, un dispositif de fumiger a été conçu.



Photo 9: Dispositif de fumigation

Le dispositif est constitué de mini boîte de pétri perforée de part et d'autre contenant du coton imbibé d'huile essentielle (Photo 9). Ensuite le dispositif est placé au centre du récipient en plastique contenant 500 g de maïs; le tout est fermé hermétiquement et mise au stockage pendant 6 mois.

Pour déterminer l'efficacité *in vivo*, les traitements suivants ont été effectués :

- ✓ échantillons traités avec l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* à 2000 ppm,
- ✓ échantillons traités avec l'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllata* à 500 ppm
- ✓ échantillons témoins non traités avec l'huile essentielle

Dénombrement des propagules des souches d'*Aspergillus flavus* L

Pour déterminer l'évolution des propagules d'*Aspergillus flavus* L, les différents échantillons sont soumis à des analyses : 1g de farine de maïs est pesé et mis dans un tube. Ensuite 5ml d'eau distillée et quelques gouttes de Tween 80(0,1%) y sont ajoutées. Après agitation et sous une hotte à flux laminaire, 50µL du mélange sont prélevés et étalés dans le milieu Rose Bengal modifié. Les boîtes sont ensuite incubées à l'étuve à la température de 25°C. Enfin, au bout de 7 jours, les colonies d'*Aspergillus flavus* L sont comptées et répertoriées dans un tableau excel.

Le nombre (N) de propagules correspondant au nombre de colonies fongiques dans 1g de farine de maïs est calculé comme suit :

$$N = n \times K$$

N= nombre de propagules dans 1g de farine de maïs

n= nombre de propagules dans 50µl de suspension sporale

K= 100, constante par laquelle il faut multiplier (50µl de suspension sporale pour obtenir 5ml de la solution mère)

II.6 Traitement des données

Les données obtenues ont été analysées par la statistique descriptive (moyennes, fréquences, incidence etc.) et par l'analyse de variance (ANOVA) et les résultats sont présentés sous forme de tableaux et de figures. Les données ont été traitées avec le logiciel RStudio. Une analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs a été effectuée à l'aide de la fonction aov du package agricolae (de Mendiburu, 2015). Une structuration des moyennes a été ensuite faite grâce à la fonction LSD test du package agricolae au seuil de probabilité de 5%.

CHAPITRE III : RESULTATS

III.1. Identification des champignons

Trois souches mycotoxinogènes d'aspergillus appartenant à la section flavi ont été identifiées :

✓ *Aspergillus parasiticus*

Sur le milieu 5/2 agar, après 48 heures d'incubation, le mycélium du champignon est tapissé au milieu de culture et forme de courts filaments aériens blancs. Au bout de 7 jours, *Aspergillus parasiticus* présente une coloration mycélienne vert olive avec un aspect duveteux et un revers transparent (Photo 10).

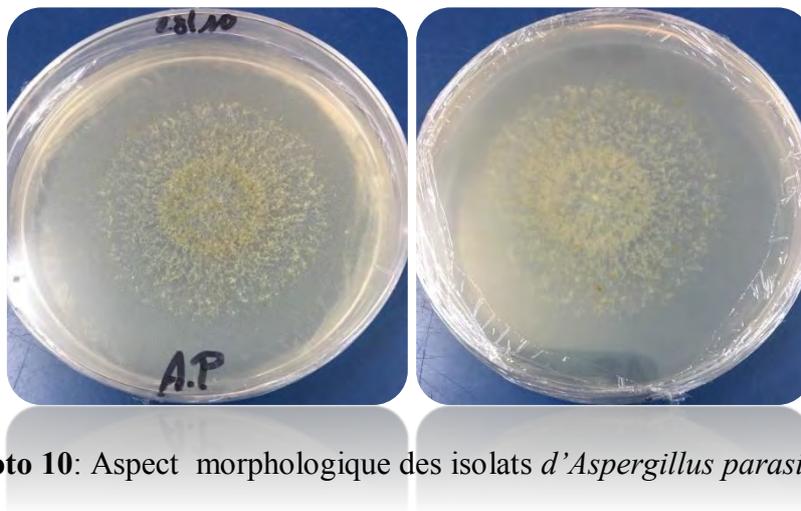


Photo 10: Aspect morphologique des isolats d'*Aspergillus parasiticus*

Du point de vue microscopique, *Aspergillus parasiticus* présente des conidiophores formés de stipes rugueux se terminant par une vésicule sphérique, fertile sur moins de 3/4 de sa surface, portant à la fois des phialides sans métules sur la plupart des têtes. Les conidies sont sphériques et ont une paroi épaisse et rugueuse.

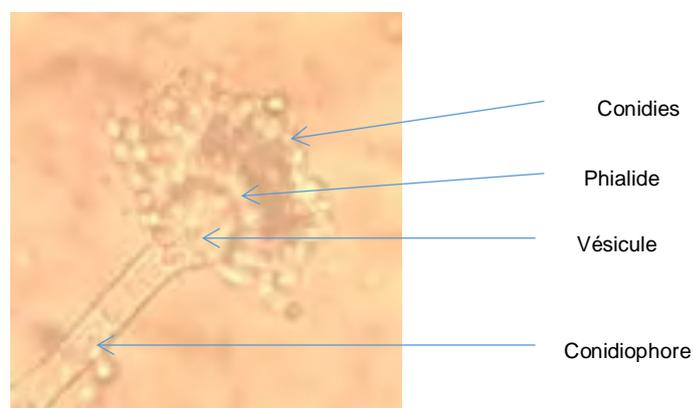


Photo 11: Conidiophore d'*Aspergillus parasiticus* G X400

✓ *Aspergillus flavus*

Aspergillus flavus L

Après 48 heures d'incubation sur milieu 5/2 agar, on observe un début de développement de mycéliums plats, formés de courts filaments aériens, blancs et au bout de 7 jours ce mycélium devient vert olive avec un aspect poudreux présentant peu ou pas de sclérotés visibles à la surface et le revers est transparent (Photo 12).

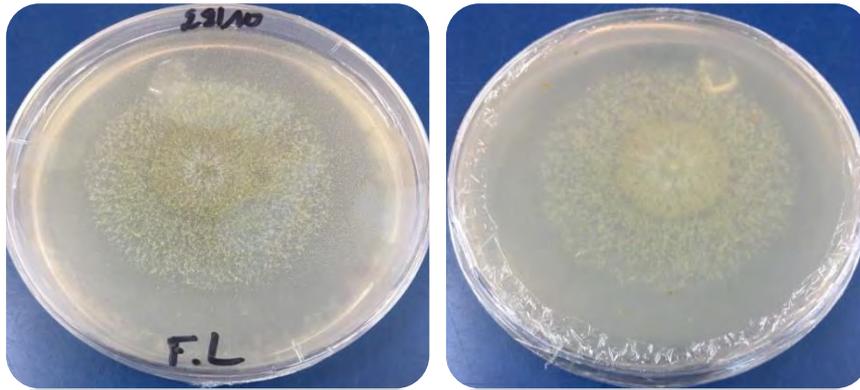


Photo 12: Aspect morphologique des isolats d'*Aspergillus flavus* L

Du point de vue microscopique, *Aspergillus flavus* présente des conidiophores formés de stipes rugueux se terminant par une vésicule sphérique, fertile sur plus de 3/4 de sa surface, portant à la fois des métules et des phialides. Les conidies sont relativement minces, pouvant être lisses ou légèrement rugueuses.

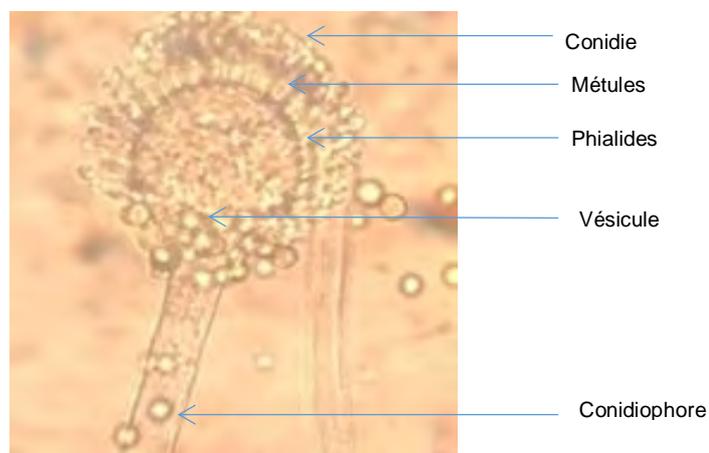


Photo13: Conidiophore d'*Aspergillus flavus* L G X400

Aspergillus flavus S

Le mycélium du champignon est formé de courts filaments blancs après 48 heures d'incubation tandis qu'au bout d'une semaine, on note la formation d'un amas mycélien de couleur jaunâtre avec de petites sclérotés noires visibles à la surface. Le revers de la boîte est transparent (Photo14).

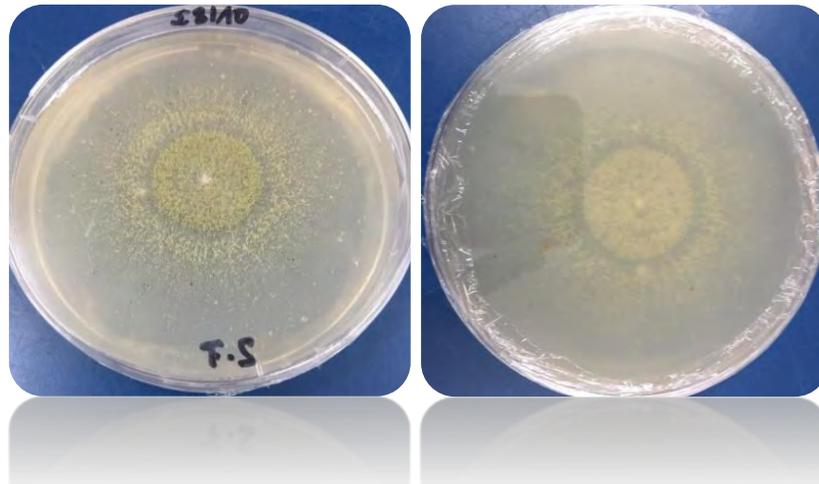


Photo 14: Aspect morphologique des isolats d'*Aspergillus flavus S*

Du point de vue microscopique, *Aspergillus flavus* présente des conidiophores formés de stipes rugueux se terminant par une vésicule sphérique, fertile sur plus de 3/4 de sa surface, portant à la fois des métules et des phialides. Les conidies sont jaunes claires avec une distribution dense. Les spores sont relativement minces, pouvant être lisses ou légèrement rugueuses.

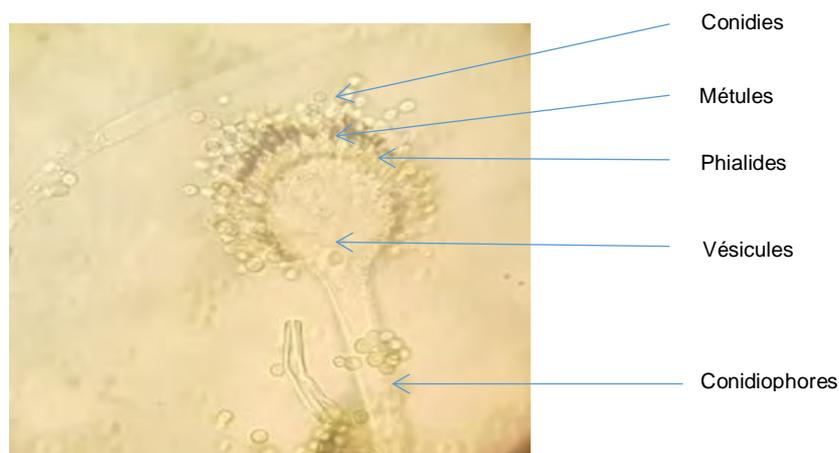


Photo 15 : Conidiophore d'*Aspergillus flavus S G X40*

III.2 Rendement en huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles des trois plantes aromatiques a permis d'observer une variabilité au niveau des rendements. *Eugenia caryophyllata* a présenté le rendement en huiles essentielles le plus élevé avec 2.33%, elle est suivie de *Melaleuca quinquenervia* avec 0.65% et enfin de la *Cymbopogon. citratus* qui a donné le rendement en huiles essentielles le plus faible avec 0.52% (Tableau 6).

Tableau 6: Rendements en huiles essentielles extraites

Plantes récoltées	Masse de la matière végétale (g)	Masse de l'huile essentielle (g)	Rendements (%)
<i>Eugenia caryophyllata</i> (EC)	8000	186,5	2,33
<i>Melaleuca quinquenervia</i> (MQ)	3000	19,4	0,65
<i>Cymbopogon citratus</i> (CC)	2000	10,5	0,52

III.3 Activité antifongique *in vitro* des huiles essentielles sur la croissance mycélienne

✓ Pour les souches *Aspergillus parasiticus*

Les résultats obtenus ont montré une bonne activité antifongique des huiles essentielles sur la croissance mycélienne d'*A. parasiticus*. Les huiles essentielles d'*Eugenia caryophyllata* et de *Cymbopogon citratus* aux concentrations respectives de 500 et 2000 ppm ont entraîné une inhibition totale de la croissance mycélienne tandis qu'avec *Melaleuca quinquenervia* une réduction de $79,74 \pm 0,68$ % de la croissance mycélienne a été notée à la concentration de 8000 ppm (Figure 4).

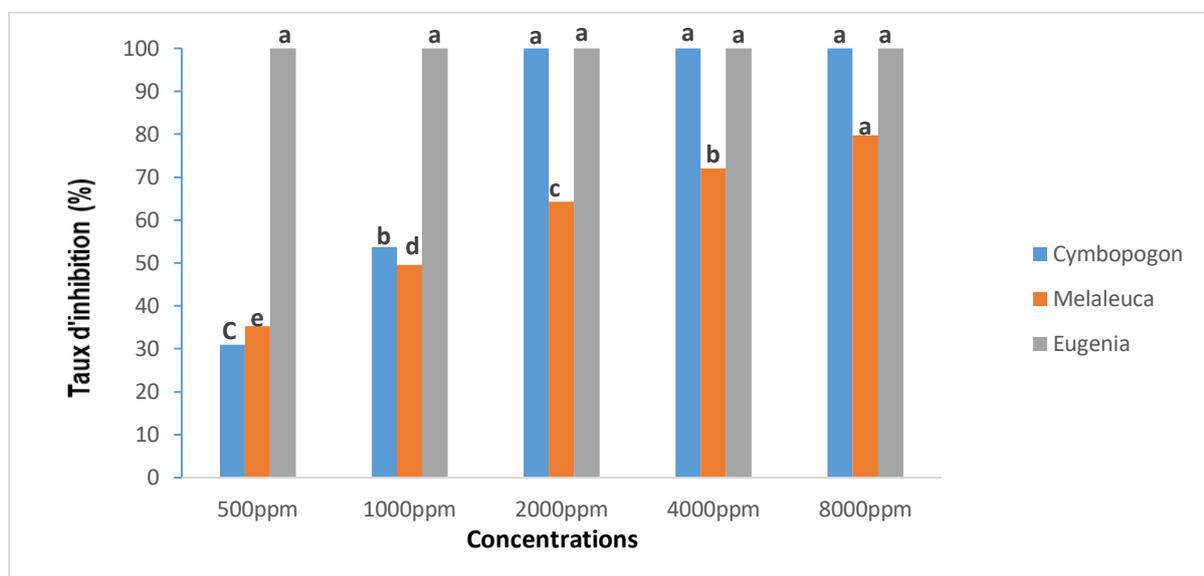


Figure 4: Effets des huiles essentielles sur la croissance mycélienne d'*Aspergillus parasiticus*

Les colonnes indexées par les mêmes lettres indiquent des valeurs qui ne sont pas significativement différentes d'après le test de Dunnett ($p < 0.05$).

✓ **Pour les souches *Aspergillus flavus* L**

Les résultats montrent une bonne activité antifongique des huiles essentielles sur la croissance mycélienne d'*A. flavus* L. A 500 ppm, l'inhibition est totale avec l'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllata* alors que pour *Cymbopogon citratus*, elle est de 2000ppm. Une réduction de la croissance mycélienne de $73,80 \pm 5,52\%$ à la concentration de 8000 ppm est notée avec l'huile essentielle de *Melaleuca quinquenervia* (Figure 5).

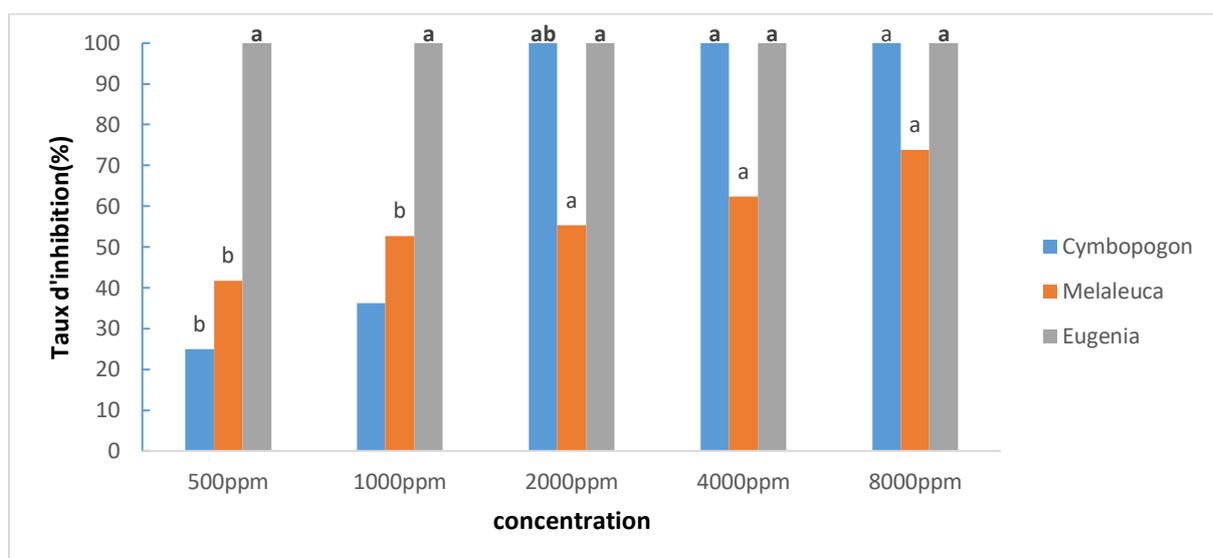


Figure 5: Effets des huiles essentielles sur la croissance mycélienne d'*Aspergillus flavus* L

Les colonnes indexées par les mêmes lettres indiquent des valeurs qui ne sont pas significativement différentes d'après le test de Dunnett ($p < 0.05$).

➤ Pour les souches *Aspergillus flavus S*

Il en est de même pour la souche *Aspergillus flavus S*, les résultats sur l'activité antifongique des huiles essentielles sont proches de ceux d'*Aspergillus flavus L* et d'*Aspergillus parasiticus* avec une inhibition totale de croissance mycélienne sous l'effet des huiles essentielles d'*Eugenia caryophyllata* et *Cymbopogon citratus* aux concentrations respectives de 500 et 2000ppm. Alors que *Melaleuca quinquenervia* a entraîné une réduction de $82,27 \pm 0,13$ % de la croissance mycélienne à 8000 ppm (Figure 6).

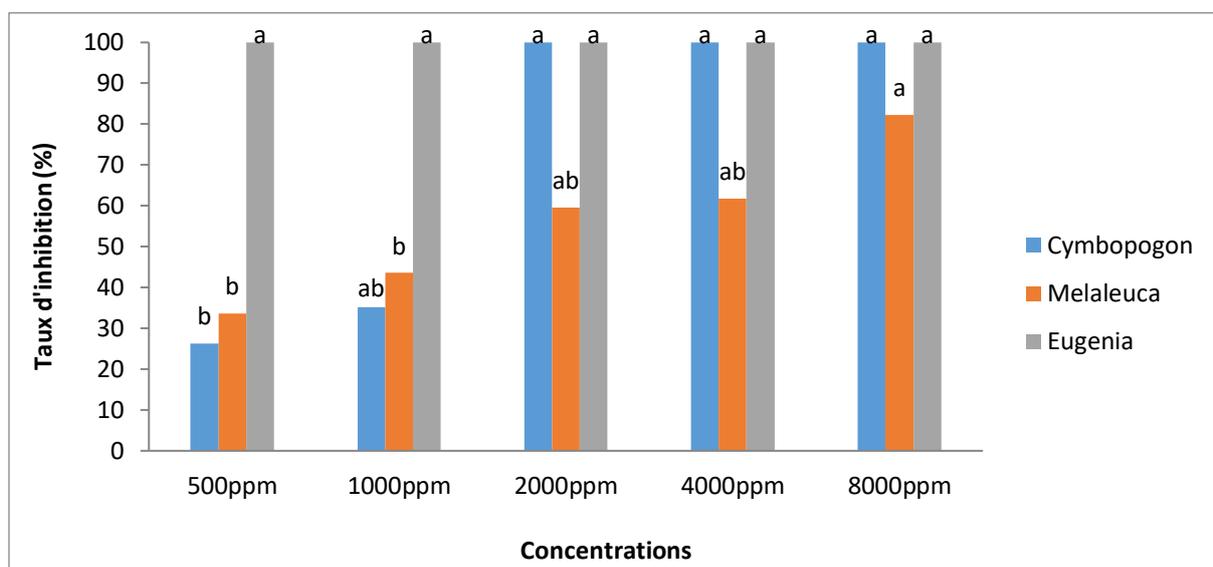


Figure 6 : Effets des huiles essentielles sur la croissance mycélienne d'*Aspergillus flavus S*

Les colonnes indexées par les mêmes lettres indiquent des valeurs qui ne sont pas significativement différentes d'après le test de Dunnett ($p < 0.05$).

III.4. Analyse de variance du taux d'inhibition de la croissance mycélienne

L'analyse de variance montre qu'il existe une variation significative du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne en fonction de l'huile essentielle utilisée mais aussi de sa concentration. L'interaction huile essentielle-concentration est également significative, de même que l'interaction huile-concentration-pathogène mais par contre, on n'observe pas de variation significative entre les pathogènes (Tableau 7).

Tableau 7: Analyse de variance du taux d'inhibition de la croissance mycélienne

Source de variation	ddl	SCE	SCM	F	Pr (>F)	Significativité
Huile	2	53027	26514	21.4	4.31e-09	***
Concentration	6	198225	33038	70.55	<2e-16	***
Pathogène	2	190	95.2	0.062	0.939	N'est pas Significative
huile concentration	20	280458	14023	788	<2e-16	***
huile pathogène	8	53284	6660	5.209	7.24e-06	***
concentration pathogène	20	198672	9934	19.68	<2e-16	***
huile_concentration et pathogène	62	281897	4547	369.4	<2e-16	***

*** signifie un p value est inférieur à 0.001 au seuil de 5%

ddl : degrés de liberté ; **SCE** : Somme des carrés des écarts ; **SCM** : Somme des carrés des moyennes ; **F** : Fonction F ; **Pr** : Probabilité ;

III.5. Activité antifongique *in vivo* des huiles essentielles sur le développement des souches *Aspergillus flavus* L

Les tests d'efficacités *in vivo* par la fumigation des huiles essentielles de *Cymbopogon citratus* et d'*Eugenia caryophyllata* dans les échantillons de maïs ont montré une bonne activité antifongique sur les souches *Aspergillus flavus* L après 6 mois de stockage. Ainsi, par rapport au test témoin une limitation des charges en *Aspergillus flavus* L de 233 propagules a été notée avec l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* soit une réduction de 68,22%. Pour l'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllata*, les charges sont limitées, 300 propagules soit une réduction est de 59,08%. (Figure 7).

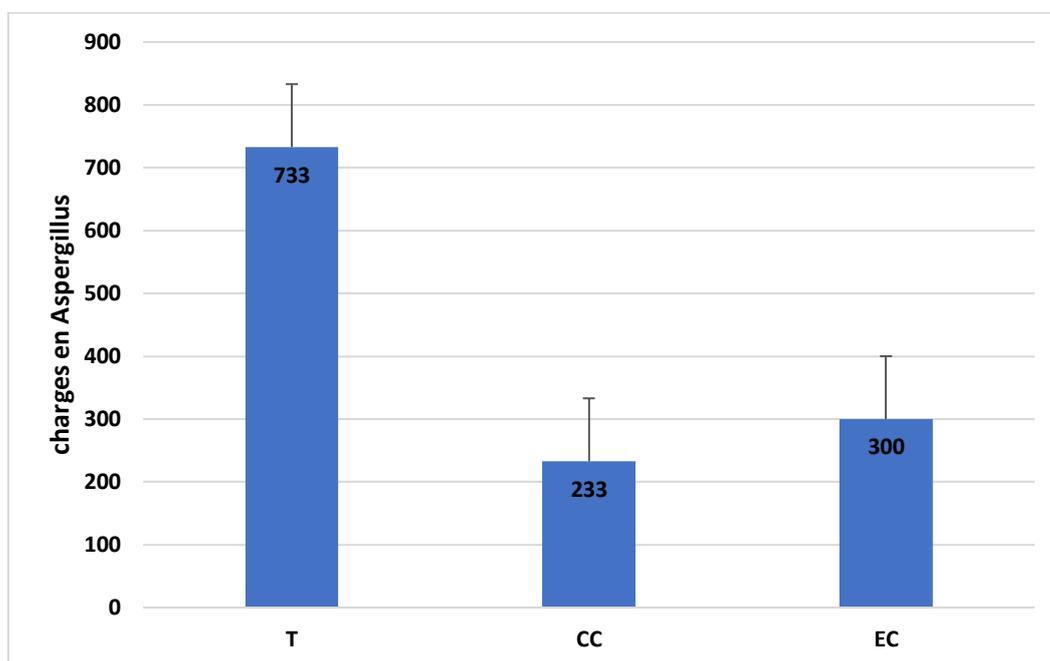


Figure 7: Charges en *A. flavus* L dans les différents échantillons traités

Echantillons traitées	CC	EC
Taux de réductions des charges en <i>Aspergillus</i>	68,22%	59,08%

Tableau 8: Taux de réductions des charges en *Aspergillus flavus* L

T : Témoin
 CC: Echantillon Traité avec *Cymbopogon citratus*
 EC: Echantillon Traité avec *Eugenia caryophyllata*

CHAPITRE IV : DISCUSSION

Les études menées au laboratoire ont permis d'isoler et de caractériser trois souches mycotoxinogènes appartenant au genre *Aspergillus* de la section flavi sur l'échantillon de maïs. L'étude des caractères culturels associés aux critères microscopiques a permis d'identifier des isolats d'*Aspergillus parasiticus*, d'*Aspergillus flavus* L et d'*Aspergillus flavus* S. Ces résultats concordent avec ceux de Probst *et al.* (2014); Diedhiou *et al.* (2011) ; Barros *et al.* (2003) qui ont montré qu'en Afrique Subsaharienne, les espèces aflatoxinogènes du genre *Aspergillus* de la section flavi infectent fréquemment les cultures de maïs. La forte présence de ces champignons dans cette zone est principalement due aux conditions climatiques favorables avec une forte humidité relative et des températures chaudes. Ces champignons constituent un véritable problème de santé publique lié à la menace des mycotoxines. Parmi celles-ci, les aflatoxines présentes dans les denrées de première nécessité comme les céréales et d'autres produits de consommation humaine et animale sont à l'origine de nombreux problèmes sanitaires et économiques partout dans le monde. Ainsi, il est indispensable d'adopter des méthodes de lutte efficaces, écologiques afin de limiter leur développement.

Les huiles essentielles répondent très bien à ces critères et constituent une bonne alternative aux fongicides chimiques. Leur activité antifongique résulte non seulement de leurs composés majoritaires mais aussi de l'effet de synergie entre leurs composés minoritaires (Soumanou et Adjou 2016).

Lors de l'extraction des plantes aromatiques, le rendement en huiles essentielles obtenus diffère en fonction des espèces végétales utilisées. *Eugenia caryophyllata* présente le meilleur rendement en huile essentielle avec 2,33%. Il est suivi de *Melaleuca quinquenervia* avec 0,65% et en fin de *Cymbopogon citratus* qui a le plus faible rendement en huile essentielle avec 0,52%. Ces différences peuvent être expliquées par des facteurs génétiques, physiologiques, pédologiques et climatiques (Gurib-Fakim, 2014). En effet, la diversité des espèces végétales (Faucon, 2012), l'origine géographique, le stade phénologique et même la température et la qualité des sols sur lesquels les plantes ont été cultivées (Bennadja *et al.*, 2013) influent sur la qualité et le rendement en huile essentielle.

Les tests d'efficacités *in vitro* des huiles essentielles sur la croissance mycélienne des champignons ont montré une bonne activité antifongique qui est variable d'une huile essentielle à une autre.

L'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllata* est la plus efficace, elle a montré une très grande efficacité sur la croissance mycélienne d'*Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus flavus* L et d'*Aspergillus flavus* S avec une inhibition totale à la concentration de 500 ppm ; ces résultats corroborent parfaitement ceux de Kocić-Tanackov et Dimić (2013) qui ont obtenu avec cette huile essentielle une inhibition totale d'*Aspergillus flavus* à la même concentration de 500 ppm. À travers ce résultat, on peut suggérer que l'activité antifongique d'*Eugenia caryophyllata* est due principalement à son profil chimique riche en eugénol qui est très actif contre différents micro-organismes (Dorman et Deans, 2000). Ce composé oxygéné soluble dans les milieux aqueux provoque d'importants dégâts sur les parois cellulaires des microorganismes (Griffin et al., 1999 ; Hammer et al., 2003).

L'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* s'est montrée aussi très efficace contre les trois souches d'*Aspergillus* avec une inhibition de 100% de la croissance mycélienne à 2000 ppm. Ces résultats sont en phase avec ceux de Singh et al., (2010) qui ont obtenu avec cette huile, une inhibition d'*Aspergillus flavus* ainsi que la production de sa toxine (aflatoxine B1) à la concentration 750 ppm. L'activité antifongique des huiles essentielles de *Cymbopogon citratus* serait due à l'action des monoterpènes oxygénés qui sont ses composants majoritaires (87,0% - 74,16%). En effet, les travaux de Yoshimura et al., (2010) ont montré que les huiles essentielles riches en monoterpènes oxygénés possèdent des effets délétères sur les membranes mitochondriales des moisissures, ce qui provoque une inhibition du métabolisme énergétique mitochondrial et entraîne la perturbation des processus physiologiques et biochimiques de la cellule. D'ailleurs, des études précisent que l'action de ces monoterpènes sur la cellule des moisissures impliquent la granulation du cytoplasme, la rupture et l'inactivation de la synthèse des membranes cytoplasmiques ainsi que l'inhibition des enzymes intercellulaires et extracellulaires (Souza et al., 2005). Ces actions peuvent se produire seule ou en combinaison et aboutir à l'inhibition de la germination du mycélium (Cowan, 1999).

L'huile essentielle de *Melaleuca quinquenervia* montre aussi une action considérable sur la croissance mycélienne des *Aspergillus* avec une bonne réduction de la croissance mycélienne de $82,27 \pm 0,13$ % pour *Aspergillus flavus* S, de $79,74 \pm 0,68$ % pour *Aspergillus parasiticus* et de $73,80 \pm 5,52$ % pour *Aspergillus flavus* L à la concentration 8000 ppm.

Cette importante réduction de la croissance mycélienne est attribuée à leurs constituants chimiques riches en terpéniques 1,8-cinéole (46,5 %), α -pinène (11,9 %) et viridiflorol qui en sont les composantes principales (Sahlan et al., 2004). Contre les champignons, les phénols

terpéniques des huiles essentielles provoquent plusieurs dégâts telles que des perturbations morphologiques des hyphes mycéliens, la rupture de la membrane plasmique et l'altération de la structure des mitochondries (Arras et *al.*, 2001).

Les tests d'efficacité *in vivo* avec les huiles essentielles d'*Eugenia caryophyllata* et de *Cymbopogon citratus* ont montré une bonne activité antifongique sur les souches d'*Aspergillus flavus* L après 6 mois de stockage. Ainsi, une réduction de 68,22% de la charge en *Aspergillus flavus* L a été notée avec l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus*. Pour l'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllata* cette réduction est de 59,08%. Ces résultats confortent ceux de kedia (2015) qui a obtenu avec l'huile essentielle de *Mentha spicata* une réduction de 70% de la population de *Aspergillus flavus* sur des pois de chiches après 12 mois de stockage. Toutefois une réduction de 100% n'a été observée dans aucun des échantillons fumigés. Ceci suggère en outre l'absorption des huiles essentielles par le produit alimentaire (Varma et Dubey, 2001) ou la dégradation de certains des composants actifs car les huiles essentielles ayant beaucoup de composants hydrogénés étaient plus susceptibles à l'oxydation dans des conditions *in vivo* (Kim et *al.*, 2003).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans cette présente étude nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles sur les champignons mycotoxinogènes du genre *Aspergillus* producteurs d'aflatoxines qui contaminent la plupart des produits alimentaires et causant ainsi des problèmes sanitaires et économiques majeurs partout dans le monde.

Ainsi (3) trois souches d'*Aspergillus* de la section flavi ont été identifiées: *Aspergillus flavus* L, *Aspergillus flavus* S et *Aspergillus parasiticus*. Pour les tests *in vitro* l'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles sur les souches d'*Aspergillus* identifiées a permis d'apprécier leur capacité inhibitrice sur la croissance mycélienne de ces champignons. L'huile essentielle d'*Eugenia caryophyllata* a été la plus efficace avec une inhibition totale à 500 ppm sur les trois champignons d'*Aspergillus*. Suivie de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* qui a entraîné une inhibition totale à 2000 ppm sur les souches et enfin l'huile essentielle de *Melaleuca quinquenervia* qui a été moins efficace.

Les tests d'efficacité *in vivo* par fumigation de deux huiles essentielles (*Cymbopogon citratus* et *Eugenia caryophyllata*) ont montré après 6 mois de stockage une bonne activité antifongique sur les charges d'*Aspergillus flavus* L.

L'ensemble de ces résultats montre que les huiles essentielles pourraient constituer une alternative biologique efficace pour limiter la prolifération des champignons *Aspergillus* producteurs d'aflatoxines.

En perspective il serait intéressant de:

- ✓ étudier l'activité des huiles essentielles sur la production des mycotoxines
- ✓ de combiner des huiles essentielles pour avoir des produits plus efficaces et à large spectre d'action
- ✓ de tester l'efficacité des huiles essentielles en condition semi-contrôlée (en serre) puis en condition réelle (au champ) pour une application à grande échelle des huiles essentielles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) (2004). Bonnes pratiques de fabrication de l'ensilage pour une meilleure maîtrise des risques sanitaires.

Rapport Synthétique. <http://www.afssa.fr>

AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) (2006). Evaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport synthétique. <http://www.afssa.fr>

Ahmed NE, Abdalla AE, Adam YS, Betjowck. (2009). Fungi and mycotoxins associated with Sorghum grains in major storage systems in Gedarif, Sudan. A paper submitted to the 17th Board of Directors meeting of the national council for mycotoxins, December 2009, Sudanese Standards and Measurements Organisation, Sudan.

Alakonya AE, Monda EO, Ajanga S. (2009). Fumonisin B1 and Aflatoxin B1 levels in Kenya maize. *J. Plant Pathol.*, 91(2): 459-464.

Akouwah J. O, Mensah L. D, Chan C, Roskilly A. (2015). Effects of practices of maize farmers and traders in Ghana on contamination of maize by aflatoxins: Case study of Ejura-Sekyeredumase Municipality. Ghana, *African Journal of Microbiology Research*. Vol. 9(25).

Arras G, Usai M (2001). Fungitoxic activity of 12 essential oils against four postharvest Citrus pathogens: chemical analysis of Thymus capitatus oil and its effect in subatmospheric pressure conditions. *J. Food Prot.*, 64, 1025-1029.

Badillet, G., de Biève, C., Guého, E. (1987). Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes, Atlas clinique et biologique, vol II, Ed VARIA, Paris

BANKOLE S.A, ADEBANJO A. Mycotoxins in food in West Africa: current situation and possibilities of controlling it. *African Journal of Biotechnology* Vol. 2 (9), pp. 254-263, September 2003 Available online at <http://www.academicjournals.org/AJB> ISSN 1684–5315 © 2003 Academic Journals.

Balajee, S. A., J. L. Gribskov, E. Hanley, D. Nickle, K. A. Marr. (2005). *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryot Cell* 4:625-32.

Balajee, S. A., D. Nickle, J. Varga, K. A. Marr. (2006). Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. *Eukaryot Cell* 5:1705-12.

- Barros G, Torres A, Palacio G, Chulze S. (2003).** Aspergillus species from section Flavi isolated from soil at planting and harvest time in peanut-growing regions of Argentina. *J. Sci. Food Agric.* 83, 1303–1307.
- Barro,G., Toress, A., Sofia Chulze ,S. (2005) :** *Aspergillus flavus* population isolated from soil of Argentina’s peanut-growing region. Sclerotia production and toxigénic profile. *Journal of science Food and Agriculture*, 85, 2349-2353.
- Benayad N. (2008) :** Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines: moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaire stockées. Projet de recherche. Université Mohammed V – Agdal. Laboratoire des Substance Naturelles et Thermolyse Eclair. Département de chimie. Faculté des sciences de Rabat. P61
- Bendjilahi A. (1999):** Extraction des plantes aromatiques et médicinales : cas particulier de l’entraînement à la vapeur d’eau et ses équipements. Le pharmacien du magheb.
- Bennadja S, Tlili Ait Kaki Y, Djahoudi A, HadeF Y., Chefrour A. (2013).** Antibiotic activity of the essential oil of laurel (*Laurus nobilis* L.) on eight bacterial strains. *Journal fo Life Sciences.* 7(8): 814-819.
- Bennett, J. (2010).** An Overview of the Genus Aspergillus. In M. Machida and K. Gomi (ed.), *Aspergillus Molecular Biology and Genomics*.
- Bennett, J.W., Klich, M. (2003).** Mycotoxins. *Clinical Microbiology Review* 16: 497–516.
- Bhat, R., Rai, R. V., Karim, A.A. (2010)** Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, 57–81.
- Bouhdid S., Abrini J., Baudoux D., Manresa A., Zhiri. (2012).** Les huiles essentielles de l’origan compact et de la cannelle de Ceylan: pouvoir antibactérien et mécanisme d’action. *J Pharm Clin* ; 31(3) : 141-148.
- Boudjemaa N.E., Ben Guegua H. (2010) :** L’effet antibactérien de *Nigella sativa*. Mémoire de fin d’études. Université kasdi merbah – ouargla. Département des sciences de la Nature et de la vie. Faculté des sciences de la nature et de la vie et science de la terre et de l’univers.
- Castegnaro, M., Pfohl-Leszkowicz, A. (2002).** Les mycotoxines: contaminants omniprésents dans l’alimentation animale et humaine, dans *La sécurité alimentaire du consommateur*, Lavoisier, Tec&Doc

CAST (Council for Agricultural Science and Technology) (2003). Mycotoxins, Risks in Plant, Animal, and Human Systems. Task force report. 139, ISBN N° 1-887383-22-0, pp 200, Ames IOWA, USA.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2004). Outbreak of aflatoxin poisoning—Eastern and Central Provinces, Kenya. MMWR 53, 790–793. Available from, <http://www.cdc.gov/nceh/hsb/chemicals/mmwr-aflatoxin.pdf>.

Chermette, R., Bussieras, J. (1993). Parasitologie vétérinaire. Mycologie, Edité par le Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons – Alfort.

Chulze SN. 2010. Les stratégies visant à réduire les niveaux de mycotoxines dans le maïs pendant le stockage: A review.

Cotty, P. J. (1989). Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology* 79: 808–814.

Cowan MM (1999). Plants products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiol. Rev.*, 12: 564-582.

Desoubeaux G., Chandénier J. Aspergillus et maladies aspergillaires. Feuillet de Biologie, (2010), 51, n°293, 11 p

DIEDHIOU P. M. (2011). *Aspergillus* colonization and aflatoxin contamination of maize and sesame kernels in two agro-ecological zones in Senegal. *J Phytopathol* 159:268-275 (2011)

Djordjevic M., Djordjevic O., Djordjevic R., Mijatovic M., Kostic M., Todorovic G., Ivanovic M. (2013). Alternative approach in control of tomato pathogen by using essential oils in vitro. *Pak. J. Bot.*, 45 (3): 1069-1072.

Dorman H.J.D., S.G. Deans, (2000).- Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.*, 88, 308-316.

Dupuy, J. (1994). Principales mycotoxines produites par des souches de *fusarium* isolées de céréales. Thèse INP Toulouse.

Duquenois P. (1968). L'utilisation des huiles essentielles en pharmacie, leur normalisation et l'Europe du médicament. *Parf. Cosm. Sov*, 11: 414-418.

ECOWAS. (2015). Etude exploratoire pour l'évaluation de l'environnement politique et des capacités techniques pour le contrôle des aflatoxines dans les états membres de la CEDEAO.

- EFSA. (2009)** European food safety authority. Les aflatoxines dans les denrées alimentaires.
- EL Haible A. (2011).** Valorisation des terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques. Thèse Doctorat de l'université de TOULOUSE, 195p.
- Faucon M. (2012).** Traité d'aromathérapie scientifique et médicale. Ed. Sang de la terre et Médicale, Paris, 879pp.
- Faye O., Lo M., Gaye O. (1997):** connaissances et circuits thérapeutique relatifs au paludisme en zone rurale Sénégalaise. Médecine tropicale; 57: 161 -164.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2004)** - Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed 2003. FAO Food and Nutrition paper 81.
- Garnon P. (1991) :** 3ieme rencontres techniques et économiques : plantes aromatiques et médicinales Nyons 2-3-4 Décembre, pp 216-231.
- Griffin S.G., S.G. Wyllie, J.L. Markham, D.N. Leach, (1999).**- The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. Flavour Fragr. J., 14 (5), 322-332.
- Gurib-Fakim A. (2014).** Toutes les plantes qui soignent. Description, préparations, usages et bienfaits. Ed. Michelle Lafon. Paris. 267p.
- Hammer K.A., C.F. Carson, T.V. Riley, (2003).**- Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. J. Appl. Microbiol., 95 (4), 853-860.
- Hibbett, D. S., M. Binder, J. F. Bischoff, M. Blackwell, P. F. Cannon. (2007).** A higherlevel phylogenetic classification of the Fungi. Mycol Res 111:509-47.
- Hsieh, D.P.H., Atkinson, D.N. and Zhao, M.S. (1992).** Aflatoxin–DNA adducts and P53 gene alterations in human liver. Abstracts. VIII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxms, Mexico City, p.36.
- Hua Sui Sheng T. (2002).** Biocontrol of *Aspergillus flavus* by Saprophytic Yeast, Progress from Laboratory Bioassay to Field Trial. Proceedings of the 3rd Fungal Genomics, 4th Fumonisin: and 16th Aflatoxin Elimination Workshops. October 13–15, 2003 Savannah, Georgia USA
- Ito Y, Peterson SW, Wicklow DT, Goto T. (2001).** *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section. Flavi. Mycol. Res., 105: 233- 239.

Johnsson P, Lindblad M, Thim AM, Jonsson N, Vargas EA, Medeiros NL, Brabet C, Quaresma de Araújo M, Olsen M. (2008). Growth of aflatoxigenic moulds and aflatoxin formation in Brazil nuts. *World Mycot. J.*, 1(2): 127-137.

Kedia, A., Jha, D.K., Dubey, N.K. (2015) Plant essential oils as natural fungicides against stored product fungi. In *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs* pp 208–214.

Kingston MM, Hashwell J. (1997). *Microwave – Enhanced Chemistry, Fundamentals, Sample Preparation, and applications.* Edition American Chemistry Society, Washington, DC, 772p.

Klich MA, Pitt JI. (1988). Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. *Trans. British mycol. Soc.*, 91(1): 99 -108.

Kocić-Tanackov S. D., Dimić G. R. (2013). Antifungal activity of essential oils in the control of food-borne fungi growth and mycotoxin biosynthesis in food. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* (A. Méndez-Vilas, Ed.): 838-849.

Luchese, R.H., Harrigan W.F. (1993). Biosynthesis of aflatoxin – the role of nutritional factors, *J. Appl. Bacteriol.* 74: 5-14.

Marechera, G. (2015) Estimation of the potential adoption of Aflasafe among smallholder maize farmers in lower eastern Kenya. *African Journal of Agriculture and Resource Economics*, 10, 72–85.

Marechera G, Ndwiga J. (2012). Estimation of the potential adoption of Aflasafe among smallholder maize farmers in lower eastern Kenya. *Afric. J. Agric. Resource Econ.*, 10(1): 72-85.

Mitchell, N.J., Bowers, E., Hurburgh, C., Wu, F. (2016) Potential economic losses to the USA corn industry from aflatoxin contamination. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 0049, 19440049.2016.1138545.

Morin, O. (1994). *Aspergillus et aspergilloses : biologie*, Ed. Techniques Encycl. Med. Chir. (Elsevier, Paris), *Maladies infectieuses* 8-600-A-10.

NDONG K. (2011). *L'aflatoxine dans les produits artisanaux dérivés de l'arachide (Sénégal).* Mémoire de Master, Université Cheikh Anta DIOP, 2011. 40p.

Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T. & Killington R. (2000) - L'essentiel en microbiologie. Berti. Paris. P. 210-216.

Njobeh BP, Dutton FM, Makun HA. (2010). Mycotoxins and human health: Significance, prevention and control in Smart Biomolecules in Medicine, Ajay KM, Ashutosh T, Shivani BM (Eds). VBRI Press: India; 132-177.

PACA, (Partenariat pour lutte contre l'aflatoxine en Afrique) (2017). Lutte contre l'aflatoxine pour l'accroissement des échanges commerciaux, une meilleure santé et des économies dynamiques en Afrique p : 4-4

Peyron L., Naves Y. R. (1977). Lexique des termes et expressions utilisées dans les industries des matières premières aromatiques. (Les huiles essentielles). *Rivistaitaliana*. E.P.P.O.S., 59 : 550-564.

Piochon M. (2008): Etude des huiles essentielles d'espèces végétal de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologique et hemi-syntese. Mémoire présenté à Université du Québec comme exigence partielle du maitre en ressources renouvelables.

Pitt, J.I., (2000). Toxigenic fungi and mycotoxins. *Br. Med. Bull.* 56 (1): 184 – 192.

Probst C, Bandyopadhyay R, Cotty P.J. (2014). Diversity of aflatoxin-producing fungi and their impact on food safety in sub-Saharan Africa.

Raper, K., Fennell, D.J. (1965). The genus *Aspergillus*, Williams and Wilkins editors, Baltimore.

Reddy KRN, Saritha P, Reddy CS, Muralidharan K. (2009). Aflatoxin B1 producing potential of *Aspergillus flavus* strains isolated from stored rice grains. *Afric. J. Biotechnol.*, 8(14): 3303-3308.

Sahlan MA, Zainal A, Sariah M, Gurmit S (2004). Identification of fungus causing leaf speckle in Malaysia. International Congress of Musa, harnessing research to improve livelihoods, 6–9 July 2004, Penang-Malaysia, Poster no 50

Samson, R.A., Hong, S.B., Frisvad, J.C. (2006). Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology* 44: 133–148.

Samate Abdoul D. (2001) : Compositions chimiques d'huiles essentielles extraites de plantes aromatiques de la zone soudanienne du Bourkina Faso : Valorisation, thèse de doctorat, univ.Ouagadougou, Bourkina Faso.

Selim, M.I., Juchems, A.M., Pependorf, E. (1998). Assessing airborne aflatoxin B1 during on-farm grain handling activities. *Am. Int. Hygiene Assoc. J.* 59: 22-256.

Shephard GS. (2008). L'évaluation des risques des aflatoxines dans les aliments en Afrique. Les additifs alimentaires et les contaminants: Partie A: Chimie, analyses, contrôle, Évaluation de l'exposition et des risques. 25(10): 1246-1256.

Singh P, Shukla R, Kumar A. (2010). Effect of citrus reticulata and cymbopogon citratus essential oils on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production on *Asparagus racemosus*. *Mycopathologia* 170: 195–202.

Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S. (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 1202 – 1205.

Smith, J.E., Moss, M.O. (1985). *Mycotoxins. Formation, analysis and significance*, John Wiley et Son, Chichester.

Soumanou MM, Adjou ES. (2016). Sweet Fennel (*Ocimum gratissimum*) Oils. In: Preedy, V.R. (Ed.), *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Academic Press, 765–773.

Souza EL, Lima EO, Freire KR, Sousa CP (2005). Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. *Bra. Arc. Technol.*, 48(2): 245-250.

Turner, W.B. (1983). “Fungal metabolites II”, Acad. Press, N.Y. and London, p. 631

Yoshimura H, Sawai Y, Tamotsu S, Sakai A, (2010). 1,8cineole inhibits both proliferation and elongation of BY-2 cultured tobacco cells, *J Chem Ecol*, 37(3):320-328.

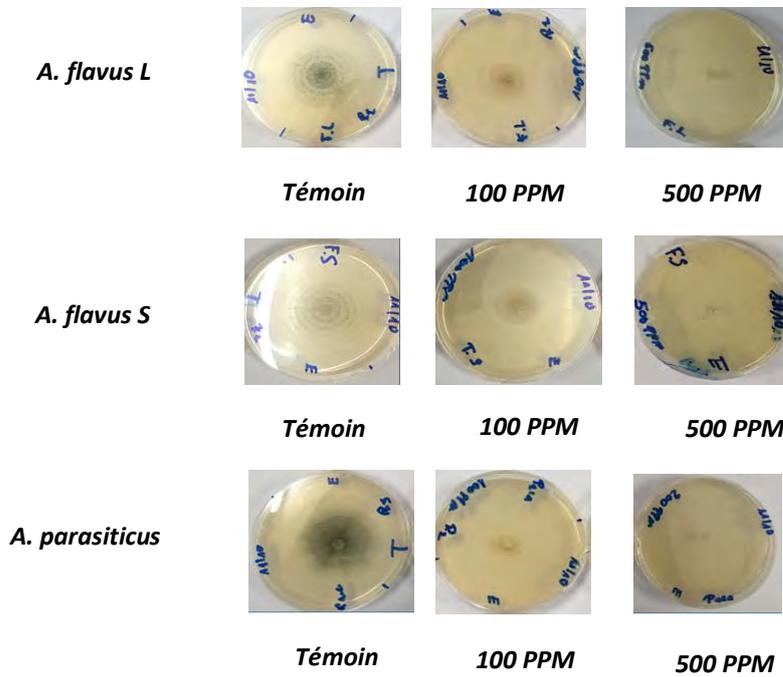
Watson, S.A., Mirocha, C.J., Hayes, A.W. (1984). Analysis for Trichothecenes in Samples from Southeast Asia Associated with Yellow Rain. *Fundamental Applied Toxicology*, 4, 1984, pp. 700-717

World Health Organization (WHO). 2006. AFRO Food Saf. Newsl., Issue No 2. July. Food Safety (FOS).

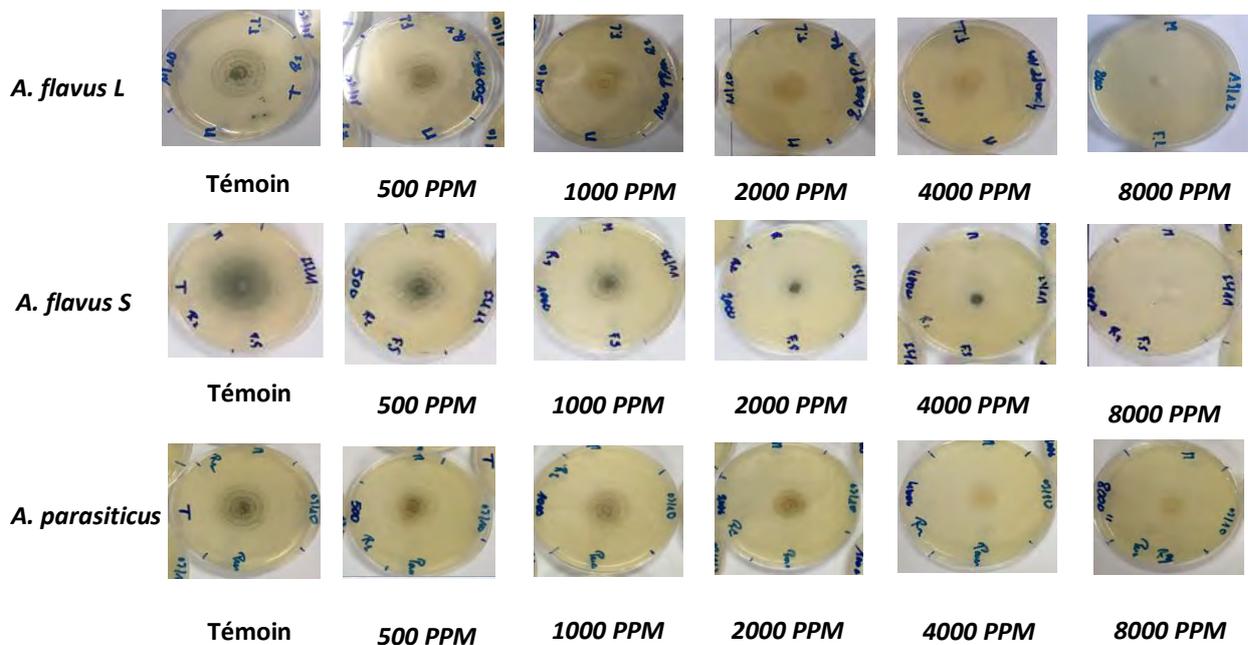
ANNEXES

ANNEXES

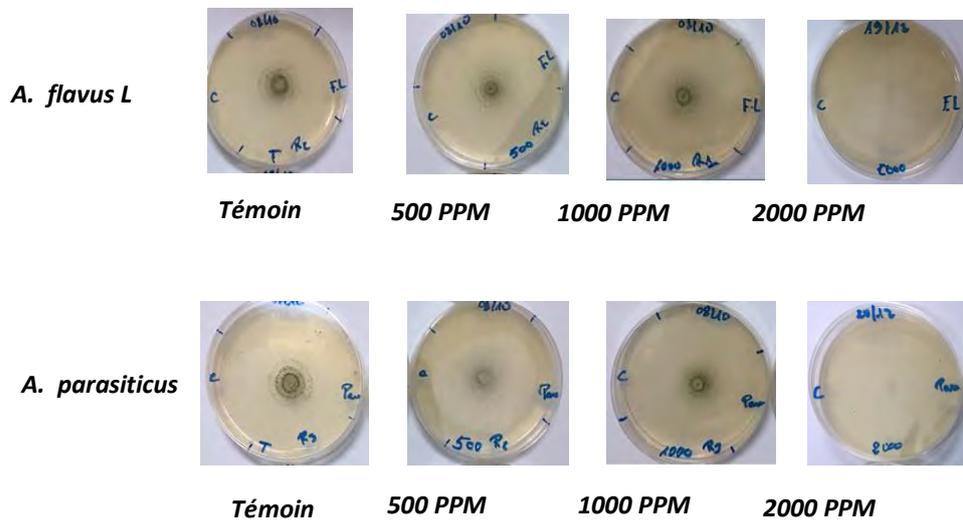
Annexe : 1 Illustration de l'effet des huiles essentielles d'*Eugenia caryophyllata* sur la croissance mycélienne de des champignons



Annexe : 2 Illustration de l'effet des huiles essentielles de *Melaleuca quinquenervia* sur la croissance mycélienne de des champignons



Annexe : 3 Illustration de l'effet des huiles essentielles de *Cymbopogon citratus* sur la croissance mycélienne de des champignons



Annexe 4: Composition de la solution Rose Bengal

Ingrédients	Quantités
Rose bengal	500 mg
Ethanol	30 ml
Eau distillée	100 ml

Annexe 5: Composition du milieu Rose Bengal modifié

Ingredients	Quantities
Eau distillée	1000 ml
Sucrose	3 g
NaNO₃	3 g
KH₂PO₄	0.75 g
K₂HPO₄	0.25 g
MgSO₄*7H₂O	0.5 g
KCl	0.5 g
NaCl	10 g
Micronutriments	1 ml
Rose Bengal	5 ml
Bacto Agar	10 g

Annexe 6 : Composition du milieu de phénotypage 5/2 agar

Ingrédients	Quantités
Eau distillée	950 ml
V8	50 ml
Agar-Agar	15 g

Annexe 7: Composition de la solution de micronutriments

Ingrédients	Quantités
Na₂B₄O₇*10H₂O	0,7 g
(NH₄)₆Mo₇O₂₄*4H₂O	0,5 g
Fe₂(SO₄)₃*6H₂O	10 g
CuSO₄*5H₂O	0,3 g
MnSO₄*H₂O	0,11 g
ZnSO₄*7H₂O	17,6 g
Eau distillée	1000 ml