جامعة سيدي محمد بن عبد الله بفاس
UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDALLAH DE FES
كلية العلوم ظهر المهراز فاس
FACULTE DES SCIENCES DHAR EL MEHRAZ FES

Formation Doctorale : Molécules Bioactives, Santé et Biotechnologies (MBSB)

Discipline : Biologie

Spécialité : Biochimie et Biotechnologie

Laboratoire d'Agroalimentaire et Sécurité Sanitaire des Aliments (LASSA)

THESE DE DOCTORAT

Présentée par

Adil LAAZIZ

Contrôle chimique de la croissance fongique et la production de l'ochratoxine A par des espèces d'*Aspergillus carbonarius* et d'*A. niger* agrégats isolées du raisin marocain et exploration de l'activité antifongique des huiles essentielles

Soutenue le 18 juillet 2020 devant le jury composé de :

Pr. Abdellatif BOUKIR	**Faculté des Sciences et Techniques, Fès**	**Président**
Pr. Naima EL GHACHTOULI	**Faculté des Sciences et Techniques, Fès**	**Rapporteur**
Pr. Abdelfattah MOUABAD	**Faculté des Sciences et Techniques, Marrakech**	**Rapporteur**
Pr. Hamid MAZOUZ	**Faculté des Sciences, Meknès**	**Rapporteur**
Pr. Geert HAESAERT	**Faculty of Bioscience Engineering, Belgique**	**Examinateur**
Pr. Khalid TAWFIKI HAJJI	**Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, Fès**	**Examinateur**
Pr. Hassan HAJJAJ	**Faculté des Sciences, Meknès**	**Co-directeur de thèse**
Pr. Amina BOUSETA	**Faculté des Sciences Dhar El Mahraz, Fès**	**Directrice de thèse**

Année Universitaire : 2019-2020

Ce travail a été réalisé en partie dans le cadre :

Du Projet de Coopération Universitaire Institutionnelle (CUI) entre l'Université Moulay Ismail, Meknès et l'Université de Gand en Belgique (CUI, VLIR-UOS)
Cluster de compétences « Agroalimentaire et Sécurité Sanitaire des Aliments »
Sous la responsabilité du Pr. Hassan HAJJAJ.

Dédicaces

A la mémoire de nos grands-parents que leurs âmes reposent dans la « rahma d'Allah »

A mes parents que Dieu les protège. En témoignage de ma profonde affection. Qu'ils sachent que ce travail est en partie le fruit de leur soutien ; je leur suis très reconnaissant. Leur fierté à mon égard aujourd'hui est pour moi la meilleure des récompenses.

A mon amour Yousra

A mes frères Soufiane et Yassine

A mes beaux-parents et beaux-frères Azzdine, Youssef et Akram

A toute la famille et à tous les ami(e)s



Remerciements

Une thèse, ce n'est pas qu'un nom sur un épais manuscrit. C'est en réalité le travail de toute une équipe, dont j'ai eu la chance de profiter. Les travaux de recherches de cette thèse ont été réalisés au Laboratoire d'Agroalimentaire et Sécurité Sanitaire des Aliments (LASSA), au département de biologie de la Faculté des Sciences Dhar el Mahraz de Fès, sous la direction du Professeur Amina BOUSETA.

En premier lieu, j'ai beaucoup de reconnaissance et d'admiration à témoigner à ma directrice de thèse, Professeur Amina BOUSETA qui m'a accueilli au sein de son laboratoire, il y a de nombreuses années. Elle m'a initié à la recherche en commençant par le mémoire du Master en 2013 puis en me donnant l'opportunité de compléter cette formation à la recherche par une thèse au sein de son équipe. Je n'ai sûrement pas les mots suffisants pour vous témoigner tous mes remerciements. Je la remercie pour sa compétence scientifique et sa disponibilité. Ses encouragements et sa patience m'ont beaucoup aidé à surmonter toutes les difficultés. Je tiens à la remercier vivement pour avoir accepté de diriger mes réflexions, pour la confiance qu'elle m'a accordée, son soutien constant et pour ses compétences qui ont largement contribué à la réussite de ce travail. Merci Madame pour votre humanité et pour toute l'aide que j'ai reçue de votre part.

Un très grand merci à mon co-directeur de thèse, Monsieur Hassan HAJJAJ, Professeur à la Faculté des Sciences de Meknès et responsable du cluster de compétence « Agroalimentaire et sécurité sanitaire des aliments » CUI-UMI. Je tiens à le remercier pour sa grande disponibilité, pour sa confiance en moi, son aide et son support scientifique et moral. Ainsi, je le remercie pour ses qualités scientifiques et humaines, ses multiples encouragements, sa passion et sa gentillesse.

Je remercie Monsieur Abdellatif BOUKIR, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès qui m'a fait l'honneur d'assurer la présidence du jury lors de ma soutenance de thèse. Veuillez trouver ici, l'expression de ma profonde gratitude.

Je remercie vivement Madame Naima EL GHACHTOULI, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, Monsieur Abdelfattah MOUABAD, Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Marrakech et Monsieur Hamid MAZOUZ, Professeur à la Faculté des Sciences de Meknès, pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse.

Je remercie également Monsieur Geert HAESAERT, Professeur à l'Université de Gand « Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University » en Belgique, je suis très reconnaissant pour la confiance que vous m'avez accordée et pour la chance que vous m'avez donnée en m'acceptant en tant que stagiaire au sein de votre institution. Merci de m'avoir accueilli pendant les deux séjours scientifiques au sein de votre établissement. Je vous remercie Monsieur pour avoir accepté de vous déplacer et de me faire bénéficier de vos compétences et d'être examinateur de ce travail de thèse.

Je remercie vivement Monsieur Khalid TAWFIKI HAJJI, Professeur à la Faculté des Sciences Dhar El Mehraz de Fès, d'avoir si gentiment accepté la lourde tâche d'examiner ce travail ainsi que pour son support et pour les discussions fructueuses et quotidiennes durant toutes ces années.

Je souhaite aussi exprimer ma gratitude aux membres de laboratoire d'Agroalimentaire et Sécurité Sanitaire des Aliments, un merci spécial au Professeur Mme Rafika IRAQI pour ses encouragements et son aide scientifique et technique, je n'oublierai jamais son support moral et sa gentillesse. Mes remerciements s'adressent aussi au Professeur Mme Rajae BELKHOU pour ses judicieux conseils et ses encouragements durant la réalisation de ce travail. Merci mon ami, Professeur Abdelouahed HAJJAJI, pour vos conseils et toute l'aide que vous m'avez accordée. Mes remerciements les plus sincères vont également au Professeur Souad QJIDAA, pour son aide, le temps si précieux consacré à la réalisation des extractions ; merci pour ton écoute et ta bonne humeur. Je te souhaite une vie pleine de santé et de bonheur. Je remercie chaleureusement Dr. Souad ZOUHAIR et Dr. Najoi EL HAZZAT, elles m'ont toujours soutenu et encouragé à avancer et aller jusqu'au bout, merci infiniment.

Je souhaite une bonne continuation aux doctorantes Siham AKHTACH, Salwa TSOULI SARHIR et Yousra El HAMMOUDI.

Je souhaiterais également remercier Professeur Kris AUDNAERT, directeur du Laboratory of Applied Mycology and Phenomics (LAMP) pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Merci à tous les membres du laboratoire LAMP pour leur soutien et l'ambiance agréable qui y règne, une pensée particulière à Mohamed Fathi ABDALLAH, Minh Trang TRAN, Neda NAJD ABBASI, Boris BEKAERT et Maarten AMEYE.

Je tiens aussi à remercier affectueusement mes parents et mes frères pour m'avoir accordé leur confiance et permis de faire de longues études et de la même façon je remercie mes beaux-parents et mes beaux-frères pour leur soutien moral et encouragement.

J'exprime toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements à ma très chère épouse Yousra EL HAMMOUDI. Aucun mot ne pourra exprimer mon amour et mon attachement à toi. Depuis que je t'ai connu, tu n'as cessé de me soutenir et de m'épauler. Tu me voulais toujours le meilleur. Ton amour ne m'a procuré que confiance et stabilité. Tu as partagé avec moi les meilleurs moments de ma vie. Aux moments les plus difficiles, tu étais toujours à mes côtés. Je remercie le bon dieu qui a croisé nos chemins. Je te souhaite une bonne continuation et bon courage pour ton doctorat.

Mes remerciements les plus sincères vont également à mes ami(e)s qui m'ont soutenu et encouragé à avancer et aller jusqu'au bout tout au long de cette thèse.

Liste des publications

- **A. Laaziz,** S. Qjidaa, Y. El Hammoudi, A. Hajjaji and A. Bouseta (2017) Chemical control of fungal growth and ochratoxin A production by *Aspergillus* isolated from Moroccan grapes. South Asian Journal of Experimental Biology 7 (2): 84-91.

- S. Qjidaa, **A. Laaziz**, A. Hajjaji and A. Bouseta (2018) Effet du trans-resvératrol sur la croissance et la production de l'ochratoxine A de certaines souches *d'Aspergillus* marocains. International Journal of Biological and Chemical Sciences. International Journal of Biological and Chemical Sciences 12: 1345-1355.

- S. Zouhair, **A. Laaziz**, S. Qjidaa and A. Bouseta (2017) Growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus niger* in relation to culture medium, water activity and temperature. Global Advanced Research Journal of Agricultural Science 6 (10): 314-322.

- **A. Laaziz,** Y. El Hammoudi, S. Qjidaa, A. Hajjaji, H. Hajjaj and A. Bouseta. Antifungal activity of *Syzygium aromaticum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus tubingensis* and *A. foetidus* strains isolated from Moroccan grapes. (Soumis au journal "*phytopathologia mediterranea"*).

- **A. Laaziz,** Y. El Hammoudi, S. Qjidaa, A. Hajjaji, H. Hajjaj and A. Bouseta. Impact of fungicides and water activity on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolated from grapes. (A soumettre)

Liste des communications

- **Laaziz, A**., Haesaert, G., El Hammoudi, Y., Hajjaj**,** H., Audenaert**,** K et Bouseta, A. 2020. Evaluation *in vitro* et *in vivo* de l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Thymus satureioides* sur la croissance fongique et la production de l'ochratoxine A par *Aspergillus niger*. Séminaire National sur les mycotoxines dans les épices et denrées alimentaires, 08 Janvier. Fès, Maroc. ***Communication par affiche.***

- **Laaziz, A**., Haesaert, G., Hajjaj**,** H., Audenaert**,** K et Bouseta, A. 2019. *Thymus satureioides* essential oil modulate gene expression and ochratoxin A production in *Aspergillus carbonarius, 16*-18 Octobre. Errachidia, Maroc***. Communication orale.***

- **Laaziz, A**., El Hammoudi, Y., Hajjaji, A., Qjidaa, S. et Bouseta, A. 2019. Evaluation of the control ability of *Thymus satureioides* essential oil against *Aspergillus niger* growth and ochratoxin A production. Colloque International sur la recherché en Agroalimentaire, 05-06 Février. Larache, Maroc. ***Communication orale.***

- **Laaziz, A**., Hajjaji, A., El Hammoudi, Y., Qjidaa, S. et Bouseta, A. 2018. In vitro antifungal activity of *Thymus satureioides* essential oil against ochratoxigenic *Aspergillus carbonarius* strain isolated from Moroccan grapes. 1er Congrès International sur l'Innovation, la Qualité et la Sécurité Sanitaire des Aliments. 28-30 Novembre, Fès, Maroc. ***Communication par affiche.***

- **Laaziz, A**., El Hammoudi, Y., Qjidaa, S., Hajjaji, A. et Bouseta, A. 2018. Chemical composition and antifungal activity of *Syzygium aromaticum* essential oil against ochratoxigenic and non-ochratoxigenic *Aspergillus* section *Nigri* isolated from Moroccan grapes. Forum BioChem 2018, 7-8 Juin, Strasbourg, France. ***Communication par affiche.***

- **Laaziz, A**., Qjidaa, S., El Hammoudi, Y., Hajjaji, A., Tawfiki Hajji, Kh. et Bouseta, A. 2016. Pouvoir anti-ochratoxinogène et composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*. Congrès National Innovation et Management de la Qualité des Aliments, 28-29 décembre, Fès, Maroc. ***Communication par affiche.***

- **Laaziz, A**., Qjidaa, S., El Hammoudi, Y., Hajjaji, A., Tawfiki Hajji, Kh. et Bouseta, A. 2016. The influence of three antifungal agents and water activity against five isolates of *Aspergillus niger* and *A. carbonarius* isolated from Moroccan grapes. Congrès National Innovation et Management de la Qualité des Aliments, 28-29 décembre, Fès, Maroc. ***Communication orale.***

- **Laaziz, A**., Qjidaa, S. et Bouseta, A. 2016. Activité antifongique et composition chimique des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et *Citrus aurantium*. 2éme congrès international Substances Naturelles et Développement Durable, 19-21 Mai, Rabat, Maroc. ***Communication par affiche.***

- **Laaziz, A**., Qjidaa, S. et Bouseta, A. 2016. Effet in vitro de l'azoxystrobine, du pyriméthanil et de l'hexaconazole sur le contrôle de la croissance et la production de l'ochratoxine A par des souches d*'Aspergillus carbonarius* et *Aspergillus niger* isolées à partir du raisin marocain. Congrès international Mycotoxines et Cancer, 24-25 Mars, Marrakech, Maroc. ***Communication orale.***

- **Laaziz, A**., Qjidaa, S., Lahjouji, T. et Bouseta, A. 2015. Activité antifongique et composition chimique de l'huile essentielle du clou de girofle. 3^{éme} congrès international sur la Biodiversité Végétale, 09-11 Octobre, Marrakech, Maroc. ***Communication orale.***

- **Laaziz, A**., Qjidaa, S., Lahjouji, T., Bouya, D. et Bouseta, A. 2014. Identification par GC-MS et GC-FID-O de métabolites volatils produits par *A. tubingensis*. Effet du temps d'incubation sur la production de terpène. 2^{éme} congrès international sur la Biodiversité Végétale, 27-29 Mars, Marrakech, Maroc. ***Communication par affiche.***

- **Laaziz, A**., Qjidaa, S., Zouhair, S., Bouya, D. et Bouseta, A. 2014. Effet de la température et du temps d'incubation sur la croissance radiale d'*A. niger* producteur d'ochratoxine A (OTA). 2^{éme} congrès international sur la Biodiversité Végétale, 27-29 Mars, Marrakech, Maroc. ***Communication par affiche.***

- El Hammoudi, Y., **Laaziz, A**., Bouseta, A., Belkhou, R. 2020. Etude *in vitro* de l'effet de souches de bactéries lactiques sur la croissance et la production de l'ochratoxine A par des espèces *d'Aspergillus sp*. Séminaire National sur les mycotoxines dans les épices et denrées alimentaires, 08 Janvier. Fès, Maroc. ***Communication par affiche.***

- Selouane, A., **Laaziz, A**., Lebrihi, A. et Bouseta, A. 2020. Ochratoxine A et champignons toxinogènes dans les échantillons de raisin marocain. Séminaire National sur les mycotoxines dans les épices et denrées alimentaires, 08 Janvier. Fès, Maroc. ***Communication par affiche.***

- Zouhair, S., **Laaziz, A**, Qjidaa, S., Bouseta, A. 2020. La croissance fongique et la production d'ochratoxine A (OTA) par des souches d'*Aspergillus* et de déoxynivalénol (DON) par des souches de *Fusarium* en présence de certains fongicides. Séminaire National sur les mycotoxines dans les épices et denrées alimentaires, 08 Janvier. Fès, Maroc. ***Communication par affiche.***

- Qjidaa, S., **Laaziz, A**. et Bouseta, A. 2020. Effet combiné des fongicides et de l'activité de l'eau sur la croissance fongique et la production de l'ochratoxine A par des souches d'*Aspergillus niger agrégats*. Séminaire National sur les mycotoxines dans les épices et denrées alimentaires, 08 Janvier. Fès, Maroc. ***Communication par affiche.***

- Hajjaji, A., Qjidaa, S., **Laaziz, A**., Selouane, A. et Bouseta A. 2020. Occurrence de l'ochratoxine A et des souches ochratoxinogènes dans les céréales et les raisins Marocains. Séminaire National sur les mycotoxines dans les épices et denrées alimentaires, 08 Janvier. Fès, Maroc. ***Communication par affiche***.

- El Hammoudi, Y., ZHAO, M., **Laaziz, A**., Bouseta, A., Belkhou, R., Ennahar, S. 2019. Etude de l'activité antifongique de bactéries lactiques sur la croissance des souches d*'Aspergillus*. Identification et quantifcation par UPLC-Qtof de l'acide phényllactique (PLA) et l'acide hydroxyphenyllactique (OH-PLA) produits. 1er Congrès International de la Santé humaine et Ressources Naturelles Oasiennes, 16-18 Octobre 2019, Errachidia, Maroc. ***Communication orale.***

- El Hammoudi, Y., **Laaziz, A.**, Bouseta, A., Belkhou, R. 2019. Etude de l'activité antifongique de bactéries lactiques isolées à partir de produits du terroir marocain sur la croissance fongique et la production d'OTA par des souches *d'Aspergillus niger* Aggregate et *A. Carbonarius*. 1ère Edition du Colloque International sur la Recherche en Agroalimentaire, 05-06 Février, Larache, Maroc. ***Communication par affiche.***

- El Hammoudi, Y., ZHAO, M., **Laaziz, A.**, Bouseta, A., Belkhou, R., ENNAHAR, S. 2018. Identification et quantification par UPLC-Qtof de composés antifongiques produits par des bactéries lactiques isolées à partir de produits fermentés marocains. 1er congrès International sur l'Innovation, la Qualité et la Sécurité Sanitaire des Aliments. 28-30 Novembre, Fès, Maroc. ***Communication orale.***

- Zouhair, S., **Laaziz, A**, Qjidaa, S., Bouseta, A. 2018. Impact de l'hexaconazole et de l'azoxystrobine sur la croissance fongique et la production dedéoxynivalénol (DON) par des souches de *Fusarium culmorum* et *F. graminearum*. 1er congrès International sur l'Innovation, la Qualité et la Sécurité Sanitaire des Aliments. 28-30 Novembre, Fès, Maroc. ***Communication orale.***

- Zouhair, S., **Laaziz, A**, Qjidaa, S., Bouseta, A. 2018. Effet de l'activité de l'eau et de l'hexaconazole sur la croissance des souches de *Fusarium culmorum.* 1er congrès International sur l'Innovation, la Qualité et la Sécurité Sanitaire des Aliments. 28-30 Novembre, Fès, Maroc. ***Communication par affiche.***

- Hajjaji, A., **Laaziz, A**., Qjidaa, S., Bouseta A. 2018. Les Maladies de l'olivier : Revue Bibliographique. 1er congrès International sur l'Innovation, la Qualité et la Sécurité Sanitaire des Aliments. 28-30 Novembre, Fès, Maroc. ***Communication par affiche.***

- Hajjaji, A., Ramchoun, M., Benchagra, L., **Laaziz, A.**, Qjidaa, S., Ahdri, S., Bouhrym, R., Figuigui, A., Bouseta, A., 2018. Determination of total phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity of two thymus varieties collected fromBeniMellal-khenifra area in Morocco. 1er congrès International sur l'Innovation, la Qualité et la Sécurité Sanitaire des Aliments. 28-30 Novembre, Fès, Maroc. ***Communication par affiche.***

- Hajjaji, A., **Laaziz, A**., Qjidaa, S. et Bouseta, A. 2017. Fungi as alternative sources of Chitin and Chitosan. Biotechnology: Perspectives beyond 2020, 18-19 décembre, Beni Mellal, Maroc. ***Communication orale.***

- El Hammoudi, Y., **Laaziz, A**., Amensag, K., Bouseta, A. et Belkhou, R. 2016. Etude de l'activité antifongique de souches de bactéries lactiques : effet sur la croissance d'*Aspergillus niger* aggregate isolée à partir de raisins marocains. Congrès National Innovation et Management de la Qualité des Aliments, 28-29 décembre, Fès, Maroc. ***Communication orale.***

- Qjidaa, S., **Laaziz, A**., Hajjaji, A. et Bouseta, A. 2016. Effet de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* sur production d'ochratoxine A par des souches d*'A. niger* aggregates isolées à partir du raisin marocain. Congrès National Innovation et Management de la Qualité des Aliments, 28-29 décembre, Fès, Maroc. ***Communication orale.***

- Zouhair, S., **Laaziz, A**. et Bouseta, A. 2016. Effet de l'interaction du milieu de culture, de la température, de l'activité de l'eau et du temps d'incubation sur le contrôle de la croissance et la production d'ochratoxine A par *Aspergillus carbonarius* et *Aspergillus niger*. Congrès National Innovation et Management de la Qualité des Aliments, 28-29 décembre, Fès, Maroc. ***Communication orale.***

- Yahyaoui, A., **Laaziz, A**., Qjidaa, S. et Bouseta, A. 2016. Etude de l'effet combiné de l'huile essentielle de *Mentha pulegium* et l'activité de l'eau sur la croissance fongique et la production de l'ochratoxine A par des souches d*'Aspergillus tubingensis* Congrès National Innovation et Management de la Qualité des Aliments, 28-29 décembre, Fès, Maroc. ***Communication par affiche.***

- Zouhair, S., Qjidaa, S., **Laaziz, A**., Bouya, D. et Bouseta, A. 2016. Efficacité de l'azoxystrobine, et de l'hexaconazole sur le contrôle de la croissance et la production de déoxynivalénol (DON) par *Fusarium graminearum*. Congrès international Mycotoxines et Cancer, 24-25 Mars, Marrakech, Maroc. ***Communication par affiche.***

- Hajjaji, A., Qjidaa, S., **Laaziz, A**., Krimissa, S. et Bouseta, A. 2016. Effect of two fungicides on the growth of two Moroccan *Aspergillus* species. Congrès National Innovation et Management de la Qualité des Aliments, 28-29 décembre, Fès, Maroc. ***Communication orale.***

- Qjidaa, S., Hajjaji, A., **Laaziz, A**. et Bouseta, A. 2016. Effet du trans-resvératrol sur la croissance fongique et la production de l'ochratoxine A chez certaines souches marocaines d'*Aspergillus*. Congrès National Innovation et Management de la Qualité des Aliments, 28-29 décembre, Fès, Maroc. ***Communication par affiche.***

- Qjidaa, S., **Laaziz, A**., Zouhair, S., Bouya, D. et Bouseta, A. 2014. Efficacité de l'azoxystrobine, du pyriméthanil et de l'hexaconazole sur le contrôle de la croissance *d'A. tubingensis* producteur d'OTA. 2^{éme} congrès international sur la Biodiversité Végétale, 27-29 Mars, Marrakech, Maroc. ***Communication par affiche.***

- Qjidaa, S., **Laaziz, A**., Lahjouji, T., Bouya, D. et Bouseta, A. 2014. Activité antifongique et composition chimique de l'huile essentielle de la menthe pouliot. 2^{éme} congrès

international sur la Biodiversité Végétale, 27-29 Mars, Marrakech, Maroc. ***Communication par affiche.***

Résumé

La contamination des produits agricoles par les champignons phytopathogènes constitue une menace majeure pour le secteur agroalimentaire à l'échelle mondiale. En particulier, les espèces *d'Aspergillus* qui, outre leur capacité à provoquer la pourriture, menacent la santé humaine et animale notamment par la production des mycotoxines. Parmi ces mycotoxines, l'ochratoxine A (OTA), métabolite secondaire de certaines espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium*, est produite sur une large gamme de denrées alimentaires et de produits agricoles. Sa persistance dans les aliments après les étapes de transformation et de stérilisation provoque plusieurs effets délétères comme les effets néphrotoxiques, cancérigènes et tératogènes. Dans ce cadre, l'évaluation de l'effet combiné de trois fongicides (azoxystrobine, hexaconazole et pyriméthanil) et de l'activité de l'eau (0.90 ; 0.95 et 0.99 a_w) sur la croissance radiale et la production de l'OTA par cinq souches *d'Aspergillus carbonarius* et *A. niger*, isolées à partir du raisin, a été réalisée. L'effet *in vitro* et *in vivo* des huiles essentielles (HE) sur la croissance radiale et la production de l'OTA par treize souches d*'A. carbonarius* et *A. niger* agrégats ainsi que l'effet de ces huiles sur l'expression des gènes responsables de la biosynthèse de l'OTA chez deux souches d*'A. carbonarius* et *A. niger* ont également été étudiés. Les résultats de l'effet des fongicides et de l'activité de l'eau sur la croissance fongique ont montré que tous les fongicides testés réduisent la croissance fongique mais cette réduction dépend de manière très significative (p=0.000) de la souche, de l'activité de l'eau, du fongicide et de la dose appliquée. L'interaction des fongicides et des activités de l'eau affectait aussi bien les phases de latence que les taux de croissance radiale de toutes les souches testées. Le pyriméthanil et l'hexaconazole se sont avérés les plus efficaces, quelles que soient l'activité de l'eau et la dose appliquée avec une inhibition totale de la croissance des cinq souches, à l'exception de la dose la plus faible d'hexaconazole (0.01×DR) à 0.99 a_w où une faible croissance a été notée pour *A. niger* (2.67 mm/jour). La réduction de la croissance fongique pour les trois fongicides était accompagnée par une réduction de la production de l'OTA. L'étude de l'efficacité *in vitro* et *in vivo* des huiles essentielles du romarin, du clou de girofle et du thym sur le contrôle de la croissance fongique et la production d'OTA par *A. carbonarius* et *A. niger* agrégats a révélé que l'activité antifongique de l'huiles essentielle du romarin (*Rosmarinus officinalis*) était faible avec des taux d'inhibition qui ne dépassent pas 41.20% à 200 µL/L d'HE. A l'inverse, les huiles essentielles du clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) et du thym (*Thymus satureioides*) ont une activité antifongique importante avec des taux d'inhibition qui varient selon la souche et la dose de l'HE et atteignent 100% à 200 µL/L. Cependant, cette réduction de croissance était accompagnée dans certains cas par une stimulation de la biosynthèse de l'OTA. En effet, l'étude de l'effet des HE du clou de girofle et du thym sur les niveaux d'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'OTA (PKS, NRPS et HAL) chez *A. carbonarius* et *A. niger* a révélé que les gènes étudiés ont été surexprimé dans la majorité des traitements. Cette surexpression peut expliquer la stimulation de l'OTA. L'étude *in vivo* de l'HE du thym et du clou de girofle a montré que ces huiles étaient capables d'une part, de réduire le pourcentage de contamination (RGB%) chez les raisins infectés, et d'autre part, de préserver l'indice d'anthocyane (AriIdx) à la dose la plus élevée (2000 µL/L).

Mots clés : Ochratoxine A, fongicides, activité de l'eau, huile essentielle ; expression des gènes ; *Aspergillus.*

Abstract

Contamination of agricultural products with phytopathogenic fungi is a major threat to the global food industry. In addition to their ability to cause rot, species of *Aspergillus* threaten human and animal health, in particular through mycotoxins production. Ochratoxin A (OTA), a secondary metabolite of certain species of *Aspergillus* and *Penicillium*, is a mycotoxin produced on a wide range of food and agricultural products. Its persistence in food after transformation and sterilization causes several deleterious effects such as nephrotoxic, carcinogenic and teratogenic effects. In this context, the evaluation of the combined effect of three fungicides (azoxystrobin, hexaconazole and pyrimethanil) and water activity (0.90; 0.95 and 0.99 a_w) on radial growth and OTA production by five strains of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger*, isolated from grapes, was carried out. The *in vitro* and *in vivo* effects of essential oils (EO) on the radial growth and OTA production by thirteen strains of *A. carbonarius* and *A. niger aggregates* as well as their effect on the expression of genes responsible for the OTA biosynthesis in two strains of *A. carbonarius* and *A. niger* have also been studied. The results showed that all the fungicides tested reduced fungal growth but this reduction depended very significantly ($p = 0.000$) on the strain, the water activity, the fungicide and the applied concentration. The interaction of fungicides and water activities affected both the lag phases and the radial growth rates of all strains tested. Pyrimethanil and hexaconazole were found to be the most effective, regardless of water activity and the applied dose with complete inhibition of growth of the five strains, except for the lowest dose of hexaconazole (0.01×RD) at 0.99 a_w where weak growth was noted for *A. niger* (2.67 mm/day). The reduction in fungal growth for the three fungicides was accompanied by a reduction in OTA production. The *in vitro* and *in vivo* study of the effectiveness of rosemary, clove and thyme essential oils on the fungal growth and OTA production by *A. carbonarius* and *A. niger aggregates* revealed that the antifungal activity of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis*) was low, with a maximum inhibition rates of 41.20% at 200 µL/L of EO. Conversely, the essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*) and thyme (*Thymus satureioides*) have a significant antifungal activity, inhibition rates were varied according to the strain and the EO concentration and reach 100% at 200 µL/L. However, this reduction in growth was accompanied in some cases by stimulation of the OTA biosynthesis. Indeed, the study of the effect of the EO of clove and thyme on the expression levels of genes involved in the biosynthesis of OTA (PKS, NRPS and HAL) in *A. carbonarius* and *A. niger* revealed that the genes studied were overexpressed in the most of treatments. This overexpression may explain the OTA stimulation. The *in vivo* study of the thyme and clove EOs has shown that these oils are able to reduce the percentage of contamination (RGB%) in infected grapes, and preserve the anthocyanin index (AriIdx) at the highest dose of EO (2000 µL/L).

Keywords: Ochratoxin A, fungicides, water activity, essential oil; gene expression; *Aspergillus*.

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFB1: Aflatoxine B1

AFB2: Aflatoxine B2

AFG1: Aflatoxine G1

AFG2: Aflatoxine G2

AFLP: Amplified fragment-length polymorphism

ARN: Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

a_w : Activité de l'eau

CE : Commission européenne

CEO : Clove Essential Oil

CYA: Czapek Yeast Extract Agar

DON: Deoxynivalenol

DR : Dose recommandée

DRO : Dérivés réactifs de l'oxygène

FAFLP: Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism

FAO : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

FDA: Food and Drugs Administration

FRAC: Fungicide resistance action committee

GC-FID : Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme

GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse

GRAS : Généralement reconnues comme sûres

HAL : Halogenase gene

HACCP : Systèmes d'analyse des risques et de maîtrise des points critiques

HE : Huile essentielle

HOG : Glycérol à haute osmolarité

HPLC : chromatographie en phase liquide haute performance

HRE : Humidité relative à l'équilibre

HSCAS : Aluminosilicates de sodium et de calcium hydratés

IARC : Centre International de Recherche sur le Cancer

IBS : Inhibiteurs des stérols membranaires

IDM : Inhibiteurs de la 14-α-déméthylase

IK : indice de Kovats

IPM : Gestion intégrée des plantes

MUCL : Mycothèque de l'Université catholique de Louvain

NADPH : Forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NRPS : Peptide synthétase non-ribosomal

OMS : Organisation mondiale de la santé

OSMAC: One strain many compounds

OTA: Ochratoxine

OTB: Ochratoxine B

OTC: Ochratoxine C

OTα: Ochratoxine α

PCR: Polymerase chain reaction

PKS: Polykétide Synthase

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA

REO: Rosemary Essential Oil

RFLPs: Restriction Fragment Lenght Polymorphisms

RGB: Red, Green, Blue

ROS: Reactive oxygen species

SNM : Synthetic Nutrient Medium agar

UCPA : Union Internationale de la Chimie Pure et Appliquée

UE : Union européenne

UV : Ultra-violet

YES: Yeast Extract Sucrose Agar

Liste des tableaux

Tableau 1. Les conditions optimales et minimales (température et activité de l'eau) de croissance des *Aspergillus* de la section Nigri sur les différents milieux de culture..... 12
Tableau 2. Principales mycotoxines produites par les espèces d'*Aspergillus*..... 14
Tableau 3. Différentes formes d'ochratoxines. 16
Tableau 4. Limites marocaines pour l'ochratoxine A dans différents produits alimentaires par rapport à la réglementation Européenne..... 26
Tableau 5. Agents biologiques de contrôle des champignons producteurs de mycotoxines (Tsitsigiannis *et al*., 2012)..... 40
Tableau 6. Souches utilisées pour cette étude. 50
Tableau 7. Caractéristiques des différents fongicides utilisés. 51
Tableau 8. Quantités (g) de soluté (glycérol) nécessaires pour 100 mL de milieu (CYA) à l'a_w requise (Belli *et al*., 2004). 57
Tableau 9. Liste des amorces utilisées. 63
Tableau 10. Effet de différentes concentrations en huile essentielle du romarin (*Rosmarinus officinalis*) sur la phase de latence (jour) des isolats d'*A. carbonarius* et *A. niger*. 128
Tableau 11. Effet de différentes concentrations en huile essentielle du clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) sur la phase de latence (jour) des isolats d'*A. carbonarius* et *A. niger*. 130
Tableau 12. Composition chimique de l'HE de thym (*Thymus satureioides*). 133
Tableau 13. Effet de différentes concentrations en huile essentielle du thym (Thymus satureioides) sur la phase de latence (jour) des isolats d'*A. carbonarius* et *A. niger*..... 134
Tableau 14. Analyse de la variance de l'effet des souches (S), des trois huiles essentielles (HE), de leurs concentrations (0-500 µL/L) et de leurs interactions sur les taux de croissance d'*A. carbonarius* et *A. niger* sur milieu CYA. 137
Tableau 15. Effet de l'HE de thym (*Thymus satureioides*) sur la production de l'OTA par *A. carbonarius* et *A. niger* sur milieu CYA. 137

Liste des figures

Figure 1. Schéma de classification des champignons. 6
Figure 2. Caractères morphologiques d'*Aspergillus* unisérié (A) et bisérié (B). (D'après Samson *et al.*, 1996) 8
Figure 3. Formule générale des ochratoxines (d'après Marquardt et Frohlich., 1992). 16
Figure 4. Structure chimique de l'ochratoxine A. 17
Figure 5. Apoptose induite par l'OTA et signalisation cellulaire (Tao *et al*., 2018)..... 19
Figure 6. Schéma de la voie hypothétique de la biosynthèse de l'OTA selon Huff et Hamilton (1979). 22
Figure 7. Voie de biosynthèse de l'OTA proposée chez A. carbonarius (Ferrara *et al*., 2016). 23
Figure 8. Schéma des différents clusters de la voie de biosynthèse de l'OTA chez *A. carbonarius* (Ferrara *et al*., 2016) 24
Figure 9. Principaux sites d'action des fongicides. 32
Figure 10. Cible des inhibiteurs respiratoire dans la chaîne mitochondriale. 33
Figure 11. Les mécanismes d'action des huiles essentielles contre les champignons 43
Figure 12. Structure chimique de l'azoxystrobine. 51
Figure 13. Structure chimique du pyriméthanil..... 52
Figure 14. Structure chimique de l'hexaconazole. 53
Figure 15. Schéma expérimental de la préparation de la solution sporale. 54
Figure 16. Schéma expérimental de la technique d'extraction de l'OTA. 55
Figure 17. Photo d'un chromatographe en phase liquide à haute performance Agilent Technologies série HP 1100 (LASSA-FSDM, USMBA). 56
Figure 18. Photo d'un appareil d'hydrodistillation de type Clevenger. 58
Figure 19. Photo d'un chromatographe en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) (LASSA-FSDM, USMBA). 59
Figure 20. Photo d'un chromatographe en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) (CURI, USMBA). 60
Figure 21. Photo de la culture d'une souche d'A. carbonarius sur milieu CYA liquide. 61
Figure 22. Vérification de la présence d'ADN génomique par électrophorèse sur gel d'agarose. 62
Figure 23. Système PCR en temps réel (q-RT-PCR) CFX96 (Bio-Rad). 63
Figure 24. Photos du PathoViewer (LAMP-UGent, Belgique)..... 65

Figure 25. Croissance phénotypique d'une souche d'*A. carbonarius* MUCL 49233 sur milieu CYA additionné de l'huile essentielle de *R. officinalis* (0 : témoin ; 25 ; 50 ; 100 et 200 µL/L) à différentes concentrations après 7 jours d'incubation à 25°C. 127
Figure 26. Croissance radiale (mm/jour) des souches d'*A. carbonarius* et *A. niger* sur milieu CYA en présence de l'huile essentielle du romarin (*Rosmarinus officinalis*) à différentes doses (0 : témoin ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 et 500 µL/L) et incubé à 25°C. 128
Figure 27. Taux de croissance moyen (mm/jour) calculé pour toutes les souches d'*A. carbonarius* et d'*A. niger* sur milieu CYA additionné de l'huile essentielle du romarin à différentes doses (0 : témoin ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 et 500 µL/L) et incubé à 25°C. 129
Figure 28. Croissance radiale d'une souche d'*A. carbonarius* (MUCL49345) sur milieu CYA additionné d'huile essentielle de *S. aromaticum* à différentes concentrations (0 : témoin ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 et 500 µL/L), après 7 jours d'incubation à 25°C. 130
Figure 29. Taux de croissance radiale (mm/jour) des souches d'*A. carbonarius* et *A. niger* sur milieu CYA en présence de l'huile essentielle du clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) à différentes doses (0 : témoin ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 et 500 µL/L) et incubé à 25°C 131
Figure 30. Taux de croissance moyen (mm/jour) calculé pour toutes souches *A. carbonarius* et *A. niger* sur milieu CYA additionné de différentes doses (0 : témoin ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 et 500 µL/L) de l'huile essentielle du clou de girofle à 25°C. 132
Figure 31. Croissance phénotypique d'une souche d'*A. niger* (MUCL49226) sur milieu CYA additionné de différentes concentrations d'huile essentielle de *Thymus satureioides* (0 : témoin ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 et 500 µL/L) après 7 jours d'incubation à 25°C. 134
Figure 32. Croissance radiale (mm/jour) des souches d'*A. carbonarius* et *A. niger* sur milieu CYA en présence de l'huile essentielle du thym (*Thymus satureioides*) à différentes doses (0 : témoin ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 et 500 µL/L) et incubé à 25°C. 135
Figure 33. Taux de croissance moyen (mm/jour) calculé pour toutes souches *A. carbonarius* et *A. niger* sur milieu CYA additionné de différentes doses (0 : témoin ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 et 500 µL/L) de l'huile essentielle du thym à 25°C. 136
Figure 34. Effet in vivo de l'huile essentielle de *S. aromaticum* sur la croissance des souches *A. carbonarius* MUCL 49345 (A) et *A. niger* MUCL 49226 (B) sur les baies de raisin, à différentes doses (CN : contrôle négatif ; C : contrôle ; 200 ; 500 ; 1000 et 2000 µL/L). 139
Figure 35. Effet *in vivo* de l'huile essentielle de *T. satureioides* sur la croissance des souches *A. carbonarius* MUCL 49345 (A) et *A. niger* MUCL 49226 (B) sur les baies de raisin, à différentes doses (CN : contrôle négatif ; C : contrôle ; 200 ; 500 ; 1000 et 2000 µ/L/). 140

Figure 36. Effet des HE du thym et du clou de girofle sur le pourcentage de contamination fongique (RGB%). 141
Figure 37. Effet des HE du thym et du clou de girofle sur l'indice d'anthocyane (AriIdx). 142
Figure 38. Effet de l'HE du thym et du clou de girofle sur l'expression des gènes (PKS, NRPS et HAL) responsables de la production de l'OTA chez A. niger. 143
Figure 39. Effet de l'HE du thym et du clou de girofle sur l'expression des gènes (PKS, NRPS et HAL) responsables de la production de l'OTA chez *A. carbonarius*. 144

Table des matières

Dédicaces i
Remerciements ii
Liste des publications v
Liste des communications vi
Résumé xi
Abstract xii
Liste des abréviations xiii
Liste des tableaux xvi
Liste des figures xvii
Introduction générale 1
CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 4
1. Généralités sur les moisissures 4
2. Le genre *Aspergillus* et mycotoxines 5
2.1. Classification et développement des espèces du genre *Aspergillus* 5
a. Analyse macroscopique 7
b. Analyse microscopique 7
c. Analyse moléculaire 9
2.2. Facteurs influençant la croissance 11
2.3. Mycotoxines produites par le genre *Aspergillus* 12
2.3.1. L'ochratoxine A 15
a. Historique 15
b. Structure chimique et propriétés physico-chimiques de l'OTA 17
c. Toxicité 18
2.3.2. Occurrence de l'OTA dans les aliments 19
2.3.3. Les voies de biosynthèse de l'OTA : 22
2.3.4. Les gènes impliqués dans la biosynthèse de l'OTA 23
2.3.5. Régulation de la biosynthèse de l'OTA 24
2.3.6. Réglementation 26
3. Moyens de lutte contre les mycotoxines et champignons producteurs 26
3.1. Les bonnes pratiques agricoles et de fabrication 27
3.2. Gestion du stockage 28
3.3. Méthodes physiques 28

3.4. Méthodes chimiques (les fongicides) 30
3.4.1. Classification des fongicides 31
3.4.1.1. Fongicides non systémiques (de contact) 31
a) Les substances polyvalentes ou multi-sites 32
b) Substances inhibitrices de la respiration mitochondriale 32
c) Inhibiteurs de la biosynthèse des lipides et stérols membranaires (IBS) 33
d) Inhibiteurs de la biosynthèse de méthionine 34
e) Inhibiteurs de la formation des microtubules et des divisions cellulaires 34
3.4.1.2. Fongicides systémiques 34
a) Fongicides inhibiteurs de la respiration mitochondriale 35
b) Fongicides inhibiteurs de la biosynthèse des lipides et stérols membranaires 35
c) Fongicides inhibiteurs de la synthèse d'ARN et d'ADN 36
d) Fongicides inhibiteurs de la biosynthèse de méthionine (IBM) 36
e) Fongicides inhibiteurs de la formation des microtubules 37
3.4.2. Effet des fongicides sur l'OTA et champignons producteurs 37
3.5. Méthodes de biocontrôle 39
3.5.1. Biocontrôle par des souches microbiennes 39
3.5.2. Les huiles essentielles 41
A. Mécanisme d'action des huiles essentielles contre les agents pathogènes fongiques 42
B. Activités antifongiques des huiles essentielles 46
CHAPITRE II. Matériel et méthodes 50
1. Le matériel fongique 50
2. Effet des fongicides sur la croissance fongique et la production d'OTA. 51
2.1. Les fongicides 51
a) Azoxystrobine 51
b) Pyriméthanil 52
c) Hexaconazole 52
2.2. Ajout de fongicides et inoculation des milieux de culture 53
2.3. Evaluation de la croissance fongique et de l'efficacité du fongicide 54
2.4. Extraction et analyse de l'OTA du milieu de culture 55
2.5. Effet de l'interaction fongicides-activité de l'eau sur la croissance fongique et la production d'OTA 56

3. Effet des huiles essentielle sur la croissance fongique et la production d'OTA. 57
3.1. Extraction des huiles essentielles 57
3.2. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles par GC-FID et GC-MS 58
a) Analyse GC-FID 58
b) Analyse GC-MS 60
3.3. Ajout des HE et inoculation du milieu CYA 61
3.4. Extraction d'ARN et PCR en temps réel (q-RT-PCR) 62
3.5. Etude in vivo de l'effet antifongique des huiles essentielles 64
4. Analyse statistique des résultats 65
CHAPITRE III : Effet combiné des fongicides et de l'activité de l'eau sur la croissance fongique et la production de l'ochratoxine A par des souches d'*Aspergillus carbonarius* et *A. niger* 66
I. Introduction 66
II. Article publié dans le journal « South Asian Journal of Experimental Biology » 67
III. Article à soumettre: Impact of fungicides and water activity on growth and ochratoxin A production by Aspergillus carbonarius and A. niger isolated from grapes 75
Chapitre IV : Effet *in vitro* et *in vivo* des huiles essentielles sur la croissance fongique, la production de l'ochratoxine A et le niveau d'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'OTA par des souches *d'Aspergillus carbonarius* et *A. niger* agrégats. 96
1. Introduction 96
2. Evaluation de l'effet antifongique des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et *Syzygium aromaticum* sur la croissance fongique et la production de l'OTA par des souches d'*A. tubingensis* et *A. luchuensis* 98
3. Effet *in vitro* et *in vivo* des huiles essentielles sur la croissance fongique, la production de l'OTA et l'expression des gènes responsables de la biosynthèse de l'OTA par des souches d'*Aspergillus carbonarius* et *A. niger* 112
3.1. Effet des huiles essentielles sur la phase de latence et la croissance radiale des souches *d'Aspergillus niger et A. carbonarius* 126
3.1.1. Effet de l'huile essentielle du romarin (*Rosmarinus officinalis*) sur la phase de latence et la croissance fongique 126
3.1.2. Effet de l'HE du clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) sur la phase de latence et la croissance fongique 129
3.1.3. Composition et Effet de l'huile essentielle du thym (*Thymus satureioides*) sur la phase de latence et la croissance fongique 132
a) Composition de l'huile essentielle 132

b) Effet de l'huile essentielle du thym sur la phase de latence et la croissance fongique 133
3.2. Analyse statistique 136
3. 3. Effet de l'huile essentielle du thym (*Thymus satureioides*) sur la production de l'OTA par des isolats *A. carbonarius* et *A. niger* 137
3.4. Effet *in vivo* de l'huile essentielle de *S. aromaticum* et *T. satureioides* sur les raisins 138
3.5. Analyses des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'OTA par *A. carbonarius* et *A. niger* 143
4. Discussion 146
5. Conclusion 151
Conclusion générale et perspectives 152
Références bibliographiques 155

Introduction générale

Les champignons microscopiques peuvent coloniser différentes cultures agricoles, entraînant ainsi des pertes économiques importantes aussi bien dans le champ qu'après la récolte et au cours du stockage. De plus, le développement de certaines espèces compte parmi les principales causes d'altération sanitaire des productions agricoles et agro-alimentaires, par la synthèse de métabolites secondaires toxiques appelés mycotoxines. Les espèces les plus rencontrés, sont celles appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* et *Fusarium*. L'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) a estimé que 25% de la production agricole mondiale annuelle est contaminée par des mycotoxines, ce qui entraîne des pertes annuelles de denrées alimentaires et d'aliments pour animaux d'environ 1 milliard de tonnes (Maestroni et Cannavan, 2011).

Ces toxines présentent un grand risque pour la santé humaine et animale en raison des effets néfastes provoqués par leur contact ou leur ingestion. Selon Pitt (2008), la contamination des aliments par les mycotoxines est le résultat de l'interaction entre le micro-organisme produisant la toxine, le substrat qui peut être plus ou moins sensible et l'environnement. Des facteurs physiques tels que l'activité de l'eau, la température, l'intégrité physique du grain ou du tissu végétal et des facteurs chimiques, comme la composition du substrat, le pH, les nutriments minéraux et la disponibilité en oxygène, influencent l'accumulation de ces mycotoxines. Ces composés hautement toxiques peuvent être présents tout au long de la chaîne alimentaire, des aliments de base aux aliments transformés, car ils sont généralement résistants à un large éventail de facteurs environnementaux ou de processus de traitements. Ils sont stables à des températures élevées et à des pH bas typiques du suc gastrique des animaux (Pfliegler *et al*., 2015). Certaines mycotoxines se distinguent par leur toxicité élevée telles que ; les aflatoxines, la citrinine, le déoxynivalénol, la patuline, la zéaralénone, les trichothécènes, les fumonisines et l'ochratoxine A qui fait l'objet de cette étude (CAST, 2003 ; Pitt, 2008 ; Wu *et al*., 2014).

L'ochratoxine A (OTA), est une mycotoxine synthétisée principalement par des espèces appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* (Petzinger et Zieglern, 2000), elle est parmi les toxines les plus toxiques et les plus étudiées. Elle existe dans une grande variété de produits tels que fruits secs, les noix, le maïs, l'avoine, le café soluble, le raisin et jus de raisin, le blé, l'orge, le pain, le riz, la bière, les grains de café et le vin (Otteneder et Majerus, 2001 ;

Czerwiecki *et al*., 2002 ; Hajjaji *et al.*, 2006 ; Zinedine *et al*., 2006 et 2007 ; Selouane *et al*., 2009a ; Galarreta *et al*., 2013). L'OTA provoque des effets néfastes, notamment tératogènes, embryotoxiques, génotoxiques, neurotoxiques, immunosuppresseurs, cancérigènes et néphrotoxiques pour l'Homme (O'Brien, 2005 ; Jo *et al.*, 2016). L'OTA est classé par le Centre International de Recherche sur le Cancer comme cancérogène possible (groupe 2B) pour l'homme (IARC, 1993). Vu la toxicité et la présence courante de l'OTA dans les denrées, plusieurs pays ont mené des évaluations des risques de l'OTA et ils ont établi les limites maximales tolérables dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux ainsi que dans les matières premières. Le Maroc s'est aligné sur la réglementation européenne (CE, 2006, 2007, 2010 et 2012) et a établi en 2016 des normes fixant les teneurs maximales tolérées dans différents produits alimentaires (Bulletin Officiel, 2016).

Pour réduire la contamination des denrées par les mycotoxines et contrôler la croissance des moisissures, des mesures préventives sont recommandées comme la mise en place des bonnes pratiques agricoles et l'utilisation de fongicides. Étant donné que l'utilisation fréquente de ces substances chimiques de synthèse est considérée comme le moyen le plus efficace et le plus rentable pour contrôler la contamination des champignons pathogènes et le développement des maladies (Garcia-Cela *et al*., 2011), leurs effets sur la production de mycotoxines doivent être pris en considération. En effet, certains fongicides peuvent stimuler ou inhiber la production de mycotoxines (Qjidaa, 2015 ; Terra *et al*., 2016 ; Laaziz *et al*., 2017 ; Zouhair, 2017). De plus, l'application de doses élevées de fongicides afin de contrôler la détérioration post-récolte des produits agricoles augmente le risque de métabolites toxiques contenues dans les produits alimentaires (Qjidaa, 2015) et peut aussi engendrer des phénomènes de résistance. De ce fait, L'utilisation raisonnée de fongicides pour maîtriser le développement de moisissures et réduire le risque sanitaire ainsi que la recherche d'alternatives aux substances chimiques s'avèrent nécessaire.

C'est dans ce cadre que s'inscrit notre projet de recherche qui vise d'une part, l'étude de l'effet des concentrations de certains fongicides, utilisés au Maroc, sur la croissance fongique et la production de l'OTA par des souches d'*A. niger* agrégats (*A. niger*, *A. fœtidus* et *A. tubingensis*) et *A. carbonarius* et d'autre part, la recherche alternatives pour lutter contre ces phytopathogènes, comme l'utilisation des huiles essentielles.

Ainsi les objectifs de ce projet de thèse consistent à étudier :

- L'effet de trois fongicides, appartenant à différentes familles chimiques (azoxystrobine, héxaconazole et pyriméthanile), et de l'activité de l'eau sur la croissance fongique et la production d'OTA par des souches *d'Aspergillus carbonarius* et *A. niger* ;
- L'effet *in vitro* de trois huiles essentielles (*Syzygium aromaticum*, *Rosmarinus officinalis* et *Thymus satureioides*) sur la croissance fongique et la production de l'OTA par des souches *d'Aspergillus carbonarius* et *A. niger* agrégats ;
- L'effet *in vivo* de deux huiles essentielles (*Syzygium aromaticum* et *Thymus satureioides*) sur la croissance fongique de deux souches *d'Aspergillus carbonarius* et *A. niger* ;
- L'effet de deux huiles essentielles (*Syzygium aromaticum* et *Thymus satureioides*) sur l'expression des gènes responsables de la production de l'OTA par deux souches *d'A. carbonarius* et *A. niger* ;

Le manuscrit est organisé en 4 chapitres, le premier est dédié à une synthèse bibliographique sur les moisissures, l'OTA et sa présence dans les denrées alimentaires ainsi que les moyens de contrôle des champignons producteurs de mycotoxines. Le deuxième chapitre décrit les techniques et matériel utilisés. Les résultats ont été rassemblés dans les chapitres III et IV. Le chapitre III abordera les résultats obtenus concernant l'effet des fongicides et de l'activité de l'eau sur la croissance fongique et la production d'OTA. L'évaluation *in vitro et in vivo* de l'activité antifongique des huiles essentielles et leur effet sur l'expression des gènes responsables de la biosynthèse de l'OTA seront présentés dans le chapitre IV. Les conclusions, les perspectives et les références bibliographiques terminent ce manuscrit.

Chapitre I

Revue bibliographique

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités sur les moisissures

Les moisissures sont des champignons microscopiques, pluricellulaires, composés de filaments ou hyphes dont l'ensemble constitue un réseau : le mycélium. C'est l'élément principal de l'appareil végétatif assurant la croissance et le développement des champignons (Peberdy, 1990). Le terme moisissure recouvre un ensemble d'organismes appartenant à plusieurs classes définies d'après leurs caractères morphologiques et leur mode de reproduction : Zygomycètes, Ascomycètes, Basidiomycètes et Hyphomycètes. La croissance n'a lieu qu'à l'extrémité de l'hyphe où la paroi n'est pas définitivement constituée, ce qui permet l'élongation et la ramification du mycélium. Les spores, produites en très grande quantité et issues de la reproduction asexuée assurent la dissémination spatiale de l'espèce**.** En effet, chez toutes les moisissures, à partir d'une spore tombée sur un milieu nutritif, dans des conditions favorables, se développe un mycélium dont la croissance est la même dans toutes les directions de l'espace.

Le développement des moisissures est dépendant de facteurs nutritifs et environnementaux. Elles sont hétérotrophes, ne se développent donc que sur les substrats organiques (Botton., *et al.*, 1990) et ne peuvent absorber leurs nutriments complexes (cellulose, amidon, collagène, …) qu'après leur hydrolyse par des hydrolases qu'elles excrètent dans le milieu. Les éléments nutritifs les plus importants sont le carbone et l'azote comme composés organiques, les ions minéraux comme le potassium, le phosphore, le magnésium, le fer ou le soufre.

Il existe donc différents modes de nutrition des champignons filamenteux, le premier mode de nutrition est le saprophytisme. Dans ce cas, les champignons dégradent la matière organique morte ou en décomposition afin de prélever les nutriments et les éléments minéraux essentiels. Ils jouent un rôle très important dans le recyclage des matières mortes comme les débris végétaux et animaux. Le deuxième mode de nutrition est la symbiose. Les champignons filamenteux obtiennent leurs nutriments grâce à un autre organisme en échange de certains bénéfices, tels une protection, de l'eau ou des sels minéraux. Les deux organismes sont alors qualifiés de symbiotes. Le troisième mode de nutrition est le commensalisme. Les champignons filamenteux dits commensaux tirent un bénéfice de leur hôte sans leur nuire et sans leur apporter un quelconque avantage. Les bénéfices observés peuvent être la récupération des débris nutritifs de l'hôte, le transport ou le refuge. Enfin, le quatrième mode de nutrition est le parasitisme. Dans

ce cas, les champignons filamenteux extraient leurs nutriments de la matière vivante. Ils tirent profit de leurs hôtes en vivant à leurs dépens entraînant parfois leur mort.

Les moisissures peuvent être des agents actifs de biodétérioration, de ce fait, elles sont considérées comme l'une des principales préoccupations de la conservation des aliments**.** Ainsi, leur croissance sur les aliments crus et/ou transformés peut entraîner une altération de la qualité organoleptique (changement de la texture, développement de saveurs et l'émission d'odeurs) et sanitaire par la production aussi de molécules hautement toxiques appelés mycotoxines. Par définition, les mycotoxines (du grec mykês signifiant moisissure) sont des métabolites secondaires toxiques synthétisés pendant la phase stationnaire, de faibles masses moléculaires dont l'ingestion provoque une intoxication chez le consommateur. Ce sont des produits contaminant les denrées alimentaires d'origine animale et végétale (Chapeland-Leclerc *et al.*, 2005 ; Dragacci et Grosso, 2005).

Les mycotoxines représentent un risque potentiel pour la santé humaine et animale. Le contact avec les mycotoxines peut être à l'origine de toxicité aiguë et chronique allant des effets délétères à la mort. Ces effets peuvent concerner le système nerveux central, l'appareil cardiovasculaire, l'appareil pulmonaire, ainsi que le système digestif et rénal (Pitt, 2000). Les mycotoxines peuvent avoir également des propriétés cancérigènes, mutagènes, tératogènes et immunosuppresseurs. Certaines ont aussi le pouvoir d'affaiblir les réactions immunitaires (Yiannikouris et Jouany, 2002).

La plupart des genres rencontrés dans les graines de plusieurs denrées alimentaires sont rassemblés en deux groupes dont le premier regroupe les champignons de champ, et comprend les genres *Alternaria, Cladosporium et Fusarium*. Le deuxième groupe concerne les champignons de stockage, représentés par les genres *Aspergillus et Penicillium* qui peuvent croitre à une humidité élevée comprise entre 70% et 90%.

2. Le genre *Aspergillus* et mycotoxines

2.1. Classification et développement des espèces du genre *Aspergillus*

Les espèces d'*Aspergillus* sont devenues parmi les moisissures les plus étudiées pour leurs rôles importants dans les écosystèmes et pour leur pouvoir pathogène. Elles produisent une quantité énorme de spores qui peuvent se répandre dans l'air et germer lors du contact avec un substrat dans des conditions favorables (Bennett, 2010). En tant que saprophytes, elles peuvent facilement être trouvées en grande quantité sur des matériaux décomposés tels que le

foin moisi, les composts organiques, les feuilles mortes, les déchets végétaux, dans d'autres substrats tels que les excréments, les tissus humains, dans le sol et dans l'air ou la poussière (Cvetnić et Pepeljnjak, 1997 ; Bennett, 2010). Elles sont également présentes dans divers produits alimentaires et peuvent altérer tous les types de produits alimentaires. Elles sont largement dispersées dans les céréales et les fruits. Un large éventail de céréales et de noix sont susceptibles d'être contaminés par *Aspergillus spp.*, y compris le riz, le blé, le maïs, l'orge, le sorgho, le soja et l'arachide (Petchkongkaew *et al*., 2008 ; Tóth *et al.*, 2012 ; Ruadrew *et al*., 2013 ; Kange *et al*., 2015). Certaines espèces xérophiles d'*Aspergillus* peuvent être trouvées dans les épices et les aliments séchés (Romero *et al*., 2005 ; Ruadrew *et al*., 2013). Ils peuvent même pousser dans des environnements hostiles comme les confitures (Williams, 1990) ou le poisson séché salé (Ahmed *et al*., 2005).

Les espèces d'*Aspergillus* peuvent se développer à une température élevée ou lorsque l'activité de l'eau est réduite, elles sont de parfaites moisissures de détérioration. *Aspergillus* fait partie des *Deuteromycetes* (champignons imparfaits, reproduction asexuée), ordre des *Hyphomycetes*, famille des *Moniliaceae* (Figure 1).

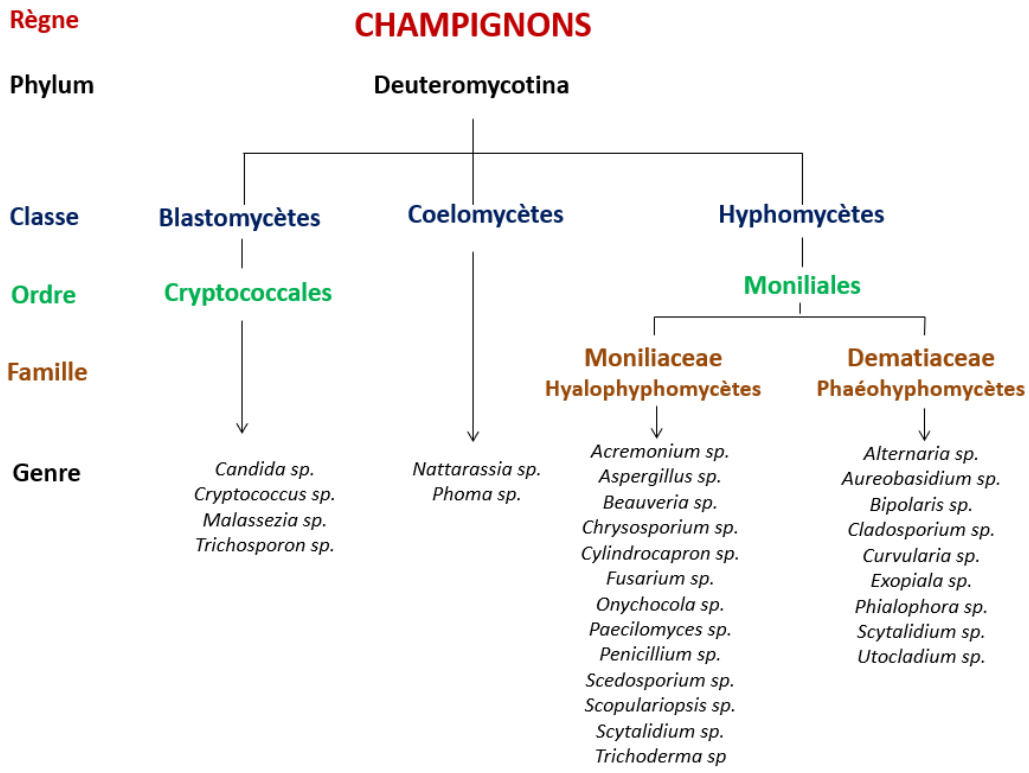


Figure 1. Schéma de classification des champignons.

En général, l'identification des champignons filamenteux repose essentiellement sur l'analyse des caractères morphologiques macroscopiques et microscopiques (Cahagnier et Richard-Molard, 1998 ; Chabasse *et al*., 2002). L'identification peut être complété par une analyse moléculaire (Geiser *et al*., 2007).

a. Analyse macroscopique

L'analyse macroscopique des colonies obtenues après culture des champignons filamenteux, repose sur l'observation de plusieurs caractères de l'appareil végétatif dont l'aspect, le relief, la taille et la couleur :

- aspect : cotonneux, velouté, duveteux, laineux, poudreux, glabre ou granuleux.
- relief : cérébriforme, plissé ou plat.
- taille : petite, envahissante ou étendue.
- couleur : blanche, crème ou colorée (verte, brune, orangée, violette, grises…).

La présence d'un pigment diffusant dans le milieu de culture ainsi que certains paramètres tels que la température de développement ou la vitesse de la pousse des colonies peuvent faciliter l'identification d'un champignon.

b. Analyse microscopique

L'identification microscopique des Aspergillus se base principalement sur l'observation de l'appareil végétatif, des organes de fructification et des spores. Le thalle végétatif est constitué de plusieurs filamenteux (hyphes) mycéliens, septés (diamètre étroit et régulier de 2 à 5 µm) ou siphonnés (filaments peu ou pas ramifiés, diamètre large et irrégulier de 5 à 15 µm) et la paroi est mélanisée (pigmentée) ou non (hyaline). Les Aspergillus sont caractérisés par la formation de conidiophores avec des grands stipes, la paroi épaisse et le bout de stipe gonflé appelé vésicules. Les vésicules sont souvent sphériques et rugueuses, parfois étirées ou gonflées, elles sont moins apparentes. Les vésicules portent les métules et les phialides (têtes conidiennes bisérieés) ou uniquement les phialides (têtes conidiennes unisériées), tous les deux sont produits simultanément. L'ensemble vésicule (avec ou sans métules), phialides et conidies forment la tête aspergillaire (Figure 2) qui permet d'identifier facilement le genre *Aspergillus*. La plupart des espèces d'*Aspergillus* peuvent être identifiées par deux autres traits de caractère : les stipes formés d'une cellule courte appelée « footcell » avec un hyphe fertile et les stipes souvent non cloisonnés (Figure 2). Ces dernières comprennent les vésicules à l'extrémité de conidiophores qui donnent naissance à des spores externes allongées (stérigmates ou phialides) qui à leur tour donnent des conidies.

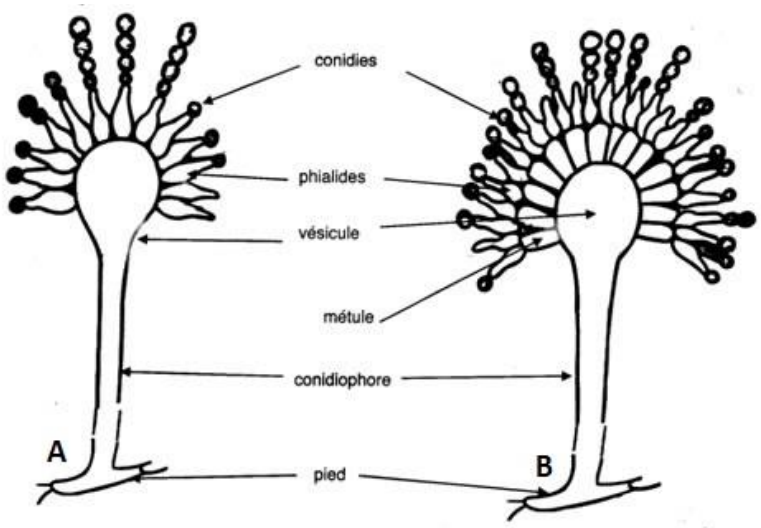


Figure 2. Caractères morphologiques d'*Aspergillus* unisérié (A) et bisérié (B). (D'après Samson *et al*., 1996)

L'identification de l'espèce tient compte du point de vue macroscopique de la vitesse de pousse et de l'aspect des colonies (surface, relief et couleur) et des critères microscopiques suivants :

- taille du conidiophore, présence ou non de pigmentation ou d'échinulations,
- aspect de la tête aspergillaire (en colonne ou ronde, radiée), de la vésicule (globuleuse, hémisphérique, sphérique),
- présence ou non de métules
- aspect des conidies (pigmentation, taille et surface),
- existence ou non de reproduction sexuée (présence ou non de cléistothèces, et de cellules en noisettes « Hülle cells »).

Le genre *Aspergillus* comprend quatre groupes ou sections qui sont : la section *Circumdati* représentée par *Aspergillus ochraceus*, la section *Fumigati* représentée par *Aspergillus fumigatus*, la section *Flavi* représentée par *Aspergillus flavus* et la section *Nigri* représentée par *Aspergillus niger* (Samson *et al.*, 2006).

La section *Nigri* est représentée par deux sous-groupes : le sous-groupe *A. niger* agrégats (*A. niger*, *A. tubingensis*, *A. foetidus*, *A. piperis*, *A. brasiliensis*, *A. ibericus*, *A. costaricensis*, *A. uvarum*, *A.vadensis* and *A. lacticoffeatus*) et les autres *Aspergillus* de la section *Nigri* (*A. japonicus*, *A.aculeatus*, *A.carbonarius*, *A. heteromorphus*, *A. ellipticus*, *A.sclerotioniger*, *A.*

homomorphus) (Samson *et al*., 2004). Selon Abarca *et al*. (2004), la section *Nigri* peut être subdivisée en quatre groupes :

- les unisériés : *A. japonicus* et *A. aculeatus* (les unisériés)
- les bisériés : *A. carbonarius*
- les bisériés : *A. niger agrégats*
- les formes non communes : *A. helicothrix*, *A. ellipticus* et *A. heteromorphus*

Les aspects morphologiques peuvent être influencées par les facteurs environnementaux, les méthodes de culture et la période d'incubation (Hayat *et al*., 2012). Ces caractéristiques sont insuffisantes pour l'identification de certaines espèces. Il est indispensable donc indispensable d'associer aux critères morphologiques, une identification moléculaire qui offre une plus grande variabilité de caractères génétiques utiles à la taxonomie des champignons, grâce au séquençage de l'ADN ribosomal et de gènes codant pour certaines protéines (Geiser *et al*., 2007 ; Samson *et al*., 2004 ; Varga *et al*., 2007). C'est le cas des espèces du groupe *A. niger* agrégats (*A. niger*, *A. tubingensis*, *A. foetidus*, …) qui ont été souvent identifiées en tant qu'espèce *A. niger*.

c. Analyse moléculaire

Les paramètres morphologiques, y compris le diamètre, la couleur et la texture de la colonie, la taille et la texture des conidies ainsi que la structure des hyphes sont des stratégies traditionnelles pour l'identification des espèces fongiques. Néanmoins, en raison de l'intense divergence des caractères morphologiques créés par un niveau élevé de variabilité génétique, la classification intra-spécifique des espèces fongiques peut être difficile (Kumeda et Asao, 2001). Les méthodes d'identification des champignons filamenteux par biologie moléculaire s'intègrent progressivement aux côtés des autres méthodes classiques, elles reposent sur l'analyse des sémantides portant l'information génétique (Verscheure *et al.*, 2002, Bougnoux *et al.*, 2003). En effet, elles sont basées sur l'étude d'un gène, d'un fragment d'ADN défini, de plusieurs gènes ou encore de l'ADN total. Les méthodes basées sur l'étude d'un gène ou de plusieurs gènes utilisent la technique PCR (Mullis *et al.*, 1986). Cette technique permet l'amplification de séquences spécifiques d'ADN via sa synthèse *in vitro* et l'obtention rapide et simple de microgrammes de l'ADN ciblé. La PCR est composée de trois étapes (Saiki *et al.*, 1985): la dénaturation d'ADN à température élevée (94°C à 96°C) pour convertir l'ADN double brins en simple brin. Ensuite, une hybridation des amorces aux extrémités de la séquence

recherchée, puis une élongation grâce à l'action d'une ADN polymérase, par l'addition de nucléotides libres pour créer à partir de chacune des amorces une copie de l'ADN initial.

La RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Arisan-Atac et Kubicek, 1995 ; Frisvad *et al.*, 1998) utilise la technique PCR pour amplifier des segments d'ADN génomique avec des amorces d'oligonucléotides non spécifiques. Cette technique présente le désavantage d'être peu reproductible et nécessite la standardisation de la méthode d'amplification ainsi que de la visualisation des fragments obtenus. Cependant, elle peut être utile lors de l'analyse rapide d'un nombre élevé d'isolats dont on suspecte qu'ils font partie du même taxon et dont aucune information sur la séquence d'un marqueur n'est connue (Verscheure *et al.*, 2002). Cette technique a été utilisée par plusieurs auteurs pour identifier les souches d'*A. carbonarius* isolées à partir des raisins, ainsi que pour distinguer les *A. carbonarius* des *A. niger agrégats* (Dachoupakan et al., 2009). Une autre technique de marquage moléculaire utilisée est La RFLPs (Restriction Fragment Lenght Polymorphisms) est basée sur le polymorphisme de taille des fragments de restriction et a été utilisée pour la discrimination d'espèce d'*Aspergillus* (de Valk *et al.*, 2008). Bau *et al*. (2006) ont également utilisé la PCR-RFLP pour distinguer les *Aspergillus niger agrégats*. L'inconvénient de la PCR-RFLP est qu'elle fournit une information phylogénétique moindre que lors d'un séquençage. Cependant, elle peut être très utile lors d'un criblage d'isolats suspectés appartenir à la même souche ou espèce.

Une autre approche utilisée concerne les empreintes génétiques de l'ADN génomique à l'aide d'analyse AFLP (Amplified fragment-length polymorphism), qui est une combinaison de la PCR et de la RFLP, elle a permis de discriminer différentes espèces d'*Aspergillus* (Perrone *et al.*, 2006). Plusieurs auteurs ont utilisé les techniques AFLP et FAFLP (Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism) pour caractériser les *Aspergillus* de la section *Nigri* et identifier les espèces productrices d'OTA (Chiotta et *al.*, 2010 ; Esteban *et al.*, 2008 ; Oliveri *et al.*, 2008 ; Perrone *et al.*, 2004).

La spectrométrie de masse MALDI-TOF/MS est une méthode d'analyse phénotypique, a émergée comme outil d'identification des champignons filamenteux en routine. Elle permet d'obtenir sous forme de spectre le profil protéique des champignons filamenteux (Marvin *et al.*, 2003). La moisissure est identifiée en comparant son spectre avec ceux d'une librairie de spectres de référence. Cette méthode (MALDI-TOF/MS) a été utilisée par Soares *et al.* (2012) pour identifier des souches d'*A. niger*. C'est une technique simple et rapide, néanmoins, le coût d'investissement est assez lourd (Lecelliers, 2013).

2.2. Facteurs influençant la croissance

Les moisissures mycotoxinogènes se développent mieux dans certaines conditions environnementales. Cependant, leur présence ne signifie pas la synthèse des mycotoxines, car la production de métabolites secondaires n'est pas essentielle à l'organisme les synthétisant. En effet, les conditions dans lesquelles ces moisissures produisent leurs mycotoxines sont très spécifiques et indépendantes de celles requises pour la croissance fongique. Inversement, l'absence visible de moisissure ne signifie pas qu'il n'y a pas de mycotoxines car elles peuvent rester dans le produit longtemps après la disparition du champignon producteur. Il n'est pas possible d'empêcher complètement la formation de mycotoxines, mais l'élimination des conditions nécessaires à la croissance fongique aide à prévenir la formation de la toxine.

Les facteurs environnementaux les plus importants sont la température et la disponibilité de l'eau dans un substrat qui peut être définie par l'humidité relative à l'équilibre (HRE) ou par l'activité de l'eau (a_w) selon la formule suivante :

$$HRE = \frac{P}{P0} \times 100 = aw \times 100$$

Avec P : Pression partielle de la vapeur d'eau du substrat à la température T
P0 : Pression partielle de la vapeur d'eau saturante à la température T

La majorité des moisissures se développent à une activité de l'eau comprise entre 0,85 et 0,99 et sont mésophiles, c'est-à-dire qu'elles se développent aux alentours de 20-25°C (Passamani *et al*., 2014). Néanmoins, les exigences thermiques diffèrent d'une moisissure à l'autre. Il existe des moisissures dites thermophiles, thermo-tolérantes ou psychrophiles. Les moisissures étant des microorganismes aérobies, l'oxygène influence aussi leur croissance. Bien que le pH optimum de croissance soit compris entre 5,5 et 7,5, les moisissures peuvent se développer à un pH compris entre 4,5 et 8 (Passamani *et al*., 2014). Le tableau 1 indique les températures et les activités en eau optimales et minimales de croissance des *Aspergillus* de la section *Nigri* sur différents milieux de culture et substrats.

Selouane *et al.* (2009b, 2014) ont rapporté que pour des souches d'*A. carbonarius*, *A. niger* agrégats (*A. tubingensis* et *A. niger*) isolées à partir de raisins marocains et cultivées sur milieu SNM avaient une croissance radiale optimale à 0,95a_w/25°C. A une activité de l'eau de 0,99, ils ont également montré que le milieu de culture influence aussi le taux de croissance moyen et que la croissance est plus rapide sur les milieux CYA et YES pour les trois espèces. Pour *A. carbonarius*, les températures optimales de croissances sont 30-37°C sur milieu CYA

et YES et 30°C sur le milieu SNM. Les températures optimales de croissance pour *A. niger* agrégats étaient de 30-37°C sur milieu CYA et 37°C sur les milieux YES et SNM. De même, les isolats d'*A. niger agrégats* isolées des grains de maïs provenant d'argentine, croient à 30°C/0.951a_w et à 30°C/0.995a_w (Astoreca *et al.*, 2009). Garcia-Cela et *al.* (2014), ont également étudié l'effet de la température et de l'activité de l'eau sur des souches d'*A. niger, A. tubingensis* et *A. carbonarius* isolées à partir de baies de raisin et cultivées sur milieu SNM. Leurs résultats ont montré que les souches d'*A carbonarius* du Nord-Est étaient mieux adaptées aux températures plus basses, alors que les souches du Sud pouvaient croitre dans des conditions plus sèches. *A. tubingensis* et *A. niger* ont montré des températures maximales de croissance plus élevées que celle d'*A. carbonarius* et les activités de l'eau minimales sont faibles (> 45°C et 0,83a_w pour *A. niger* et *A. tubingensis* contre 40-42°C et 0,87a_w pour *A. carbonarius*). Par ailleurs, Romero *et al*. (2007) ont aussi rapporté que des souches d'*A. carbonarius* isolées à partir de raisins secs d'Argentine avaient un optimum de croissance de 0,95a_w/30°C.

Tableau 1. Les conditions optimales et minimales (température et activité de l'eau) de croissance des *Aspergillus* de la section *Nigri* sur les différents milieux de culture.

	Milieu	**Gamme de T (°C)**	**T opt (°C)**	**a_w opt**	**a_w min**	**Références**
Aspergillus niger agrégats	Grains de mais	15-30	30	0.95	0.91	Astoreca *et* al. *(2007)*
	Grains d'arachide	15-30	30	0.99	0.91	Astoreca *et* al. *(2009)*
	Grains de café	15-30	25	0.99	0.93	Astoreca et al. *(2010)*
	Nutriment synthétique (SNM)	10-37	25	0.95	0.93	Selouane *et al*. (2009)
Aspergillus carbonarius	Jus de raisin synthétique	10-40	35	0.98	0.88	Mitchell et al. (*2004)*
	Raisins secs	15-30	25-30	0.99	0.91	Astoreca et al. (2007)
	CYA	15-37	30	0.95	085	Romero et al. (2008)
	Nutriment synthétique (SNM)	10-37	25	0.95	0.90	Selouane et *al.* (2009b)

T : Température ; opt : Optimale ; min : Minimale.

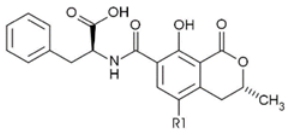
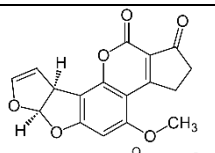
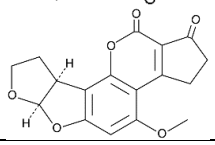
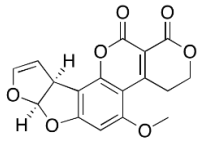
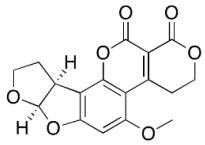
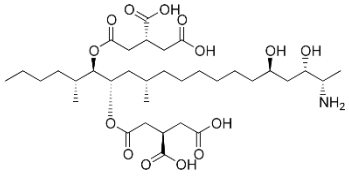
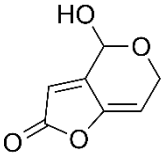
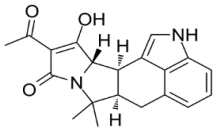
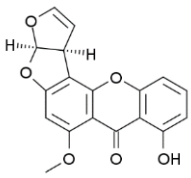
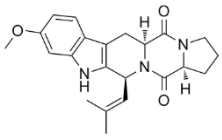
2.3. Mycotoxines produites par le genre *Aspergillus*

Plus de 40 espèces d'*Aspergillus* ont été identifiées comme espèces capables de produire des mycotoxines (Cole *et al.*, 2003). Les mycotoxines produites par Aspergillus ont un impact

sérieux sur la santé des humains et des animaux. Les principales mycotoxines produites par les espèces d*'Aspergillus* comprennent les aflatoxines, la stérigmatocystine, les ochratoxines, les fumonisines, la patuline, la gliotoxine et l'acide cyclopiazonique. Le genre *Aspergillus* comprend 344 espèces (Samson *et al*. 2014), et la chimiodiversité parmi ces espèces est très élevée. Selon Frisvad (2015), le nombre moyen d'exométabolites est de 5,77 par espèce dans ce genre, ce qui est supérieur à celui observé chez *Penicillium* (3,77) ou *Talaromyces* (3,58). La même mycotoxine peut être produite par des espèces non apparentées (par exemple, les fumonisines des espèces de *Fusarium*, *Aspergillus*, *Tolypocladium* et *Bipolaris*). Par ailleurs, Frisvad et Larsen (2015), ont suggéré que ce phénomène pourrait s'expliquer par un transfert latéral ou horizontal de clusters de gènes entre des espèces non apparentées. D'un autre côté, une espèce (ou même un seul isolat) peut produire une variété de métabolites secondaires. C'est le cas d'*A. niger*, par exemple, il produit à la fois des fumonisines et des ochratoxines (Frisvad *et al*. 2011). À cet égard, il convient de mentionner l'approche dite OSMAC (une souche plusieurs composés). Bode *et al*. (2002) ont précisé que l'utilisation de différents milieux ou la modification d'autres paramètres de croissance (température, activité de l'eau, etc.) permettaient d'identifier divers exométabolites chez *A. westerdijkiae* et d'autres champignons. Cette observation a été confirmée par van der Molen *et al*. (2013).

Le tableau 2 regroupe les principales mycotoxines produites par plusieurs espèces d'*Aspergillus*. Parmi ces mycotoxines, les aflatoxines et l'OTA sont les métabolites secondaires les plus redoutés dans les produits alimentaires. Nous nous limiterons dans cette étude à l'OTA.

Tableau 2. Principales mycotoxines produites par les espèces d'*Aspergillus.*

Mycotoxines	Structures	Espèces
Ochratoxin A		*A. ochraceus* *A. carbonarius,* *A. niger* *A. tubingensis* *A. alliaceus*
Aflatoxin B1 and B2	 AFB1  AFB2	*A. flavus,* *A. parasiticus,* *A. nomius*
Aflatoxin G1 and G2	 AFG1  AFG2	*A. parasiticus* *A. nomius*
Fumonisine B2		*A. niger*
Patuline		*A. clavatus*
Cyclopiazonic acid		*A. flavus,* *A. tamarii*
Sterigmatocystin		*A. versicolor,* *Emericella spp*
Fumitremorgens		*A. fumigatus*

2.3.1. L'ochratoxine A

a. Historique

L'ochratoxine A (OTA) a été découverte il y a environ une cinquantaine d'années par un groupe de chercheurs Sud-Africains lors d'une recherche systémique de mycotoxines, elle a été identifiée dans les céréales (Van der Merwe *et al.*, 1965 a et b). L'OTA se produit généralement dans les climats subtropicaux et tempérés (Rapport de la Commission européenne, 1999). C'est le métabolite le plus fréquent de certaines espèces toxinogènes appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* (Chu, 1974). Cette toxine a été détectée comme contaminant naturel dans les produits alimentaires (Dwivedi et Burns, 1986). Les niveaux de contamination des aliments peuvent être supérieurs à 100 µg/kg (Kuiper-Goodmann et Scott, 1989, Mobashar *et al.*, 2012).

L'ochratoxine A appartient à la famille des polycétoacides et plus précisément au groupe des ochratoxines. Ce groupe présente une structure générale qui peut, en fonction des groupements R, donner en plus de l'OTA différents analogues de structures (Figure 3 et Tableau 3).

Tableau 3. Différentes formes d'ochratoxines.

Désignation des ochratoxines en fonction des différents groupements R_1, R_2, R_3, R_4 et R_5 (Hohler, 1998).

Nom commun	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
Ochratoxines naturelles					
OTA	Phénylalanine (Phe)	Cl	H	H	H
OTB	Phe	H	H	H	H
OTC	Phe, éthyl ester	Cl	H	H	H
OTα	OH	Cl	H	H	H
OTβ	OH	H	H	H	H
4-R-Hydroxyochratixne A	Phe	Cl	H	OH	H
4-s-Hydroxyochratoxine A	Phe	Cl	OH	H	H
10-Hydroxyochratoxine A	Phe	Cl	H	H	OH
Ester méthylique Ochratoxine A	Ester méthylique, Phe	Cl	H	H	H
Ester méthylique Ochratoxine B	Ester méthylique, Phe	H	H	H	H
Ester éthylique, Phe Ochratoxine B	Ester éthylique, Phe	H	H	H	H
Analogue tyrosine de l'OTA	Tyrosine	Cl	H	H	H
Analogue sérine de l'OTA	Sérine	Cl	H	H	H
Analogue hydroxyproline de l'OTA	Hydroxyproline	Cl	H	H	H
Analogue lysine de l'OTA	Lysine	Cl	H	H	H
Ochratoxines synthétiques					
d-Ochratoxine A	D-phénylalanine	Cl	H	H	H
Amide éthylique d'OTA	Amide éthylique, Phe	Cl	H	H	H
O-méthyl Ochratoxine A	Phe, $OHCH_3$ en C-8	Cl	H	H	H
Lactone ouvert Ochratoxine A	Phénylalanine	Cl	H	H	-

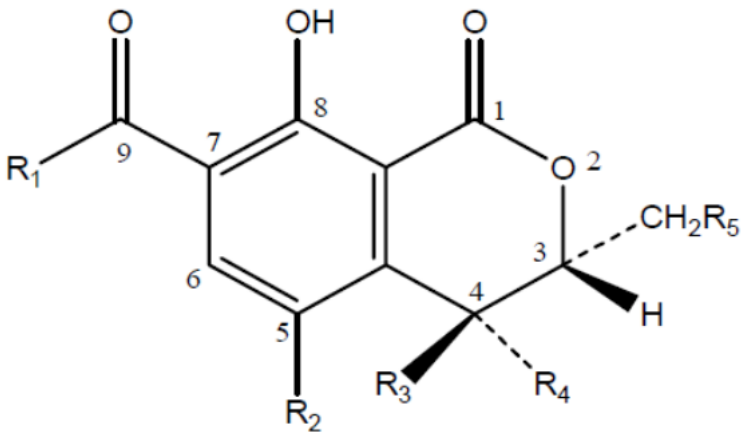


Figure 3. Formule générale des ochratoxines (d'après Marquardt et Frohlich., 1992).

L'ochratoxine B (OTB) est le dérivé non chloré de l'OTA et l'ochratoxine C (OTC) est son ester éthylique. Structurellement les trois ochratoxines diffèrent très légèrement les unes des autres, cependant ces différences ont des effets marqués sur leur potentiel toxique respectif. L'OTA étant à la fois la plus répandue et la plus toxique des ochratoxines.

b. Structure chimique et propriétés physico-chimiques de l'OTA

L'OTA est un dérivé cyclique de la pentacétide dihydroisocoumarine chlorée (7-carboxy-5-chloro-8- hydroxy-3,4-dihydro-3R-méthylisocoumarine (OTα)) lié au niveau de son groupement carboxyle en C7, à la L-β-phénylalanine par une liaison amide (Figure 4) (Abarca *et al*., 2001). La nomenclature officielle de cette molécule selon l'UCPA est : L-phenylalanine-N- [(5- chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-1H-2-benzopyran-7-yl) carbonyle] -(R) - isocoumarine (Ringot *et al.*, 2006).

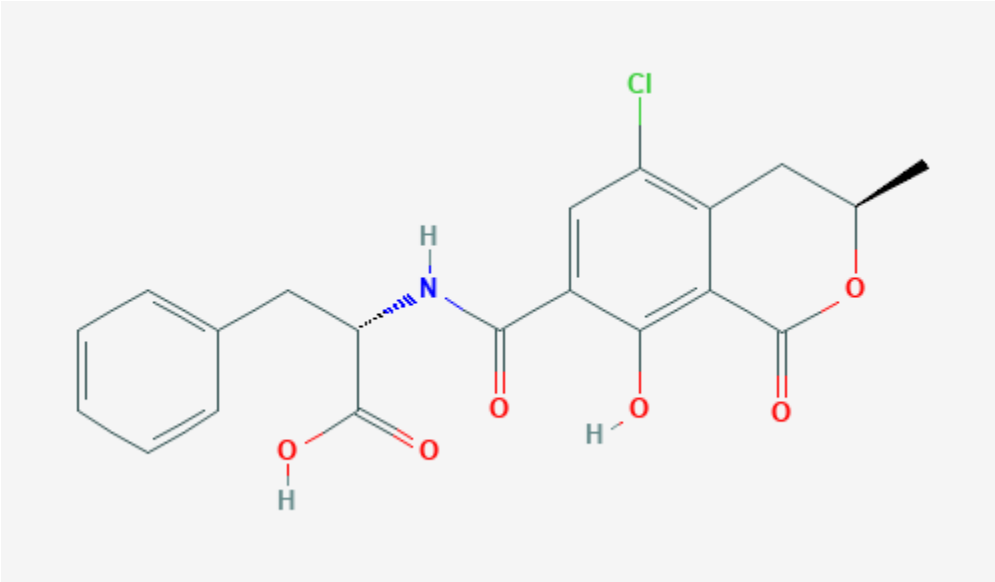


Figure 4. Structure chimique de l'ochratoxine A.

L'ochratoxine A est la toxine la plus étudiée au sein des ochratoxines (Malir *et al*., 2016). L'Union Internationale de la Chimie Pure et Appliquée a étudié les caractéristiques physico-chimiques de l'OTA et a permis de préciser différentes propriétés dont voici quelques-unes (Pohland *et al.*, 1982) :

- L'OTA est un solide blanc de masse molaire 403.8 g/mol, ayant un point de fusion de 90°C quand elle est cristallisée dans le benzène et de 169°C lorsqu'elle est cristallisée dans le xylène ;

- Elle possède un maximum d'absorption à 333 nm avec un coefficient d'extinction molaire de 5500/mol x cm dans le méthanol ;
- Elle présente un maximum d'émission de fluorescence à 467 nm dans l'éthanol à 96% et à 428 nm dans l'éthanol absolu.
- L'OTA présente deux groupements qui peuvent exister ou non sous forme ionisable selon les conditions physiologiques et qui sont : le groupement carboxyle de la phénylalanine ayant un pKa de 4.4 (Valenta, 1998) et le groupement hydroxyle sur le C8 ayant un pKa entre 7.05 et 7.1 (Marquardt et Frohlich, 1992).
- La molécule présente un caractère "acide faible" (Petzinger et Ziegler, 2000) et peut entrer en réaction par ses groupements phénolique et carboxylique. Par son groupement phénol, l'OTA pourrait s'adsorber sur les surfaces chargées négativement à travers des liaisons hydrogènes et ou à travers des complexes de transfert de charge (Hamaker et Thompson, 1972). Elle peut aussi s'adsorber sur des composés hydrophobes en résultat de l'intéraction avec ses deux orbitales électroniques (π) (Furuya *et al*., 1997).
- L'OTA est instable à la lumière et à l'air, elle disparaît ou se dégrade après une brève exposition à la lumière essentiellement en présence d'humidité. Dans une solution d'éthanol, elle peut rester stable pendant une année dans des conditions réfrigérées et à l'obscurité.

Quand elle est chauffée jusqu'à décomposition, la molécule émet des fumés toxiques de chlorine et d'oxydes d'azote (IARC, 1976). Comparée à la patuline ou à l'acide pénicillique, l'OTA paraît plus stable dans les aliments, bien qu'elle le soit probablement moins par rapport à l'aflatoxine (Weiden Börner, 2001).

Une fois formée dans l'aliment, cette molécule peut résister à des températures élevées à différentes étapes du procédé alimentaire (cuisson, torréfaction, fermentation) (Malir *et al*., 2016). Toutefois, des températures aussi importantes que 250°C ne l'ont pas éliminé dans des conditions normales de cuisson ou de fritures (Malir *et al*., 2016).

c. Toxicité

L'OTA est une mycotoxine toxique pour l'homme et les animaux, elle a été détectée dans de nombreux produits agricoles. Plusieurs néphropathies touchant les animaux et les humains ont été attribuées à l'OTA. C'est l'agent étiologique de la néphropathie porcine danoise et des troubles rénaux chez d'autres animaux. L'ochratoxine A a été associée classiquement, bien que d'une manière peu concluante, à plusieurs problèmes sanitaires humains tels que la néphropathie endémique des Balkans chez l'homme, et aussi à des désordres rénaux en Egypte et Tunisie (Maaroufi *et al*., 1996 ; Waffa *et al*., 1998), bien que d'autres composés puissent être impliqués. L'OTA présente des propriétés immunosuppressives, tératogènes, hépatotoxiques, cancérogènes et probablement génotoxiques (Malir *et al*., 2016). Elle peut être impliquée dans

la néphropathie interstitielle chronique, les tumeurs urothéliales et le cancer du testicule. Le Centre international de recherche sur le cancer (IARC) classe l'OTA comme cancérogène possible pour l'homme (Varga *et al.*, 2015 ; IARC, 1993). Sa toxicité reste cependant très variable et dépend du sexe, de l'espèce et du type cellulaire (O'Brien *et al.*, 2000). En plus, l'OTA a induit l'augmentation des enzymes NADPH et P450, qui active la voie de signalisation des caspases et induit l'apoptose. L'augmentation des espèces réactives à l'oxygène (Reactive oxygen species « ROS ») provoque un stress oxydatif des mitochondries et du réticulum endoplasmique, induisant une libération de calcium et inhibant le cycle cellulaire, l'épissage d'ARNm, la réplication de l'ADN, le métabolisme des lipides et des nucléotides. Tous ces facteurs pourraient conduire à l'apoptose cellulaire (Figure 5).

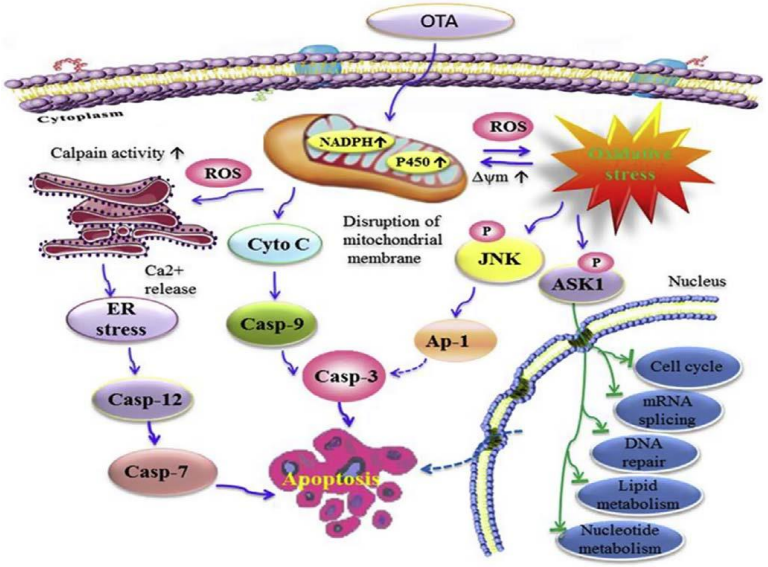


Figure 5. Apoptose induite par l'OTA et signalisation cellulaire (Tao *et al.*, 2018)

2.3.2. Occurrence de l'OTA dans les aliments

En 1969, Shotwell *et al.* avec des collègues du département américain de l'Agriculture (USDA) ont publié la toute première information sur la quantité d'OTA dans un échantillon de maïs à des niveaux de 110 à 150 ng/g. Au Canada, Scott *et al.* (1970) ont publié des données sur l'OTA dans les céréales moisies, les haricots et les arachides. Les concentrations d'OTA dans le blé, l'avoine, l'orge et le seigle (échantillons positifs à 62,0%) variaient de 30 à 27 000 ng/g (Scott *et al.*, 1970, 1972) La présence d'OTA dans le rein de porc a été mentionnée pour la première fois par Hald et Krogh en 1972 et par Hunt *et al.* en 1979. Depuis lors, plus de 90 types de denrées alimentaires d'origine végétale et animale, y compris le lait, se sont révélées contribuer à l'exposition alimentaire à l'OTA (Ostry *et al.*, 2013).

L'ochratoxine A (OTA) a été détectée dans plusieurs produits alimentaires tels que le blé, le maïs, l'orge, l'avoine, les épices, le riz, les fruits, les céréales pour le petit déjeuner, le pain, le café, le chocolat et le vin (Zinedine *et al.*, 2006 ; Vidal *et al.*, 2013 ; Lai *et al.*, 2015). La contamination par ces toxines entraîne une perte de la qualité nutritive et sanitaire des aliments. L'OTA peut contaminer un large éventail de fruits et de fruits secs, à savoir les raisins, les raisins secs, les dattes, les prunes séchées et les figues sèches. Dans ces types de produits, l'OTA était produite par des espèces d'aspergilli noirs (section *Nigri*), en particulier *A. carbonarius*, et la contamination se produisait au champ (Iamanaka *et al.*, 2005 ; Lucchetta *et al.*, 2010). En zone tropicale, l'OTA est principalement produite dans les grains de café par *A. ochraceus* et *A. westerdijkiae* (section *Circumdati*). L'OTA avait été trouvé dans du café vert, du café torréfié et du café instantané. La contamination par l'OTA dans le café soluble était variable (Reddy *et al*., 2010). De même, le cacao brut et les sous-produits du cacao, tels que le beurre de cacao, le cacao en poudre, les gâteaux et le chocolat, peuvent être aussi contaminés par l'OTA (Copetti *et al.*, 2013).

Au Maroc, Tantaoui-Elaraki *et al*. (1994) avaient signalé la contamination de trois des 75 échantillons d'orge analysés (niveau maximum 2,83 µg/kg), tandis que l'OTA n'était détecté dans aucun des 107 échantillons de blé, ni dans les 43 échantillons de maïs étudiés. Zinedine *et al*. (2006) ont analysé l'OTA dans des échantillons de blé (n=20), d'orge (n=20) et de maïs (n=20). Le nombre d'échantillons contaminés était respectivement de 8, 11 et 8, et les niveaux maximaux de 1.73, 0.80 et 7.22 µg/kg. De plus, Hajjaji *et al*. (2006) ont montré que 2 échantillons de blé sur les 17 analysés étaient contaminés par l'OTA avec une concentration moyenne de 29,4 µg/kg. Les niveaux les plus élevés d'OTA dans les céréales au Maroc ont été signalés dans le riz avec 47 µg/kg dans une étude où 26 échantillons se sont révélés contaminés sur les 100 analysés (Juan *et al*., 2008).

En Algérie, Riba *et al*. (2008) ont détecté l'OTA dans 40% des échantillons de blé algérien analysés, avec des quantités allant de 0,21 à 3,91 µg/kg. Ils ont également ont analysé cette mycotoxine dans les grains de blé des cultures de 2012 et 2013 (Riba *et al*., 2016). En effet, l'OTA a été détectée dans 27 échantillons sur 39 (69,23%) à des teneurs allant de 0,21 à 27,31 µg / kg avec une moyenne de 7,09 µg/kg. Parmi les 42 échantillons de produits dérivés du blé analysés, l'OTA a été détecté dans 39 (92,85%) à des niveaux variant de 0,25 à 34,75 µg/kg (Riba *et al*., 2016). Cette étude a montré que les grains de blé et les produits dérivés étaient fortement contaminés et que 50% des échantillons positifs dépassaient les seuils de l'UE pour l'OTA (3 µg/kg pour les céréales brutes et 5 µg/kg pour les produits céréaliers).

L'incidence de l'OTA était de 38% dans le blé, 40% dans l'orge, 38% dans le sorgho et 28% dans le riz, avec des niveaux moyens respectivement de 250, 940, 150 et 950 µg/kg (Zaied *et al*., 2009). Cependant, Ghali *et al*. (2009) ont signalé que le niveau d'OTA ne dépassait pas 33,8 µg/kg dans les échantillons de céréales. Dans une étude ultérieure, Oueslati *et al*. (2014) ont montré que l'OTA était l'une des mycotoxines les plus fréquemment présentes (98%) dans le sorgho avec une valeur de contamination moyenne de 1,93 µg/kg.

Dans le cas des fruits secs et les noix, Zinedine *et al*. (2007) ont montré que l'incidence de l'OTA dans les raisins secs, les figues sèches, les noix et les arachides était respectivement de 30%, 65%, 35% et 25%, tandis que les échantillons de pistaches étaient exempts d'OTA. Les moyennes d'OTA dans des échantillons positifs d'arachide, de figues sèches, de raisins secs et de noix sont respectivement de 0,68, 0,33, 0,96 et 0,11 µg/kg. De plus, Ghali *et al*. (2009) ont signalé une teneur maximale en OTA de 29,9 µg/kg dans 6 échantillons sur 20 d'arachides et de pistaches. Une étude menée sur les raisins noirs frais provenant du Maroc a montré que l'OTA a été détectée dans 13 échantillons sur les 22 analysés. Les concentrations dans les échantillons positifs variaient de 0,08 à 4,00 µg/kg. (Selouane *et al*., 2009a).

La présence de l'OTA a été aussi étudiée dans l'olive et l'huile d'olive par Tantaoui-Elaraki et Le Tutour (1985). Sur 103 échantillons d'olive analysés, 5 étaient contaminés par l'OTA (40 à 80 µg/kg) tandis que sur 60 échantillons d'huile d'olive, 3 présentaient une contamination par l'OTA (40 µg/kg). Il est important de signaler que les olives ne sont pas un milieu favorable à la croissance fongique et à la toxigénèse, d'une part, et que les mycotoxines présentes ont tendance à rester principalement dans le marc lorsque l'huile est extraite, d'autre part (Tantaoui-Elaraki *et al*., 1983b). El Adlouni *et al*. (2006) ont également analysé l'OTA dans 10 échantillons d'olives noires marocaines et leurs résultats ont montré que tous les échantillons étaient contaminés par l'OTA avec des valeurs allant de 0,2 à 1,2 µg/kg.

Les humains peuvent être exposés à l'OTA non seulement par la consommation d'aliments contaminés, mais également par l'inhalation d'OTA en suspension dans l'air. L'OTA a été détecté dans le sang de consommateurs et de travailleurs dans des unités de transformation de café, de fèves de cacao et d'épices (Iavicoli *et al.*, 2002 ; Sangare-Tigori *et al.*, 2006). Outre les produits végétaux, l'OTA peut contaminer la viande. De nombreuses études ont montré que l'OTA était présente dans les jambons (Wang *et al.*, 2006 ; Rodríguez *et al.*, 2012a ; Rodríguez *et al.*, 2012b).

2.3.3. Les voies de biosynthèse de l'OTA :

Malgré les nombreuses études sur la contamination des denrées par l'OTA et ses propriétés toxiques, il est surprenant de savoir que des enzymes ou gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'OTA sont mal connus ; contrairement aux voies de biosynthèse d'autres mycotoxines importantes telles que l'aflatoxine B1 qui ont été complètement élucidées (Yu *et al.*, 2004). Plusieurs hypothèses ont été avancées depuis plusieurs années sur cette voie de biosynthèse. Huff et Hamilton (1979), ont proposé un premier schéma hypothétique de la voie de biosynthèse au niveau biochimique (Figure 6). Ces chercheurs ont suggéré que la synthèse de l'OTA commence par la formation de mélléine à partir d'acétate et de malonates, sous l'action de Polykétide Synthase (PKS) ; puis sous l'action d'une oxydase, la mélléine est ensuite transformé en 7-methylmelleine et puis en OTβ. Cette dernière se convertie en OTα par l'intermédiaire d'une halogénase ou chloroperoxydase. L'obtention de l'OTC résulte de la liaison entre l'OTα et le phénylalanine-ester. Par la suite grâce à une réaction de désestérification, l'OTC est modifié et transformé en OTA.

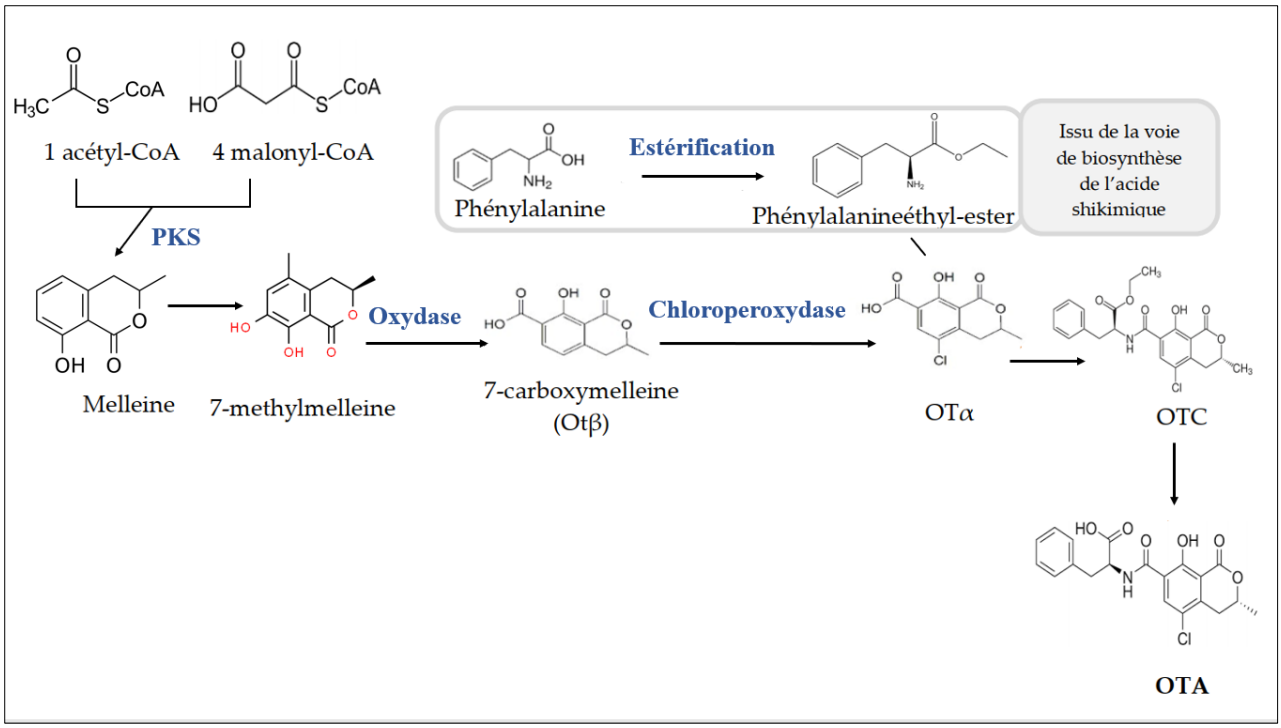


Figure 6. Schéma de la voie hypothétique de la biosynthèse de l'OTA selon Huff et Hamilton (1979).

Des années plus tard, une autre hypothèse a été suggérée et des chercheurs ayant postulé que la melleine n'a aucun rôle dans la biosynthèse de cette mycotoxine (Harris et Mantle, 2001,

Bacha *et al.*, 2009, Bacha *et al.*, 2012). Néanmoins, ces hypothèses ont été écartées par Gallo *et al.* (2012) qui ont proposé un nouveau modèle présentant la voie de biosynthèse de l'OTA chez *A. carbonarius*. En effet, ils ont proposé que l'ochratoxine β et la L-phénylalanine forment l'ochratoxine B (OTB) sous l'action de peptide synthétase non-ribosomal (NRPS) et que l'OTB soit transformé en OTA par chloration chez *A. carbonarius*. Wang *et al.* (2015) ont caractérisé deux polycétide synthases (PKS) impliquées dans la biosynthèse de l'OTA chez *A. ochraceus*. Farber et Geisen (2004) ont démontré le rôle potentiel d'une éventuelle halogénase par l'analyse de gènes de biosynthèse d'OTA exprimés de manière différentielle chez *Penicillium nordicum*, et finalement Ferrara *et al.* (2016) ont confirmé que l'enzyme halogénase/chloperoxydase est impliquée dans la biosynthèse de l'OTA chez *A. carbonarius* (Figure 7).

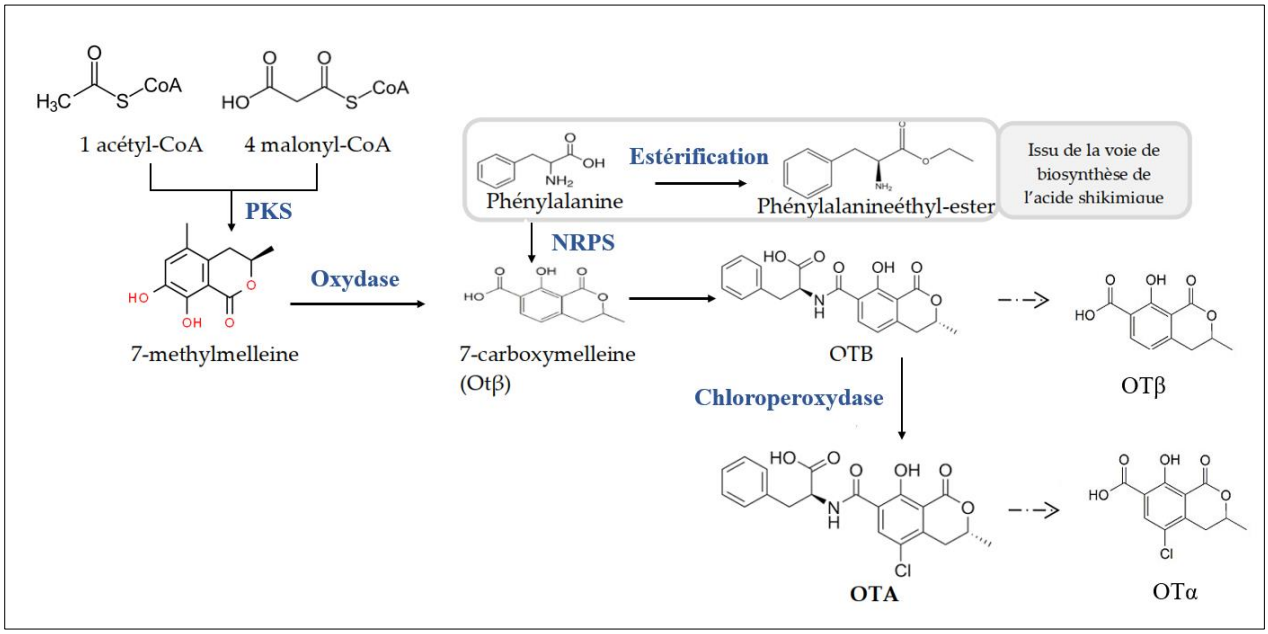


Figure 7. Voie de biosynthèse de l'OTA proposée chez *A. carbonarius* (Ferrara *et al.*, 2016).

2.3.4. Les gènes impliqués dans la biosynthèse de l'OTA

Le groupe de gènes impliqués dans la biosynthèse de l'OTA est constitué de quatre gènes structurels codant pour une PKS, une NRPS, une halogénase et une P450 (Figure 8), ainsi que pour un facteur de transcription bZIP, supposé être le régulateur spécifique de l'expression des gènes structurels à la fois des espèces *d'Aspergillus* et de *Penicillium* (Ferrara *et al.* 2016 ; Gil-Serna *et al.* 2018). Jusqu'à présent, cette même explication a été rapportée chez *A. westerdijkiae, A. steynii, A. niger, A. welwitschiae, A. carbonarius* et *P. nordicum* (Susca *et al.* 2016 ; Gil-Serna *et al.* 2018). Les motifs de liaison bindi-palindromiques ATGACGTGTA ou

TACACGTCAT ont été découverts en amont de tous les gènes du cluster, même deux fois dans le cas de l'halogénase, qui est la plus exprimée dans des conditions permissives pour la production d'OTA. Ce fait suggère l'implication du facteur de transcription bZIP dans le cluster des gènes impliqués dans la régulation de la synthèse de l'OTA (Gil-Serna *et al.* 2018). Des gènes supplémentaires codant pour la PKS en dehors du noyau central ont été signalés chez certaines espèces telles que *A. westerdijkiae, A. carbonarius, P. verrucosum* et *P. nordicum*. Leur implication dans la synthèse de l'OTA a été confirmée par la perturbation génique, qui supprime la synthèse de toxine, et pourrait compléter l'expression du gène codant pour la PKS dans le cluster dans des conditions spécifiques (Gallo *et al.* 2017).

s

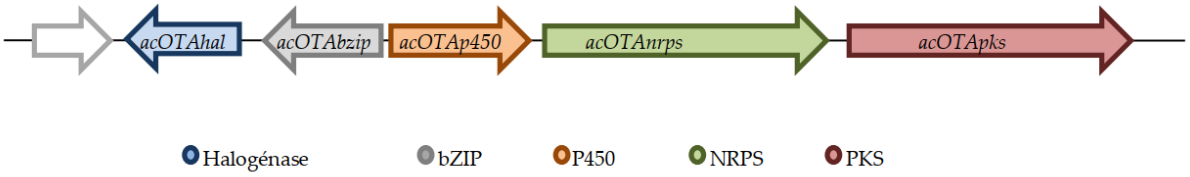


Figure 8. Schéma des différents clusters de la voie de biosynthèse de l'OTA chez *A. carbonarius* (Ferrara *et al.*, 2016)

2.3.5. Régulation de la biosynthèse de l'OTA

La plupart des aspects régulateurs sous-jacents à la production d'OTA restent flous, raison pour laquelle les études sur la régulation de la biosynthèse de l'OTA se sont intensifiées au cours des dernières années. Certaines se sont probablement basées sur des modèles de fonctionnement déjà identifiés pour la production d'autres mycotoxines. De nombreuses études ont montré que la production d'OTA est sensible aux facteurs environnementaux généraux, tels que la lumière et le complexe velvet, le stress oxydatif et le stress osmotique (Gil-Serna *et al.*, 2019). L'effet de la lumière à différentes longueurs d'onde sur la production d'OTA a été rapporté par plusieurs auteurs. L'exposition fongique à la lumière blanche semble réduire systématiquement la production d'OTA chez les principaux producteurs, notamment *P. nordicum, P. verrucosum, A. westerdijkiae, A. carbonarius et A. niger*, bien que certaines autres longueurs d'onde entraînent une augmentation de la production d'OTA chez *A. steynii* (jaune et vert) et *A. carbonarius* (lumière rouge) (Schmidt-Heydt *et al.*, 2011 ; Cheong *et al.*, 2016).

L'implication du complexe velvet dans l'effet de la lumière a été rapportée dans plusieurs cas, notamment la production d'aflatoxines par *A. parasiticus* et *A. flavus* (Calvo *et al.* 2004 ;

Duran *et al.*, 2007) et la production d'OTA par *A. carbonarius* (Crespo- Sempere *et al.* 2013). Le facteur de transcription veA est une protéine transportée dans le noyau où il interagit avec laeA, un régulateur principal du métabolisme secondaire chez *Aspergillus*, afin de contrôler la production de métabolites secondaires. On sait que le transport du facteur de transcription veA vers le noyau est inhibé par la lumière. Par conséquent, dans des conditions de luminosité, veA est principalement situé dans le cytoplasme cellulaire (Bayram *et al.* 2008). La suppression de laeA et de la veA chez *A. carbonarius* a entraîné une forte réduction de la production de conidies et une diminution importante de la production d'OTA, corrélée à une régulation négative du gène AcOTAnrps (Crespo- Sempere *et al.*, 2013). Ces résultats ont confirmé le rôle des deux protéines dans la régulation de la conidiation et de la biosynthèse de l'OTA en réponse à la lumière susceptible de toucher d'autres champignons. Récemment, il a été signalé que laeA avait également un effet régulateur sur la production d'acide citrique et d'enzymes cellulolytiques chez *A. carbonarius* (Linde *et al.*, 2016). L'étude d'El Khoury *et al.* (2016), a montré que les huiles essentielles et les extraits végétaux induisent une réduction de la production d'OTA par une souche d'*A. carbonarius*. Ainsi, les huiles essentielles de fenouil, de camomille et de romarin ont pu réguler négativement les gènes laeA et veA et par conséquent, l'expression des gènes de biosynthèse de l'OTA a été réduite.

Concernant le stress oxydatif, la réponse fongique est basée sur la production de molécules antioxydantes et l'activation d'enzymes pour lutter contre les oxydants. De plus, la présence intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène peut également déclencher d'autres réponses métaboliques, notamment la synthèse de mycotoxines (Reverberi *et al.* 2010). La présence d'agents stressants oxydants tels que l'hydroperoxyde de t-butyle ou le tétrachlorure de carbone induisait la production d'OTA chez *A. ochraceus* (Reverberi *et al.*, 2012).

Le stress osmotique est également lié à des modifications du métabolisme secondaire des champignons, y compris la biosynthèse des mycotoxines, et la participation de la voie du glycérol à haute osmolarité (HOG) a été rapportée (Duran *et al.*, 2010). Un stress osmotique a également été signalé en tant que modulateur de biosynthèse d'OTA chez *P. nordicum*. Ce champignon est adapté aux habitats fortement concentrés en sel et aux fortes productions d'OTA induites par NaCl (Stoll *et al.* 2013). Les auteurs ont indiqué que la production d'OTA induite par NaCl chez *P. nordicum* était due à un changement du statut de phosphorylation de la kinase HOG-MAP, qui active des facteurs de transcription qui pourraient par conséquent affecter les gènes de biosynthèse de l'OTA.

2.3.6. Réglementation

Des réglementations relatives aux mycotoxines ont été mises en place dans de nombreux pays pour protéger le consommateur des effets nocifs de ces composés. Différents facteurs jouent un rôle dans le processus de décision pour fixer des teneurs limites de mycotoxines dans les aliments. Ceux-ci comprennent des facteurs scientifiques, tels que la disponibilité de données toxicologiques et de données sur l'occurrence, des connaissances détaillées sur les possibilités d'échantillonnage et d'analyse et des problèmes socio-économiques. Récemment, le Maroc a établi des réglementations relatives aux mycotoxines, il a fixé les limites maximales des mycotoxines dans une grande variété de produits alimentaires autorisées (Bulletin Officiel, 2016). En raison de ses propriétés toxiques, l'OTA est soumis à une réglementation légale aux niveaux national et international. En ce qui concerne les limites actuelles de l'OTA, celles de l'UE sont généralement considérées comme les plus complètes et les plus détaillées (FAO. 2003). Au Maroc la limite maximale de l'OTA, est strictement identique à la réglementation de l'UE (Tableau 4).

Tableau 4. Limites marocaines pour l'ochratoxine A dans différents produits alimentaires par rapport à la réglementation Européenne.

Produits alimentaires	Limites Marocaine en (µg/kg)	Limites Européenne en (µg/kg)
Céréales non transformées	5	5
Produits dérivés de céréales non transformées	3	3
Fruits de vigne séchés (groseilles, raisins secs et raisins secs)	-	10
Grains de café torréfiés et café torréfié moulu	5	5
Café soluble	10	10
Vin	-	2
Aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales (nourrissons)	0,5	0,5
Epices, y compris épices séchées	15	15
Aliments transformés à base de céréales et aliments pour bébés, nourrissons et jeunes enfants	0,5	0,5

3. Moyens de lutte contre les mycotoxines et champignons producteurs

En raison des effets toxiques des mycotoxines, de nombreuses stratégies ont été développées pour contrôler les champignons producteurs de ces métabolites toxiques afin de

protéger les consommateurs de ses risques délétères sur leur santé. Ceux-ci comprennent les efforts déployés avant la récolte pour contrôler la production de mycotoxines et la détoxification après la récolte de produits contaminés par des mycotoxines et aussi la surveillance continue de ces toxines dans les cultures agricoles, les aliments pour animaux et l'alimentation humaine. Les stratégies de prévention avant la récolte, telles que les bonnes pratiques agricoles et de fabrication, sont le meilleur moyen de prévenir la synthèse de mycotoxines dans les produits agricoles et agro-alimentaires. Cependant, une fois que les mycotoxines sont présentes, cette approche risque de ne pas les éliminer (Karlovsky *et al.*, 2016). Par conséquent, d'autres procédures de détoxication post-récolte doivent être envisagées (Jarda *et al.*, 2011 ; Temba *et al.*, 2016 ; Zhu *et al.*, 2016). Pour les stratégies de décontamination, des méthodes innovantes physiques, chimiques, biologiques et autres ont été proposées.

3.1. Les bonnes pratiques agricoles et de fabrication

Les bonnes pratiques agricoles et de fabrication constituent les solutions les plus efficaces pour prévenir la croissance fongique et la production de mycotoxines, en effet, l'adoption de bonnes pratiques peut défavoriser la dispersion des spores fongiques qui existent dans le sol. Ces bonnes pratiques se basent essentiellement sur la préparation et la fertilisation du sol avant la semée, le désherbage et la rotation des cultures (FAO-OMS, 2013, Magan *et al.*, 2004).

Les systèmes d'analyse des risques et de maîtrise des points critiques (HACCP) jouent également un rôle important dans la prévention et la gestion des mycotoxines, ces systèmes comportent désormais des stratégies de prévention, de contrôle et de bonnes pratiques d'hygiène et de fabrication à toutes les étapes de la fabrication, de la surveillance du stockage, de la ségrégation et des procédures de nettoyage (FAO, 2002 ; Stove, 2013).

Selon le comité mixte FAO/OMS du Codex Alimentarius (2003), la prévention de la contamination des baies de raisin, des graines de céréale et de café durant la récolte, dépend tout d'abord de la bonne performance et de la propreté de l'équipement agricole et de la récolte qui doit être effectuée la récolte quand la teneur en eau des plantes atteint son optimum pour éviter le maximum de dommages mécaniques. De plus, pour éviter la contamination des produits agricoles par les mycotoxines et champignons producteurs, il faut d'abord, éliminer les grains souillés tombés par terre afin d'éviter la contamination de nouveaux fruits récoltés et aussi empêcher tout contact entre le sol et les fruits semés (FAO, 2009, Bucheli and Taniwaki, 2002).

Par ailleurs, les agriculteurs qui ont peu de formation en bonnes pratiques agricoles et le retard de la récolte, de la culture intercalaire et de la culture continue augmente le risque de contamination par les mycotoxines (Atukwase *et al.*, 2009 ; Hell *et al.*, 2003).

3.2. Gestion du stockage

Bien que l'application des bonnes pratiques agricoles aux champs et au moment de la récolte soit indispensable à la limitation de la contamination des produits agricoles par les champignons mycotoxinogènes, le contrôle des conditions de stockage (température, humidité des entrepôts et obscurité) s'avère aussi nécessaire pour limiter et prévenir la croissance des moisissures et empêcher la production de mycotoxines (Peraica *et al.*, 2002). En effet, le fait d'abaisser le niveau d'humidité des produits agricoles pendant le stockage peut réduire la croissance fongique et la biosynthèse des mycotoxines (Lanyasunya *et al.*, 2005). En effet, Hamiton (2000) a rapporté que le risque de croissance fongique et de synthèse d'aflatoxines peut être réduit pour le maïs séché, lors de la récolte, à une teneur en eau de 15,5% ou moins. Awuah et Ellis (2002) ont étudié l'effet de la teneur en eau sur les arachides et ont constaté que les arachides peuvent être exemptes de champignons et de mycotoxines pendant 6 mois avec une teneur en eau de 6,6%. Une concentration relativement faible en oxygène et une concentration relativement élevée en dioxyde de carbone contribuent à l'inhibition du développement fongique et la production de mycotoxines (Driehuis & Oude-Elferink, 2000). La réduction de la concentration en oxygène a diminué la production d'aflatoxine lorsque la concentration en oxygène a été réduite de 5% à 1% ; il était possible d'empêcher le développement d'*Aspergillus* et la biosynthèse de l'aflatoxine (Magan et Aldred, 2007). Pour réduire le risque mycotoxique, il est nécéssaire d'éviter les mélanges de céréales et les stockages prolongés, car elles peuvent augmenter le risque d'infection par les mycotoxines (Luo *et al.*, 2018). Corbett a indiqué qu'une longue période de stockage des pommes entraînait une augmentation spectaculaire de la teneur en patuline dans le jus de pomme (Corbett, 2003).

3.3. Méthodes physiques

La décontamination des mycotoxines par des méthodes physiques comprend diverses procédures telles que le tri et la séparation, l'immersion et le lavage, l'irradiation, la filtration et l'adsorption.

Tri et séparation : Le tri est l'élimination des fruits pourris et de mauvaise qualité ou la coupe des fruits pourris peut réduire considérablement les niveaux des mycotoxines dans les

produits à base de fruits. Il est parfois possible de réduire les niveaux de certaines mycotoxines jusqu'à 99%, si on procède à la méthode de tri et séparation (Beretta *et al.*, 2000 ; Broggli *et al.*, 2002 ; Scudamore & Banks, 2004).

Immersion et lavage : En raison des propriétés de densité des graines de céréales contaminés, l'immersion des grains dans l'eau et l'élimination des fractions flottantes peuvent généralement éliminer une certaine quantité d'aflatoxines, et cette technique de flottement peut éliminer jusqu'à 80% d'aflatoxines (Fandohan *et al.*, 2005 ; Bethke *et al.*, 2014). Par ailleurs, Scudamore et Banks (2004) ont constaté que les procédures de nettoyage et de récurage peuvent réduire de manière significative la contamination des graines de céréales par les ochratoxines.

Irradiation : Les radiations sont efficaces pour inhiber la croissance fongique et décontaminer certaines mycotoxines telles que, les aflatoxines, la toxine T-2 ou le DON lorsqu'elles sont appliquées sur une mince couche de céréales (Peraica *et al.*, 2002). Le traitement par rayonnement réduit la production d'AFB1 dans les arachides et le soja contaminés. Avec une dose de 10 kGy d'irradiation γ, l'aflatoxine B1 dans la farine d'arachide pourrait être complètement éliminée (Bhat *et al.*, 2007). Les rayons UV se sont également révélés efficaces sur les aliments pour volailles contaminés par l'OTA. Seules 60 minutes de rayonnement UV pouvaient ramener le niveau d'OTA de 500 µg/kg à 100 µg/kg (Gul Ameer *et al.*, 2016).

Néanmoins, les aliments irradiés doivent être étiquetés et contrôlés conformément à la législation. Le Comité mixte d'experts sur les aliments pour irradiation recommande de dégager jusqu'à 10 kGy de « dose moyenne globale », la dose admissible allant jusqu'à 150 kGy au Japon, alors qu'elle est autorisée à moins de 10 kGy aux États-Unis et en Chine (Ying Luo, 2018).

Filtrage et adsorption : Au cours des dernières décennies, divers adsorbants ont été explorés pour déterminer leur capacité à adsorber les mycotoxines. Le charbon actif, en tant qu'adsorbant général, il présente une grande surface spécifique et une excellente capacité d'adsorption dans les environnements aqueux. Plusieurs études ont rapporté une adsorption de mycotoxines avec du charbon actif, et il a été démontré que la réduction des résidus d'aflatoxine, de patuline, dezéaralénone, de déoxynivalénol et du nivalénol était due à sa structure poreuse (Avantaggiato *et al.*, 2003, 2004 ; Liu *et al.*, 2011). L'argile bentonite peut se lier et éliminer l'aflatoxine B1 des environnements aqueux et il a été rapporté que 79% de l'aflatoxine M1 avait été retirée du lait en ajoutant de l'argile bentonite (Magnoli *et al.*, 2011).

En outre, un mélange de différents adsorbants tels que le charbon de bois allié Q/FIS et les HSCAS (aluminosilicates de sodium et de calcium hydratés) a la capacité d'adsorber différentes mycotoxines en même temps (Avantaggiato *et al*., 2007).

3.4. Méthodes chimiques (les fongicides)

L'OTA et les champignons producteurs constituent une menace majeure pour la production agricole, de ce fait, l'application de fongicides pour prévenir ou éliminer les infections fongiques des plantes s'avère nécessaire. Ces agents antifongiques d'origine chimique sont souvent considérés comme indispensables pour garantir l'approvisionnement alimentaire mondial (Strange *et al.*, 2005). De nombreuses substances ayant des constituants chimiques très différents sont utilisées comme fongicides (Gupta, 1988, 2016). Dans l'Union européenne (UE), les ventes de fongicides (basées sur la masse) représentent plus de 40% des ventes totales de pesticides avec des fongicides synthétiques et biologiques représentant environ 60% de tous les fongicides (Zubrod *et al.*, 2019). Dans les régions viticoles, les fongicides peuvent représenter plus de 90% de toutes les applications de pesticides (Roßberg, 2009). De plus, l'utilisation de fongicides a augmenté en raison des changements des conditions climatiques, du développement de la résistance aux fongicides et des espèces fongiques envahissantes (Boxall *et al.*, 2009 ; Hakala *et al.*, 2011 ; Fisher *et al.*, 2012).

Les fongicides sont classés en fonction de leurs structures chimiques ou classés en agriculture et en horticulture en fonction de leur mode d'action (Ballantyne, 2003). Selon le mode d'application, les fongicides sont regroupés en fongicides foliaires, de sol et de pansement. Les fongicides foliaires sont appliqués sous forme de liquides ou de poudres sur les parties vertes aériennes des plantes, produisant une barrière protectrice sur la surface cuticulaire et une toxicité systémique pour le développement des champignons. Les fongicides du sol sont appliqués sous forme de liquides, de poudres sèches ou de granulés. Des fongicides de pansement sont appliqués sur la culture après récolte sous forme de liquides ou de poudres sèches pour empêcher l'infestation fongique. Ainsi, les fongicides efficaces doivent être protecteurs, curatifs ou éradicatifs et doivent posséder les propriétés suivantes (Phillips, 2001) :

- Une faible toxicité pour la plante/l'animal mais une toxicité élevée pour le champignon,
- La capacité de pénétrer dans les spores fongiques ou le mycélium en développement pour atteindre le site d'action,
- Une faible écotoxicité,
- Une capacité de former un dépôt protecteur et tenace à la surface de la plante qui sera résistant aux intempéries du soleil, de la pluie et du vent.

3.4.1. Classification des fongicides

Les fongicides sont souvent classés comme protecteurs ou systémiques. Les fongicides protecteurs sont généralement efficaces contre toute une gamme de champignons et protègent la plante contre l'infection à la surface des feuilles et des tiges. Les fongicides systémiques peuvent être absorbés par la plante sans dommage et être transportés vers d'autres tissus où ils sont toxiques pour les champignons. Par ailleurs, en alternant les différentes classes de fongicides, la population fongique est moins susceptible de développer une résistance à un produit chimique particulier (Matthias, 2014). Initialement, les premiers fongicides étaient des composés inorganiques à base de soufre ou d'ions métalliques (cuivre, étain, cadmium, mercure) qui sont connus par leurs effets toxiques contre les champignons. Actuellement, les fongicides à base de cuivre et de soufre sont encore largement utilisés. Le sulfate de cuivre est homologué aux États-Unis depuis 1956. L'atome de cuivre se lie aux protéines, modifiant leur structure. Cela peut briser les membranes autour des cellules, provoquant leur mort. Ainsi, le sulfate de cuivre est efficace pour détruire les champignons, les algues et même les escargots. Cependant, la plupart des fongicides utilisés aujourd'hui sont des composés organiques synthétiques (Lesemann *et al.*, 2006).

3.4.1.1. Fongicides non systémiques (de contact)

Ce type de fongicides a un effet préventif en inhibant la croissance des champignons et les spores fongiques avant que le mycélium ne puisse se développer dans les tissus végétaux (Oliver et Hewitt, 2014). Bien que les fongicides non systémiques restent généralement à la surface des plantes, ils sont potentiellement phytotoxiques et peuvent endommager la plante lorsqu'ils sont absorbés (Lesemann *et al.*, 2006). Ainsi, ce type de fongicides est utilisé comme protecteur et doivent être appliqué avant la période d'infection. Les agents de contact tels que le polycarbonate, l'oxychlorure de cuivre, le soufre, le mancozèbe, la bouillie bordelaise et d'autres ne sont pas en mesure de traiter les plantes déjà infectées.

Les fongicides de contact sont des produits adaptés à une utilisation préventive (prophylactique) car ils agissent par contact sur la surface de la plante. En effet, l'action protectrice de ces fongicides ne dépasse pas 10 à 12 jours avant les premières fortes pluies et le traitement doit être répété (3 à 6 fois par saison).

Les fongicides de contact ne pénètrent pas profondément dans les tissus végétaux et sont facilement éliminés et efficaces. Pour cette raison, et en raison de prix relativement bas, ils sont encore largement utilisés. Parmi ces fongicides on peut citer :

a) Les substances polyvalentes ou multi-sites

C'est une classe de fongicides apparue pour la première fois au XIXème siècle. Ces substances n'ont pas de cible enzymatique spécifique, elles affectent plusieurs fonctions essentielles du champignon à la fois (Figure 9). Ce type de fongicides multi-sites (Figure 9) est utilisé soit en pulvérisation sur le feuillage des cultures, soit en traitement des semences. Ils inhibent plus particulièrement la germination des spores.

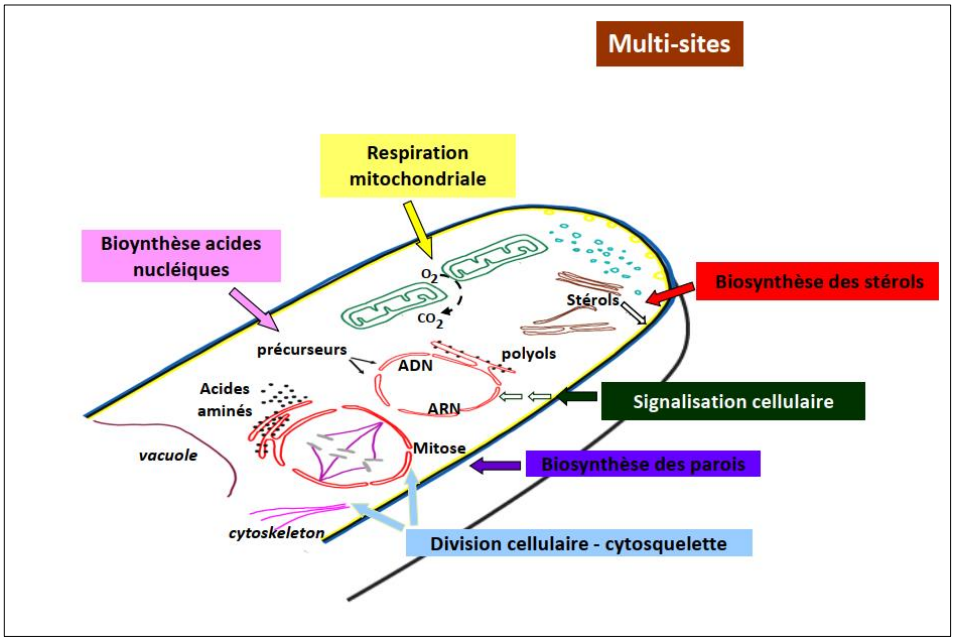


Figure 9. Principaux sites d'action des fongicides.

Des exemples typiques des fongicides de contact primaires sont les composés de cuivre inorganiques tels que la bouillie bordelaise, le carbonate de cuivre et le soufre inorganique sous forme de soufre élémentaire (Pablo *et al*., 2003). Les fongicides de contact jouent un rôle important dans le contrôle complet des maladies phytosanitaires (Johnson *et al*., 2014).

b) Substances inhibitrices de la respiration mitochondriale

Chez les champignons les processus respiratoires correspondent aux mécanismes enzymatiques (catabolisme oxydatif des glucides, lipides et protéines). Ces derniers génèrent une source d'énergie à l'organisme, sous forme d'ATP (Figure 10). De nombreux agents antifongiques inhibent la germination des spores des champignons en ciblant les mitochondries.

Cette classe de fongicides, agissent essentiellement en se fixant sur le complexe III (cytochrome bc_I), soit sur la face interne au niveau de l'ubiquinone réductase, soit sur la face externe au niveau de l'ubiquinol oxydase (Rocher, 2007). De plus, ce type d'antifongiques empêche la libération de l'ATP mitochondrial et agit au niveau de la rhizosphère.

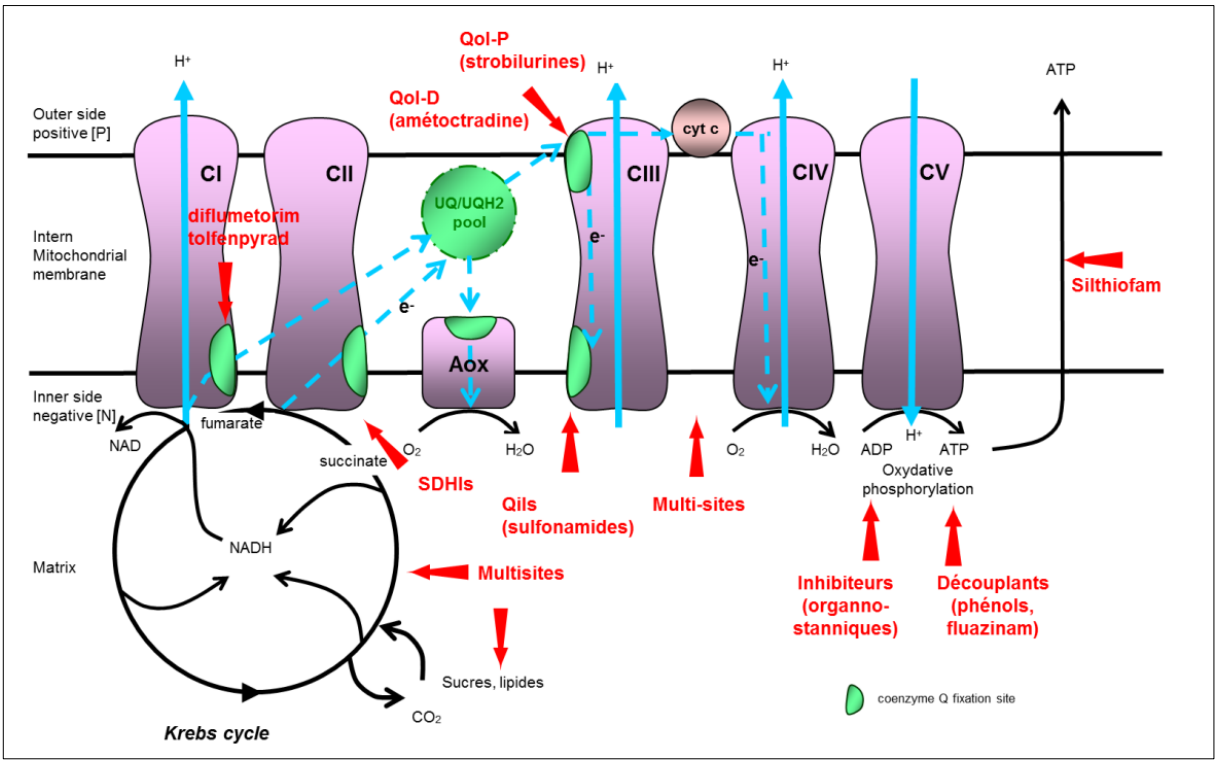


Figure 10. Cible des inhibiteurs respiratoire dans la chaîne mitochondriale.

c) Inhibiteurs de la biosynthèse des lipides et stérols membranaires (IBS)

Ce sont des fongicides qui inhibent la NADH cytochrome C réductase dans la peroxydation des lipides. Les risques de développement des résistances est souvent associé à l'utilisation de ces fongicides, spécialement contre *Botrytis cinerea*. Pour cette raison, l'association avec d'autres substances actives est souvent préconisée. Parmi ces fongicides, on trouve les dicarboximides, le tolclofos-méthyl, l'iprodione, la procymidone et la vinchlozoline.

L'ergostérol (constituants membranaires) est le stérol le plus représenté chez les champignons. Cependant, certains synthétisent d'autres molécules voisines de l'ergostérol, comme l'ergosta-5, 24(28)-diénol chez les oïdiums (Leroux, 2003a). On distingue deux modes d'action pour ce type de fongicides, ce sont des inhibiteurs de la 14-α-déméthylase (ou IDM). Ces fongicides sont représentés par le prochloraze (commercialisé sous forme d'un complexe de manganèse) qui appartient à la famille des imidazoles, le bitertanol et le difénoconazole

(triazoles). Le prochloraze est appliqué contre la pourriture grise de diverses cultures florales. Le deuxième mode d'action est l'inhibition de la 3-cétoréductase (C4-déméthylation), c'est le cas du fenhexamide destiné au genre *Botrytis*, il réduit la synthèse de l'ergostérol (Debieu *et al*., 2001).

d) Inhibiteurs de la biosynthèse de méthionine

Les inhibiteurs de la synthèse de la méthionine agissent d'une façon non compétitive sur la cystathionine β-lyase (Fritz *et al*., 2003). Ils appartiennent à la famille des anilinopyrimidines, représentée par le pyriméthanil.

e) Inhibiteurs de la formation des microtubules et des divisions cellulaires

Ce sont des substances qui affectent l'assemblage de la β-tubuline, inhibant ainsi, la division cellulaire, dont le pencycuron qui est une phénylurée, elle est utilisée en culture maraîchère contre le rhizoctone.

3.4.1.2. Fongicides systémiques

Les fongicides systémiques sont absorbés par la plante et transportés vers le site d'infection. Ces composés peuvent donc inhiber totalement le champignon après que les mycéliums franchisent le parenchyme du tissu végétal, arrêtant ainsi la propagation de l'infection (Oliver et Hewitt, 2014). Certains fongicides systémiques se déplacent dans la plante à une courte distance du site de pénétration. Il s'agit de fongicides systémiques locaux. Certains fongicides localement systémiques traversent la plaque foliaire d'une surface foliaire à l'autre mais ne se propagent pas à l'intérieur de la plante. Ces fongicides sont appelés translaminaires, c'est le cas du trifloxystrobine (Mueller, 2006). Le troisième type de fongicide systémique est un système de phloème mobile, le composé circule dans le phloème hors de la feuille où il se dépose vers le haut vers les autres feuilles et vers le bas jusqu'aux racines (Lesemann *et al.*, 2006). Un seul exemple de ce type de systémique existe parmi les fongicides pour gazon : les phosphonates, qui comprennent le fosétyl-Al et les phosphites (Vincelli *et al.*, 2017).

La principale différence entre les effets des fongicides systémiques et de contact est que le premier supprime parfois le champignon après l'infection de la plante, tandis que le second doit être présent à la surface de la plante avant l'infection. Progressivement, depuis les années 1960, les fongicides systémiques ont remplacé la préparation non systémique, offrant des niveaux plus élevés de protection des plantes (Dias, 2012). Cependant, par rapport aux produits

non systémiques, les fongicides systémiques sont environ deux fois plus chers en termes de ventes (McGrath, 2004).

Plusieurs modes d'action sont connues pour ce type d'antifongique, on peut citer l'inhibition de la respiration mitochondriale, de la biosynthèse des lipides et stérols membranaires, de la synthèse d'ARN et d'ADN, de la biosynthèse de la méthionine et de de la formation des microtubules.

a) Fongicides inhibiteurs de la respiration mitochondriale

• *Inhibition du complexe II (succinate déhydrogénase) :* Parmi ces inhibiteurs on trouve les carboxamides. Ils sont souvent commercialisés en association avec un deuxième fongicide, car ils déclenchent des phénomènes de résistance chez les champignons (Rocher, 2007). La carboxine est également un phénylamide qui est efficace contre les Basidiomycota auquel on attribue des propriétés systémiques (Couteux et Lejeune, 2004). Le flutolanil est, quant à lui, un anilide appliqué sur les semences de pomme de terre pour contrôler le rhizoctone. Ce produit persiste durant tout le cycle de la plante.

• *Inhibition du complexe III (cytochrome bcI) :* Parmi ces fongicides deux strobilurines sont systémiques :

- ✓ l'azoxystrobine, dont le toxophore (méthyl β-méthoxyacrylate : groupement attribuant l'effet toxique), est utilisé sur les plants de chicorée pour contrôler le mildiou. Cette molécule présente de plus la propriété d'être redistribuée à l'extérieur de la plante en phase vapeur (Leroux, 2003 b) ;
- ✓ la picoxystrobine est apparue sur le marché en 2003. Son spectre d'action est étendu. Elle est rapidement absorbée par la plante et est aussi redistribuée sous forme de vapeurs autour de celle-ci.

b) Fongicides inhibiteurs de la biosynthèse des lipides et stérols membranaires

Les inhibiteurs de biosynthèse des lipides perturbent essentiellement la perméabilité membranaire. Le propamocarbe (famille des carbamates), est utilisé en traitement des sols pour contrôler la fonte des semis, il agit essentiellement sur la synthèse d'acides gras (FRAC, 2004). Les fongicides dicarboximide sont un exemple de ce groupe (González *et al.*, 2017). Le mode d'action de ces composés est apparemment lié à l'inhibition de la biosynthèse des triglycérides chez les champignons (Borgers, 1980 ; González *et al.*, 2017)

Les stérols fongiques sont synthétisés dans le cytoplasme ; les phases terminales qui vont du squalène à l'ergostérol sont catalysées par des enzymes microsomales. Ces stérols sont des composants importants des membranes cellulaires dont ils régulent la fluidité et les enzymes qu'elles renferment, comme les chitines synthases. Selon une étude menée par Elad *et al.* (2004), les fongicides inhibiteurs de la biosynthèse des stérols (IBS) peuvent être divisés en quatre groupes qui diffèrent par leur mode d'action :

- ✓ les inhibiteurs de la 14-α-déméthylase des stérols appelés aussi IDM (famille des imidazoles).
- ✓ les inhibiteurs de la Δ14-réductase et de la Δ8→ Δ7 isomérase (famille des amines)
- ✓ les inhibiteurs de la C-4 déméthylation (famille des hydroxyanilides)
- ✓ les inhibiteurs de la squalène époxydase (famille des triazoles)

Ces différents fongicides, à faibles doses, inhibent l'élongation des tubes germinatifs et la croissance mycélienne (Leroux *et al*., 1999). La famille des triazoles représente la plus grande famille chimique de fongicides IBS. Ces molécules chimiques sont en majeur partie des systémiques xylémiennes. En effet, l'hexaconazole agit en bloquant la synthèse des stérols chez les champignons, et plus précisément la biosynthèse de l'ergostérol par l'inhibition de l'activité de la 14-α-déméthylase (Elad *et al*., 2004). Il bloque le site actif de cet enzyme qui est également un cytochrome P450.

c) Fongicides inhibiteurs de la synthèse d'ARN et d'ADN

Des fongicides appartenant à la famille des phénylamides, comme le bénalaxyl et le méfénoxame inhibent l'action de la polymérase I. D'autres antifongiques inhibent l'adénosine désaminase I dont le bupirimate qui est une hydroxypyrimidine appliquée pour traiter les oïdiums sur les cultures légumières et fruitières.

d) Fongicides inhibiteurs de la biosynthèse de méthionine (IBM)

Ce type de fongicides IBM est modérément mobile dans les plantes (Vincelli *et al.*, 2017). En effet, les fongicides systémiques, appelés xylemmobile ou systémiques acropétaux, se déplacent à l'intérieur du tissu conducteur de l'eau (xylème). Par exemple, le cyprodinil qui appartient à la famille des anilinopyrimidines est un inhibiteur de la cystathionine β-lyase, ce fongicide est efficace contre plusieurs champignons pathogènes. Cette famille chimique a été testée par Rosslenbroich et Stuebler (2000), ils ont rapporté que les anilinopyrimidines inhibent

l'élongation du tube germinatif et la croissance mycélienne de *B. cinerea*. D'autres études ont montré que ces antifongiques pouvaient interférer dans la biosynthèse de plusieurs acides aminés et spécialement de la méthionine (Leroux, 1994 ; Masner *et al*., 1994 ; Fritz *et al*., 1997)**.** Les anilinopyrimidines peuvent aussi empêcher la sécrétion d'enzymes hydrolytiques (cellulases, protéinases et polygalacturases) impliquées dans le processus d'infection du champignon (Leroux, 1996).

e) Fongicides inhibiteurs de la formation des microtubules

Ces types de composés contrôlent une large gamme de champignons à un coût de traitement relativement faible (Bernauer *et al.*, 2015). Par exemple, le bénomyl est l'un des benzimidazoles les plus efficaces et les plus utilisés dans la protection des cultures (Pablo *et al.*, 2003). Les benzimidazoles benomyl, carbendazime et thiabendazole (retiré du marché) et le phénylcarbamate diéthofencarbe interfèrent spécifiquement avec la formation de microtubules, qui fonctionnent dans une variété de processus cellulaires, y compris la mitose et le maintien de la forme cellulaire (Gaëlle *et al.*, 2003). Ces fongicides se lient spécifiquement aux sous-unités protéiques appelées tubuline et empêchent leur assemblage afin de former des microtubules.

3.4.2. Effet des fongicides sur l'OTA et champignons producteurs

Les principaux facteurs qui influencent le développement fongique et la production de mycotoxines sont l'activité de l'eau (a_w), la température, le temps d'incubation et la présence d'agents antifongiques d'origine chimique (Astoreca *et al.*, 2009 ; Hajjaji *et al.*, 2006 ; Marin *et al.*, 2013b ; Medina *et al.*, 2007a, b ; Nazari *et al.*, 2014 ; Popovski et Celar, 2012 ; Selouane *et al.*, 2009a). Ces derniers sont souvent préconisés pour lutter contre les champignons producteurs de mycotoxines. Cependant cette utilisation devrait être maitrisée vu l'exposition humaine aux résidus et le développement de souches résistantes. Des études récentes ont montré que les fongicides peuvent stimuler dans certains cas la production des mycotoxines (Belli *et al.*, 2006 ; Mateo *et al.*, 2011 ; Medina *et al.*, 2007a; Ramirez *et al.*, 2004 ; Zouhair *et al.*, 2014), alors que d'autres chercheurs ont rapporté un effet contraire (Kang *et al.*, 2001; Pirgozliev *et al.*, 2002; Lo Curto *et al.*, 2004 ; Varga et Kozakiewicz, 2006 ; Folcher *et al.*, 2009; Laaziz *et al.*, 2017). En effet, Zouhair *et al.* (2014) ont démontré que l'hexaconazole inhibait complètement la croissance fongique à des concentrations supérieures à 0.01×DR et diminuait fortement les taux de croissance pour deux souches d'*A. carbonarius* et *A. niger* aux doses les plus faibles (72.0-73.8% pour *A. carbonarius* et 86.7-92.2% pour *A. niger*). En 2013, Schmidt-

Heydt *et al.* ont montré que l'application du fongicide rovral, appartenant à la classe des imidazoles, conduit à une diminution du taux de croissance mais à une forte augmentation de la biosynthèse de l'OTA par *P. nordicum* et de la citrinine par *P. verrucosum*. De plus, Medina *et al.* (2007a) ont rapporté que l'utilisation de carbendazime (fongicide systémique utilisé contre les infections fongiques dans les vignobles) provoque une induction de la biosynthèse de l'OTA par des souches d'*A. carbonarius* même si le taux de croissance a été faiblement réduit. Par ailleurs, l'induction de l'OTA a été aussi rapportée par Mateo *et al.* (2011) qui ont montré que l'application de faibles doses du procloraz et tebuconazol (appartenant à la famille des triazoles), stimulent aussi la biosynthèse de mycotoxines (T-2 et HT-2) chez *Fusaium langsetheae.* Ces résultats ont été confirmés par Terra *et al.* (2016), en appliquant des doses sous-létales de fongicides (hydroxyde de cuivre, oxychlorure de cuivre et tébuconazole) contre des souches d'*A. carbonarius.* Également Qjidaa. (2015), a montré que le pyriméthanil, le sulfate de cuivre, l'hexaconazole et l'azoxystrobine, avaient un effet positif sur la stimulation de l'OTA chez *A. tubingensis* et *A. niger*. Zouhair *et al*. (2014) ont également rapporté que l'OTA a été stimulée à des doses sous-léthales de l'azoxystrobine, de pyriméthanil et d'hexaconazole.

A côté de leur effet inducteur de la production de mycotoxines, ces agents antifongiques peuvent également dans certains cas diminuer ou inhiber la biosynthèse de ces métabolites toxiques. Ainsi, Valero *et al.* (2007) ont testé l'effet de deux fongicides Chorus (cyprodinil) et Switch (37,5% cyprodinil + 25% fludioxonil) sur l'infection causée par *Aspergillus* et sur la l'accumulation de l'OTA dans les raisins déshydratés, ils ont montré qu'il n'y avait aucune différence entre les applications simples ou doubles de deux agents fongiques. Les deux fongicides sont restés actifs sur les raisins pendant le processus de séchage, réduisant la croissance fongique et la biosynthèse de l'OTA. Lo Curto *et al.* (2004) ont également signalé que l'application de différents fongicides couramment utilisés dans les vignobles, tels que l'azoxystrobine, le dinocap et le penconazole, a entraîné une diminution de l'accumulation d'OTA. D'après Pirgoliev *et al.* (2002), le traitement des grains de blé par l'azoxystrobine (strobilurines) et le metconazole (triazoles) mènerait à une réduction de la biosynthèse de déoxynivalénol (DON) par *Fusarium graminearum* et *Fusarium culmorum.* Ces deux fongicides ont été également testés par Baturo *et al*. (2011), ils ont rapporté que le metconazole a réduit d'une manière significative la croissance fongique des souches appartenant au genre *Fusarium* alors que l'azoxystrobine a peu d'influence contre ces isolats. Par ailleurs, sur des souches isolées à partir du raisin marocain, Qjidaa (2015) a signalé que les souches d'*A.*

tubingensis et *A. foetidus* étaient sensibles au pyriméthanil, à l'hexaconazole et à l'azaxystrobine, cette diminution de la croissance été accompagnée aussi d'une diminution de la production de l'OTA pour certains isolats. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Zouhair (2017), dont l'azoxystrobine qui était capable de réduire les niveaux d'OTA produites par *A. niger*.

Cependant, l'utilisation des fongicides doit être maitrisée vu leur toxicité envers l'environnement et la santé humaine ainsi que le risque de développer des souches fongiques résistantes à ces fongicides.

3.5. Méthodes de biocontrôle

3.5.1. Biocontrôle par des souches microbiennes

L'utilisation de nombreuses méthodes physiques et chimiques disponibles pour la décontamination de produits agricoles contaminés par des mycotoxines est limitée en raison de problèmes de biosécurité, de pertes de qualité nutritionnelle des produits traités, de leur efficacité limitée et aussi leurs coûts élevés (Walter *et al*., 2015). En outre, le développement de la résistance aux fongicides chez de nombreux agents pathogènes fongiques ainsi que les préoccupations grandissantes du public concernant les risques associés à l'utilisation de pesticides ont suscité un intérêt marqué pour la mise au point de méthodes alternatives de lutte contre ces pathogènes fongiques, surtout des méthodes respectueuses de l'environnement.

La lutte biologique utilisant des antagonistes microbiens, seuls ou dans le cadre d'une stratégie de lutte intégrée visant à réduire l'utilisation de pesticides, est une approche prometteuse pour la lutte contre l'OTA et d'autres mycotoxines dans les cultures avant et après la récolte (tableau 5). Plusieurs micro-organismes, y compris des bactéries, des levures et des champignons non toxinogènes appartenant au genre *Aspergillus* (Xu *et al.*, 2013), ont été testés pour leur capacité à réduire la contamination par les mycotoxines. Par ailleurs, plusieurs scientifiques ont découvert que les espèces *Bacillus* et *Brevibacterium* peuvent être utilisées pour réduire la contamination par les mycotoxines. L'utilisation de *B. licheniformis* isolé à partir de soja fermenté de Thaïlande éliminait efficacement l'OTA, avec une efficacité d'élimination de 92,5% pour un traitement de 48h à 37 °C (Petchkongkaew *et al.*, 2008). Des études ont confirmé que les espèces de *Brevibacterium* dégradent l'OTA en hydrolysant sa liaison amide (Rodriguez *et al.*, 2011 ; Moreno *et al.*, 2013).

Tableau 5. Agents biologiques de contrôle des champignons producteurs de mycotoxines (Tsitsigiannis *et al*., 2012).

Champignon cible	Mycotoxine	Agent de biocontrôle
A. carbonarius *A. niger*	Ochratoxine A	Levures isolées de phyllosphère (*Aureobasidium pullulans*)
A. flavus *A. parasiticus* *Aspergillus spp*	Aflatoxine	Souches d'*Aspergillus* non toxinogènes Bactéries lactiques
F. verticillioides	Fumonisine	*Bacillus subtilis, B. amyloliquefaciens, Kluyveromyces* sp
F. graminerarum, F. culmorum	DON	*Fusarium equiseti*, levures, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp.
Penicillium expansum	Patuline	*A. pullulans, P. syringae, Candida sake, Pantoea agglomerans*

De nombreuses mycotoxines, notamment les aflatoxines, le DON et l'OTA peuvent être adsorbées par les bactéries lactiques. La liaison semble être physique et est associée à la surface bactérienne (Haskard *et al.*, 2001, 2000 ; Fazeli *et al.*, 2009). Il a été démontré que les souches de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Lactococcus* adsorbaient l'AFB1 ; les souches testées présentaient différentes capacités d'adsorption allant de 5,6% à 59,7%, la réduction de de l'AFB1 serait due à la liaison de la surface cellulaire plutôt qu'à la dégradation enzymatique (Peltonen *et al*., 2001). Une autre étude menée par Fuchs *et al.* (2008) a montré que des bactéries lactiques sont capables d'adsorber la patuline et que *Lactobacillus plantarum* présentait la meilleure capacité d'adsorption. Par ailleurs, la capacité des bactéries lactiques à adsorber l'OTA variait entre 8% et 28%, et aucun produit de dégradation n'a été détecté, ce qui suggère que l'élimination a été réalisée par un processus de liaison (Del Prete *et al*., 2007). Bejaoui *et al.* (2004) ont observé que l'ajout de *Lactobacillus plantarum*, provoque une baisse importante de la concentration de l'OTA dans un milieu synthétique et naturel de jus de raisin sans engendrer des métabolites de dégradation, indiquant ainsi la possibilité de l'adsorption de l'OTA sur la membrane cellulaire de ces bactéries.

Les interactions entre bactéries lactiques et fumonisines ont été examinées in vitro par Niderkorn *et al*. (2009). L'aptitude de 29 souches de bactéries lactiques à éliminer la FB1 et la FB2 a été évaluée ; ces auteurs ont démontré que la plupart des souches étaient capables d'éliminer les deux toxines et que l'interaction entre les bactéries lactiques et les fumonisines était influencée par la structure des peptidoglycanes de la paroi cellulaire.

Bien que les agents de biocontrôle aient souvent été utilisés avec succès en laboratoire, leur commercialisation dépend en grande partie de leur capacité à contrôler de manière constante les champignons mycotoxinogènes dans différents endroits et cultivars et à réduire les niveaux de mycotoxines en dessous des limites réglementaires.

3.5.2. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles, produites par le métabolisme secondaire des plantes, sont des extraits aromatiques volatils, liquides à température ambiante (Hyldgaard *et al.*, 2012). Ils sont connus pour leurs activités biologiques, telles que les effets bactéricides, virucides, fongicides, antiparasitaires, insecticides et antioxydants (Bakkali *et al.* 2008). De plus, les HE réagissent au niveau de plusieurs cibles empêchant le développement de résistance chez les microorganismes (Nazzaro *et al.* 2013 ; de Souza 2016). Au cours des dernières années, en raison de la perception négative croissante des additifs synthétiques par le consommateur, on s'est davantage intéressé à l'application des HE dans les produits cosmétiques et pharmaceutiques, ainsi comme conservateurs pour aliments (Hyldgaard *et al.*, 2012). De plus, les huiles essentielles sont classées comme « généralement reconnues comme sûres » (GRAS) par la Food and Drugs Administration (FDA) ; elles ne sont donc pas nocives et, en raison de leur origine naturelle, sont plus largement acceptées par les consommateurs que les composés de synthèse (Edris *et al.*, 2007). Les HE sont composés de terpènes, de composés aromatiques dérivés de phénylpropanïdes et de composés aliphatiques (Nazzaro *et al.* 2013). Ce sont des mélanges complexes pouvant contenir de nombreux composés différents (Zuzarte et Salgueiro 2015). Plus de 220 composés différents ont été trouvés dans l'huile du géranium rose indien (Rao, 2009). La composition (les composés et leurs concentrations respectives) des HE peut varier considérablement en fonction de la méthode d'extraction, de l'organe de la plante utilisé, de la saison de récolte et de l'origine de la plante (Figueiredo *et al.* 2008 ; Yuan *et al.* 2016). L'activité antimicrobienne d'une huile essentielle dépend de l'effet antimicrobien de chacun de ses composés et de certaines interactions synergiques, additives et antagonistes entre eux (Hyldgaard *et al.*, 2012 ; Nazzaro *et al.* 2013). Par conséquent, la composition variable des HE rend la comparaison de leurs activités antimicrobiennes plus difficile. Cependant, la connaissance de l'action antimicrobienne spécifique de chaque composé d'HE pourrait aider à comprendre l'activité antimicrobienne de ces HE et à donner un aperçu de leurs potentiels d'application.

A. Mécanisme d'action des huiles essentielles contre les agents pathogènes fongiques

Une activité antifongique peut être obtenue en détruisant la cellule fongique pathogène. Selon Freiesleben et Jager (2014), les agents antifongiques peuvent inhiber le champignon en perturbant la structure et la fonction des membranes ou organites des cellules fongiques et/ou en inhibant la matière nucléaire ou la synthèse des protéines (Figure 11).

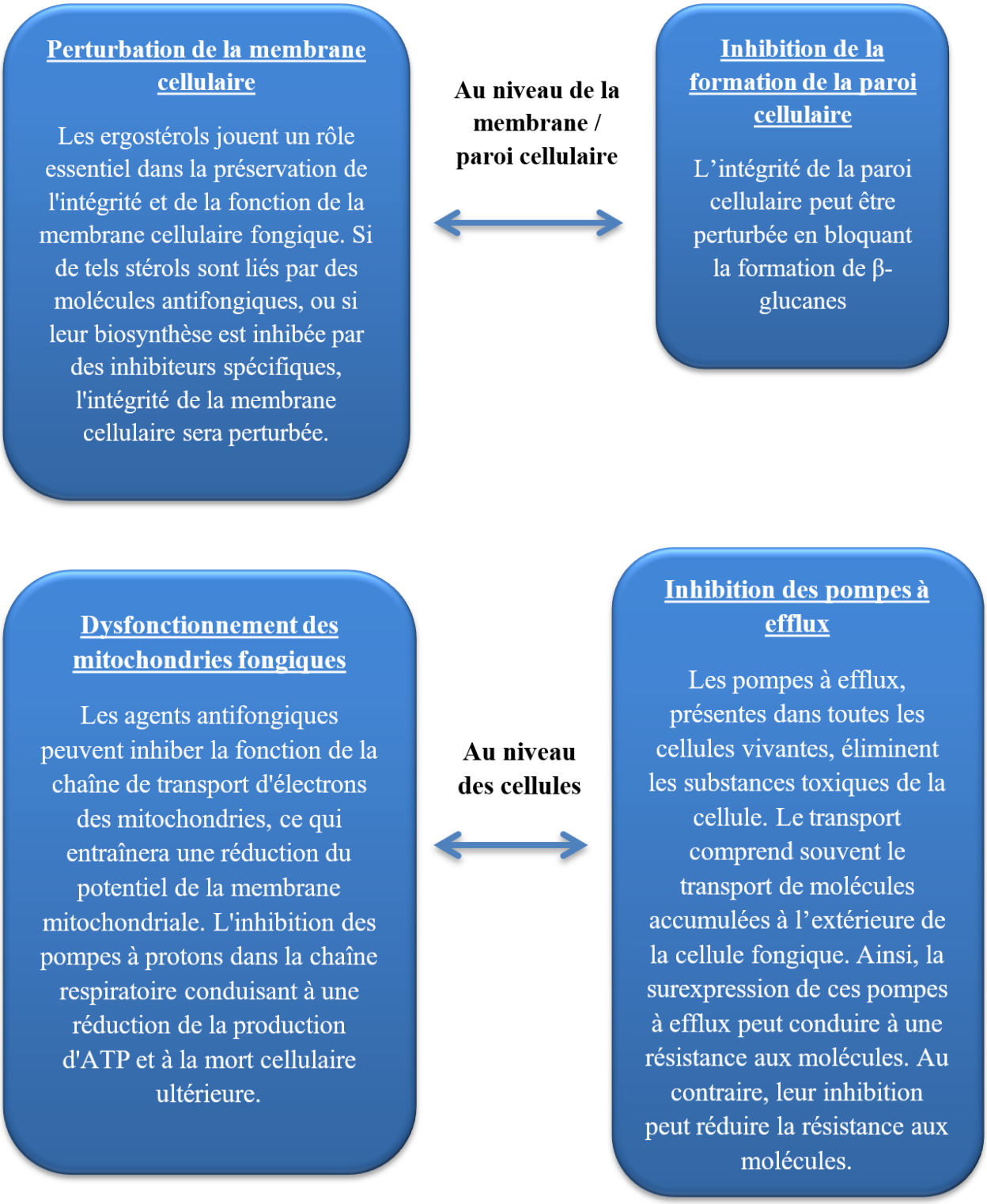


Figure 11. Les mécanismes d'action des huiles essentielles contre les champignons

En observant la composition de la cellule fongique, différents mécanismes antifongiques peuvent être suggérés (Mc Clanahan, 2009 ; Walker *et al.* 2012).

- Rupture de la membrane cellulaire et inhibition de la formation de la paroi cellulaire

La paroi cellulaire fongique est principalement constituée de β-glucanes et de chitine. Si la synthèse de ces composés est inhibée, l'intégrité de la paroi cellulaire sera perturbée (Hector, 1993 ; Mc Clanahan, 2009 ; Walker *et al.* 2012). En fait, l'hydrophobicité des HE et de leurs composants permet à l'huile de se répartir dans les couches lipidiques des membranes cellulaires fongiques et entraîne une perturbation des structures membranaires et de l'intégrité de la membrane cellulaire. Ces modifications permettent davantage la perméabilité pour l'échange de cations H^+ et K^+. Par conséquent, ces événements pourraient provoquer une modification du flux de protons et donc des gradients ioniques, modifier le pH des cellules, affecter la composition chimique des cellules et les processus métaboliques dans les cellules des agents pathogènes, entraînant finalement la mort cellulaire (Beckman, 2000). D'un autre côté, les ergostérols sont essentiels pour la membrane cellulaire. Si la synthèse de ces stérols est inhibée, l'intégrité de la membrane cellulaire sera perturbée (Ghannoum *et al.*, 1999 ; Walker *et al.* 2012).

- Dysfonctionnement des mitochondries fongiques

L'inhibition du transport d'électrons mitochondriaux entraînera une réduction du potentiel de la membrane mitochondriale. L'inhibition peut se produire via l'inhibition des pompes à protons dans la chaîne respiratoire, en inhibant l'action des déshydrogénases mitochondriales, impliquées dans la biosynthèse de l'ATP, comme la lactate déshydrogénase, la malate déshydrogénase et la succinate déshydrogénase, ce qui entraînera ainsi une réduction de la production d'ATP et ultérieurement la mort cellulaire (Mc Clanahan, 2009 ; Agostini-Costa *et al.* 2012 ; Nazzaro *et al.*, 2017). Chen *et al.* (2013) ont montré que l'HE d'*Anethum graveolens* était capable d'agir comme agent antifongique en perturbant le cycle de l'acide citrique et en inhibant la synthèse d'ATP dans les mitochondries des souches de *C. albicans*. Bakkali *et al*, (2006) ont rapporté que le traitement de *Saccharomyces cerevisiae* par des HE de *Origanum compactum*, *Artemisia herba alba* et *Cinnamomum camphora* a révélé une augmentation du nombre de mutations cytoplasmiques (dommages mitochondriaux). Haque *et al.* (2016) ont indiqué que les terpénoïdes pourraient jouer un rôle clé dans la diminution du

contenu mitochondrial, ce qui donne lieu à un niveau modifié de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) et de génération d'ATP.

- Inhibition de la division cellulaire et la synthèse des protéines

L'inhibition de la division cellulaire peut se produire via l'inhibition de la polymérisation des microtubules, et inhibant ainsi la formation du fuseau mitotique (Mc Clanahan, 2009 ; Walker *et al.* 2012).

Par ailleurs, si l'agent antifongique pénètre dans la cellule, par exemple via le transport actif sur les ATPases, et interfère avec l'ARN, il peut provoquer une synthèse d'ARN défectueuse et une inhibition de la transcription de l'ADN. L'inhibition de la synthèse des protéines est également une cible antifongique connue (Mc Clanahan, 2009).

- Inhibition des pompes d'efflux

Les pompes d'efflux sont présentes dans toutes les cellules vivantes au niveau de la membrane plasmique fongique et ont pour fonction de transporter les substances toxiques hors de la cellule ; soutiennent le grand gradient de proton électrochimique transmembranaire à travers la membrane cellulaire nécessaire à l'absorption des nutriments ; de plus, la H^+-ATPase régule également le pH intracellulaire et la croissance des cellules fongiques. Le transport comprend souvent le transport des agents antifongiques accumulés hors de la cellule fongique (Kang *et al.*, 2010 ; Haque *et al.*, 2016 ; Set-Young *et al.*, 1997 ; Perlin *et al.*, 2006 ; Ahmad *et al.*, 2013). La surexpression des pompes à efflux peut entraîner une résistance à ces agents. En inhibant les pompes à efflux, on pense que la résistance aux molécules à effet antifongique peut être réduite (Kang *et al.*, 2010), ainsi, l'inhibition de la H^+-ATPase entraîne une acidification intracellulaire et la mort cellulaire. Ahmad *et al.* (2013) ont montré que l'eugénol et le thymol sont d'excellents agents antifongiques, et que l'action se situe probablement au niveau de la membrane. Les deux composés inhibent l'activité H^+-ATPase. Le thymol et le carvacrol, principaux composants chimiques de l'huile de thym, ont présenté un effet antifongique synergique avec le fluconazole en inhibant la surexpression des gènes CDR1 et MDR1 de la pompe à efflux chez *C. albicans*. Les deux monoterpènes ont inhibé l'efflux de 70 à 90%, ce qui montre leur puissance élevée pour bloquer les pompes de transport des agents antifongiques.

B. Activités antifongiques des huiles essentielles

Les maladies causées par des agents phytopathogènes contribuent de manière significative à la perte annuelle de rendement des cultures végétales dans le monde (Savary *et al.*, 2006), les champignons étant les principaux agents pathogènes ayant le plus grand impact sur les maladies et les pertes de la production agricole (Bajpai *et al.*, 2010). L'application de fongicides chimiques est la méthode de lutte la plus répandue et la plus efficace contre ces maladies, ce qui représente une grave menace pour l'environnement et la santé publique, en plus du développement de la résistance des agents pathogènes aux antifongiques (Goussous *et al.*, 2010). Par conséquent, au cours des dernières années, il y a eu une nette tendance à la recherche de méthodes alternatives plus sûres pour le contrôle des maladies fongiques (Moghaddam *et al.*, 2013). En janvier 2009, le Parlement européen a approuvé le texte d'un règlement sur les produits phytopharmaceutiques (91/414 / CE) (Richardson *et al.*, 2009). La gestion intégrée des plantes (IPM) est l'effort de contrôler les maladies phytosanitaires en appliquant des méthodes alternatives au fongicides de synthèse, en éliminant ou en contrôlant leur utilisation et en mettant en œuvre l'application de méthodes de contrôle alternatives telles que les substances fongicides naturelles.

Les huiles essentielles représentent une nouvelle classe de produits de protection des cultures en raison de leurs effets, de leur courte durée de conservation et de leur faible toxicité envers l'environnement (Djordjevic *et al.*, 2013). Habituellement, les mono- et sesquiterpènes, les phénols, les alcools, les éthers, les aldéhydes et les cétones sont les principaux constituants des huiles essentielles, qui sont souvent responsables de l'activité biologique ainsi que de leur parfum (Bahraminejad *et al.*, 2016). En fait, ces dernières années, les chercheurs ont rapporté de nombreux hydrocarbures mono- et sesquiterpéniques comme inhibiteurs des pathogènes microbiens (Cakir *et al.*, 2004). Des composés tels que le carvacrol, le thymol, le linalol, le cymène, le pinène sont connus pour leur activité antimicrobienne (Knobloch *et al.*, 1985 ; Juven *et al.*, 1994 ; Harborne *et al.*, 1995 ; Cimanga *et al.*, 2002). Des études ont montré que certaines huiles essentielles sont actives contre les champignons pathogènes sans effets secondaires (Sokmen *et al.*, 1999 ; Tabassum *et al.*, 2013 ; Ebani *et al.*, 2017). Actuellement, il existe quelques revues sur l'activité antifongique des extraits de plantes, généralement structurées en fonction de la famille botanique des espèces végétales source des HE actifs ou des composés actifs d'extraits de plantes.

Les propriétés antifongiques des HE et de leurs constituants ont été rapportées dans plusieurs études, dont la plupart sont dues à l'inhibition de la croissance mycélienne fongique in vitro. Le mycélium soutient toutes les activités fongiques, de la germination des spores à la formation du corps fructifère, et représente donc un bon indicateur de la survie des champignons. Cependant, les études de l'impact des HE sur la production de l'OTA sont rares.

Parmi les études antérieures sur l'activité antifongique de l'HE, Dubey et Tripathi (1987) ont signalé la nature fongistatique de l'HE des feuilles de *Piper betle* L. contre *Aspergillus flavus*. Nguefack *et al*. (2004) ont montré une inhibition complète de la germination des conidies et la croissance mycélienne de trois champignons (*Fusarium moniliforme, A. flavus*, *A. fumigatus*) sur d'une gélose de farine de maïs en utilisant les HE d'*Ocimum gratissimum* (basilic africain), *Thymus vulgaris* (thym) et *Cymbopogon citratus* (citronnelle) à 800, 1000 et 1200 ppm, respectivement. Vagi *et al.* (2005) ont étudié les propriétés antifongiques d'*Origanum majorana* L. EO contre trois champignons isolés à partir de matrices alimentaires (*A. niger, Trichoderma viride* et *Penicillium cyclopium*).

Soylu *et al.* (2006) ont montré une inhibition de la croissance de *Phytophthora infestans* avec une concentration de 6,4 µg/mL *d'Origanum syriacum* (origan), *Thymbra spicata* (thym), *Foeniculum vulgare* (fenouil), tandis que les HE de *Rosmarinus officinal* (romarin) et *Lavandula stoechas* (lavande) n'étaient efficaces qu'à 12,8 et 25,6 µg/mL. Tao *et al.* (2014a) ont signalé une inhibition complète de *P. italicum* et *P. digitatum* à des concentrations de 2,5 et 40 µL/mL de l'HE de *Citrus reticulata Blanco* (ponkan). Kohiyama *et al.* (2015) ont testé l'activité antifongique de l'HE de *Thymus vulgaris* contre *A. flavus*, ils ont noté que la biosynthèse de l'ergostérol chez *A. Flavus* a été inhibée à 100 et 250 µg/mL d'HE de thym. D'un autre côté, Li *et al.* (2016) ont rapporté que l'application d'une concentration de 0,5 et 1,0 µL/mL (concentration inhibitrice minimale et concentration fongicide minimale) de l'HE de *Litsea cubeba* avec fumigation été efficace contre *A. flavus*. Par ailleurs, Bozik *et al.* (2017) ont démontré une activité antifongique de la vapeur de l'HE du clou de girofle, du thym, de l'origan et de la citronnelle contre *A. flavus*, *A. parasiticus* et *A. clavatus* isolés d'avoine.

La lutte contre les champignons pathogènes dans les produits alimentaires et agricoles par contact direct avec les huiles essentielles de diverses plantes a été largement étudiée. Cependant les études de l'effet des HE sur des souches fongiques productrices d'OTA sont rares.

Chapitre II

Matériel et méthodes

CHAPITRE II. Matériel et méthodes

1. Le matériel fongique

Dans la présente étude, nous avons sélectionné treize souches appartenant au genre *Aspergillus*, préalablement isolées du raisin marocain et identifiées par voie moléculaire (sept *A. tubingensis*, un *A. luchuensis*, trois *A. carbonarius* et deux *A. niger*) dont neuf sont productrices d'OTA et quatre non productrices d'OTA. Les 13 souches ont été déposées dans la collection de la Mycothèque de l'Université catholique de Louvain (Mycothèque de l'Université catholique de Louvain « MUCL », Louvain La Neuve, Belgique). La conservation des isolats sous forme d'une suspension de spores a été réalisée dans 25% glycérol-0.01% Tween 80 à -20°C. Le tableau 6 présente le code de chaque souche, l'espèce, l'année d'isolement et la capacité de production de l'OTA.

Tableau 6. Souches utilisées pour cette étude.

Code MUCL	Code LASSA	Espèce	Année d'isolement	Source d'isolement	Région	OTA (µg/g CYA)
MUCL 49226	EN19	*A. niger*	2004	Raisin sec	Marché de Fès	117.47
MUCL 49227	AV7	*A. niger*	2005	Raisin frais	Meknès	0.16
MUCL 49232	M3	*A. carbonarius*	2005	Raisin frais	Meknès	0.16
MUCL 49233	M4	*A. carbonarius*	2005	Raisin frais	Meknès	0.11
MUCL 49345	M5	*A. carbonarius*	2005	Raisin frais	Rabat	92.7
MUCL54481	AV19	*A. tubingensis*	2006	Raisin frais	Meknès	0.06
MUCL54482	AV35	*A. tubingensis*	2006	Raisin frais	Meknès	0.14
MUCL54483	S2	*A. tubingensis*	2005	Raisin frais	Tiflet	0.80
MUCL54484	S3	*A. tubingensis*	2005	Raisin frais	Tiflet	0.07
MUCL54477	Tf1	*A. luchuensis*	2005	Raisin frais	Tiflet	ND
MUCL54478	Tf4	*A. tubingensis*	2005	Raisin frais	Tiflet	ND
MUCL54485	H-3	*A. tubingensis*	2006	Raisin frais	Meknès	ND
MUCL54486	I-4	*A. tubingensis*	2006	Raisin frais	Meknès	ND

2. Effet des fongicides sur la croissance fongique et la production d'OTA.

2.1. Les fongicides

Pour cette étude nous avons utilisé trois fongicides appartenant à trois familles chimiques différentes à savoir : Hexa, Pyrus et Ortiva. Le Tableau 7 présente la famille chimique, la matière active, la dose recommandée et le fournisseur.

Tableau 7. Caractéristiques des différents fongicides utilisés.

Fongicide	Matière active	Dose recommandée	Concentration matière active	Fabrication	Famille chimique
Ortiva	Azoxystrobine	8 mL/L	250 g/L	SYNGENTA	Strobilurines
Pyrus	Pyriméthanil	2,5 mL/L	400 g/L	PHILEA	Anilinopyrimidines
Hexa	Hexaconazole	5 mL/L	50 g/L	PROTECO	Triazoles

a) Azoxystrobine

L'azoxystrobine ($C_{22}H_{17}N_3O_5$) (Figure 12) est une molécule qui appartient à la famille chimique des strobilurines, avec un large spectre d'action contre les différentes familles de champignons pathogènes. L'azoxystrobine agit au niveau des mitochondries, plus précisément en inhibant le complexe mitochondrial III, induisant un blocage de la respiration et arrêt de la production d'énergie (Leroux, 2003 ; Elad *et al*., 2004). De plus, elle agit sur la germination des spores, sur la croissance mycélienne et sur la sporulation. La pénétration de cette substance dans la plante est translaminaire et systémique. L'action de l'azoxystrobine est principalement protectrice.

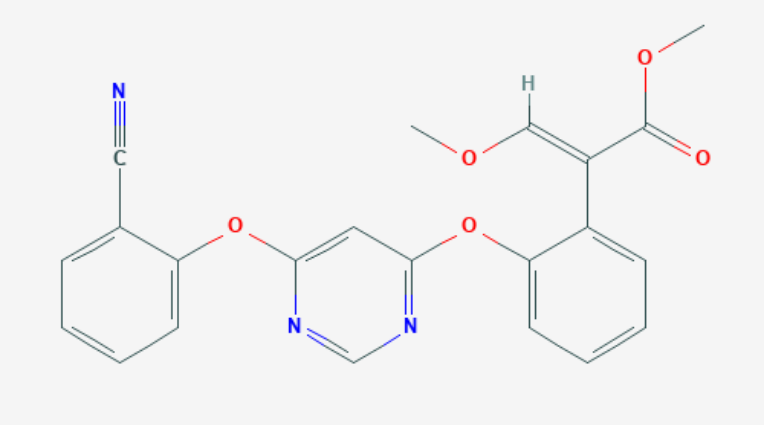


Figure 12. Structure chimique de l'azoxystrobine.

b) Pyriméthanil

Le pyriméthanil ($C_{12}H_{13}N_3$) (Figure 13) est un fongicide de contact de la famille chimique des anilinopyrimidines. Cette substance agit en bloquant la sécrétion par le champignon des enzymes nécessaires au moment de l'infection, en particulier celles émises par le tube germinatif et les hyphes mycéliens participant à la destruction des parois cellulaires du végétal (Rosslenbroich et Stuebler, 2000).

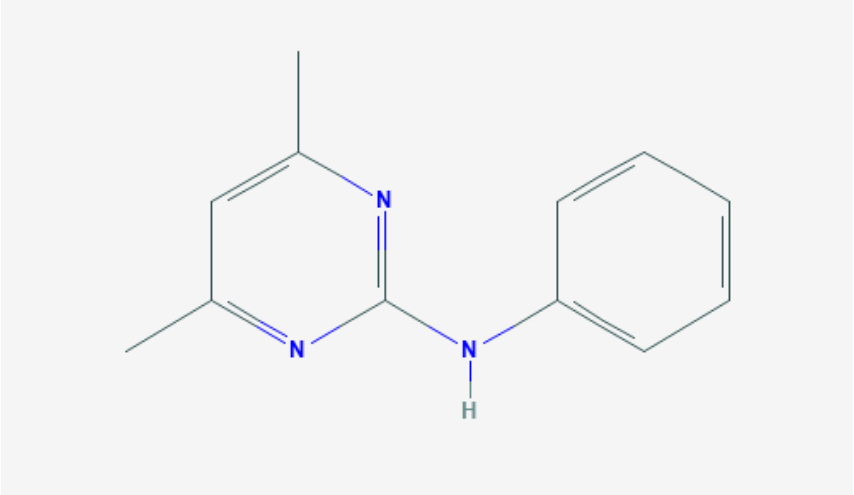


Figure 13. Structure chimique du pyriméthanil.

c) Hexaconazole

L'hexaconazole ($C_{14}H_{17}Cl_2N_3O$) (Figure 14) est un fongicide appartenant à la famille des triazoles, ces derniers ont une action à la fois préventive et curative. Leur mode d'action est spécifique : ils bloquent essentiellement la synthèse des stérols chez le champignon, et plus précisément la biosynthèse de l'ergostérol, en inhibant l'activité de la 14 -α-déméthylase (Elad *et al*., 2004), ils bloquent le site actif de cet enzyme qui est également un cytochrome P450. Ce fongicide inhibe aussi l'élongation des tubes germinatifs et la croissance mycélienne (Leroux *et al*., 1999).

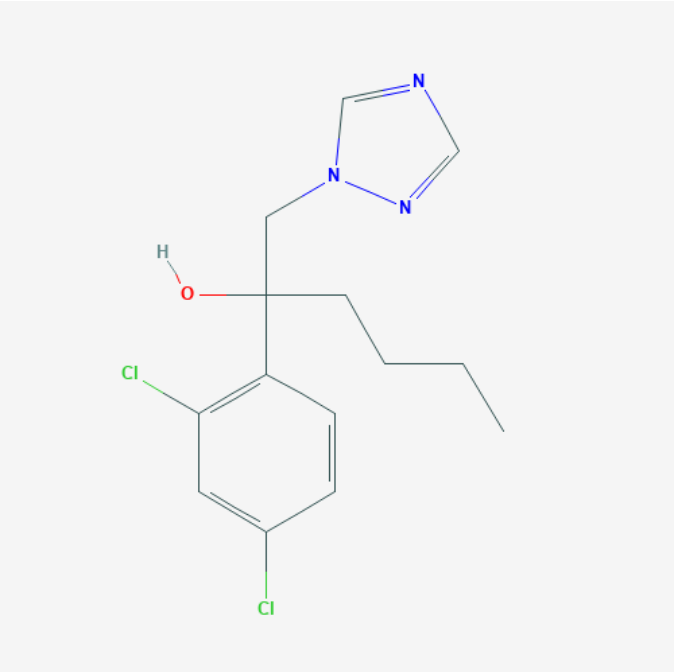


Figure 14. Structure chimique de l'hexaconazole.

2.2. Ajout de fongicides et inoculation des milieux de culture

Préparation des fongicides

Les fongicides utilisés se présentent sous forme d'une solution concentrée. Pour chacun d'entre eux, une solution mère a été préparée en les solubilisant dans de l'eau distillée stérile. Les concentrations finales testées, obtenues par une série de dilution de cette solution mère, sont exprimées sous forme d'un multiple de la dose recommandée : 2×DR, 1.5×DR, 1×DR, 0.5×DR, 0.02×DR, 0.01×DR.

Préparation de la solution sporale

Les 13 souches d'*Aspergillus* ont été cultivées sur milieu CYA (Laaziz *et al*., 2017) à 25°C pendant 7 jours. Les conidies ont été récoltées par grattage dans une solution de Tween 80 à 0.5%. Les concentrations finales des suspensions de spores ont été déterminées à l'aide d'une cellule hématimétrique (cellule de Thoma). La suspension de spores fongiques a été ajustée à environ 10^5 spores/mL (Figure 15).

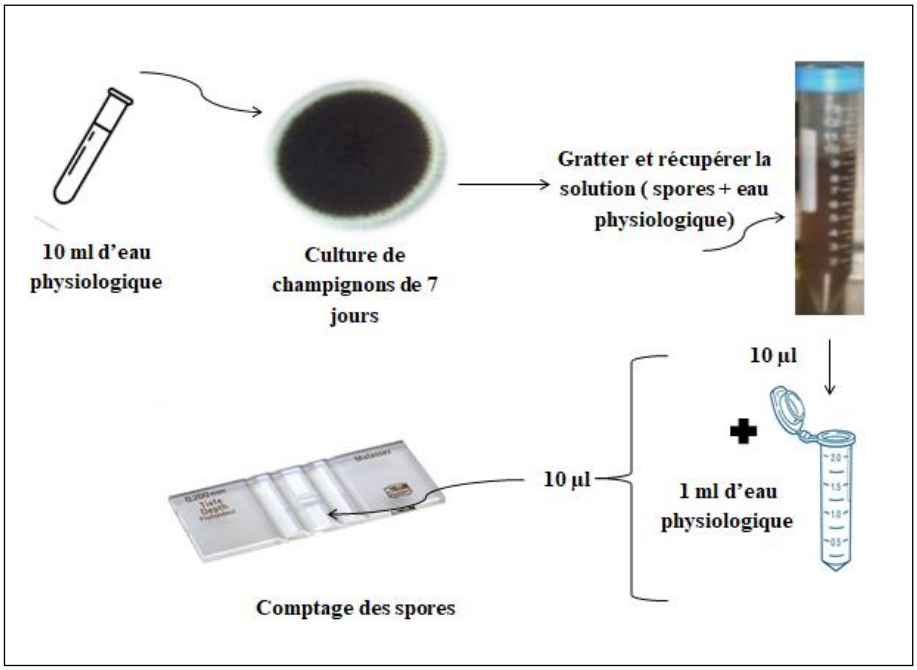


Figure 15. Schéma expérimental de la préparation de la solution sporale.

Inoculation et incubation

Le milieu CYA a été préparé et autoclavé à 121°C pendant 20 min. Chaque fongicide testé, à une concentration donnée, a été incorporé aseptiquement dans le milieu CYA maintenu en surfusion entre 45°C-50°C puis coulé dans des boites de Pétri de 90 mm de diamètre. Après refroidissement et solidification du milieu, un volume de 10 µL de la solution sporale ajustée à 10^5 spores/mL ont servi pour l'inoculation du milieu culture. Les témoins ont été réalisés dans les mêmes conditions mais sans ajout de fongicides. Pour chaque concentration, les essais ont été réalisés en triple. Toutes les boites ont été incubées à 25°C à l'obscurité.

2.3. Evaluation de la croissance fongique et de l'efficacité du fongicide

Les boites de Pétri ont été examinées chaque jour, au cours de la période d'incubation, et les deux diamètres perpendiculaires des colonies en croissance ont été déterminés. La pente de la droite obtenue par régression linéaire du rayon de la colonie en fonction du temps a été utilisée pour déterminer le taux de croissance (mm/jour). La phase de latence a été déterminée, elle correspond au temps (jours) au bout duquel chaque colonie atteint un diamètre de 5 mm (Astoreca *et al*., 2009). L'efficacité du fongicide a été estimée par le pourcentage d'inhibition selon la formule suivante :

$$\% \mathbf{I} = \frac{\mathbf{Ct} - \mathbf{Cf}}{\mathbf{Ct}} * \mathbf{100}$$

Ct= Taux de croissance des colonies témoins

Cf= Taux de croissance en présence du fongicide

2.4. Extraction et analyse de l'OTA du milieu de culture

Extraction de l'OTA

L'extraction de l'OTA a été réalisée suivant la méthode de Bragulat *et al***.** (2001) (Figure 16). Après sept jours d'incubation, à l'aide d'un emporte-pièce, trois carottes (7 mm de diamètre) ont été prélevées à partir de chaque boite (à partir du centre, du milieu et de l'extrémité de la colonie), pesées et introduites dans un microtube auxquelles 1 ml de méthanol a été ajouté. Les microtubes ont été agités pendant 5 secondes à l'aide d'un vortex et incubés pendant 60 minutes à 25 °C. Les microtubes ont été ensuite centrifugés 3 fois à 13000 t/min pendant 10 minutes, le surnageant ainsi obtenu a été filtré (filtre millipore PVDF hydropholic, Acrodisk LC 13, 0.2 µm de diamètre des pores). Les extraits de l'OTA ont été conservés à -18° C jusqu'à l'analyse.

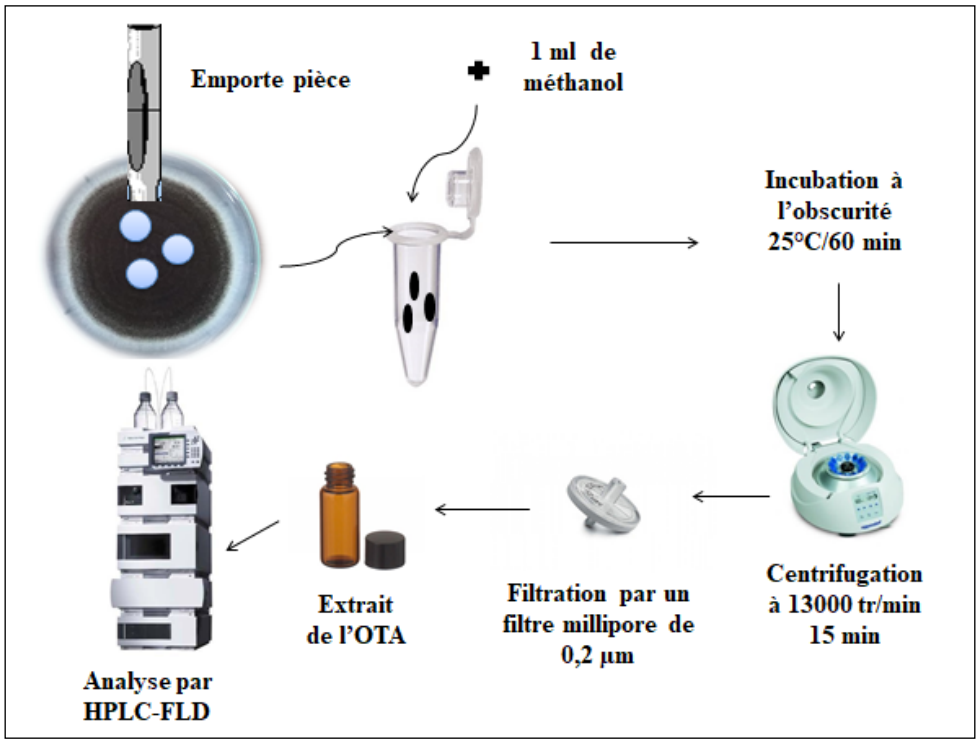


Figure 16. Schéma expérimental de la technique d'extraction de l'OTA.

Analyse des extraits de cultures par HPLC-FLD

L'analyse de l'OTA a été réalisée par chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) à l'aide d'un chromatographe en phase liquide (HP Agilent Technologies série 1100) (Figure 17) équipé d'une boucle d'injection de 20 µL et couplé à un détecteur fluorimétrique de type HP G132A. Les métabolites des extraits fongiques ont été séparés sur une colonne en phase inverse (Zorbax SB-C18, 4.6 x 250 mm, l'épaisseur du film est de 5 µm). La détection par fluorescence a été réalisée à une longueur d'onde d'excitation de 330 nm et une longueur d'onde d'émission de 460 nm. La phase mobile est pompée à un débit de 1 mL/min et l'OTA a été analysée en mode isocratique (Acétonitrile/eau/acide acétique : 99/2/99 ; V/V/V). Le volume d'injection est de 20 µL.



Figure 17. Photo d'un chromatographe en phase liquide à haute performance Agilent Technologies série HP 1100 (LASSA-FSDM, USMBA).

2.5. Effet de l'interaction fongicides-activité de l'eau sur la croissance fongique et la production d'OTA

Pour cette expérience, nous avons étudié l'effet de l'interaction des fongicides (Hexa, Ortiva et Pyrus) et de trois activités de l'eau (a_W) (0.90 ; 0.95 ; 0.99) sur la croissance fongique de 5 souches sélectionnées (*A. carbonarius* et *A. niger*). Pour ajuster les activités de l'eau, des quantités bien déterminées de glycérol ont été ajoutées au milieu CYA (Tableau 8). Après stérilisation à 121°C pendant 20 min, le milieu est maintenu en surfusion entre 40 et 45°C, et

on ajoute les volumes de fongicides adéquats pour obtenir les concentrations équivalentes à 2×DR ; 1.5×DR ; 1×DR ; 0.5×DR ; 0.02×DR ; 0.01×DR. Les milieux ainsi obtenus ont été coulés dans des boites de Pétri de 90 mm de diamètre. 10 µl de la solution sporale ajustée à 10^5 spores/mL ont été déposés au milieu de chaque boite. Tous les essais ont été réalisés en triple. Les témoins ont été réalisés à la même activité de l'eau mais en absence de fongicides. Toutes les boites ont été incubées pendant 7 jours à 25°C.

Tableau 8. Quantités (g) de soluté (glycérol) nécessaires pour 100 mL de milieu (CYA) à l'a_w requise (Belli *et al*., 2004).

Acivité de l'eau (a_w)	Glycérol (g/100 mL)
0.90	29.6
0.95	16.3
0.99	0

3. Effet des huiles essentielle sur la croissance fongique et la production d'OTA.

Pour réaliser cette étude trois HE appartenant à différents genres ont été sélectionnées. et le romarin ont été collectés de la ville de Fès, le thym provient de la région de Tighassaline près de la ville de Béni Mellal et le clou de girofle a été acheté d'un marché à Fès.

- Romarin : *Rosmarinus officinalis*
- Clou de girofle: *Syzygium aromaticum*
- Thym: *Thymus satureioides*

3.1. Extraction des huiles essentielles

L'huile essentielle a été extraite par hydrodistillation à l'aide d'un extracteur de type Clevenger (Figure 18). L'eau et 100 g de la partie aérienne de la plante préalablement séchée ont été placées dans un ballon et le mélange est porté à ébullition. En présence de la vapeur d'eau, les cellules végétales éclatent et libèrent les composés volatils (Guenther, 1972). Ces composés sont entrainés par la vapeur d'eau puis condensées via un réfrigérant. La phase organique du condensat (huile essentielle) est ensuite récupérée. Les rendements en HE ont été déterminés par rapport à 100 g de la matière sèche, estimée à partir d'échantillons séchés pendant trois jours à température ambiante.



Figure 18. Photo d'un appareil d'hydrodistillation de type Clevenger.

3.2. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles par GC-FID et GC-MS

L'analyse de la composition chimique des huiles essentielles été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) et par chromatographie couplée à un spectromètre de masse (GC-MS).

a) Analyse GC-FID

Le chromatographe (Thermo Finingan, Trace GC 2000) est équipé d'un injecteur split-splitless, d'un détecteur à ionisation de flamme, d'un détecteur olfactif, d'un intégrateur (Chromjet DP-700) et d'un système d'acquisition de données chromatographiques (logiciel ChromQuest version 4.2) (Figure 19). Les composés volatils ont été séparés sur une colonne capillaire (50 m x 0.32 mm Wall Coated Open Tubular (WCOT) ; CP-SIL5 CB (CHROMPACK), épaisseur du film de 1.2 µm). La température du four est maintenue à 36°C pendant 2 min et ensuite programmée de 36°C à 85°C avec une pente de 20°C/min puis jusqu'à 145°C à 1°C/min et enfin jusqu'à 250°C à 3°C/min. La température du four est maintenue à 250°C pendant 30 minutes. Le débit du gaz vecteur (azote) est de 1 mL/min. Les températures de l'injecteur et du détecteur sont respectivement de 225 et 275°C. L'huile essentielle diluée dans le dichlorométhane a été analysée en double et l'injection se fait en mode splitless avec ouverture du split à 0.80 min. La surface minimale des pics intégrés est fixée à 1000 µV.S. En sortie de colonne un diviseur permet d'envoyer la moitié de l'effluent vers le détecteur (FID) et l'autre moitié vers une sortie chauffée. Ce dispositif permet de flairer chaque composé volatil

séparé préalablement. En général la colonne se termine par un entonnoir dans lequel l'opérateur place son nez et tente alors de définir chaque odeur perçue, son intensité relative ainsi que le temps où il perçoit l'odeur. L'évaluation de l'odeur a été effectuée deux fois pour chaque extrait et par trois opérateurs. Les composés ont été identifiés sur base de leurs indices de rétention (IK) et de leurs odeurs en comparaison avec ceux des standards purs injectés.

Les indices de Kovats nous permettent d'identifier les composés volatils présents dans l'HE. Ils se basent sur la relation linéaire existant entre le temps de rétention (ou son logarithme, s'il n'y a pas de programmation de température) et le nombre d'atomes de carbone d'une série d'alcanes. Ainsi, le temps de rétention de chaque composé analysé par chromatographie peut être comparé à deux alcanes, l'encadrant sur le chromatogramme et converti en indice de Kovats. Par définition l'indice de Kovats d'un alcane est fixé à 100 fois son nombre d'atomes de carbone (n). Le grand avantage des IK est leur constance pour une phase stationnaire donnée et cela, quelle que soient les conditions expérimentales. L'indice de Kovats des composés organiques volatils est calculé d'après la formule suivante.

IKx= [(TRx- TRn)/(TRn+1-TRn)] x 100 + IKn

IKx : indice de Kovats du composé x.
IKn : indice de Kovats de l'alcane à n atomes de carbones = 100 x n.
TRn et TRn+1 sont les temps de rétention (en minutes) des deux alcanes qui encadrent, dans le chromatogramme, le composé x.
TRx= temps de rétention du composé x.



Figure 19. Photo d'un chromatographe en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) (LASSA-FSDM, USMBA).

b) Analyse GC-MS

Le chromatographe (Thermo Fischer, Trace GC ULTRA) (Figure 20) est couplé à un spectromètre de masse à trappe d'ions (Thermo Fischer, Polaris Q). L'ionisation se fait par impact électronique (70 eV). La source et l'interface sont maintenues à 200 et 300°C, respectivement. L'injection se fait en mode split. La séparation est réalisée sur une colonne capillaire (60 m x 0.32 mm WCOT CP SIL 5 CB, épaisseur du film 0.25 µm). La température du four est maintenue à 36°C pendant 2 min et programmée ensuite de 36°C à 85°C avec une pente de 20°C/min, puis jusque 145°C à 1°C/min et enfin jusqu'à 250°C à 3°C/min. Le four est maintenu à 250°C pendant 30 min. Le débit du gaz vecteur (hélium) est de 1 mL/min. La température de l'injecteur est de 225°C. La spectrométrie de masse l'ionisation et la fragmentation des composés présents dans l'échantillon. L'identification de chaque composé séparé par GC a été réalisée sur base de leurs spectres de masse comparés à ceux de la banque de données NIST et sur base de leurs indices de rétentions (IK) comparées à ceux des standards injectés sur la même colonne en GC-MS et en GC-FID. L'analyse des composés volatils par GC-MS a été réalisée au Centre Universitaire Régional d'Interface de l'Université Sidi Mohamed Ben Abdellah (CURI).



Figure 20. Photo d'un chromatographe en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) (CURI, USMBA).

3.3. Ajout des HE et inoculation du milieu CYA

Les tests antifongiques (*in vitro*) ont été réalisés selon la méthode rapportée par Remmal *et al*. (1993). L'huile essentielle est émulsionnée par une solution d'agar à 0.2 % afin de disperser les composés. Des volumes de cette dilution ont été ajoutés au milieu CYA stérilisé et refroidi à 45-50°C. Les concentrations finales en huile essentielle sont 25, 50, 100, 200 et 500 µL/L. Des témoins contenant le milieu de culture seule ont également été préparés. Tous les essais ont été réalisés en triple. 10 µL de la solution sporale ajustée à 10^5 spore/mL sont déposés au milieu de chaque boite le tout est incubé à 25°C, à l'obscurité et pendant 7 jours. La détermination des taux de croissance et de la concentration de l'OTA a été réalisée selon les protocoles décrits dans les paragraphes 2.3 et 2.4.

En ce qui concerne l'étude de l'effet des HE du clou de girofle et du thym sur l'expression des gènes responsables de la biosynthèse de l'OTA par deux souches d'*A. carbonarius* et *A. niger*, les cultures ont été réalisées su milieu CYA liquide. Les HE ont été initialement dissous dans du Tween 20 stérile (solution aqueuse à 0,01%) qui a été utilisé comme émulsifiant pour faciliter la dispersion dans le milieu liquide. Des volumes de cette dilution ont été ajoutés au milieu CYA liquide stérilisé et refroidi à 45-50°C. Les concentrations finales en huile essentielle sont 25, 50, 100, 200 et 500 µL/L. Des témoins contenant uniquement le milieu de culture ont également été préparés. Tous les essais ont été réalisés en triple. 10 µL de la solution sporale ajustée à 10^5 spore/mL sont déposés dans des plaques multipuits (6 puits) contenant le milieu CYA supplémentés de différentes doses en HE (Figure 21), le tout est incubé à 25°C, à l'obscurité et pendant 7 jours.

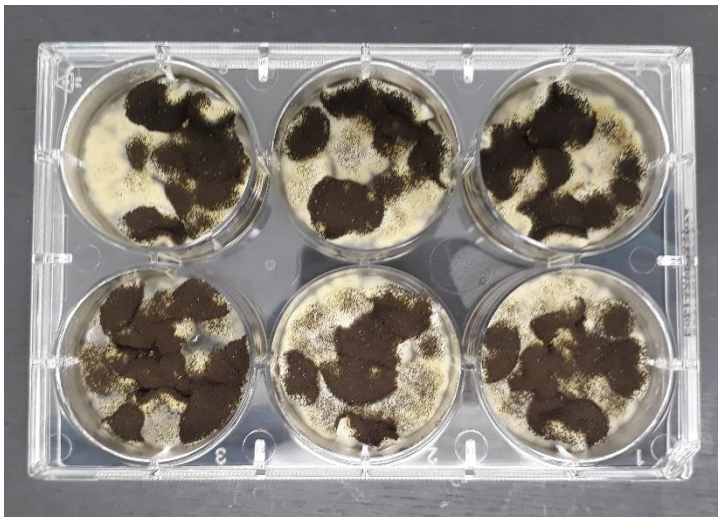


Figure 21. Photo de la culture d'une souche d'*A. carbonarius* sur milieu CYA liquide.

3.4. Extraction d'ARN et PCR en temps réel (q-RT-PCR)

Après 7 jours d'incubation, le mycélium est prélevé de chaque plaque, ensuite rincé par de l'eau millipore, puis filtré sur papier whatman. Un broyage du mycélium a été réalisé dans l'azote liquide pour stabiliser l'expression des gènes. Les mycéliums ont été conservés à -18° C jusqu'à l'extraction de l'ARN.

L'ARN total a été extrait en utilisant le réactif TRI (Sigma-Aldrich) selon les spécifications du fabricant, quantifié avec un spectrophotomètre (Quantus fluorometer ; Promega) et ensuite traité avec Turbo DNase (Ambion) pour éliminer la contamination de l'ADN génomique. L'ADN complémentaire du premier brin a été synthétisé à partir de 500 ng d'ARN total en utilisant le kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega). La présence d'ADN génomique a été vérifiée par électrophorèse sur gel (Figure 22).

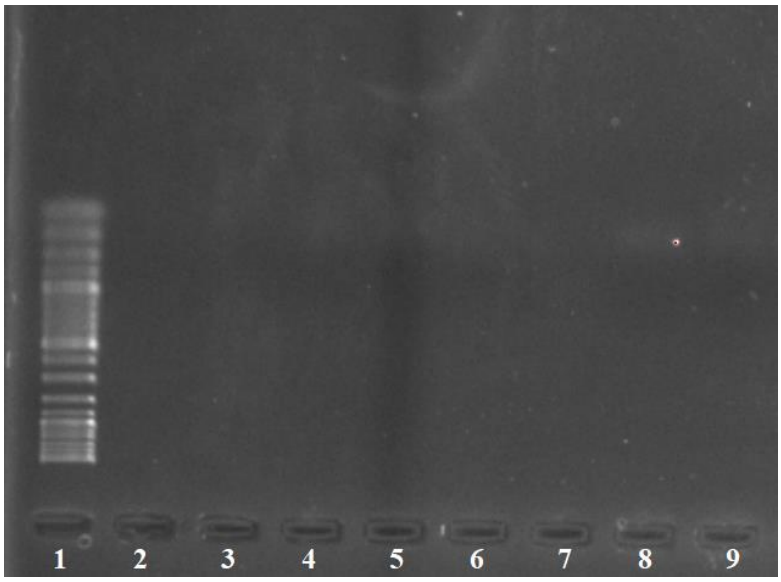


Figure 22. Vérification de la présence d'ADN génomique par électrophorèse sur gel d'agarose.

1: Standard; **2:** Témoin (MUCL 49226); **3:** Témoin (MUCL: 49345); **4:** MUCL 49226-G-25 µL/L; **5:** MUCL 49226-Th-25 µL/L; **6:** MUCL 49226-G- 50 µL/L; **7:** MUCL 49345-G-100 µL/L; **8:** MUCL 49345-th-100 µL/L; **9:** MUCL 49345-G-200 µL/L.

Les amorces utilisées pour les analyses de PCR en temps réel (q-RT-PCR) sont répertoriées dans le tableau 9. L'analyse q-RT-PCR a été réalisée en utilisant un système CFX96 (Bio-Rad) (Figure 23) et le kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega). Le profil thermique consistait en une étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 2 min, suivie de 40

cycles de 15 s à 95°C, 60 s et 60°C. Tous les calculs et analyses de la qualité des gènes de référence ont été effectués à l'aide du logiciel qBase+ (Biogazelle).



Figure 23. Système PCR en temps réel (q-RT-PCR) CFX96 (Bio-Rad).

Tableau 9. Liste des amorces utilisées.

Amorce	Séquence (5'→3')
acOTApks-F	CGTGTCCGATACTGTCTGTGA
acOTApks-R	GCATGGAGTCCTCAAGAACC
acOTAnrps-F	ATCCCCGGAATATTGGCACC
acOTAnrps-R	CCTTCGATCAAGAGCTCCCC
laeA-F	CACCTATACAACCTCCGAACC
laeA-R	GGTTCGGCCAACCGACGACGC
veA-F	TCCCGGTTCTCACAGGCGTA
veA-R	GCTGTCCTTGGTCTCCTCGTA
β-tubulin-F	CGCATGAACGTCTACTTCAACG
β-tubulin-R	AGTTGTTACCAGCACCGGA
calmodulin-F	CCAGATCACCACCAAGGAGC
calmodulin-R	GTTATCGCGGTCGAAGACCT
HAL_nigF	GCACGAGACAGTCCCGTCTTA
HAL_nigR	GGTTACCGCATCGAGTACCT
NRPS_nigF	CGAACATGCTCGAGCACGCTT
NRPS_nigR	CCACTCTTGCAACTGCTGTTGA
PKS_nigF	GTCCTGTCCGAGATTCGACGA
PKS_nigR	CTCCAATGAGAAGGTATGACGCA

3.5. Etude *in vivo* de l'effet antifongique des huiles essentielles

Les raisins ont été obtenus sur le marché de Gand (Belgique) et triés pour l'uniformité de la taille, de la forme et l'absence de défauts physiques. Les fruits ont été immergés dans la solution d'hypochlorite de sodium à 2% pendant 2 min, rincés avec de l'eau distillé et séchés à température ambiante. La chaire de chaque raisin a été prélevée (environ 2 mm de profondeur) à l'aide d'un emporte-pièce stérile près de la région équatoriale des fruits. Par la suite, les raisins ont été pulvérisés par différentes concentrations en huiles essentielles sélectionnées (clou de girofle ou thym). Après 1 h de traitement, les centres des parties des fruits prélevées (traitées ou non par les HE) ont été inoculés par une suspension sporale (10 µL, 10^5 spores / mL). Après l'inoculation, les raisins traités ont été stockés dans des boîtes en plastique de polyéthylène dans des conditions humides à température ambiante. Chaque traitement a été réalisé trois fois et l'expérience a été effectuée deux fois. Après 10 jours d'incubation, les baies de raisin ont été analysées par un PathoViewer qui est un système de phénotypage végétal, destiné à l'imagerie multispectrale haute résolution dans un environnement hautement contrôlable. Le système est composé d'une caméra 6Mp - 16 bits montée sur un robot à coordonnées cartésiennes, et peut être utilisé pour surveiller l'effet du stress biotique (par exemple pathogènes fongiques) et abiotique (par exemple sécheresse) sur un grand nombre de semis et de petites plantes (Figure 24). Par ailleurs, ce PathoViewer nous a permis de déterminer le pourcentage de contamination (calculé par rapport à la superficie de la baie de raisin) (RGB%), et aussi de l'indice d'anthocyanes (AriIdx).

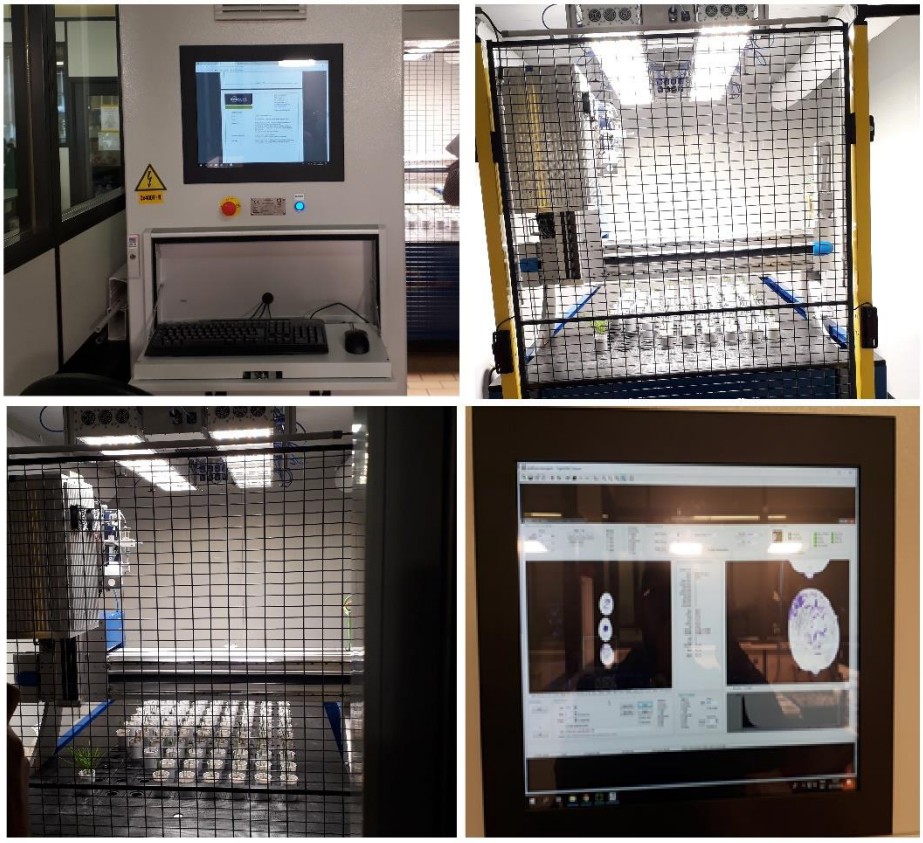


Figure 24. Photos du PathoViewer (LAMP-UGent, Belgique).

4. Analyse statistique des résultats

Les régressions linéaires des rayons des colonies en fonction du temps (jours), pour la détermination des taux de croissance (mm/jour), ont été obtenues par le programme Microsoft Excel version 2013. L'analyse de la variance pour l'effet de l'interaction des différents traitements sur la croissance et les concentrations d'OTA produites a été réalisée à l'aide du logiciel SPSS 20.0 (Statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL, USA).

Chapitre III

Effet combiné des fongicides et de l'activité de l'eau sur la croissance fongique et la production de l'ochratoxine A par des souches d'*Aspergillus carbonarius* et *A. niger*

CHAPITRE III : Effet combiné des fongicides et de l'activité de l'eau sur la croissance fongique et la production de l'ochratoxine A par des souches d'*Aspergillus carbonarius* et *A. niger*

I. Introduction

La pourriture noire d'*Aspergillus* sur les baies de raisin est une maladie particulièrement grave dans les pays producteurs des raisins et des produits dérivés comme la France, l'Italie, la Grèce, l'Espagne, l'Égypte, l'Algérie, la Tunisie et le Maroc (Marin *et al*., 2008). Les principaux agents responsables de cette contamination dans les champs sont des espèces *d'Aspergillus* de la section *Nigri*, et en particulier *Aspergillus carbonarius* et les espèces d'*Aspergillus niger* agrégats. Ces champignons sont aussi capables de produire l'OTA et cette production dépend de plusieurs facteurs tels que la température, le pH du milieu et l'activité de l'eau (a_w). Les températures élevées et la lumière du soleil pendant la maturation des raisins favorisent le développement des Aspergilli noirs, ce qui les rend des colonisateurs communs des vignobles (Taniwaki et *al.*, 2018). Cependant, il ne semble pas que les souches d*'Aspergillus sp*. puissent pénétrer par la peau intacte des raisins. La contamination des baies de raisin au cours de la maturation serait favorisée d'une part, par les dommages mécaniques dus à l'équipement de culture ou de récolte, et d'autre part, dans certains cultivars suite à l'éclatement des pellicules de baies par des pluies. Une fois la pellicule traversée, les souches d'*Aspergillus* prospèrent dans un environnement acide et riche en sucres (Pitt et *al.*, 2012), ce qui permettra à certaines espèces de croitre et de produire l'OTA jusqu'à ce que les raisins sèchent à une activité de l'eau inférieure à 0.80 (Hocking et *al.*, 2003). En termes de prévention, il est indispensable de lutter contre le développement de champignons producteurs de l'OTA et de mettre en place des moyens de détoxification des produits agricoles contaminés. Le contrôle chimique des champignons par l'utilisation des fongicides de synthèse compte parmi les stratégies les plus utilisées. Plusieurs études sur l'efficacité de différents fongicides ont montré que ces substances chimiques réduisent la croissance fongique mais stimulent dans certains cas la production de l'OTA (Belli *et al.*, 2006 ; Qjidaa, 2015 ; Terra *et al*., 2016 ; Zouhair, 2017).

Dans ce contexte et pour contribuer à la réduction des risques sanitaires et des résidus de fongicides dans les produits agricoles, nous avons évalué l'effet combiné de l'activité de l'eau et différentes concentrations de trois fongicides, utilisés au Maroc pour le contrôle des maladies fongiques de la vigne, d'une part sur la croissance radiale et d'autres part, sur la production de l'OTA par des souches d'*A. carbonarius* et *A. niger*

II. Article publié dans le journal « South Asian Journal of Experimental Biology »

South Asian J Exp Biol; 7 (2): 84-91; 2017

South Asian Journal of Experimental Biology

ISSN: 2230-9799 Vol. 7, Issue 2, Page 84-91 http://www.sajeb.org

REGULAR ARTICLE

Chemical control of fungal growth and ochratoxin A production by *Aspergillus* isolated from Moroccan grapes

Adil Laaziz[1*], Souad Qjidaa[1], Yousra El Hammoudi[1], Abdelouahed Hajjaji[1, 2] and Amina Bouseta[1]

[1]*Laboratory of Agro-food and Safety of Food, Faculty of Sciences Dhar El Mahraz, Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Fez, Morocco*
[2]*Polyvalent Laboratory in Research and Development, Polydisciplinary Faculty, Sultan Moulay Slimane University,Beni Mellal, Morocco*

ARTICLE INFO

Article History:
Received: 4 Oct 2017
Revised: 17 Nov 2017
Accepted: 20 Nov 2017

**Corresponding Author:*
Email: adil.laaziz@usmba.ac.ma
Telephone: +212674545974

Keywords: Fungicides, Ochratoxin A, fungal growth, *Aspergillus carbonarius, Aspergillus niger*

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of three fungicides azoxystrobin (Ortiva), hexaconazole (Hexa) and pyrimethanil (Pyrus) for their ability to inhibit the radial growth and ochratoxin A (OTA) production by five ochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* previously isolated from Moroccan grapes. Our results showed that, the addition of the fungicides to the Czapek Yeast Autolysate agar culture medium reduced the growth of the ochratoxigenic strains. Pyrimethanil caused total inhibition of spore germination and growth of the five strains, for all dose tested. Whereas hexaconazole totally inhibited the growth of 4 strains and gave growth for the MUCL 49227 strain (2.67 mm/day) at sub-lethal concentration. The reduction in radial growth was less marked for azoxystrobin, with growth rate varying between 0 and 6.37 mm/day depending on the strain and the azoxystrobin concentration. Analysis of variance showed that the effect of single factors (fungicides, concentration and strain) and their interactions on growth and OTA production were highly significant (P=0.000).These findings suggest that the use of tested fungicides have to potential for reduction in production of OTA.

1. Introduction

Ochratoxin A (OTA) is a very important mycotoxin which can be produced by *Aspergillus* and *Penicillium* species; indeed the *Aspergilli* like *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. steynii*, *A. tubingensis* or *A. ochraceus* are mainly responsible for the occurrence of OTA in agricultural products. They contaminate them, in the field or during storage, resulting in significant economic loss and are among the leading causes of deterioration in crop production. The contamination of grape products by this mycotoxin is mainly due to the contamination of grapes by some species of *Aspergillus* section *Nigri* with a prevalence of *A. carbonarius* in Europe and *A. niger* aggregate in Morocco (Diaz et al., 2009; Selouane et al., 2009a). Selouane et al. (2009a) reported that 42.8% of Moroccan *A. niger* aggregate isolates were able to synthesize OTA. Furthermore, the infection of grapes can be initiated by *A. carbonarius* at the veraison stage and the period between early veraison and harvesting can be considered as critical period (Battilani et al., 2003)

Ochratoxin A has been described as nephrotoxic, carcinogenic, hepatotoxic, neurotoxic, immunosup-

pressive and teratogenic in animals (Murphy et al., 2006; IARC, 2009; Coronel et al., 2010), it has been classified as possible carcinogen in humans (group 2B) by the International Agency for Research in Cancer (IARC., 1993). The ochratoxin A has been associated with nephropathy in humans from the Balkan area (Balkan Endemic Nephropathy; BEN) (Marquardt and Frohlich., 1992). In European countries, the maximum tolerable levels of this mycotoxin in raisins and sultanas were set to 10 and 2 µg/Kg, respectively (Commission of the European Communities, 2006). So OTA has also been frequently found in a wide variety of agricultural and food products such as cereals and derived products (Hajjaji et al., 2006; Duarte et al., 2010a; Duarte et al., 2010b; Gamza et al., 2015), cocoa (Bonveh., 2004; Copetti et al., 2010), coffee beans (Al-Hazmi., 2010; Drunday and Pacin., 2013), grapes, grape and apple juices (Battilani et al., 2006; Leong et al., 2006a) and spices (Ramesh and Jayagoudar., 2014; Wan Ainiza et al., 2015).

To minimize the potential hazard due to the presence of mycotoxins in foods, prevention measures of the growth of mycotoxin producing fungi have been recommended. The most effective strategies to reduce mycotoxin contamination of agricultural products, chemical control using the fungicides have often used to reduce fungal growth. However, the complex interaction of environmental factors on growth and the production of mycotoxins make difficult the control of mycotoxin risk. Furthermore, biosynthesis of mycotoxins may be stimulated if certain environmental stress factors and low fungicide doses are maintained during the growth of mycotoxin producing fungi (Belli et al., 2006; Medina et al., 2007; Mateo et al., 2011). Study by Zouhair et al. (2014) showed that the application of sub-lethal doses of hexacoazole, pyrimethanil or azoxystrobin led to a decrease of growth rate and an increase in OTA production by *A. carbonarius* and *A. niger*. The stimulation of the OTA production depends on the strain, the nature and the applied concentrations of fungicides. The prevention of the growth of the mycotoxin producing fungi is the most effective strategy for controlling the presence of mycotoxins in crops. It is important to evaluate the effectiveness of agricultural practices, including application of fungicides. For this reason, the aim of this study was to test the *in vitro* efficacy of three fungicides used in vineyards, against ochratoxigenic strains of *A. carbonarius* and *A. niger* isolated from Moroccan grapes in relation to both growth and OTA production.

2. Materials and Methods

2.1. Fungal strains and culture conditions

Three strains of *A. carbonarius* (MUCL 49232, MUCL 49233 and MUCL 49345) and two strains of *A. niger* (MUCL 49226 and MUCL 49227) previously isolated from Moroccan grapes and deposited at BCCM/ MUCL (Mycothèque de l'Université catholique de Louvain, Belgium) were used. Molecular fungal identification was performed at MUCL according to the method described by Selouane et al. (2009b). Prior to the study, OTA production by the five strains was confirmed *in vitro* on Czapek Yeast Autolysate agar (CYA). The strains (suspensions of spores) were maintained in 25% glycerol- 0.01% Tween 80 at -20°C. Inocula were prepared by growing each strain on CYA at 25°C for seven days. Suspensions of spores (~10^6 spores/mL) were prepared in sterile distilled water containing 5‰ Tween 80. A Thoma chamber was used to determine the final spore number.

2.2. Modification of media with fungicides

Studies were carried out *in vitro* using a CYA medium. Three fungicides were investigated in the present study, namely Hexa, Ortiva and Pyrus. The active ingredient, product name, recommended dose (RD: dose recommended by the manufacturers) and company of the fungicide used in this study are shown in Table 1. Recommended dose is studied according to the toxicity of the active ingredient of the fungicide. For azoxystrobin, pyrimethanil and hexaconazole, maximum residue levels (MRLs) in grapes are 3, 5 and 0.01mg/Kg respectively (Commission of the European Communities, 2012; Commission of the European Communities, 2017). Diluted solutions of the fungicide were prepared by mixing appropriate amounts in sterile deionized water and used immediately after preparation. A solid medium of CYA was maintained at 45-50°C. Then, appropriate volume of fungicide stock solution was aseptically added to obtain the target concentrations in the autoclaved medium. No fungicide was added to control plates (Control). Flasks of molten media were thoroughly shaken prior to pouring into sterile Petri dishes, to ensure that an even dispersion of the fungicide treatment was obtained. CYA plates with decreasing concentrations of those fungicides (RD: recommended dose by the manufacturer; 2×RD; 1.5×DH; 1×RD; 0.5×RD; 0.02×RD and 0.01×RD) and control plates were single-point inoculated with 10 µL of the suspension of the fungal spores (approximately 10^4spores) as a

Fungicides name	Active ingredient	Concentration of active ingredient	Manufacturers	Recommended dose
Pyrus	Pyrimethanil	400 g/L	PHILEA	2.5 mL/L
Hexa	Hexaconazole	50 g/L	PROTECO	5 mL/L
Ortiva	Azoxystrobin	250 g/L	SYNGENTA	8 mL/L

Table 1: Fungicides used, their names, active ingredients and manufacturers.

Concentrations	Lag phase (day)		
	Ortiva	Hexa	Pyrus
Control	1	1	1
0.01×RD	2	6	NG
0.02×RD	2	NG	NG
0.5×RD	2	NG	NG
RD	2	NG	NG
1.5×RD	2-3	NG	NG
2×RD	2-3	NG	NG

Table 2: Effects of fungicides concentrations on the lag phases (day) of *A. carbonarius* and *A. niger*.
NG = No Growth

Source of variation	Growth study				OTA production study			
	DF[a]	MS[b]	F	P	DF[a]	MS[b]	F	P
Strain (S)	4	0.827	117.728	0.000	4	12611.477	71.229	0.000
Fungicide (F)	2	536.971	76453.578	0.000				
Concentration (C)	6	222.155	31630.316	0.000	6	4204.661	23.748	0.000
S×F	8	1.764	55.482	0.000				
S×C	24	0.390	203.10	0.000	24	1730	9.775	0.000
F×C	12	18.207	2592.350	0.000				
S×F×C	48	0.341	48.507	0.000				

Table 3: Analysis of variance of the effects of strains, concentrations of different fungicides and their interaction on growth rates and OTA production by *A. carbonarius* and *A. niger* strains.
[a]DF, degree of freedom
[b]MS, mean square

drop at the center of the plate. All the experiments were carried out in triplicate for the growth survey. The Petri plates were examined daily, and the diameter of the colonies was measured in two perpendicular directions during a period of 7 days. Linear regression of colony radius (mm) against time (days elapsed from the day the colon was 5 mm diameter) was used to determine growth rates (mm/day). Lag phase for growth was considered as the time (days) elapsed between inoculation and the time when fungal growth became evident (colony reaches 5 mm of diameter) for each treatment (Astoreca et al., 2009).

2.3. Extraction and HPLC analysis of OTA from cultures

Ochratoxin A was extracted according to the method of Bragulat et al. (2001). Briefly, three agar plugs (diameter = 7 mm) were removed from the inner, middle, and outer areas of each colony. Plugs were weighed and dispensed into 3mL vials before adding 1 mL of methanol. The vials were shaken for 5 sec with an autovortex and incubated standing at 25°C for 60 min. The extracts were centrifuged three times for 10 min at 13,000 rpm; the supernatant, filter-sterilized through a PVDF hydrophilic filter (0.22 µm) and then analysed by HPLC (Agilent Technologies, USA) with fluorescence detection (excitation 333 nm, emission 460 nm; calibration with OTA standard (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany). The separation of metabolites was performed on a C18 reverse-phase column (Zorbax SB, 4.6×250 mm × 5 µm particle size). The OTA was analyzed in isocratic mode, the mobile phase (acetonitrile-water-acetic acid; 99:99:2, v/v//v) was pumped at 0.7 $mL.min^{-1}$ and the injection volume is 20 µL. Run time for samples was 30 min with OTA being detected at about 11 min. The identification of the OTA has been carried out by comparing the retention time of the peaks of the extract with the OTA standard and by co-injection. The final concentration (expressed in µg/g CYA) has been determined on the basis of a right of calibration established for each series of analysis. All analysis were

Fungicide	Isolates / Doses[a)]	OTA (µg/g CYA)[b)] (Mean±S.D.[c)])				
		Aspergillus carbonarius			*Aspergillus niger*	
		MUCL49232	MUCL49233	MUCL49245	MUCL49226	MUCL49227
Pyrimethanil	Control	0.16 ± 0.097	0.11 ± 0.01	123.59 ± 39.40	0.40 ± 0.33	126.16 ± 27.77
	0.01×RD	NG[e)]	NG	NG	NG	NG
	0.02×RD	NG	NG	NG	NG	NG
	0.5×RD	NG	NG	NG	NG	NG
	RD	NG	NG	NG	NG	NG
	1.5×RD	NG	NG	NG	NG	NG
	2×RD	NG	NG	NG	NG	NG
Hexaconazole	Control	0.16 ± 0.097	0.11 ± 0.01	123.59 ± 39.40	0.40 ± 0.33	126.16 ± 27.77
	0.01×RD	NG	NG	NG	ND[d)]	NG
	0.02×RD	NG	NG	NG	NG	NG
	0.5×RD	NG	NG	NG	NG	NG
	RD	NG	NG	NG	NG	NG
	1.5×RD	NG	NG	NG	NG	NG
	2×RD	NG	NG	NG	NG	NG
Azoxystrobin	Control	0.16 ± 0.01	0.11 ± 0.01	123.59 ± 39.40	0.40 ± 0.33	126.16 ± 27.77
	0.01×RD	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	55.20 ± 29.30	0.34 ± 0.21	103.78 ± 26.47
	0.02×RD	0.09 ± 0.00	0.08 ± 0.01	26.92 ± 8.64	0.50 ± 0.27	36.75 ± 35.94
	0.5×RD	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	19.97 ± 13.12	0.29 ± 0.11	20.65 ± 5.89
	RD	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.00	33.91 ± 13.22	0.20 ± 0.05	22.90 ± 14.53
	1.5×RD	0.10 ± 0.01	0.12 ± 0.00	17.44 ± 11.84	0.22 ± 0.14	19.10 ± 7.46
	2×RD	0.10 ± 0.20	0.13 ± 0.01	18.47 ± 10.35	0.32 ± 0.11	9.18 ± 1.90

Table 4: Effect of different concentrations of three fungicides on ochratoxin A production by *A. carbonarius* and *A. niger* strains on CYA medium.
[a)]Concentration of each fungicide was expressed as multiple of recommended dose (RD); [b)]means (n=3); [c)]S.D.: standard deviaton; [d)]N.D.: not detected; [e)]N.G.: no growth, CYA: Czapek Yeast Autolysate agar

done on triplicate.

2.4. Statistical analysis

Linear regression of the radius of the colony against time (days) to determine the growth rates (mm/day) under each set of conditions, was obtained with the program Microsoft Excel version 2013. Analysis of variance for the different sets of growth results and for the amounts of OTA detected was carried out using IBM SPSS Statistics, version 20.

3. Results

3.1. Effect of fungicides on lag-phase and fungal growth

Table 2 shows the effect of three antifungal agents on lag-phase of five strains typically found in Moroccan grapes, *A. carbonarius* and *A. niger*. The results indicate that the use of different commercial fungicides (Ortiva, Pyrus and Hexa) at various concentrations (0.01×RD; 0.02×RD; 0.5×RD; RD; 1.5×RD and 2×RD) has an effect in the lag-phase. After 7 days of incubation, no growth was observed in the presence of the fungicide Pyrus and Hexa at all concentrations. Hexa fungicide totally inhibited the growth of 4 strains at all concentrations and gives growth for the MUCL 49227 strain (*A. niger*) at a concentration of 0.01×RD. As shown in Table 2, the fungicide Ortiva increased the lag-phase depending on the dose of the fungicide. For the five ochratoxigenic strains, lag-phase varied of one to 3 days.

Figure 1 gives an example of the mycelial growth of an ochratoxigenic strain *A. carbonarius* (MUCL 49245) on CYA medium supplemented with different doses of azoxystrobin compared with the control. To assess the activity of the fungicides against the five fungal strains, the radial growth rates were determined. The mean radial growth rates (GR, mm/day) of three *A. carbonarius* and two *A. niger* were shown in Figure 2. Total inhibition of growth was observed, regardless of the isolate and the concentration of pyrimethanil fungicide. Another effective fungicide is Hexa which inhibit completely growth of strains at different doses, except for *A. niger* strain MUCL 49227 where low growth (2.67 mm/day) was observed at 0.01×RD. However, Ortiva fungicide had a little effect on growth rate. Indeed as shown in Figure 2, the radial growth rate decreased with increasing fungicide concentration, the mean inhibition rate of this fungicide varied

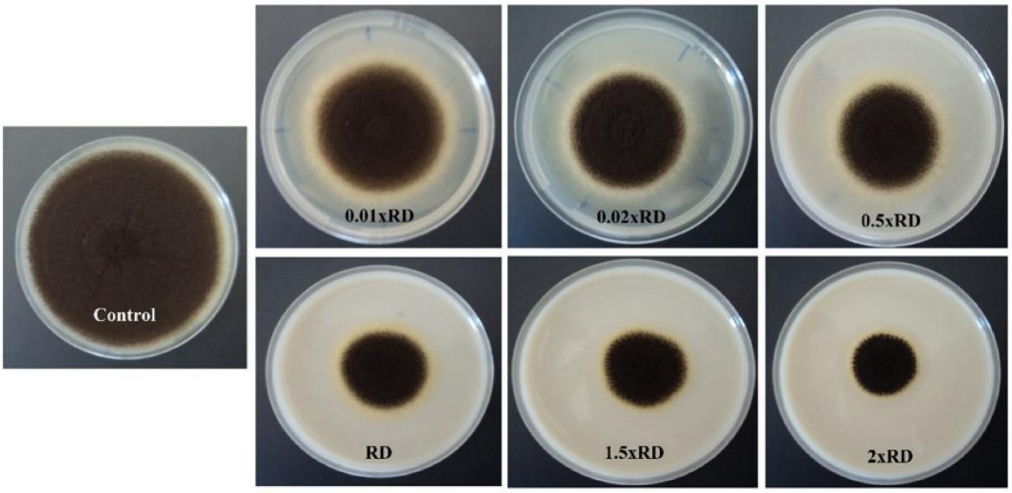


Figure 1: Phenotypical growth of the fungal ochratoxigenic strain *A. carbonarius* (MUCL 49245) on CYA agar plates either without supplement (Control) or supplemented with azoxystrobin at concentration of 0.01×RD to 2×RD.

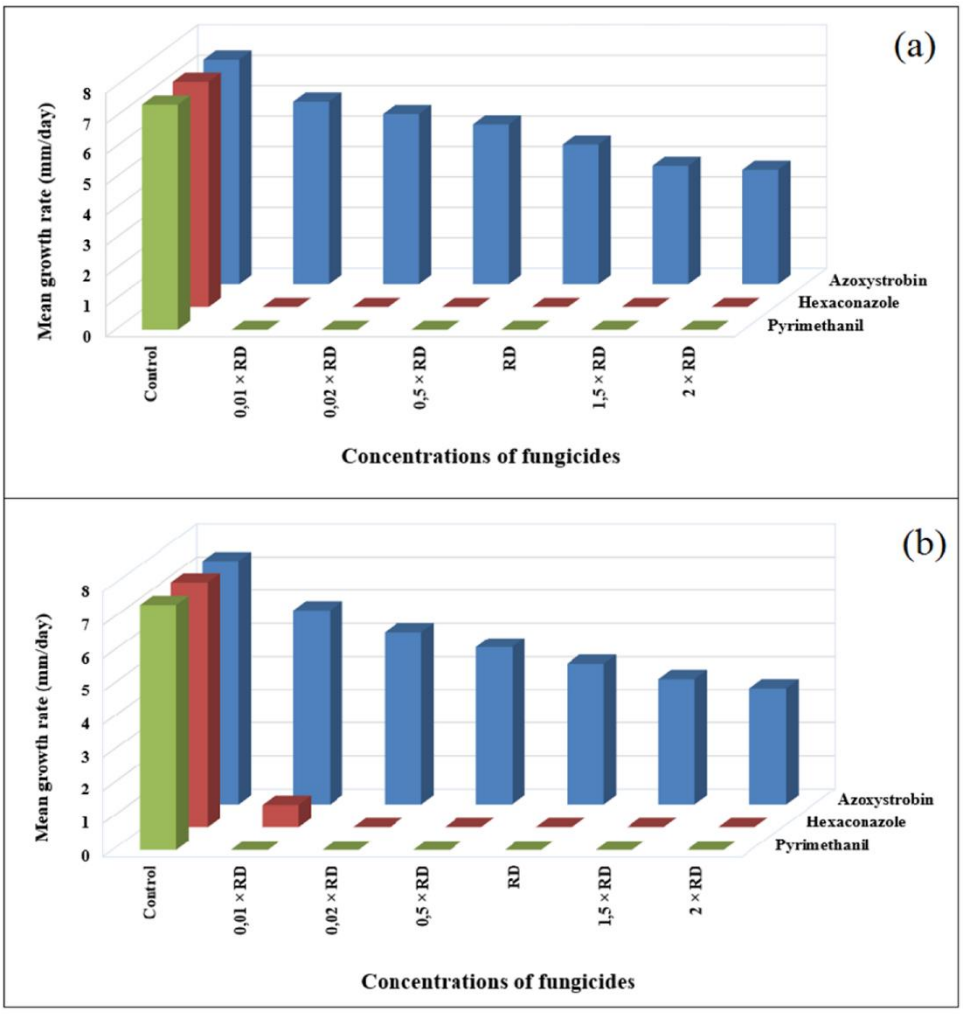


Figure 2: Mean growth rates (GR, mm/day) of *A.carbonarius* (a) and *A. niger* (b) on CYA medium supplemented with different doses (0: Control; 0.01×RD; 0.02×RD; 0.5×RD; RD; 1.5×RD 2×RD) of fungicides hexaconazole (Hexa), pyrimethanil (Pyrus) and azoxystrobin (Ortiva).

from 20 to 51.6%. Analysis of variance (ANOVA) (table 3) showed that the effect of all single factors (active ingredient of fungicide, concentration and strains) and their two or three interactions were highly significant.

3.2. Effect of fungicides on the production of ochratoxin A

The effect of the concentration range of fungicides treatments at 25°C on OTA production for all the strains tested are shown in Table 4. After 7 days of incubation, no growth was observed for all strains in presence of Pyrus whatever the fungicide dose used. For Hexa, no significant effect on OTA production was obtained at concentration where fungal growth was observed (0.01×RD) for *A. niger* (MUCL 49227). Liquid chromatography (HPLC) analysis of mycelial extracts of the strains grown on CYA medium supplemented with fungicide Ortiva, showed significant differences in ochratoxin A production. This fungicide seems to reduce the production of OTA for all the strains studied. In general, the production of toxin decreased when fungicide (Ortiva) dose increased. Analysis of variance of the effects of strains, concentrations and their interaction on OTA production by *A. carbonarius* and *A. niger* strains on CYA medium was shown in table 3. The interaction of two single factors (isolates, concentrations) had a high significant effect on OTA production by *A. carbonarius* and *A. niger.*

4. Discussion and Conclusions

Numerous studies showed that the use of fungicide can exert stimulatory or preventive effects on mycotoxin production; our study demonstrated the effectiveness of some fungicides used in vineyards on growth and OTA production by five Moroccan isolates of *A. carbonarius* and *A. niger*. It was found that treatment with Pyrus and Hexa had a strong inhibitory effect on the growth and development of all strains at all doses, except one isolate of *A. niger* (MUCL 49227) with a Hexa fungicide, these results partially agree with those obtained by Zouhair et al. (2014) who demonstrated that Hexa which inhibited completely growth at concentrations above 0.01×RD and strongly decreased growth rates for two strains of *A. carbonarius* and *A. niger* at lowest doses (72.0-73.8% for *A. carbonarius* and 86.7-92.2% for *A. niger*) , our results corroborated also those of Qjidaa et al. (2014) who reported that strains of *A. tubingensis and A. foetidus* were more sensitive to pyrimethanil, with a percentage inhibition varied from 57.4 to 100%. Yu et al. (2013), showed that the concentration of pyrimethanil above 40 µg/mL inhibited entirely the survival of *P. expansum*. Zouhair et al. (2014) have also reported that the inhibitory effect of pyrimethanil increased with increasing the concentration of the fungicide and varied from 54.1 to 100% and 24.3 to 100% for *A. carbonarius* and *A. niger*, respectively. In our study, Ortiva was tested for its ability to inhibit the fungal growth and OTA production by *A. carbonarius* and *A. niger* at different doses (0.01×RD to 2×RD). Furthermore our results showed that azoxystrobin was less effective against our fungal strains, these findings were corroborated studies of Schmidt-Heydt et al. (2013) who reported that azoxystrobin had little effect on growth rate with only slight decrease against *Cladosporium sp*. Zouhair et al. (2014) also reported that Azoxystrobin had less effect on the growth rate of *A. niger* with only a slight reduction of 3.8 to 57.2% and the percentage inhibition of fungal growth of *A. carbonarius* was below 74.4 %. Indeed, the azoxystrobin is a respiratory inhibitor that acts on mitochondria by blocking the transfer of electrons between cytochrome b and cytochrome c1 (Zheng et al., 2000).

Regarding OTA, in the present study the OTA production depends on the strain and the applied concentration of antifungal agents, the use of these fungicides seems to reduce the production of OTA. The same behavior was observed by Zouhair et al. (2014), where they have demonstrated that the application of azoxystrobin on a strain of *A. niger* did not stimulate the production of OTA. Similar effect was described by Belli et al. (2006) who reported that azoxystrobin had an effect on the growth rate of *A. carbonarius* and a reduction on OTA production. Lo Curto et al. (2004) have also reported that the application of different fungicides commonly used in grapes, such as azoxystrobin, dinocap and pencoazole, led to a decrease in OTA accumulation. The studies of Valero et al. (2007) tested the application of two pre-harvest fungicide treatments Chorus (cyprodinil) and Switch (37.5% cyprodinil+25% fludioxonil) on *Aspergillus* infection and on the OTA content of dehydrating grapes and showed that no differences between single or double applications of two fungal agents; both fungicides remained active on grapes during the drying process, reducing fungal growth and OTA synthesis.

The fungicides Pyrus (Pyrimethanil) and Hexa (Hexaconazole) were highly effective against *A. carbonarius* and *A. niger*. OTA contamination can be

reduced by correct agronomic management. The risk of developing resistant strains by the treatments by the fungicides must be taken into account.To follow up this work, additional studies should also be performed in order to explore the influence of the interaction of environmental factors (water activity and temperature) and fungicides on control of fungal growth and on mycotoxin production as well as on the key genes in the mycotoxin biosynthesis pathway.

References

Al-Hazmi NA (2010) Determination of patulin and ochratoxin A using HPLC in apple juice samples in Saudi Arabia. Saudi Journal of Biological Sciences 17: 353-359.

Astoreca A, Barberis C, Magnoli C, Combina M, Dalcero A (2009) Influence of ecophysiological factors on growth, lag phase and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate strains in irradiated corn grains. International Journal of Food Microbiology 129: 174-179.

Battilani P, Giorni P, Bertuzzi T, Formenti S, Pietri A (2006) Black aspergilli and ochratoxin A in grapes in Italy. International Journal of Food Microbiology 111: 53-60.

Battilani P, Giorni P, Pietri A (2003) Epidemiology of toxin producing fungi and ochratoxin A occurrence in grape. European Journal of Plant Pathology 109: 715-722.

Belli N, Marin S, Sanchis V, Ramos AJ (2006) Impact of fungicides on *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on synthetic grape-like medium and on grapes. Food Additives & Contaminants 23: 1021-1029.

Bonveh JA (2004) Occurrence of ochratoxin A in cocoa products and chocolate. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 6347-6352.

Bragulat MR, Abarca ML, Cabanes FJ (2001) An easy screening method for fungi producing Ochratoxin in Pure Culture. International Journal of Food Microbiology 71: 139-144.

Commission of the European Communities (2006) Commission Regulation (EC) No 1881/2006.Official Journal of the European Communities L 364: 5-24.

Commission of the European Communities (2012) Commission Regulation (EU) No 899/2012 Official Journal of the European Union L 273/1.

Commission of the European Communities (2017) Commission Regulation (EU) No 2017/171 Official Journal of the European Union L 30/45.

Copetti MV, Pereira JL, Iamanaka BT, Pitt JI, Taniwaki MH (2010) Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. International Journal of Food Microbiology 143: 67-70.

Coronel MB, Sanchis V, Ramos AJ, Marin S (2010) Ochratoxin A: presence in human plasma and intake estimation. Food science and Technology International 16: 5-18.

Díaz GA, Torres R, Vega M, Latorre BA (2009) Ochratoxigenic *Aspergillus* species on grapes from Chilean vineyards and *Aspergillus* threshold levels on grapes. International Journal of Food Microbiology 133: 195-199.

Drunday V, Pacin A (2013) Occurrence of ochratoxin A in coffee beans, ground roasted coffee and soluble coffee and method validation. Food Control 30: 675-678.

Duarte SC, Lino CM, Pena A (2010a) Mycotoxin food and feed regulation and the specific case of ochratoxin A: a review of the worldwide status. Food Additives & Contaminants 27: 1440-1450.

Duarte SC, Pena A, Lino CM (2010b) A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. Food Microbiology 27: 187-198.

Gamza NK, Ozbey F, Kabak B (2015) Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in cereal flours commercialised in Turkey. Food Control 54: 275-281.

Hajjaji A, El Otmani M, Bouya D, Bouseta A, Mathieu F, Collin S, Lebrihi A (2006) Occurrence of mycotoxins (ochratoxin A, deoxynivalenol) and toxigenic fungi in Moroccan wheat grains: impact of ecological factors on the growth and ochratoxin A production. Molecular Nutrition and Food Research 50: 494-499.

IARC International Agency for Research on Cancer (1993) IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans. IARC; Lyon, France 56: 489-521.

IARC International Agency for Research on Cancer (2009) Agents Reviewed by the IARC Monographs vols. 1-100a (by cas numbers) P:10.

Leong SLL, Hocking AD, Varelis P, Giannikopoulos G, Scott ES (2006a) Fate of ochratoxin A during vinification of Semillon and shiraz grapes. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 6460-6464.

Lo Curto R, Pellicano T, Vilasi F, Munafo P, Dugo G (2004) Ochratoxin A occurrence in experimental wines in relationship with different pesticide treatments on grapes. Food Chemestry 84: 71-75.

Marquardt RR, Frohlich AA (1992) A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. Journal of Animal Science 70: 2968-3988.

Mateo EM, Gil-Serna J, Patiño B, Jiménez M (2011) Aflatoxins and ochratoxin A in stored barley grain in Spain and impact of PCR based strategies to assess the occurrence of aflatoxigenic and ochratoxigenic *Aspergillus spp*. International Journal of Food Microbiology 149: 118-126.

Medina A, Mateo R, Valle-Algarra FM, Mateo EM, Jiménez M (2007) Effect of carbendazim and physicochemical factors on the growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius* isolated from grapes. International Journal of Food Microbiology 119: 230-235.

Murphy PA, Hendrich S, Landgren C, Bryant CM (2006) Food mycotoxins: an update. Journal of Food Science 71: 51-65.

Qjidaa S, Selouane A, Zouhair S, Bouya D, Decock C, Bouseta A (2014) In vitro effect of pyrimethanil on the fungal growth of ochratoxigenic and non-ochratoxigenic species of *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus foetidus* isolated from Moroccan grapes. South Asian Journal of Experimental Biology 4 (2): 76-84.

Ramesh Ch, Jayagoudar S (2014) Determination of ochratoxin A in spices from Dharwad by high performance liquid chromatography. Asian Journal of Plant Science and Research 4(1): 42-52.

Schmidt-Heydt M, Stoll D, Geisen R (2013) Fungicides effectively used for growth inhibition of several fungi could induce mycotoxin

biosynthesis in toxigenic species. International Journal of Food Microbiology 166: 407-412.

Selouane A, Bouya D, Lebrihi A, Bouseta A (2009b) Impact of some environmental factors on growth and production of ochratoxin A of/by *Aspergillus tubingensis, A. niger* and *A. carbonarius* isolated from Morrocan grapes. The Journal of Microbiology 411-419.

Selouane A, Zouhair S, Bouya D, Lebrihi A, Bouseta A. (2009a) Natural occurrence of ochratoxigenic *Aspergillus* species and ochratoxin A in Moroccan grapes. World Applied Sciences Journal 7: 297 -305.

Valero A, Marín S, Ramos AJ, Sanchis V (2007) Effect of preharvest fungicides and interacting fungi on *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A synthesis in dehydrating grapes. Letters in Applied Microbiology 45: 194-199.

Wan Ainiza WM, Jinap S, Sanny M (2015) Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in single and mixed spices. Food Control 50: 913-918.

Yu C, Zhou T, Sheng K, Zeng L, Ye C, Yu T, Zheng X (2013) Effect of pyrimethanil on *Cryptococcus laurentii*, *Rhodosporidium paludigenum*, and *Rhodotorula glutinis* biocontrol of *Penicillium expansum* infection in pear fruit. International Journal of Food Microbiology 164: 155-160.

Zheng D, Olaya G, Koller W (2000). Characterization of laboratory mutants of *Venturia inaequalis* resistant to the strobilurin-related fungicide kresoxim-methyl. Current Genetics 38: 148-155.

Zouhair S, Qjidaa S, Selouane A, Bouya D, Decock C, Bouseta A (2014) Effect of five fungicides on growth and ochratoxin A production by two *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus niger* isolated from Moroccan grapes. South Asian Journal of Experimental Biology 4 (3): 118-126.

South Asian Journal of Experimental Biology

ABOUT THE JOURNAL: SAJEB (eISSN: 2230-9799) is a peer-reviewed, open-access and online journal aimed at advancement and rapid dissemination of scientific knowledge generated by the highly motivated researchers in the field of biological sciences through publication of high-quality original research and critical up-to-date review articles covering all the aspects of biological sciences. Every year, it publishes six issues. SAJEB has received Global Impact Factor (GIF)-2015, 0.765; Index Copernicus Value-2015, 93.0 and NAAS (ICAR)-India 2017 rating, 4.79. SAJEB has been included in the ISI master list of journals of Thomson Reuters under Zoological Record. The SAJEB is also covered by CABI (UK), AGRICOLA, NLM catalogue, CAS (ACS, USA), DOAJ, Journal TOCs (ICBL, Edinburgh), Directory of research Journals Indexing (DRJI) and Indian Science Abstracts (ISA, NISCAIR).

III. Article à soumettre: Impact of fungicides and water activity on growth and ochratoxin A production by Aspergillus carbonarius and A. niger isolated from grapes

Adil Laaziz[1*], Yousra El Hammoudi[1], Souad Qjidaa[1], Abdelouahed Hajjaji[1, 2]
Hassan Hajjaj[3] and Amina Bouseta[1]

[1] Laboratory of Biotechnology, Environment, Agri-food and Health, Faculty of Sciences Dhar El Mahraz, Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Fez, Morocco

[2] Polyvalent Laboratory in Research and Development, Polydisciplinary Faculty, Sultan Moulay Slimane University,Beni Mellal, Morocco

[3] Laboratory of Plant Biotechnology and Molecular Biology, Faculty of Sciences, Moulay Ismail University, Meknes, Morocco

*Corresponding Author:
Telephone: +212674545974
Email: adil.laaziz@usmba.ac.ma

Abstract

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin produced mainly by *Aspergillus and Penicillium* species. To reduce fungal growth and mycotoxins production in agricultural products, the use of fungicides is often recommended. In this study, the combined effects of water activity (0.90 and 0.95) and three fungicides widely used in Morocco (ortiva "azoxystrobin", pyrus "pyrimethanil" and hexa "hexaconazole") at different concentrations on the lag phase, radial growth and OTA production by five ochratoxinogenic strains of *A. carbonarius* and *A. niger* on Czapek Yeast Autolysate agar (CYA) at 25°C, have been determined. Our results showed that, in general, the addition of fungicides reduced the rates of radial growth and increased the lag phase of all isolates. Pyrimethanil and hexaconazole completely inhibits the growth of all tested strains whatever the fungicide dose and water activity. Our results showed also that azoxystrobin was less effective than the other tested fungicides, the growth reduction was between 34.34 and 72.84% at 0.95 a_w and between 14.32 and 100% at 0.90 a_w. Indeed, the application of increasing doses of tested azoxystrobin at both water activities decreased OTA levels in cultures, for both *A. carbonarius* and *A. niger* strains; reduction was ranged from 90 to 97% at 0.95 a_w.

key words: Ochratoxin A; fungicides; water activity; fungal growth; *Aspergillus*.

Introduction

Fungal contamination is responsible for major economic losses for farmers and/or food industry, and affects safety of food by production of mycotoxins. According to the United Nations Food and Agriculture Organization, about 25% of crops are contaminated by mycotoxins and the total loss of foodstuff due to this contamination is estimated at nearly 1000 million tons per year (FAO, 2008). Among these toxins, ochratoxin A (OTA) is a natural contaminant of several food and agricultural products and widely-spread all over the world. Since its discovery in 1965 by a group of South African researchers (Van der Merwe *et al*., 1965), the OTA has been one of the most studied mycotoxins because of its adverse human health effects. Indeed, this toxin is nephrotoxic, carcinogenic, teratogenic and immunosuppressive (Maruya *et al*., 1982; Mally *et al*., 2005; Stoev *et al*., 2010). Moreover, the International Agency for research on Cancer (IARC) has categorized the OTA in the group 2B as a possible human carcinogen (IARC, 1993). To limit the risk of human exposure to this mycotoxin, the European Union (EU), as well as several countries included Morocco, have set maximum permitted levels of OTA in a wide range of food and feed (European Commission, 2006, 2007, 2010, 2012 ; Bulletin Officiel, 2016). To minimize fungal growth and mycotoxin production in foodstuffs, various physical (Kanapitsas *et al*., 2016; Ying Luo et al., 2018), microbiological (Bejaoui *et al.*, 2004; Del Prete *et al*., 2007) and chemical methods (Lo Curto *et al*., 2004; Bellí *et al*., 2006; Zouhair *et al*., 2014; Laaziz *et al*., 2017) have been tested. Chemical methods such as the use of synthetic fungicides have proven to be the most effective against fungal infections (Lo Curto *et al*., 2004). However, the use of synthetic chemical fungicides is progressively becoming limited by food safety regulations, because of their toxic effects for consumers by exposure to residues, and the development of resistant toxigenic fungi and other major plant pathogens. Zhang, *et al* (2007) reported that the use of fungicides has been noted to have residual and cumulative effects that are harmful to human life. In addition, the biosynthesis of secondary metabolites such as mycotoxins can be induced by fungicides (Ramirez *et al*., 2004; Belli *et al*., 2006; Medina *et al*, 2007a; Mateo *et al*, 2011; Zouhair *et al*, 2014). In addition, Fungal growth and mycotoxin production depend on physical factors such as, temperature and water activity as well as the chemical composition of the substrate on which the mycotoxin-producing fungi are growing. The objective of this study was to test the in vitro effects of water activity and the common used fungicides in Moroccan vineyards on growth and OTA production by *A. carbonarius* and *A. niger* previously isolated from Moroccan grapes.

Materials and Methods

1. Fungal strains and culture conditions

Three strains of *A. carbonarius* (MUCL 49232, MUCL 49233 and MUCL 49345) and two strains of *A. niger* (MUCL 49226 and MUCL 49227) previously isolated from Moroccan grapes (Selouane *et al.*, 2009b) and deposited at BCCM/ MUCL (Mycothèque de l'Université catholique de Louvain, Belgium) were used. Inocula were prepared by growing each strain on Czapek Yeast Autolysate agar (CYA) at 25°C for seven days. Suspensions of spores (~10^5 spores/mL) were prepared in sterile distilled water containing 5‰ Tween 80. A Thoma chamber was used to determine the final spore number.

2. Modification of *media with fungicides and water activity*

Studies were carried out *in vitro* using a CYA medium. Three fungicides were investigated in the present study, namely Hexa (hexaconazole), Ortiva (azoxystrobin) and Pyrus (pyrimethanil). The active ingredient, product name, recommended dose (RD: dose recommended by the manufacturers) and company of the fungicide used in this study are shown in Table 1. Recommended dose is studied according to the toxicity of the active ingredient of the fungicide. The water activity of CYA medium was adjusted to 0.90 and 0.95 by adding glycerol as described by Belli *et al*. (2004). Diluted solutions of selected fungicides were prepared by mixing appropriate amounts in sterile deionized water and used immediately after preparation. A solid medium of CYA was maintained at 45-50°C. Then, appropriate volume of fungicide was aseptically added to obtain the target concentrations in the autoclaved medium. No fungicide was added to control plates (Control). Flasks of molten media were thoroughly shaken prior to pouring into sterile Petri dishes, to ensure that an even dispersion of the fungicide treatment was obtained. CYA plates with decreasing concentrations of those fungicides (RD: recommended dose by the manufacturer; 2×RD; 1.5×DH; 1×RD; 0.5×RD; 0.02×RD and 0.01×RD) and control plates were single-point inoculated with 10 µL of the suspension of the fungal spores (approximately 10^5spores/mL) as a drop at the center of the plate. All the experiments were carried out in triplicate. The Petri plates were examined daily, and the diameter of the colonies was measured in two perpendicular directions during a period of 7 days. Linear regression of colony radius (mm) against time (days elapsed from the day the colony was 5 mm diameter) was used to determine growth rates (mm/day). Lag phase for growth was considered as the time (days) elapsed between inoculation and the time when fungal

growth became evident (colony reaches 5 mm of diameter) for each treatment (Astoreca *et al*., 2009).

3. Extraction and HPLC-FLD analysis of OTA from cultures

Ochratoxin A was extracted according to the method of Bragulat *et al*. (2001). Briefly, three agar plugs (diameter = 7 mm) were removed from the inner, middle, and outer areas of each colony. Plugs were weighed and dispensed into 3 mL vials before adding 1 mL of methanol. The vials were shaken for 5 sec with an autovortex and incubated standing at 25°C for 60 min. The extracts were centrifuged three times for 10 min at 13,000 rpm; the supernatant, filter-sterilized through a PVDF hydrophilic filter (0.22 µm) and then analysed by HPLC (Agilent Technologies, USA) with fluorescence detection (excitation 333 nm, emission 460 nm; calibration with OTA standard (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany). The separation of metabolites was performed on a C18 reverse-phase column (Zorbax SB, 4.6×250 mm × 5 µm particle size). The OTA was analyzed in isocratic mode, the mobile phase (acetonitrile-water-acetic acid; 99:99:2, v/v//v) was pumped at 0.7 mL/min and the injection volume is 20 µL. Run time for samples was 30 min with OTA being detected at about 11 min. The identification of the OTA has been carried out by comparing the retention time of the peaks of the extract with the OTA standard and by co-injection. The final concentration (expressed in ng/g CYA) has been determined on the basis of a right of calibration established for each series of analysis. All analyses were done on triplicate.

4. Statistical analysis

Linear regression of the radius of the colony against time (days) to determine the growth rates (mm/day) under each set of conditions, was obtained with the program Microsoft Excel version 2013. Analysis of variance for the different sets of growth results and for the amounts of OTA detected was carried out using IBM SPSS Statistics, version 20.

Results

The combined effect of water activity (0.90 and 0.95 a_w) and fungicides (azoxystrobin, pyrimethanil and hexaconazole) on *A. carbonarius* and *A. niger* growth and OTA production was evaluated at concentrations of 0.01×RD; 0.02×DH; 0.5×RD; RD; 1.5 ×RD and 2×RD in CYA medium. Radial growth of tested *Aspergillus* strains exposed to different concentrations of fungicides was affected at both water activities (Table 1 and 2).

The lag phase is the time elapsed between inoculation and the time when fungal growth became evident. For this, mean lag phases (day) of fungal strains at both a_w in presence of azoxistrobin, pyrimethanil and hexaconazole, was determined. In control treatments, the lag phase was 2 and 3 days when the water activity ranged from 0.95 to 0.90 for both group of strains (*A. carbonarius* and *A. niger).* At all concentrations of pyrimethanil and hexaconazole none of the ochratoxigenic isolates developed visible mycelium at any a_w. For azoxystrobin, the lag phase of *Aspergillus* strains increased compared to the control treatment, and reached 4-5 days and 7 days when grown in CYA supplemented with 2×RD of azoxistrobin, at 0.95 and 0.90 a_w, respectively.

Growth rates of *Aspergillus* section *Nigri* strains at different a_w levels in the presence of fungicides doses (0 to 2×RD) at 25 °C are shown in table 1 and 2. The results showed that after 7 days of incubation, no growth was observed for all cultures treated with pyrimethanil and hexaconazole at both water activities, whatever the fungicide dose used. Indeed, the effect of azoxystrobin fungicide depends on the isolate, the applied dose and the water activity. At the lowest water activity (0.90 a_w), the MUCL49227 starin (*A. niger*) was the most sensitive to this fungicide. At a concentration of 0.01×RD, the growth rate was 0.88 mm/day, with a reduction of 80.92%. At the higher concentrations assayed 2×RD), no growth was observed for all strains at the same water activity. As we can notice, azoxystrobin was more effective at 0.90 than 0.95 a_w. At 0.95 a_w, the application of azoxystrobin fungicide at different doses decrease clearly the fungal growth. The growth rates were ranged from 1.63 to 3.45 mm/day for *A. carbonarius* strains, and growth rate reduction varied between 34.30 and 73.75% (table 1). For the other strains of *A. niger* specie, the growth rate reduction was ranged from 48.38 to 78.38%, compared to the control and the growth rate values varied between 1.72 and 3.12 mm/day.

Table 1: Growth rates (mm/day) of *A. carbonarius* strains on CYA medium supplemented with different doses (0: Control; 0.01×RD; 0.02×RD; 0.5×RD; RD; 1.5×RD and 2×RD) of fungicides hexaconazole (Hexa), pyrimethanil (Pyrus) and azoxystrobin (Ortiva) at different a_w.

Strains	Doses [a]	Growth rates (mm/day)					
		Azoxystrobin (Ortiva)		Hexaconazole (Hexa)		Pyrimethanil (Pyrus)	
	a_w	0.90	0.95	0.90	0.95	0.90	0.95
MUCL49232	**Control**	**4.47±0,10**	**7.02±0,04**	**4.47±0,10**	**7.02±0,04**	**4.47±0,10**	**7.02±0,04**
	0.01×RD	3.83±0,11	4.13±0,03	NG	NG	NG	NG
	0.02× RD	2.40±0,17	4.01±0,12	NG	NG	NG	NG
	0.5× RD	0.76±0,04	3.25±0,01	NG	NG	NG	NG
	RD	NG [b]	3.01±0,27	NG	NG	NG	NG
	1.5× RD	NG	2.90±0,14	NG	NG	NG	NG
	2× RD	NG	2.65±0,03	NG	NG	NG	NG
MUCL49233	**Control**	**4.65±0,14**	**5.73±0,58**	**4.65±0,14**	**5.73±0,58**	**4.65±0,14**	**5.73±0,58**
	0.01× RD	2.34±0,10	3.76±0,25	NG	NG	NG	NG
	0.02× RD	1.35±0,23	3.43±0,07	NG	NG	NG	NG
	0.5× RD	0.86±0,08	3.13±0,03	NG	NG	NG	NG
	RD	0.72±0,03	3.13±0,13	NG	NG	NG	NG
	1.5× RD	NG	3.03±0,34	NG	NG	NG	NG
	2× RD	NG	2.83±0,07	NG	NG	NG	NG
MUCL49345	**Control**	**4.48±0,09**	**6.20±0,08**	**4.48±0,09**	**6.20±0,08**	**4.48±0,09**	**6.20±0,08**
	0.01× RD	1.69±0,06	3.45±0,16	NG	NG	NG	NG
	0.02× RD	1.00±0,12	2.88±0,10	NG	NG	NG	NG
	0.5× RD	NG	2.71±0,42	NG	NG	NG	NG
	RD	NG	2.29±0,16	NG	NG	NG	NG
	1.5× RD	NG	1.95±0,33	NG	NG	NG	NG
	2× RD	NG	1.63±0,09	NG	NG	NG	NG

[a] Concentration of each fungicide was expressed as multiple of recommended dose (RD); [b] N.G.: no growth

Table 2: Growth rates (mm/day) of *A. niger* strains on CYA medium supplemented with different doses (0: Control; 0.01×RD; 0.02×RD; 0.5×RD; RD; 1.5×RD and 2×RD) of fungicides hexaconazole (Hexa), pyrimethanil (Pyrus) and azoxystrobin (Ortiva) at different a_w.

Strains	Doses [a]	Growth rates (mm/day)					
		Azoxystrobin (Ortiva)		Hexaconazole (Hexa)		Pyrimethanil (Pyrus)	
	a_w	0.90	0.95	0.90	0.95	0.90	0.95
MUCL 49227	**Control**	**4.59±0,50**	**6.69±0,11**	**4.59±0,50**	**6.69±0,11**	**4.59±0,50**	**6.69±0,11**
	0.01×RD	0.88±0,02	3.45±0,10	NG	NG	NG	NG
	0.02× RD	NG [b]	2.74±0,03	NG	NG	NG	NG
	0.5× RD	NG	2.54±0,03	NG	NG	NG	NG
	RD	NG	2.82±0,09	NG	NG	NG	NG
	1.5× RD	NG	2.33±0.23	NG	NG	NG	NG
	2× RD	NG	2.19±0,09	NG	NG	NG	NG
MUCL 49226	**Control**	**4.76±0,05**	**6.33±0,04**	**4.76±0,05**	**6.33±0,04**	**4.76±0,05**	**6.33±0,04**
	0.01× RD	3.00±0,87	3.12±0,19	NG	NG	NG	NG
	0.02× RD	2.38±0,13	3.07±0,07	NG	NG	NG	NG
	0.5× RD	0.80±0,01	2.43±0,22	NG	NG	NG	NG
	RD	NG	2.24±0,16	NG	NG	NG	NG
	1.5× RD	NG	1.78±0,58	NG	NG	NG	NG
	2× RD	NG	1.72±0,09	NG	NG	NG	NG

[a] Concentraton of each fungicide was expressed as multiple of recommended dose (RD); [b] N.G.: no growth

The different water activities affected clearly the growth rates of control cultures, the mean growth rate was 7.40; 6.39 and 4.59 mm/day at 0.99; 0.95 and 0.90 a_w, respectively (Figure 1). At the highest concentration of azoxystrobin, mean reduction percentages were between 20 and 51.60% at 0.99 a_w (Laaziz *et al.*, 2017) and between 49.95 and 73.75% at 0.95 a_w. At the lowest water activity (0.90 a_w), the growth inhibition varied from 61.97% at 0.01×RD to 74.85% at the recommended dose, with total inhibition of the growth of all strains at a concentration of azoxystrobin higher than the recommended dose. As we can notice, 0.90 a_w combined with all fungicides displayed more antifungal potential as a mycelia growth inhibitor than 0.99 a_w against all tested strains (Figure 1).

The effects of water activity (a_w), strains (S), fungicides (F), concentrations (C) and their interactions on growth of *A. carbonarius* and *A. niger*were highly significant (Table 3).

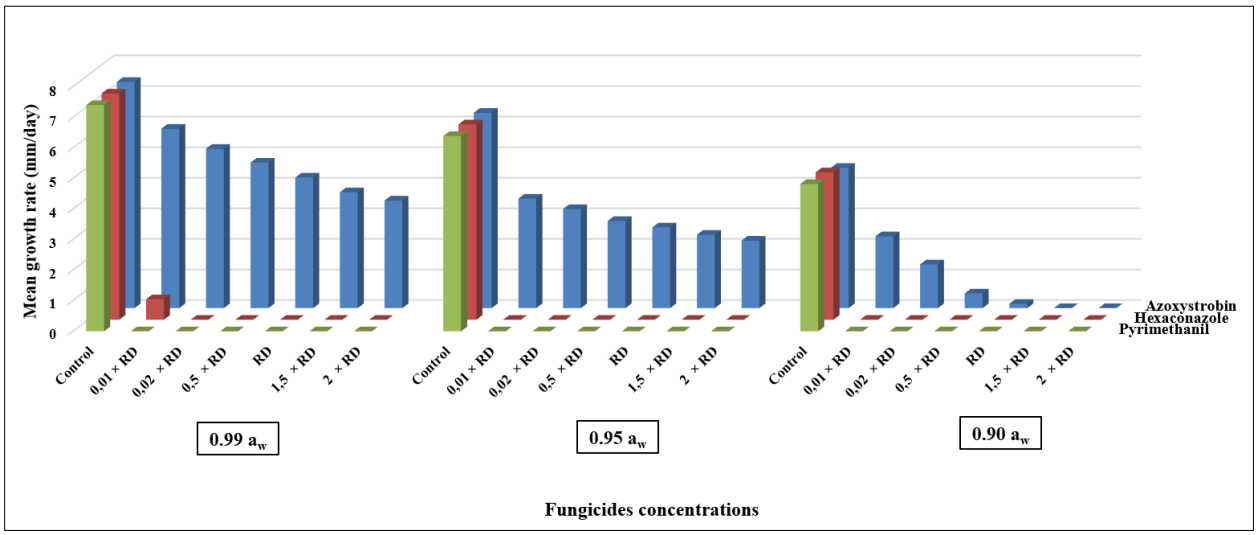


Figure 1: Mean growth rates (mm/day) of *A. carbonarius* and *A. niger* strains on CYA medium supplemented with different doses (0: Control; 0.01×RD; 0.02×RD; 0.5×RD; RD; 1.5×RD and 2×RD) of fungicides hexaconazole (Hexa), pyrimethanil (Pyrus) and azoxystrobin (Ortiva) at different a_w (0.90, 0.95 compared to 0.99 a_w (Laaziz *et al*, 2017)).

Table 3: ANOVA test. Effects of fungicides, concentration, water activity and their concentrations on growth rate of *A. carbonarius* and *A. niger* strains.

Source of variation	Growth study			
	DF[(a)]	MS[(b)]	F	P
Strain (S)	4	2,462	68,958	0,000
Concentration (C)	6	313,726	8785,537	0,000
Fungicide (F)	2	170,477	4774,009	0,000
Water activity (a_w)	1	124,045	3473,732	0,000
S×C	24	0,481	13,458	0,000
S×F	8	2,072	58,012	0,000
S×a_w	4	1,223	34,240	0,000
C×F	12	9,556	267,612	0,000
C×a_w	6	4,245	118,889	0,000
F×a_w	2	62,442	1748,630	0,000
S×C×F	48	0,365	10,225	0,000
S×C×a_w	24	0,280	7,853	0,000
S×F×a_w	8	0,700	19,597	0,000
C×F×a_w	12	1,923	53,864	0,000
S×C×F×a_w	48	0,097	2,719	0,000

DF[(a)], degree of freedom
MS[(b)], mean square

As shown in Table 4, a significant reduction of OTA production was observed in CYA culture medium supplemented with different doses of azoxystrobin, compared to the control treatments. The dose effect was more evident for this fungicide at the highest concentrations at both water activities. In fact, at 0.95 a_w, the highest OTA reduction was observed at 2×RD concentration, OTA production was completely inhibited for two strains of *A. carbonarius* (MUCL 49232, MUCL 49233) and the two strains of *A. niger* (MUCL 49226 and MUCL 49227), at the same a_w. OTA reduction of 95 and 97% was observed at the dose of 1.5×RD, for *A. carbonarius* and *A. niger*, respectively. Furthermore, at 0.90 a_w, in presence of azoxystrobin fungicide, no OTA was detected, except for the control treatments (OTA was 103.91 ng/g for MUCL 49345 and 196.42 ng/g for MUCL 49226 strains).

Table 4: Effect of different concentrations of three fungicides on OTA production by *A. carbonarius* and *A. niger* strains on CYA medium at 0.95a_w.

Fungicide	Doses[a)]	OTA (µg/kg)[b)] (Mean±S.D.[c)])				
		Aspergillus carbonarius			*Aspergillus niger*	
		MUCL49232	**MUCL 49233**	**MUCL 49345**	**MUCL 49226**	**MUCL 492227**
Pyrimethanil	**Control**	**ND[d)]**	**ND**	**510.92 ± 57.06**	**273.39 ± 39.33**	**ND**
	0.01×RD	NG[e)]	NG	NG	NG	NG
	0.02×RD	NG	NG	NG	NG	NG
	0.5×RD	NG	NG	NG	NG	NG
	RD	NG	NG	NG	NG	NG
	1.5×RD	NG	NG	NG	NG	NG
	2×RD	NG	NG	NG	NG	NG
Hexaconazole	**Control**	**ND**	**ND**	**510.92 ± 57.06**	**273.39 ± 39.33**	**ND**
	0.01×RD	NG	NG	NG	NG	NG
	0.02×RD	NG	NG	NG	NG	NG
	0.5×RD	NG	NG	NG	NG	NG
	RD	NG	NG	NG	NG	NG
	1.5×RD	NG	NG	NG	NG	NG
	2×RD	NG	NG	NG	NG	NG
Azoxystrobin	**Control**	**ND[d)]**	**ND**	**510.92 ± 57.06**	**273.39 ± 39.33**	**ND**
	0.01×RD	ND	ND	38.65 ± 4.99	27.02 ± 1.28	ND
	0.02×RD	ND	ND	38.85 ± 6.90	28.00 ± 3.19	ND
	0.5×RD	ND	ND	44.79 ± 3.91	26.63 ± 13.49	ND
	RD	ND	ND	28.98 ± 10.92	18.55 ± 8.75	ND
	1.5×RD	ND	ND	25.36 ± 3.84	5.62 ± 2.21	ND
	2×RD	ND	ND	ND	ND	ND

[a)] Concentration of each fungicide was expressed as multiple of recommended dose (RD); [b)] means (n=3); [C)] S.D.: standard deviation; [d)] N.D.: not detected; [e)] N.G.: no growth, CYA: Czapek Yeast Autolysate agar

Discussion

In the current study, lag phase, mycelial growth and OTA production by *A. carbonarius* and *A. niger* strains were found to be significantly affected by fungicides and waer activity. The azoxystrobin fungicide had clear concentration and a_w-dependent antifungal activity on fungal species. In fact, hexaconazole and pyrimethanil were the most effective antifungal agents than azoxystrobin at all tested a_w (inhibition of 100%). This behavior is consistent with the results obtained by Giorni *et al*. (2014) where prothioconazole and prochloraz were effective in limiting fungal growth of *A. niger* and *F. verticillioides* at different levels of a_w (0.99, 0.98 and 0.95). They report that, all the fungal species were affected by the fungicide modified media, with reductions in growth varying from about 9 to 66%. Santos *et al*. (2013), also studied the effect of fungicides but combined with temperature conditions on fungal growth of *A. tubingensis*, they observed that, the use of tebuconazole, dodine, cypronidil+fludioxonil, and mancozeb totally prevented growth of *A. tubingensis*, regardless of temperature and incubation time. In addition, cyproconazole reduced the radial growth of the tested *A. tubingensis* from 84 to 100% compared to the control. In 2011, Mateo *et al*. studied the efficacity of prochloraz, tebuconazole and fenpropimorph for controlling growth of *F. langsethiae* at 0.96 and 0.98 a_w, the authors demonstrated that the radial growth rates were decreased as the fungicide dose was increased regardless of a_w, temperature and strain.

In this study, the effect of azoxystrobin was also studied at 0.90 and 0.95 a_w; our results showed that azoxystrobin was less effective than the other tested fungicides. The growth reduction was between 34.34 and 72.84% at 0.95 a_w and between 14.32 and 100% at 0.90 a_w. In our previous study (Laaziz *et al*., 2017), the antifungal activity of the same fungicide was tested at 0.99 a_w against *A. carbonarius* and *A. niger*, the mean inhibition rate of this fungicide was ranged from 20 to 51.60%, as we can notice, the growth rate of *A. carbonarius* and *A. niger* is favored by high water availability. Azoxystrobin is a respiratory inhibitor that acts on mitochondria by blocking the transfer of electrons between cytochrome b and cytochrome c1 (Zheng *et al*., 2000), this fungicide was also studied by Zouhair *et al*. (2014) at 0.99 a_w, this antifungal agent was capable to inhibit the growth of *A. niger* (3.8 to 57.2%) and *A. carbonarius* (74.4 %). A study of Schmidt-Heydt *et al.* (2013) noted that azoxystrobin had little effect on growth of *Cladosporium sp.* with only a slight decrease of growth rates. Indeed, Medina *et al*. (2007b), reported that, the addition of carbendazim at the assayed levels of a_w (0.94, 0.96 and 0.98) did not significantly influenced fungal growth rate of *A. carbonarius*, the highest lag phases were observed at 0.94 a_w/20 °C, with a concentration of carbendazim of 450 ng/ml.

Regarding OTA production, our results showed that the application of increasing doses of tested azoxystrobin (0.95 a_w) decreased OTA levels in cultures. For *A. carbonarius*, OTA was ranged from 510.92 to 25.36 ng/kg, a reduction of 95% and for *A. niger*. At azoxystrobin dose of 1.5×RD, the OTA level was 18.55 ng/kg, with a reduction of 97%. In our previous study, the same behavior was observed, the application of azoxystrobin at 0.99 a_w lead to a decrease in the OTA production, our results are in agreement with those reported by Santos *et al*. (2013), they found that copper oxychoride, triadimenol, sulfur and trifloxystrobin decreased the OTA production by *A. tubingensis* at 20 and 30° C. Furthermore, in a study of Medina *et al*. (2007b), the OTA accumulation was stimulated in a culture medium treated by carbendazim. Battilani *et al*. (2003) also have found that fungicides can induce OTA biosynthesis in cultures of OTA produced by *Aspergillus* section Nigri. Terra *et al*. (2016), demonstrated that, copper hydroxide, copper oxychloride and tebuconazole had a positive influence on OTA stimulation, whereas the highest OTA levels were detected in treatments with the lower fungicide levels. Indeed, during the growth of toxigenic fungi, the use of low levels of fungicides and environmental conditions of stress can lead to the stimulation of mycotoxins biosynthesis (Magan *et al*., 2002; Nesci *et al*., 2003; Medina *et al*., 2007b). In addition, the application of suboptimal concentrations of conservator agents, such as calcium propionate and potassium sorbate, had induced the biosynthesis of OTA by *P. verrucosum*. In parallel, the polyketide synthase gene of *P. verrucosum*, a gene involved in the biosynthesis pathway of OTA, was activated under stress conditions (Schmidt-Heydt *et al*., 2007).

According to the present study, the selected fungicides showed, *in vitro*, a significant effect on controlling fungal growth of *A. carbonarius* and *A. niger* and OTA production at the different doses, which indicated that this activity is influenced by the fungicide, concentration, and also water activity. In this regard, other studies have to be conducted on the effects of fungicides and their interactions with water activity and other environmental factors on the growth and OTA production by species of *Aspergillus* section *niger*, both *in vitro* and *in vivo*, to better control the use of the doses of the various fungicides. This will contribute to a rational use of this synthetic antifungal chemicals.

REFERENCES

Battilani, P., Pietri, A., Bertuzzi, T., Formenti, S., Barbano, C., Languasco, L. 2003. Effect of fungicides on ochratoxin producing black aspergilli. *Journal of Plant Pathology*. 85, 285–291.

Belli, N., Marin, S., Sanchis, V., Ramos, A.J. 2006. Impact of fungicides on *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on synthetic grape-like medium and on grapes. Food Additives & Contaminants. 23, 1021-1029.

Commission of the European Communities. 2006. Commission Regulation (EC) No 1881/2006.Official Journal of the European Communities L 364: 5-24.

Commission of the European Communities. 2012. Commission Regulation (EU) No 899/2012 Official Journal of the European Union L 273/1.

Commission of the European Communities. 2017. Commission Regulation (EU) No 2017/171 Official Journal of the European Union L 30/45.

FAO, 2008. United Nations Food and Agriculture Organization Rome.

Giorni, P, Formenti, S., Bertuzzi, T., Magan, N and Battilani, P. 2014. Influence of water activity and anti-fungal compounds on development and competitiveness of *Fusarium verticillioides*. *Phytopathologia Mediterranea* 53, 3, 459-469

Kanapitsas, A., Batrinou, A., Aravantinos, A., Sflomos, C. and Markaki, P. 2016. Gamma radiation inhibits the production of Ochratoxin A by Aspergillus carbonarius. Development of a method for OTA determination in raisins. *Food Bioscience*, 15, 42-48

Lo Curto, R., Pellicano, T., Vilasi, F., Munafo, P and Dugo, G. 2004. Ochratoxin A occurrence in experimental wines in relationship with different pesticide treatments on grapes. *Food Chemestry* 84: 71-75.

Magan, R., R. Hope, A. Colleate, and E. S. Baxter. 2002. Relationship between growth and mycotoxin production by Fusarium species, biocides and environment. *Eur. J. Plant Pathol*. 108:685–690.

Mally, A., Keim-Heusler, H., Amberg, A., Kurz, M., Zepnik, H., Mantle, P., Völkel, W., Hard, G.C., Dekant, W. 2005. Biotransformation and nephrotoxicity of ochratoxin B in rats. *Toxicol.Appl. Pharmacol. 206,* 43–53.

Maruya, K., Reddy, V., Hayes, A.W., Berndt, W.O.1982. Embryocidal, fetotoxic and teratogenic effects of ochratoxin A in rats. *Toxicology*, *25*, 175–185

Mateo, EM., Gil-Serna., J, Patiño., B, Jiménez., M. 2011. Aflatoxins and ochratoxin A in stored barley grain in Spain and impact of PCR based strategies to assess the occurrence of aflatoxigenic and ochratoxigenic *Aspergillus spp*. *International Journal of Food Microbiology* 149: 118-126.

Medina, A., M. Jimenez, R. Mateo, and N. Magan. 2007. Efficacy of ´natamycin for control of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains under different environmental conditions. *J. Appl. Microbiol*. 103:2234–2239.

Medina, A., Mateo, R., Valle-Algarra, FM., Mateo, EM., Jiménez, M. 2007. Effect of carbendazim and physicochemical factors on the growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius* isolated from grapes. *International Journal of Food Microbiology* 119: 230-235.

Nesci, A., M. Rodriguez, and M. Etcheverri. 2003. Control of Aspergillus growth and aflatoxin production using antioxidants at different conditions of water activity and pH. *J. Appl. Microbiol*. 95:279–287.

Ramirez, M. L., Chulze, S. and Magan, N. 2004. Impact of environmental factors and fungicides on growth and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentinian wheat. *Crop Protection*, 23, 117-125.

Santos, L., Marin, S., Sanchis, V. and Ramos, A. J. 2013. In vitro effect of some fungicides used in cultivation of Capsicum spp. On growth and ochratoxin A production by Aspergillus species. *World Mycotoxin Journal*, 6(2): 159-165

Stoev, S.D., Denev, S., Dutton, M.F., Njobeh, P.B., Mosonik, J.S., Steenkamp, P.A., Petkov, I. 2010. Complex etiology and pathology of mycotoxic nephropathy in south african pigs. *Mycotoxin Res. 26*, 31–46

Van der Merve, K.J., Steyn, P.S. et Fourie, L. 1965. Mycotoxins. Part II The constitution of chratoxins A, B and C, metabolites of Aspergillus ochraceus Wilh. *Journal of Chemical Society*, 7083–7088.

Var, I., Kabak, B., Erginkaya, Z., 2008. Reduction in ochratoxin A levels in white wine, following treatment with activated carbon and sodium bentonite. *Food Control*, 19, 592-598

Zhang, H., Wang, L., Zheng, X., and Dong, Y. 2007. Effect of yeast antagonist in combination with heat treatment on postharvest blue mold decay and Rhizopus decay of peaches. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 53-58

Zouhair, S, Qjidaa., S, Selouane A, Bouya., D, Decock., C Bouseta, A. 2014. Effect of five fungicides on growth and ochratoxin A production by two *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus niger* isolated from Moroccan grapes. *South Asian Journal of Experimental Biology* 4 (3): 118-126.

Discussion

Prévenir les mycotoxines et champignons producteurs est devenue une des préoccupations majeures afin de protéger les consommateurs face aux risques délétères que peut provoquer l'ingestion de ces métabolites toxiques. Parmi ces mycotoxines, l'OTA est connue pour ses effets néfastes sur la santé humaine et animale ainsi que pour les pertes économiques liées à cette mycotoxine. Par ailleurs, l'utilisation des fongicides est l'une des méthodes les plus efficaces, ce qui a augmenté l'usage de ces produits phytosanitaires. Malgré leur efficacité, l'adoption de ce moyen de lutte a montré des effets néfastes sur la biodiversité végétale et animale, ainsi que sur la santé humaine après une longue exposition à ces produits. Ceci a incité les chercheurs à trouver d'autres moyens de luttes pour pallier aux problèmes liés à la contamination des produits agricole et agroalimentaires par les mycotoxines et résidus de fongicides. Dans cette étude, nous avons testé l'effet de l'activité de l'eau (0.90 ; 0.95 et 0.99) et trois fongicides (Hexaconazole, pyriméthanil et azoxystrobine), souvent utilisés dans les vignobles, pour leur efficacité à contrôler la croissance fongique et la production de l'OTA de/par cinq souches d'*A. carbonarius* et d'*A. niger* isolées à partir du raisin marocain. Tous les fongicides testés ont réduit la croissance fongique mais cette réduction dépend de façon très significative de la souche, de l'activité de l'eau, de la nature et des doses du fongicide.

Nos résultats ont montré que le Pyrus « pyriméthanil » et l'Hexa « hexaconazole » se sont avérés les plus efficaces pour contrôler la croissance fongique. En effet, quel que soit la dose et l'activité de l'eau, le pyriméthanil a complètement inhibé la croissance des souches d'*A. carbonarius* et *A. niger*. L'effet du pyriméthanil a été aussi rapporté par Qjidaa. (2015), elle a démontré que l'interaction du pyriméthanil et des activités de l'eau (0,90 ; 0,95 ; 0,99) sur la croissance radiale des souches *d'Aspergillus tubingensis* et *A. foetidus* a révélé que la combinaison entre une dose de 0.01×DR de pyriméthanil et une activité de l'eau de 0.90 permet un meilleur contrôle de la croissance fongique, elle a rapporté que la seule souche qui a pu résister dans ces conditions avait un taux de croissance très faible (1.23 mm/jour). L'effet inhibiteur de la croissance mycélienne par le pyriméthanil a été aussi rapporté par Zouhair *et al*. (2014), à une activité de l'eau de 0.99a_w, ils ont remarqué que le pourcentage d'inhibition augmente avec la concentration du fongicide Scala (pyriméthanil) et varie de 54.1% (0.01×DR) à 100% (doses supérieures ou égales à 0.1×DR) pour une souche d'*A. carbonarius* et de 24.3% (à 0.02×DR) à 100% (à 2×DR) pour une souche d'*A. niger*. Markoglou *et al*. (2011) ont aussi rapporté que la croissance fongique d'*A. parasiticus* a été affectée par le pyriméthanil. En effet ce fongicide était capable de réduire la croissance du champignon avec un pourcentage

d'inhibition de 50 % à une concentration de 0.2 mg/L. Cependant, ce fongicide été moins efficace sur la germination, la sporulation et la croissance mycélienne des souches d'*Aspergillus fumigatus* et d*'A. niger*, isolées des pommes en conservation au Maroc (Attrassi *et al*., 2007). Il est à noter que le pyriméthanil est un fongicide systémique qui appartient à la famille des anilino-pyrimidines et souvent utilisé pour lutter contre *Botrytis cinerea* dans les vignobles. Ce fongicide à un large mode d'action qui présente une activité anti-pénétrante vis-à-vis de nombreux champignons phytopathogènes en inhibant la biosynthèse de plusieurs acides aminés, notamment la méthionine (Attrassi *et al*., 2007 ; Leroux et Gredt, 1995).

L'ajout au milieu de culture de différentes concentrations du fongicide hexaconazole, de la famille des triazoles, inhibent complètement la croissance fongique aux activités de l'eau testées (0.90 ; 0.95 et 0.99 a_w), à l'exception de la plus faible dose (0.01×DR) à 0.99 a_w où une faible croissance a été notée pour *A. niger* MUCL 49227 (2.67 mm/jour, soit une réduction de 62.99%). Ces résultats corroborent ceux rapportés par Reddy *et al*. (2009) qui ont montré que l'application de certains fongicides appartenant à la famille des triazoles (l'hexaconazole, le tébuconazole et le propiconazole) provoquaient un arrêt complet de la croissance mycélienne des souches d*'Aspergillus sp*. Au Maroc, Zouhair *et al*. (2014) ont monté que l'hexaconazole à une acticité de l'eau de 0.99 a_w a complètement inhibé la croissance fongique d'*A. carbonarius* et d'*A. niger* à des concentrations supérieures ou égales à 0.01×DR et a diminué fortement les taux de croissance pour les deux souches aux plus faibles doses. Le pourcentage de réduction de la croissance était de 72.0-73.8% (0.01×DR) pour *A. carbonarius* et 86.7-92.2% (0.02×DR) pour *A. niger*. Une autre étude menée par Qjidaa (2015) a montré que l'hexaconazole (Hexa) a complètement inhibé la croissance mycélienne de huit souches d'*Aspergillus* (7 souches d'*A. tubingensis* et une souche d'*A. foetidus*) à des concentrations supérieures ou égales à 0.02×DR, cependant, un taux de croissance de 2.5 mm/jour à la plus faible dose appliquée (0,01xDH) a été observé, ces résultats sont en accord avec ce que nous avons démontré dans cette étude. En effet l'hexaconazole) agit en bloquant la synthèse des stérols chez les champignons, et plus précisément la biosynthèse de l'ergostérol par l'inhibition de l'activité de la 14-α-déméthylase (Elad *et al*., 2004). Il bloque le site actif de cet enzyme. Ce fongicide inhibe aussi l'élongation des tubes germinatifs et la croissance mycélienne (Leroux *et al*., 1999). En 2016, Terra *et al*. ont testé l'efficacité du tébuconazole, un fongicide qui appartient à la même famille (triazoles) contre deux souches d'*A. carbonarius* isolées à partir du raisin, l'étude a montré que ce fongicide était capable d'inhiber complétement la croissance fongique des deux souches à des doses de 2×DR et 4×DR. Mateo *et al*. (2013) ont par ailleurs rapporté l'effet inhibiteur du

fenpropimorphe, prochloraze et tébuconazole (fongicides inhibiteurs de la biosynthèse des stérols) sur des isolats de *F. langsethiae*. La réduction de la croissance fongique de deux souches de *F. graminearum* par des triazoles (Tébuconazole, propiconazole, et époxiconazole) a également été démontrée par l'étude de Ramirez *et al*. (2004), , selon les auteurs, une inhibition totale été notée à une dose supérieure à 15 µg/mL, quelles que soient l'activité de l'eau et la température testées.

Dans la présente étude, l'effet de l'azoxystrobine (Ortiva) a été aussi testé. Rappelons que ce fongicide appartient à la famille des strobilurines, il exerce une action principalement protectrice. Cette substance agit sur la germination des spores, sur la croissance mycélienne et sur la sporulation. Elle agit essentiellement en inhibant le complexe mitochondrial III, induisant un blocage de la respiration et un arrêt de la production d'énergie (Leroux, 2003 ; Elad *et al*., 2004). L'effet de l'interaction du fongicide azoxystrobine et de l'activité de l'eau sur la croissance radiale des souches d'*A. carbonarius* et *A. niger* a montré que la réduction de l'activité de l'eau à 0.90 inhibe complètement la croissance fongique à partir de la dose 0.02×DR (l'inhibition dépend de la souche). A une activité de l'eau de 0.95 et 0.99, l'effet de l'azoxystrobine dépend de la souche et de la dose du fongicide, les pourcentages moyens d'inhibition étaient compris entre 20.01 et 51.57% à 0.99 a_w ; et entre 48.82 et 100% à 0.90 a_w. L'ajout de l'azoxystrobine a provoqué en général une réduction de la croissance radiale par rapport aux témoins pour la plupart des paramètres testés. Zouhair *et al*. (2014) a rapporté que l'ajout de l'azoxystrobine dans les milieux de culture inoculés par deux souches d'*A. carbonarius* et *A. niger* a montré que les différentes concentrations de ce fongicide ont eu peu d'effet sur le taux de croissance à 0.99 a_w, en effet, le pourcentage moyens d'inhibition n'a pas dépassé 65.8% (2×DR). L'efficacité moyenne de ce fongicide été aussi rapporté par Schmidt-Heydt *et al*. (2013), où une faible inhibition de la croissance fongique chez des souches de *Cladosporium* sp. a été constatée. Cependant, l'efficacité de ce fongicide peut être améliorée en diminuant l'activité de l'eau. En effet, Qjidaa. (2015) a rapporté que ce fongicide était efficace à 0.90 a_w, il a inhibé complétement la croissance mycélienne de huit souches d'*A. tubingensis* et *A. foetidus*.

Parallèlement à cette inhibition de la croissance fongique, une réduction de la concentration de l'OTA dans les milieux de cultures additionnés d'azoxystrobine a été constatée et ce quelle que soient la dose et l'activité de l'eau. Cependant, Zouhair *et al*. (2014) ont montré que l'azoxystrobine était capable de réduire les niveaux d'OTA produites par *A. niger* mais stimule

par contre la production de l'OTA chez *A. carbonarius*. Santos *et al*. (2013) ont montré que la trifloxystrobine, l'oxychlorure de cuivre, le triadiménol et le soufrediminuaient la production de l'OTA chez *A. tubingensis* à une température de 20 et 30 °C. Un effet similaire a été décrit par Belli *et al*. (2006), ils ont signalé que l'azoxystrobine avait un effet sur le taux de croissance d'*A. carbonarius* et une réduction de la production de l'OTA. Des résultats similaires ont été rapporté par Lo Curto *et al*. (2004), ils ont montré que l'application de différents fongicides couramment utilisés dans les raisins, tels que l'azoxystrobine, le dinocap et le penconazole, a entraîné une diminution de l'accumulation d'OTA. Valero *et al.* (2007) ont testé l'effet de l'application de deux traitements antifongiques, Chorus (cyprodinil) et Switch (37,5% cyprodinil + 25% fludioxonil), sur l'infection causée par les aspergilli noirs et sur la teneur en OTA dans les raisins secs. Leurs résultats ont montré qu'il n'y avait aucune différence entre les applications simples ou doubles des deux agents antifongiques et les deux fongicides sont restés actifs sur les raisins pendant le processus de séchage, réduisant la croissance fongique et la biosynthèse de l'OTA.

A l'inverse, d'autres auteurs ont rapporté la stimulation de l'OTA par les fongicides. Terra *et al*. (2016) ont démontré que l'application de trois fongicides (Hydroxyde de cuivre, oxychlorure de cuivre et tébuconazole) souvent utilisés dans la vigne, ont induit une stimulation de l'OTA chez deux souches d'*A. carbonarius,* les niveaux d'OTA les plus élevés ont été détectés dans les traitements avec les plus faibles doses de fongicides. Également Qjidaa (2015), a montré que le pyriméthanil, le sulfate de cuivre, l'hexaconazole et l'azoxystrobine, induisaient la stimulation de la production de l'OTA chez *A. tubingensis* et *A. niger*. Zouhair *et al*. (2014) ont également rapporté que la production de l'OTA a été stimulée à des dose sous-léthales de fongicides. Dans une étude menée par Medina *et al*. (2007), l'accumulation de l'OTA a été stimulée dans le milieu de culture traité par le carbendazime.

Généralement, lors de la croissance des champignons toxinogènes, l'utilisation de faibles doses de fongicides et les conditions environnementales de stress peuvent conduire à la stimulation de la biosynthèse des mycotoxines (Magan *et al*., 2002 ; Nesci *et al*., 2003 ; Medina *et al*., 2007). De plus, l'application de concentrations sous-optimales du propionate de calcium et le sorbate de potassium (agents conservateurs), avait induit la biosynthèse de l'OTA par *P. verrucosum*. Parallèlement, le gène de la polycétide-synthase de *P. verrucosum*, un gène impliqué dans la voie de biosynthèse de l'OTA, a été surexprimé dans des conditions de stress (Schmidt-Heydt *et al*., 2007).

Conclusion

Bien que l'utilisation de pesticides soit l'une des méthodes les plus efficaces pour contrôler différents micro-organismes de la vigne, il existe également une préoccupation croissante concernant l'impact des fongicides sur la santé humaine, sur l'apparition de résistances et sur l'environnement. Par ailleurs, la plupart des pays importateurs de fruits, et plus particulièrement les pays européens ont adopté des législations très strictes vis-à-vis de l'emploi des pesticides. De ce fait, l'utilisation de certains produits est déjà limitée et d'autres ne sont plus autorisés. Les phénomènes de résistance, la présence de résidus dans les produits finaux ainsi que l'image négative des produits chimiques dans la société remettent en cause l'utilisation de ces fongicides et justifient également la recherche de méthodes alternatives à la lutte chimique contre les phytopathogènes.

Dans cette étude, l'interaction de l'activité de l'eau et des concentrations de trois fongicides a une influence aussi bien sur les phases de latence que sur les taux de croissance radiale des souches. Nos résultats ont montré que le pyriméthanil est efficace même aux doses les plus faibles (0.01×DH) quelle que soit l'activité de l'eau avec une inhibition totale de toutes les souches testées, ce qui permettra de réduire largement les doses préconisées. Pour l'hexaconazole, une inhibition totale de toutes les souches testées a été observée quelle que soit la dose du fongicide à 0.95 et 0.90 a_w et aux doses supérieures à 0.01×DH à 0.99 a_w. L'azoxystrobine était le fongicide le moins efficace, avec des pourcentages d'inhibition variant de 20.01 à 100%, selon les souches, l'activité de l'eau et les doses testées. Une réduction de l'activité de l'eau en présence de l'azoxystrobine, augmente son efficacité. En effet, la diminution de l'activité de l'eau de 0.99 à 0.90 augmente la phase de latence et diminue fortement le taux de croissance fongique ainsi que la production de l'OTA.

Ainsi, dans le but de chercher d'autres alternatives aux fongicides de synthèse, le prochain chapitre traitera l'effet de trois huiles essentielles sur la croissance fongique et la production de l'OTA par différentes souches appartenant aux espèces *A. carbonarius* et *A. niger* agrégats.

Chapitre IV

Effet *in vitro* et *in vivo* des huiles essentielles sur la croissance fongique, la production de l'ochratoxine A et le niveau d'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'OTA par des souches d'*Aspergillus carbonarius* et *A. niger agrégats.*

Chapitre IV : Effet *in vitro* et *in vivo* des huiles essentielles sur la croissance fongique, la production de l'ochratoxine A et le niveau d'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'OTA par des souches *d'Aspergillus carbonarius* et *A. niger* agrégats.

1. Introduction

De mauvaises pratiques de récolte, un stockage inapproprié et des conditions non maitrisées de transport, de commercialisation et de transformation peuvent contribuer à la croissance fongique et augmenter le risque de production de mycotoxines (Wagacha et *al.*, 2008). Malgré les améliorations de l'hygiène et des techniques de production alimentaire, la sécurité sanitaire des aliments reste un problème de santé publique important. On estime que jusqu'à 30% des habitants des pays industrialisés souffrent chaque année de maladies d'origine alimentaire (OMS, 2008). Plusieurs efforts ont été déployés pour réduire les mycotoxines dans les matières premières et les aliments transformés. Les stratégies actuelles de lutte contre les mycotoxines et les champignons producteurs peuvent être divisées en traitements avant récolte pour réduire ou inhiber la production des toxines sur le terrain et en assainissement après récolte des produits contaminés (Zhu *et al*., 2016). Actuellement, les conservateurs chimiques sont considérés comme responsables de nombreux attributs cancérigènes, tératogènes et de la toxicité résiduelle (Skandamis *et al*., 2001). De plus, le développement de la résistance des champignons aux fongicides est devenu une des préoccupations aussi bien nationales qu'internationales. L'utilisation raisonnée de substances chimiques de synthèse et la recherche de nouvelles méthodes biologiques ou respectueuses de l'environnement sont donc nécessaires. Des stratégies préventives telles que les bonnes pratiques agricoles, la gestion des maladies des plantes et des conditions de stockage adéquates permettraient aussi de limiter les niveaux de mycotoxines dans la chaîne alimentaire mais elles ne sont pas toujours suffisantes pour éliminer complètement les mycotoxines (Karlovsky *et al*., 2016). L'une des alternatives préconisées est l'utilisation de substances naturelles et de leurs extraits comme les huiles essentielles (HE). Ces dernières sont des liquides huileux aromatiques obtenus à partir de matières végétales (fleurs, bourgeons, graines, feuilles, brindilles, écorce, herbes, bois, fruits et racines). La composition des HE est très complexe, une seule HE contient plusieurs composés volatils (Bohme *et al*., 2014). De plus, les HE et leurs composants possèdent des activités fongicides et bactéricides (Combrinck *et al.*, 2011 ; Teixeira *et al*., 2013). Ces activités peuvent être liées à des composés uniques ou à des groupes de composés. Ces métabolites secondaires ont des fonctions biologiques dans les plantes dont ils sont issus telles que la protection contre les prédateurs et

les agents pathogènes microbiens ainsi que la participation à des mécanismes de défense contre le stress abiotique (Bassole et Juliani 2012 ; Lang et Buchbauer 2012). A l'instar des autres pays méditerranéens, le Maroc est très riche en plantes médicinales et aromatiques, utilisées principalement en médecine traditionnelle (Ghourri *et al*., 2013 ; Benlamdini *et al.*, 2014 ; Fakchich *et al.*, 2014 ; El Hamsas El Youbi *et al.*, 2016). Bien que l'activité antibactérienne et antioxydante des HE et extraits de plantes soient largement étudiées, leur activité antifongique et principalement contre les espèces toxinogènes sont rares. Dans ce contexte, nous avons dans un premier temps évalué l'effet de trois huiles essentielles (clou de girofle, romarin et thym) sur la croissance fongique et la production de l'ochratoxine A par des souches d'*Aspergillus tubingensis* et *A. luchuensis* isolées à partir du raisin marocain. L'effet *in vivo* des HE sur la contamination fongique et *in vitro* sur la production de l'OTA et l'expression des gènes responsables de la biosynthèse de cette mycotoxine chez deux souches d'*A. carbonarius* (MUCL 49345) et *A. niger* (MUCL 49227) a été étudié.

2. Evaluation de l'effet antifongique des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et *Syzygium aromaticum* sur la croissance fongique et la production de l'OTA par des souches d'*A. tubingensis* et *A. luchuensis*

Article soumis au journal « *phytopathologia mediterranea* »

Antifungal activity of *Syzygium aromaticum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus tubingensis* and *A. luchuensis* strains isolated from Moroccan grapes

ADIL LAAZIZ[1*], YOUSRA EL HAMMOUDI[1], SOUAD QJIDAA[1], ABDELOUAHED HAJJAJI[1, 2], HASSAN HAJJAJ[3], GEERT HAESAERT[4] AMINA BOUSETA[1]

[1] Laboratory of Biotechnology, Environment, Agri-food and Health, Faculty of Sciences Dhar El Mahraz, Sidi Mohamed Ben Abdellah University, B.P. 1796-Atlas, 30003, Fez, Morocco

[2] Laboratory of Biotechnology and Sustainable Development of Natural Resources, Polydisciplinary Faculty, Sultan Moulay Slimane University, Mghila B.P. 592, Beni Mellal, Morocco

[3] Laboratory of Plant Biotechnology and Molecular Biology, Faculty of Sciences, Moulay Ismail University, B.P. 11201-Zitoune, Meknes, Morocco

[4] Department of Crops and Plants, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Campus Schoonmeersen Building C, Valentin Vaerwyckweg 1, 9000, Ghent, Belgium

*Corresponding Author:
Email: adil.laaziz@usmba.ac.ma

Abstract

Essential oils have been used in ancient times in agri-food science and traditional medicine to preserve food, as well as to combat several human diseases. In this study, clove and rosemary essential oils (EOs) obtained by hydro-distillation were analyzed by GC/MS and evaluated both for their antifungal activity against strains of *A. tubingensis* and *A. luchuensis* and for their effect on ochratoxin A (OTA) production. The major constituents of clove and rosemary EOs were eugenol (86.41%) and eucalyptol (35.88%), respectively. The results of mycelial growth inhibition assays showed that essential oils had a dose-depend inhibition effect that reached 41.20% for rosemary and 100% for clove for an EOs concentration of 200 µL/L. This reduction depends very significantly ($p \leq 0.001$) on the strain, the essential oil type and their interactions. Analysis of OTA in the culture medium extracts of *Aspergillus* strains was done by HPLC-FLD and confirmed by LC-MS/MS for positive controls of two OTA-producing strains of *A. tubingensis*. Results showed that in general OTA was reduced (from 45 to 100%), except for two strains of *A. tubingensis*, where the OTA production was stimulated (up to 8.29 µg/g).

Key words: antifungal activity, *Aspergillus tubingensis*, *A. luchuensis*, ochratoxin A, essential oils

1. Introduction

Aspergillus species are widely recognized as food contaminants, which may create severe economic losses, and constitute a health risk for consumers due to their ability to produce mycotoxins. Ochratoxin A is the one of the most frequent toxic secondary metabolites produced by several fungal species belonging to the genera *Aspergillus* and *Penicillium.* This mycotoxin is hazardous to human health since it can be neurotoxic, carcinogenic, nephrotoxic, hepatotoxic, teratogenic and immunosuppressive (Murphy *et al.*, 2006; IARC, 2009; Coronel *et al.*, 2010). It has been classified as possible carcinogen for humans (group 2B) by the International Agency for Research in Cancer (IARC, 1993). OTA has been frequently found in a wide range of agricultural and food products such as cereals and derived products (Hajjaji *et al.*, 2006; Gamza *et al.*, 2015), cocoa (Copetti *et al.*, 2010), grapes, grape and apple juices (Battilani *et al.*, 2006; Leong *et al.*, 2006; Selouane *et al*., 2009) and spices (Zinedine *et al*., 2007; Wan Ainiza *et al.*, 2015).

To reduce the potential hazard due to the presence of mycotoxin-producing fungi in crops and stored agricultural products, control with conventional fungicides is often advocated. However, the use of antifungal chemicals is progressively becoming restricted by food safety regulations as it could lead to the development of resistant strains as well as the occurrence of residues in food, feed, crops and environment. In addition, these fungicides may stimulate in certain conditions the production of mycotoxins (Audenaert *et al*., 2010; Zouhair *et al*., 2014). Therefore, the research for alternative antifungal substances is of paramount importance in order to control the growth of spoilage fungi and the risk of OTA. In this sense, the use of essential oils (EOs) can be regarded as a natural alternative to synthetic fungicides. Accordingly, several aromatic and medicinal plants have received much attention and are at present studied by numerous researchers to control the growth of toxigenic fungi and production of mycotoxins (Lappa *et al.*, 2017; Mateo *et al.*, 2017; Lasram *et al*., 2019; Oliveira *et al*., 2020). EOs are complex mixtures of volatile organic compounds mainly include terpenoids, aromatic, and aliphatic components, all characterized by a low molecular weight (Bassole and Juliani, 2012). The Food and Drugs Administration (FDA) classified them as “Generally Recognized as Safe” (GRAS) substances (Edris, 2007). Indeed, several biological activities were attributed to essential oils such as the antibacterial (Risaliti *el al.*, 2019) and antifungal activities (Bomfim *et al*., 2015; Santamarina *et al*., 2016). It was reported that, EOs contain major and minor components and that the mixture is more biological active than the major

constituents mixed (Gill et al., 2002; Mourey and Canillac, 2002), which suggests that the minor components may have a potentiating influence or synergistic effect.

Several studies have reported the antifungal activity of clove and rosemary essential oils against mycotoxins-producing fungi (Rasooli *et al*., 2008; Bouddine *et al*., 2012; Bomfim *et al.*, 2015; Boukaew *et al.*, 2017). El Khoury *et al*. (2016); found that rosemary EO significantly inhibited the production of OTA by *A. carbonarius.* In addition, the antifungal activity of the major compounds of these EOs (eugenol and eucalyptol) has also been widely reported (Morcia *et al.*, 2012; Jahanshiri *et al*., 2015; Caceres *et al*., 2016; Nazzaro *et al.*, 2017).

The aim of the present work was to study the effect of *Syzygium aromaticum* (clove) and *Rosmarinus officinalis* (rosemary) essential oils on fungal growth and OTA production of/by eight strains of *A. tubingensis* and *A. luchuensis*.

2. Materials and methods

2.1. Fungal strains and culture conditions

Seven strains of *A. tubingensis* (MUCL54478, MUCL54481, MUCL54482, MUCL54483, MUCL54484, MUCL54485 and MUCL54486) and one strain of *A. luchuensis* (MUCL54477) previously isolated from Moroccan grapes were used. All strains were identified (Qjidaa *et al*., 2014) and deposited at BCCM/ MUCL (Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain, Belgium). The strains (suspensions of spores) were maintained in 25% glycerol- 0.01% Tween 80 at -20°C. Prior to the study, OTA production of the eight strains was confirmed *in vitro* on Czapek Yeast Autolysate agar (CYA). The identification of the OTA peak in the chromatogram was confirmed by methylation according to Zimmerli and Dick, (1995). Inocula for the experiments were prepared by growing each strain on CYA at 25°C for seven days. Then, suspensions of spores (~10^5spores/mL) were prepared in sterile distilled water containing 5‰ Tween 80. A Thoma chamber was used to determine the final spore concentrations.

2.2. Essential oil isolation

The dried *S. aromaticum* and dried leaves of *R. officinalis* (100 g) were hydro-distillated (3 h) using a Clevenger-type apparatus. EOs were stored at 4°C in dark before analysis.

2.3. Antifungal test

In vitro experiments to evaluate the efficacy of EOs against *A. tubingensis* and *A. luchuensis* was carried out using a CYA medium (0.99a_w). Spores of *A. tubingensis* and *A. luchuensis* were exposured to a series of increasing concentrations of the tested antifungal agents (Remmal *et al.*,1993). Therefore, CYA plates prepared with different concentrations of EOs (25, 50, 100 and 200 µL/L) and control plates were single-point inoculated as a drop at the center of the plate with 10 µL of a suspension of the fungal spores (approximately 10^5 spores) and incubated at 25°C. All the experiments were carried out in triplicate. The Petri plates were examined daily, and the diameter of the colonies was measured in two perpendicular directions during a period of 7 days. Linear regression of colony radius (mm) against time (days elapsed from the day the colony was 5 mm diameter) was used to determine growth rates (mm/day). Lag phase for growth was considered as number of days elapsed between inoculation and the time when fungal growth became evident (colony reaches 5 mm of diameter). Petri plates were also used for OTA extraction and determination.

2.4. Essential oils analysis

Gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) analyses were performed on a Thermo Finnigan gas chromatograph directly coupled to the mass spectrometer system (model TRACE GC ULTRA S/N 20062969; Polaris Q S/N 210729). Retention Indices and the confirmation of MS identified compounds were carried out using a gas chromatograph with flame-ionization detection (GC-FID) Thermos Finnigan Trace GC 2000 under the same conditions as GC/MS analysis. Compounds were separated using TR-5 capillary column (60 m x 0.32 mm, 0.25 µm film thickness). The Oven temperature was maintained at 40 °C for 2 min, programmed to 280°C at 5°C/min and the final temperature kept for 10 min. The splitless injector was maintained at 220 °C and opened after 0.85 min. The flow rate of carrier gas (helium) was 1mL/min and the volume of injected specimen was one µL of diluted oil in hexane. Electron impact mass spectra was recorded at 70 eV. The ion source temperature and interface line temperature were 200 °C and 300°C, respectively and scan mass range m/z was of 40-650. The same method was previously used by Bennouna *et al.* (2018).

2.5. Extraction and OTA analysis

Ochratoxin A was extracted according to the method of Bragulat *et al.* (2001). Briefly, three agar plugs (diameter=7 mm) were removed from the inner, middle, and outer areas of each colony. Plugs were weighed and dispensed into 3mL vials before adding 1 mL of methanol. The

vials were shaken for 5 sec with an autovortex and incubated at 25°C for 60 min. The extracts were centrifuged three times for 10 min at 13,000 rpm; the supernatant, filter-sterilized through a PVDF hydrophilic filter (0.22 µm) and then analyzed using HPLC technology (Agilent Technologies, USA) with fluorescence detection (excitation 333 nm, emission 460 nm; calibration with OTA standard (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany). The separation of metabolites was performed on a C18 RP column (Zorbax SB, 4.6 ×250 mm × 5 µm particle size). The mobile phase (acetonitrile-water-acetic acid; 99:99:2, v/v/v) was pumped at 0.7 mL/min and the injection volume reached 20 µL. Run time for samples was 30 min with OTA being detected at about 11 min. OTA was identified by its retention time (11-11.6 min) according to the OTA standard. Quantification of OTA was done by measuring peak area according to a linear standard curve, and the limit of detection was 0.2 ppb. All analysis were repeated three times. OTA production by ochratoxigenic strains was confirmed using an UPLC-MS/MS system (Waters, Milford MA, USA) coupled with a triple-quadrupole (Xevo TQ-S micro) mass spectrometer (MS). The OTA was separated using an UPLC C18 column (2.1 µm particle size, 1.7 x 100 mm) with a C18 pre-column (2.1 µm particle size, 1.7 x 20 mm). Both the column and guard column were maintained at 45 °C. The flow rate was 0.4 mL/min and the injection volume of 2 **µ**L. The mobile phase consisted of a gradient achieved with the following mobile phase: phase A) water/0.1% formic acid /5 mM ammonium formate, and phase B) methanol/0.1% formic acid /5 mM ammonium formate.

Time in min	**Phase A**	**Phase B**
0	98	2
1	98	2
13	1	99
14	98	2
17	98	2

The mass spectrometry analysis ESI-MS/MS was performed using the positive electrospray ionization mode (ESI+) in a multiple reaction monitoring mode (MRM) at capillary voltage of 3.5 kV, cone voltage of 8 V, source temperature of 150 ºC and desolvation temperature of 500 ºC. Argon was used as desolvation with a flow rate of 1000 L/h. Full scan mode was employed in the mass range of 30-1250 Da. The transition of the most abundant product transition ion (m/z 404.2 < 239.1) and the second least abundant transition (target or confirmatory) ion (m/z

404.2 < 358.2) were selected for quantification and identification. MassLynx (V4.1) software (Waters Corporation) was used for the data acquisition.

2.6. Statistical analysis

Linear regression of the radius of the colony against time (days) to determine the growth rates (mm/day) under each set of conditions, was obtained with the program Microsoft Excel version 2013. Analysis of variance for the different sets of growth results was carried out using IBM SPSS Statistics, version 20.

3. Results

3.1. Essential oils composition

Hydro-distillation of clove and rosemary yielded an average of 3 mL and 2 mL for 100 g of the dry plant, respectively. Based on the results of the GC/MS and GC/FID analyses, different compounds were identified (Table 1). The most abundant chemical components were eugenol (86.41%), eugenyl acetate (8.94%) and α-humulene (1.11%) for clove EO and eucalyptol (35.88%), camphor (21.15%) and o-cymene (4.79%) for rosemary EO.

Table 1: Chemical composition of rosemary and clove essential oils**.**

RI[a]	Compound	Identification[b]	Amount (%)[c]	
			Rosemary	**Clove**
940	α-pinene	MS, RI, Std	0.12	-
956	camphene	MS, RI, Std	4.15	-
1024	γ-terpinen	MS, RI, Std	0.35	-
1035	o-cymene	MS, RI, Std	4.79	-
1044	eucalyptol	MS, RI	35.88	-
1166	camphor	MS, RI, Std	21.15	-
1186	borneol	MS, RI, Std	4.68	-
1208	α-terpinol	MS, RI, Std	2.90	-
1232	verbenone	MS, RI	0.56	-
1301	bornyl acetate	MS, RI	0.38	-
1390	eugenol	MS, RI	-	86.41
1442	α-humulene	MS, RI, Std	1.24	1.11
1477	germacren D	MS, RI	0.15	0.14
1552	eugenyl acetate	MS, RI	-	8.94
1615	caryophyllene oxide	MS, RI	-	0.12
Total			**76. 35**	**96.72**

[a]RI (Kovat's retention indices (TR-5 capillary column); [b]Identification (MS: based on comparison of mass spectra with those of NIST library, RI: comparison of retention indices with literature, Std: confirmed by injection of standards); [c](% of pic area of compound compared to the total area).

3.2. Antifungal effect on lag phase and growth rates of essential oils

The lag phases observed in CYA cultures supplemented with clove EO were always longer than in case of rosemary EO and this under all doses tested. A concentration of 200 µL/L of clove inhibits totally the fungal growth of MUCL54482, MUCL54484, MUCL54486 and MUCL54477 strains. On the other hand, the lag phases for the control cultures were 1 day, and for the cultures supplemented with clove EO were about 2-3 days for 25 to 50 µL/L, between 4-6 days for 100 to 200 µL/L. However, the lag phases after rosemary EO treatments were similar for dose tested (roughly 2 days).

Table 2: ANOVA test. Effects of essential oils and their concentrations on growth rate of *Aspergillus* section *Nigri* strains.

Source of variation	Growth study			
	DF[(a)]	MS[(b)]	F	P
Strain (S)	7	2,835	14,812	0,000
Concentration (C)	4	131,808	688,548	0,000
Essential oil (EO)	1	65,125	340,206	0,000
S×C	28	0,731	3,817	0,000
S×EO	7	2,546	13,299	0,000
C×EO	4	61,150	319,441	0,000
S×EO×C	28	0,416	2,175	0,001

DF[(a)], degree of freedom
MS[(b)], mean square

Statistical analysis (Table 2) reveals that the EOs, the concentration of EOs, the fungal strains as well as their interactions had a significant effect on the antifungal activity ($P \leq 0.001$). In control plates the mycelium growth had already reached the edges of the Petri dishes after 7 days of incubation, and the mean growth rate was 7.35 mm/day. The application of clove EO at different concentrations (0-200 µL/L) decreased highly the radial growth rate of the OTA producing strains as well as non-producing strains (Figure 1). Clove EO applied at 25 µL/L showed growth rates between 6.43 and 7.25 mm/day and growth rate reduction varied between 1.19 and 13.34%. Higher concentrations of clove EO, caused in 50% of the tested strains an inhibition of 100%. However, for the other strains, the growth rate reduction compared to the control varied between 69.18 and 78.38%, with growth values ranged between 1.63 and 2.20 mm/day.

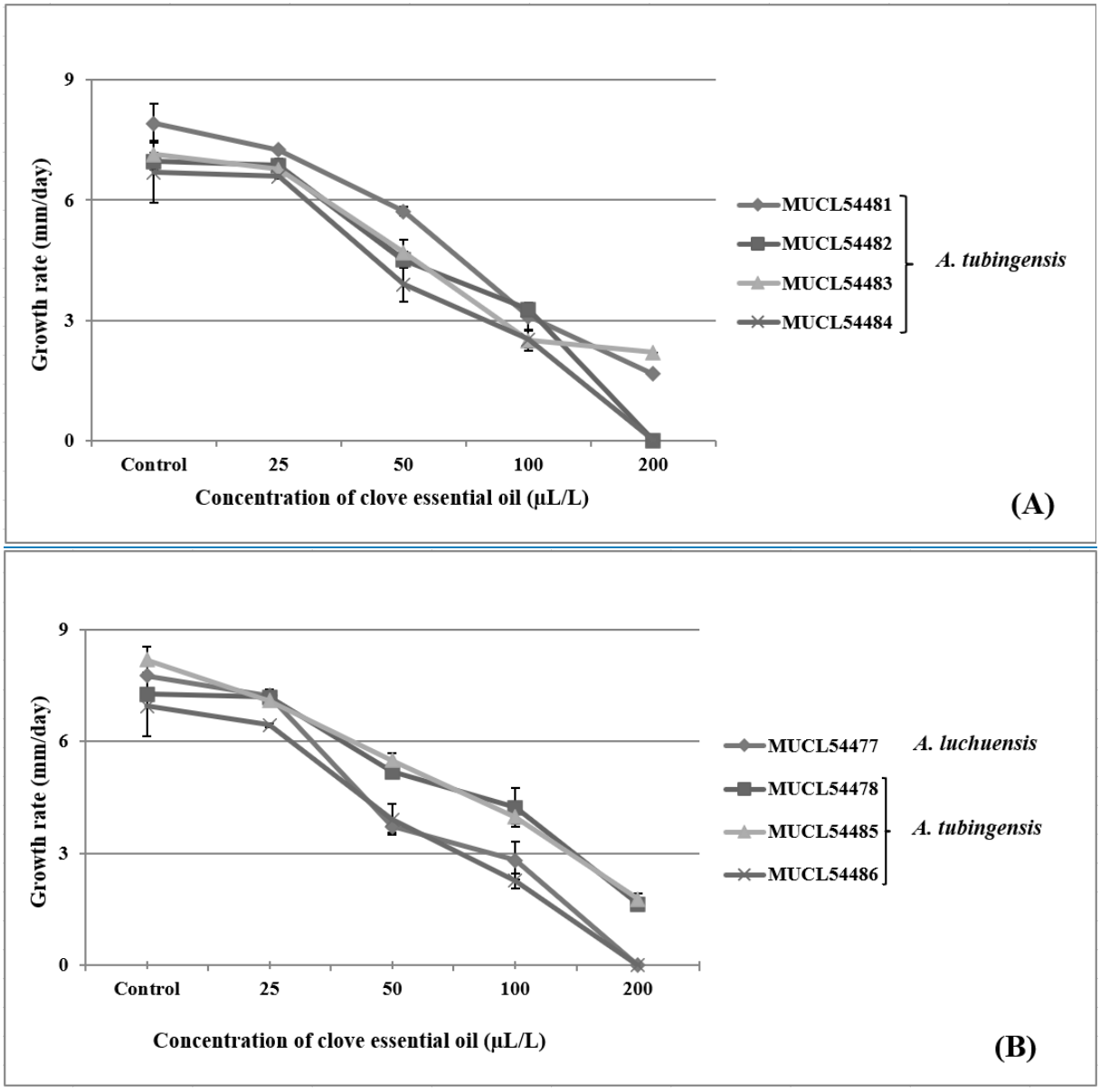


Figure 1: growth rates (mm/day) of *A. tubingensis* and *A. luchuensis* on CYA medium supplemented with different doses of clove essential oil (A: OTA producing strains; B: non-OTA producing strains in the tested conditions)

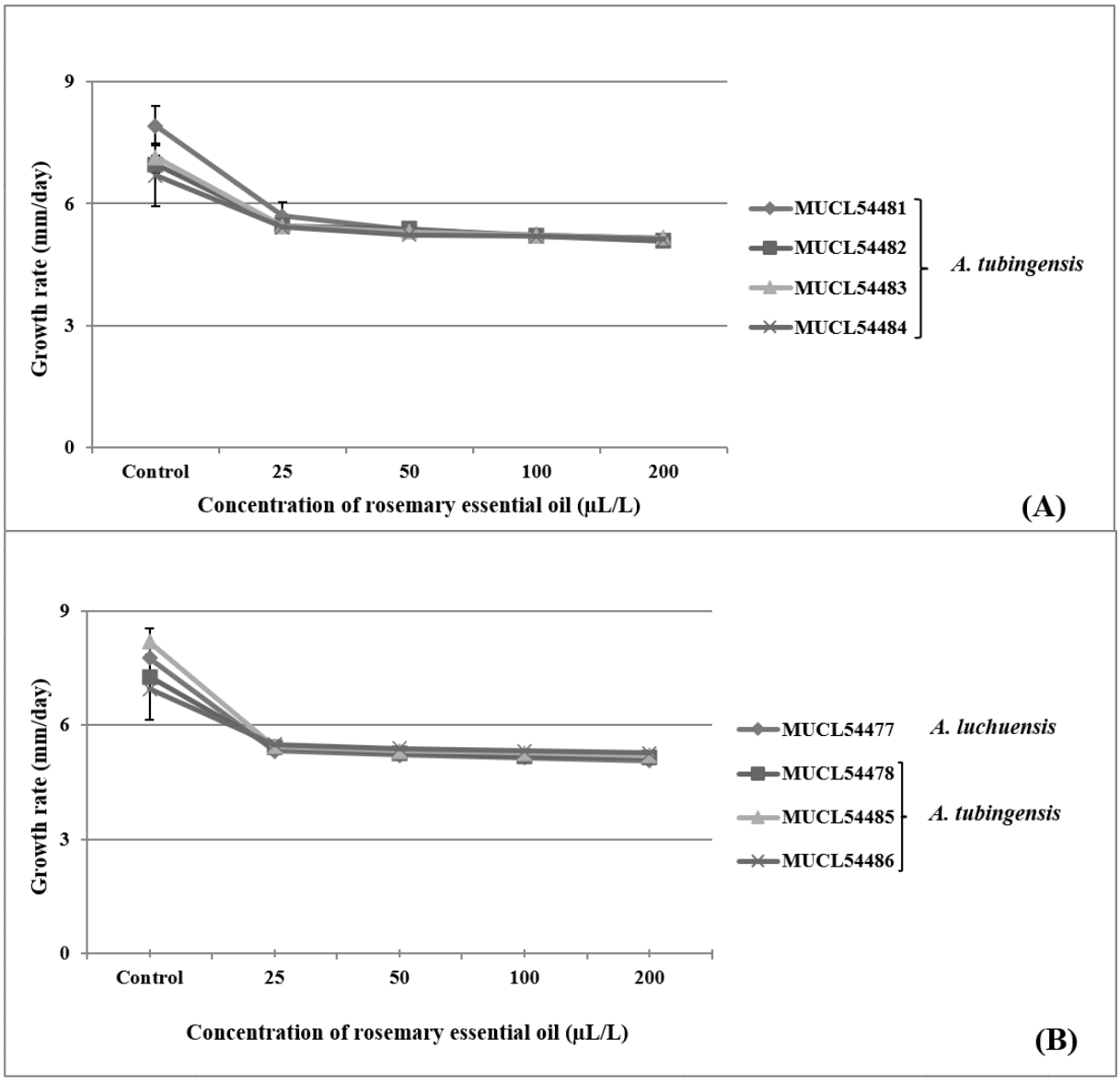


Figure 2: Growth rates (mm/day) of *A. tubingensis* and *A. luchuensis* on CYA medium supplemented with different doses of rosemary essential oil. (A: OTA producing strains; B: non-OTA producing strains in the tested conditions)

On the other hand, the rosemary EO was proved to be the least effective (Figure 2, 3). At 25 µL/L, the growth rates varied between 5.31 and 5.68 mm/day resulted in a reduction ranged from 18.86 to 33.54% compared to the control. At 200µL/L of rosemary EO, the growth rates were between 5.07 and 5.26 mm/day resulting in inhibitions between 23.5 to 41.2%. As we can notice, clove EO displayed a larger antifungal potential as a mycelia growth inhibitor than rosemary EO (Figure 3).

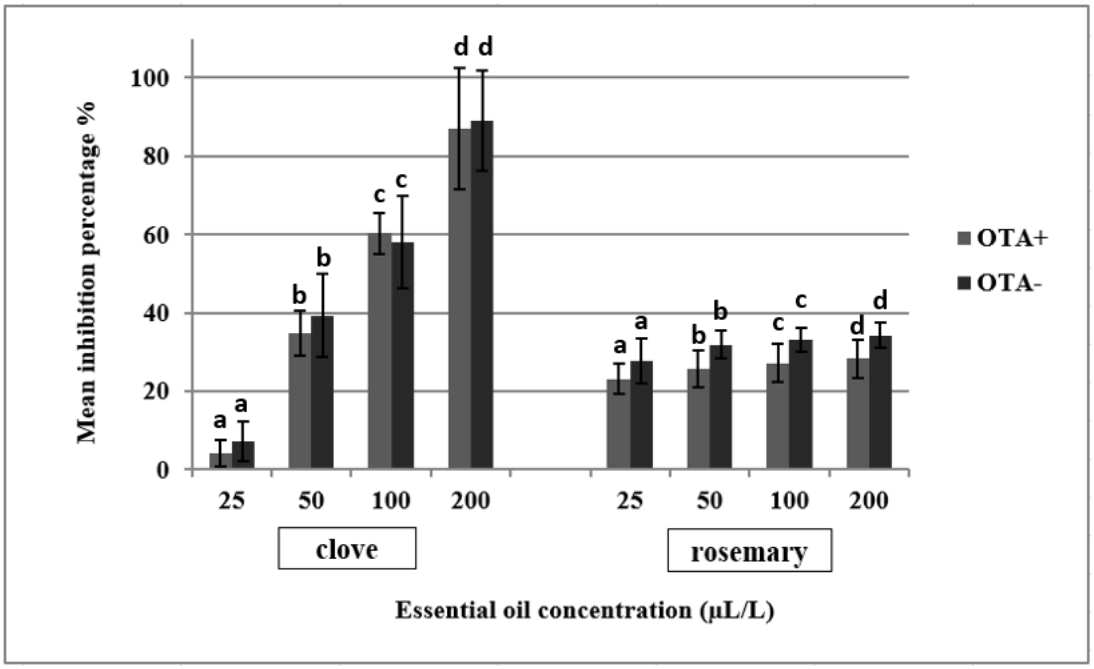


Figure 3: Mean inhibition percentage (%) of *A. tubingensis* and *A. luchuensis* on CYA medium supplemented with different doses of clove and rosemary essential oils. (OTA^+: OTA producing strains; OTA^-: non-OTA producing strains in the tested conditions). Means within a column followed by the same letter are not significantly different (LSD, 5%).

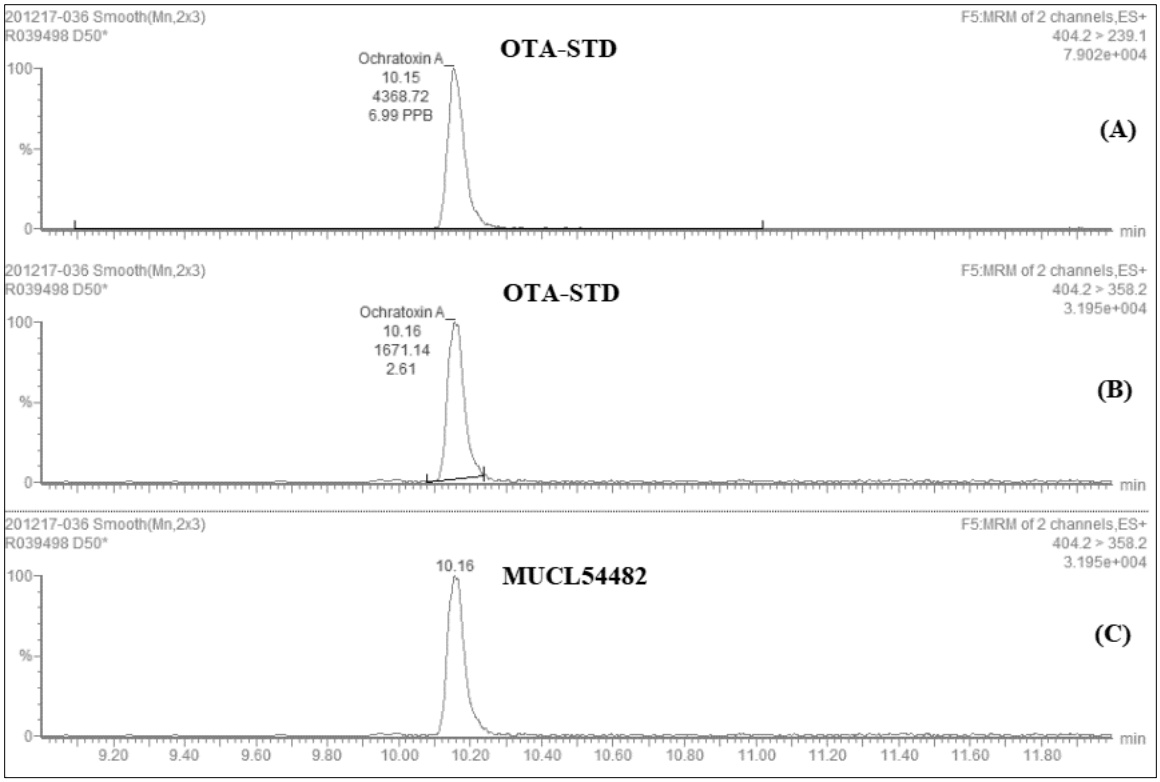


Figure 4: UPLC-MS/MS chromatogram of OTA standard (A and B) and *A. tubingensis* MUCL54482 (C).

3.3. OTA production

Over all treatment cultures of *A. tubingensis* and *A. luchuensis* were examined by HPLC-FLD to determine OTA production (Table 3). No OTA was detected in culture extracts of OTA non-producing strains, with or without clove and rosemary EOs, except for *A. tubingensis* MUCL54478 strain grown in presence of clove essential oil at a concentration of 25 µL/L where an important concentration of OTA was detected (8.29 µg/g). For OTA producing strains controls, the OTA levels produced were ranged from 0.06 to 0.14 µg/g. The use of rosemary EO seems to reduce the accumulation of OTA for all the strains studied except for *A. tubingensis* MUCL54483 and MUCL54484 strains at 200 µL/L where the OTA seems to be stimulated (0.44 and 0.22 µg/g, respectively). Furthermore, when clove EO was applicated at the doses of 50, 100 and 200 µL/L, OTA has not been detected (depending on the strain) but exceeded the control levels of OTA especially for MUCL54484 strain at 25 and 50 µL/L (0.41 and 0.43 µg/g respectively). As we mentioned, the analysis of the culture extracts was carried out by HPLC-FLD and the confirmation of OTA production by *A. tubingensis* MUCL54482 and MUCL54483 was carried out by UPLC-MS/MS with a production of 1050 µg/kg for *A. tubingensis* MUCL54482 strain (Figure 4).

Table 3: Effect of different concentrations of essential oils on OTA production by *A. tubingensis* and *A. luchuensis* strains on CYA medium.

Essential oils	Doses (µL/L)	OTA (µg/g)[a] (Mean±S.D. [b])							
		OTA non-producing strains				OTA producing strains			
		A. luchuensis	*A. tubingensis*			*A. tubingensis*			
		MUCL54477	MUCL54478	MUCL54485	MUCL54486	MUCL54481	MUCL54482	MUCL54483	MUCL54484
S. aromaticum	Control	ND[c]	ND	ND	ND	0.06±0.09	0.14±0.2	0.08±0.11	0.07±0.09
	25	ND	8.29±2.69	ND	ND	<LOQ [e]	<LOQ	0.12±0.02	0.41±0.11
	50	ND	ND	ND	ND	<LOQ	<LOQ	ND	0.43±0.27
	100	ND	ND	ND	ND	<LOQ	<LOQ	ND	ND
	200	NG[d]	ND	ND	NG	ND	NG	ND	NG
R. officinalis	Control	ND	ND	ND	ND	0.06±0.09	0.14±0.2	0.08±0.11	0.07±0.09
	25	ND	ND	ND	ND	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	50	ND	ND	ND	ND	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	100	ND	ND	ND	ND	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	200	ND	ND	ND	ND	0.1±0.04	0.06±0.01	0.44±0.16	0.22±0.16

[a] means (n=3); [b] S.D: standard deviaton; [c] ND: not detected; [d] NG: no growth; LOD: limit of detection; LOQ[e]: limit of quantification.

LOD= 0.2 µg/kg; LOQ = 0.6 µg/kg.

4. Discussion

Regarding the chemical composition of clove and rosemary EOs from Moroccan origin GC/MS analyzes of the studied chemotypes revealed that eugenol and eucalyptol (1,8-cineole) are the major compounds of clove and rosemary EOs, respectively. For clove EO, eugenol represents 86.41% of the total volatile compounds. This is in agreement with the observation of Santamarina *et al*. (2016) who showed that the proportion of eugenol in commercial clove EO was 88.58%. Bozik *et al*. (2017) also reported that eugenol was the major constituent in two commercial clove EO with values of 81.74 and 77.76%. In addition, Studies of Boukaew *et al.* (2017) and Sharma *et al.* (2017) concluded that eugenol constitutes 62.43 and 75.41% of clove EO volatiles, respectively.

On the other hand, the results of rosemary EO in the current study showed that eucalyptol represents 35.88% of total volatiles. Risaliti *et al*. (2019) also reported similar results, with a proportion of 48.72%. Study of Farhat *et al*. (2017) reported that the proportion of eucalyptol in Tunisian rosemary EO ranged from 20.82 to 64.71% according to the extraction methods used. Analysis of rosemary EO volatiles from Brazil (Takayama *et al.*,2016) and Morocco (Bouyahya *et al*., 2017) showed that major component was eucalyptol with a percentage of 28.5 and 23.67%, respectively. Studies on the chemical composition of the essential oils from clove and rosemary revealed a great variability in their chemical profile in relation to growing conditions, sampling moment, phenological stage, extraction and analytical methods used and even the existence of new chemotypes as previously suggested (Kokkini *et al.*, 2004; Sharma and Tripathi, 2008). The chemical composition as well as the antibacterial activity of clove and rosemary EOs has been described by several authors. However, studies on antifungal activity of these essential oils against *A. niger aggregates* and their effect on OTA synthesis are scarce.

In the current study, the lag phase, radial growth and ochratoxin A accumulation by strains of *Aspergillus tubingensis* and *A. luchuensis* were strongly influenced by clove and rosemary EOs. In general, the statistical analysis showed that EO type, the concentrations, fungal isolate and the interactions between these factors have a highly significant effect (p=0.000) on radial growth. For clove EO, mean inhibition rates greater than 90% were obtained at 200 µL/L, showing that the effectiveness of clove EO exceeds some fungicides widely used in Morocco (azoxystrobin, benomyl, hexaconazole and pyrimethanil) (Zouhair *et al*., 2014; Laaziz *et al*., 2017). In fact, the inhibition rates vary from 1.19 to 13.34% at the lowest concentration of the EO (25 µL/L) and reached 69.18 to 100% for a concentration of 200 µL/L. Study of Passone *et*

al. (2012) reported that the application of 500 µL/L of clove EO inhibited the growth of *Aspergillus* section *Nigri* with 48.8 to 100%, according to the concentration of essential oils, strains and water activity levels. In 2016, Santamarina *et al.* reported significant antifungal activity of clove EO against *Fusarium* spp. They demonstrated that for a concentration of 300 mg/mL, there was a growth reduction of 88% in case of *F. graminearum*. Boukaew *et al.* (2017) also studied the antifungal effect of clove EO but on *A. flavus* responsible of the deterioration of maize in storage in Thailand. They demonstrated that low concentrations of clove essential oil (1 and 10 µL/L) induce a stronger growth inhibition (85.7 and 94.0%, respectively) and complete growth inhibition (100%) was achieved at EO concentrations of 50 and 100 µL/L.

With regard to the antifungal activity of rosemary EO, the current study showed that fungal growth inhibition rates of *A. tubingensis* ranged from 23.50 to 41.20% (200 µL/L), depending on the concentration. Bouddine *et al*. (2012) also reported that rosemary EO showed a weaker effect on *A. niger* using the broth dilution method. The antifungal activity of rosemary EO at 20 µl, using the disc diffusion method, showed inhibitory effect against *A. parasiticus* with an inhibition level of 17% (Rasooli *et al.*, 2008). In another study, the same essential oil was found to inhibit the growth of *F. verticillioides* (29.7%) at a concentration of 300 µg/mL (Bomfim *et al.*, 2015). The weaker effect of rosemary EO on growth inhibition for fungal pathogens was also demonstrated (1.56 to 24.17% at 1 µL/mL) by Matusinsky *et al.* (2015).

Investigation towards the synergistic or potential effects of the different compounds of EOs can give more insight into how the composition of EOs affects antifungal activities. In fact, Morcia *et al.* (2012) demonstrated that eugenol, the major components of clove EO, has a high level of activity against *A. tubingensis* and *A. carbonarius*. However, eucalyptol (major compound of rosemary EO) was only active at the highest doses (2%). Nazzaro *et al.* (2017) also reported that eucalyptol and eugenol exhibited an important antifungal activity. Many studies demonstrated that, the lipophilic properties and low molecular weight of essential oils allows them to cross cell membrane causing irreversible cell wall and cellular organelle damage as well as affecting the equilibrium of inorganic ions and pH homeostasis (Helal *et al.*, 2007; Rasooli *et al.*, 2006; Pawar *et al.*, 2006).

Many scientists reported the high efficacy of EOs in disease control. The use of EOs in the packaging of fruits and other commodities is reported in several research works (Sivakumar *et al.*, 2014; Guerra-Rosas *et al.*, 2017; Munhuweyi *et al.*, 2017; Talebi *et al.*, 2018). Indeed, Campos et al. (2016) reported that the use of thyme and sage EOs in the headspace of strawberry

package led to a decrease in the degree of contamination of the fruits. In order to improve shelf-life without changing the organoleptic characteristics of jujube fruit, Nikkhah and Hashemi, (2020) demonstrated that the treatment of jujube fruit with thyme, cinnamon and rosemary EOs (0.156, 0.625, 0.078 g/L, respectively) during 60 days of storage did not had a negative impact on taste, texture, aroma and overall acceptance. In addition, the authors suggest that, using multiple essential oils in low concentrations is boosting the antifungal activity because of synergistic actions. The authors demonstrated that, the concentration of penetrated EOs to the fruit flesh remained under the taste detection threshold. According to the European Food Safety Authority (EFSA, 2012) the Acceptable Daily Intake (ADI) and Acceptable Operator Exposure Level (AOEL) for eugenol are 1.0 mg/kg bw/day. In our study a total inhibition for clove essential oil was obtained at 200 µL/L meaning that the use of this essential oil to conserve fruits in storage seems to be safe. On the other hand, based on the Maximized Survey-derived Daily Intake (MSDI) approach, EFSA. (2013), reported that, 1,8-cineole (eucalyptol) present no safety concern (1200 µg/capita/day)

In parallel to the fungal growth inhibitory effect by the two tested EOs, there was a contradictory effect on OTA biosynthesis by both tested *Aspergillus* strains (reduction or stimulation). Although several authors have reported that *A. tubingensis* was able to produce OTA, the ability of this species to produce this toxin is controversial. Indeed, studies have shown that strains of *A. tubingensis* were able to produce a metabolite identified by HPLC-FLD as OTA (Medina *et al*., 2005; Perrone *et al*., 2006; Selouane *et al*., 2009; Chiotta *et al*., 2011). While others have considered that *A. tubingensis* was not an OTA producer (Abarca *et al*., 2004; Frisvad *et al*., 2011). Pantelides *et al.* (2017) also showed that none of the 261 strains of *A. tubingensis* isolated from wine grapes were found to be ochratoxigenic when analyzed by UPLC-MS/MS while some of these isolates were initially considered to be toxin producers by HPLC-FLD. In the same way, Storari *et al*. (2012) re-examined *A. tubingensis* strains previously described as ochratoxigenic using LC-MS and could not detect the toxin, concluding that *A. tubingensis* cannot be considered as an ochratoxigenic species. This is in agreement with more recent publications (Gil Serna *et al*., 2019 and Tavakol *et al*., 2020). Therefore, data related to OTA production in our controls was validated by using an UPLC-MS/MS based method, in order to be sure that the observed peak is not an artifact (figure 4). Our results showed that *A. tubingensis* strains used in this study produce OTA and to our knowledge, this is the first time that the production of OTA by *A. tubingensis* using the UPLC-MS/MS technique has been confirmed.

The inhibitory effect of rosemary EO on OTA production was also reported by El Khoury *et al*. (2016); they found that this EO significantly inhibited the production of OTA by *A. carbonarius*. Bomfim *et al*. (2015) concluded that rosemary EO reduced fumonisins B1 and B2 contamination by *F. verticillioides*. Experiments with *A. parasiticus* clearly illustrate a reduction of aflatoxin production by using rosemary EO (Rasooli et al., 2008). The use of eugenol also caused a reduction of aflatoxin B1 production by *A. parasiticus* and *A. flavus* (Jahanshiri *et al*., 2015; Caceres *et al*., 2016).

Other studies showed that, the use of some essential oils as a biocontrol agent against fungi, lead to the stimulation of the mycotoxin biosynthesis. In fact, the stimulation of OTA production depended on the strain, the nature of the essential oil and the applied dose. The results of the current study showed that certain sub-lethal concentrations of EOs stimulate the production of OTA by *A. tubingensis*. Lappa *et al.* (2017) who demonstrated that the treatment of *A. carbonarius* with lemongrass, cinnamon and mandarin essential oils leads to a decrease in the growth rate but increases the production of OTA. The stimulation of OTA biosynthesis by essential oils was also reported by Passone *et al.* (2012), they demonstrated that species of *A. niger aggregate* and *A. carbonarius* tended to show OTA stimulation in the presence of 1000 µL/L of poleo essential oil. In addition, Mateo *et al.* (2017) also reported that a stimulation of AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2 accumulation was registered in some cultures treated with ethylene-vinyl alcohol (EVOH) copolymer films containing oregano, carvacrol and cinnamon, these findings are similar to those reported by Bluma and Etcheverry. (2008) for the species *Aspergillus* section *flavi*.

Mycotoxin production may be stimulated when stressing environmental conditions and sub-lethal antifungal agent doses are maintained in the culture medium during the growth of mycotoxin-producing fungi (Mateo *et al.*, 2013; Prakash *et al.*, 2015).

In conclusion, the results of the effect of clove and rosemary EOs on fungal growth and OTA production by different isolates has shown that these oils had significant antifungal activity. In fact, the inhibition rates vary according to the isolate and the dose of the essential oil (20 to 100%). In general, the statistical analysis showed that the different concentrations of clove and rosemary EOs, the strains and their interactions have a highly significant effect on radial growth ($p \leq 0.001$). Mean inhibition rates greater than 85% were obtained at the level 200 µL/L, showing that the effectiveness of clove EO exceeds some fungicides tested and widely used in Morocco (azoxystrobin, benomyl, hexaconazole and pyrimethanil). Clove EO can be used to

control fungal growth and mycotoxin production as potential alternative to chemical control. However, more studies are required to evaluate the *in vivo* efficacy of these EOs and to understand their effects on the expression of OTA biosynthesis and regulation genes.

Competing Interests: The Author(s) declare(s) no conflict of interest.

Acknowledgments: This work was carried out in part within the framework of the South Initiatives Project (SI-VLIR UOS) “Capacity building in training and research to optimize the use of fungicides and the development for natural alternatives to chemical fungicides” between Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Fez, Morocco and Ghent University, Ghent, Belgium. The authors kindly thank the City of Innovation, Sidi Mohamed Ben Abdellah University, Fez Morocco, for GC/MS analysis.

LITERATURE CITED

Abarca M.L., F. Accensi, J. Cano, F.J. Cabanes, 2004. Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie Van Leeuwenhoek* 86, 33-49. DOI: 10.1023/B:ANTO.0000024907.85688.05

Audenaert K., E. Callewaert, M. Hofte, S. De Saeger, G. Haesaert, 2010. Hydrogen peroxide induced by the fungicide prothioconazole triggers deoxynivalenol (DON) production by *Fusarium graminearum*. *BMC Microbiology* 10, 1-10. DOI : https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-112.

Bassole I.H.N. and H.R. Juliani, 2012. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules* 17, 3989-4006. DOI :10.3390/molecules17043989

Battilani P., P. Giorni, T. Bertuzzi, S. Formenti, A. Pietri, 2006. Black aspergilli and ochratoxin A in grapes in Italy. *International Journal of Food Microbiology* 111, 53-60. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.03.006

Baydar H., O. Săgdiç, G. Özkan, T. Karadŏgan, 2004. Antibacterial activity and composition of essential oils from origanum, thymbra and satureja species with commercial importance in turkey. *Food Control* 15, 169-172. https://doi.org/10.1016/S0956-7135(03)00028-8

Bennouna F., S. Ibnsouda Koraichi, H. Barkai, Y. Lekbach, S.El Abed, M. Lachkar. 2018. Essential oil effect on the physicochemical characteristics of different wood species. *Asian Journal Scientific Research* 11, 568-573. DOI: 10.3923/ajsr.2018.568.573

Bluma R. and M. Etcheverry, 2008. Application of essential oils in maize grain: impact on *Aspergillus* section *Flavi* growth parameters and aflatoxin accumulation. *Food Microbiology* 25, 324-334. https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.10.004

Bomfim D. S., L. P. Nakassugi, J. F. P. Oliveira, C. Y. Kohiyama, S. A. G. Mossini, R. Grespan, S. B. Nerilo, C. A. Mallmann, B. A. A. Filho and M. Machinski, 2015. Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by *Rosmarinus officinalisL*. essential oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. *Food Chemistry* 166, 330–336. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.06.019

Bouddine L., B. Louaste, S. Achahbar, N. Chami, F. Chami and A. Remmal, 2012. Comparative study of the antifungal activity of some essential oils and their major phenolic components against *Aspergillus niger* using three different methods. *African Journal of Biotechenology* 11, 14083-14087. http://dx.doi.org/10.5897/AJB11.3293

Boukaew S., P. Prasertsan and S. Sattayasamitsathit, 2017. Evaluation of antifungal activity of essential oils against aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and their allelopathic activity from fumigation to protect maize seeds during storage. *Industrial Crops and Products* 97, 558-566. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.01.005

Bouyahya A, A. Et-Touys, Y. Bakri, T. Ahmed, H. Fellah, J. Abrini, N. Dakka, 2017. Chemical composition of *Mentha pulegium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. *Microbial Pathogenesis,* Doi: 10.1016/j.micpath.2017.08.015.

Božik M., M. Císarová, D. Tančinová, L. Kouřimská, L. Hleba and P. Klouček, 2017. Selected essential oil vapours inhibit growth of *Aspergillus spp*. in oats with improved consumer acceptability. *Industrial Crops and Products*. 98, 146-152. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.044

Bragulat M.R., M.L. Abarca and F.J. Cabanes, 2001. An easy screening method for fungi producing Ochratoxin in Pure Culture. *International Journal of Food Microbiology* 71, 139-144. DOI: 10.1016/s0168-1605(01)00581-5

Caceres I., R. El Khoury, A. Medina, Y. Lippi, C. Naylies, A. Atoui, A. El Khoury, I. P. Oswald, J.D. Bailly and O. Puel, 2016. Deciphering the Anti-Aflatoxinogenic Properties of Eugenol Using a Large-Scale q-PCR Approach, *Toxins* 8, 123. doi: 10.3390/toxins8050123

Campos T., S. Barreto, R. Queirós, S. Ricardo-Rodrigues, MR. Félix, M. Laranjo, 2016. Conservação de morangos com utilização de óleos essenciais. *AGROTEC* 18,90-6

Chiotta M.L., A. Susca, G. Stea, G. Mulè, G. Perrone, A. Logrieco, S.N. Chulze, 2011. Phylogenetic characterization and ochratoxin A-Fumonisin profile of black *Aspergillus* isolated from grapes in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 149, 171-176. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.06.002

Copetti M.V., J.L. Pereira, B.T. Iamanaka, J.I. Pitt and M.H. Taniwaki, 2010. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. *International Journal of Food Microbiology* 143, 67-70. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.031

Coronel M.B., V. Sanchis, A.J. Ramos and S. Marin, 2010. Ochratoxin A: presence in human plasma and intake estimation. *Food science and Technology International* 16, 5-18. DOI: 10.1177/1082013209353359

De Medeiros F. C.M., F. N. Gouveia, H. R. Bizzo, R. F. Vieira and C. H.S. Del Menezzi, 2016. Fungicidal activity of essential oils from Brazilian Cerrado species against wood decay fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* 114, 87-93. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.06.003

Edris A.E., 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytother. Res*, 21, 308-323. DOI: 10.1002/ptr.2072

El Khoury R., A. Atoui, C. Verheecke, R. Maroun, A. El Khoury and F. Mathieu. 2016. Essential oils modulate gene expression and ochratoxin A production in *Aspergillus carbonarius*. Toxins 8, 242. doi:10.3390/toxins8080242

European Food Safety Authority. 2012. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance plant oils/clove oil. EFSA Journal 10 (1), 2506. doi: 10.2903/j.efsa.2012.2506

European Food Safety Authority. 2013. Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF); Scientific Opinion Flavouring Group Evaluation 23, Revision 4 (FGE.23Rev4): Aliphatic, alicyclic and aromatic ethers including anisole derivatives from chemical groups 15, 16, 22, 26 and 30. EFSA Journal, 11(2), 3092. doi:10.2903/j.efsa.2013.3092.

Farhat A., H. Benmoussa, R. Bachoual, Z. Nasfi, W. Elfalleh, M. Romdhane, J. Bouajilal, 2017. Efficiency of the optimized microwave assisted extractions on the yield, chemical composition and biological activities of Tunisian *Rosmarinus officinalis* L. essential oil, *Food and Bioproducts Processing*http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2017.07.011

Frisvad J.C., T.O. Larsen, U. Thrane, M. Meijer, J. Varga, R.A. Samson, K.F. Nielsen, 2011. Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. *PLoS ONE*. 6, e23496. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023496

Gamza N. K., F. Ozbey and B. Kabak, 2015. Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in cereal flours commercialized in Turkey. *Food Control* 54, 275-281. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.014

Gill A.O., P. Delaquis, P. Russo and R.A. Holley, 2002. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology* 73, 83-92. DOI: 10.1016/s0168-1605(01)00712-7

Gil-Serna J., M. García-Díaz, C.Vázquez, M.T. González-Jaén, B. Patiño, 2019. Significance of *Aspergillus niger* aggregate species as contaminants of food products in Spain regarding their occurrence and their ability to produce mycotoxins. *Food Microbiology* 82, 240-248. DOI: 10.1016/j.fm.2019.02.013

Guerra-Rosas MI., J. Morales-Castro, MA. Cubero-Márquez, L. Salvia-Trujillo, O. Martín-Belloso. 2017. Antimicrobial activity of nano emulsions containing essential oils and high methoxyl pectin during long-term storage. *Food Control* 77, 131-8. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.008

Hajjaji A, M. El Otmani, D. Bouya, A. Bouseta, F. Mathieu, S. Collin and A. Lebrihi, 2006. Occurrence of mycotoxins (ochratoxin A, deoxynivalenol) and toxigenic fungi in Moroccan wheat grains: impact of ecological factors on the growth and ochratoxin A production. *Molecular Nutrition and Food Research* 50, 494-499. DOI: 10.1002/mnfr.200500196

Helal G., M. Sarhan, A. Abu Shahla and E. Abou El-Khair, 2007. Effects of *Cymbopogon citratus l.* Essential oil on the growth, morphogenesis and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* mL2-strain. *Journal of Basic Microbiology* 47, 5-15. DOI: 10.1002/jobm.200610137

IARC. International Agency for Research on Cancer, 1993. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans. IARC, Lyon, France 56, 489-521.

IARC. International Agency for Research on Cancer, 2009. Agents Reviewed by the IARC Monographs vols. 1-100a (by cas numbers) P:10.

Jahanshiri Z., M. Shams-Ghahfarokhi, A. Allameh and M. Razzaghi-Abyaneh., 2015. Inhibitory effect of Eugenol on aflatoxin B1 production in *Aspergillus parasiticus* by downregulating the expression of major genes in the toxin biosynthetic pathway, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*31, 1071-1078. DOI 10.1007/s11274-015-1857-7

Kokkini S., E. Handilou and R. Karouscou, 2004. Clinal variation of *Mentha pulegium* essential oils along the climatic gradient of Greece. *Journal of Essential Oil Research* 16, 588-93. https://doi.org/10.1080/10412905.2004.9698805

Laaziz A., S. Qjidaa, Y. El Hammoudi, A. Hajjaji and A. Bouseta. 2017. Chemical control of fungal growth and ochratoxin A production by *Aspergillus* isolated from Moroccan grapes. *South Asian Journal of Experimental Biology* 7, 2, 84-91.

Lappa I. K., E. Simini, G. E. Nychas and E. Z. Panagou, 2017. In vitro evaluation of essential oils against *Aspergillus carbonarius* isolates and their effects on Ochratoxin A related gene expression in synthetic grape medium. *Food Control* 73, 71-80.https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.08.016

Lasram S., H. Zemni, Z. Hamdi, S. Chenenaoui, H. Houissa, M. Saidani Tounsi, A. Ghorbel. 2019. Antifungal and antiaflatoxinogenic activities of *Carum carvi L., Coriandrum sativum L*. seed essential oils and their major terpene component against *Aspergillus flavus*. *Industrial Crops & Products* 134, 11-18. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.03.037

Leong S.L.L., A.D. Hocking, P. Varelis, G. Giannikopoulos and Scott ES, 2006. Fate of ochratoxin A during vinification of Semillon and shiraz grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 6460-6464. DOI: 10.1021/jf061669d

Mateo E. M., J. V. Gómez, I. Domínguez, J. V. Gimeno-Adelantado, R. Mateo-Castro, R. Gavara and M. Jiménez,2017. Impact of bioactive packaging systems based on EVOH films and essential oils in the control of aflatoxigenic fungi and aflatoxin production in maize. *International Journal of Food Microbiology* 254, 36-46. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.007

Mateo E.M., F.M. Valle-Algarra, M. Jiménez and N. Magan, 2013. Impact of three sterol biosynthesis inhibitors on growth of *Fusarium langsethiae* and on T-2 and HT-2 toxin production in oat grain under different ecological conditions. *Food Control* 34, 521-529. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.05.011

Matusinsky P., M. Zouhar, R. Pavela and P. Novy, 2015. Antifungal effect of five essential oils against important pathogenic fungi of cereals. *Industrial Crops and Products* 67, 208-215. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.022

Medina, A., R. Mateo, L. Lopez-Ocana, F.M. Valle-Algarra, M. Jimenez, 2005. Study of Spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section Nigri. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 4696-4702. DOI: 10.1128/AEM.71.8.4696-4702.2005

Morcia C., M. Malnati and V. Terzi. 2012. In vitro antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. *Food Additives & Contaminants: Part A* 29, 3, 415-422.http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2011.643458

Mourey A. and N. Canillac, 2002. Anti-Listeria monocytogenes activity of essential oils components of conifers. *Food Control* 13, 289-292. https://doi.org/10.1016/S0956-7135(02)00026-9

Munhuweyi K., Caleb OJ, CL. Lennox, AJ. van Reenen, UL. Opara. 2017. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of chitosan-essential oils against pomegranate fruit pathogens. *Postharvest Biology and Technology* 129, 9-22. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.03.002

Murphy P.A., S. Hendrich, C. Landgren and C.M. Bryant, 2006. Food mycotoxins: an update. *Journal of Food Science* 71, 51-65. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00052.x

Nazzaro F, F. Fratianni, R. Coppola and V. De Feo., 2017. Essential oils and antifungal activity, *Pharmaceuticals* 10, 86; doi:10.3390/ph10040086

Nikkhah M, and M. Hashemi. 2020. Boosting antifungal effect of essential oils using combination approach as an efficient strategy to control postharvest spoilage and preserving the jujube fruit quality. *Postharvest Biology and Technology* 160, 111159. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111159

Oliveira R.C., M. Carvajal-Moreno, P. Mercado-Ruaro, F. Rojo-Callejas, B. Corre. 2020. Essential oils trigger an antifungal and anti-aflatoxigenic effect on *Aspergillus flavus* via the induction of apoptosis-like cell death and gene regulation. *Food Control* 110, 107038. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107038

Pantelides I.S., E. Aristeidou, M. Lazari, M.D. Tsolakidou, D. Tsaltas, M. Christofidou, D. Kafouris, E. Christou, N. Ioannou, 2017. Biodiversity and ochratoxin A profile of Aspergillus section Nigri populations isolated from wine grapes in Cyprus vineyards. *Food Microbiology* 67, 106-115. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2017.06.010

Passone M. A., N. S. Girardi and M. Etcheverry, 2012. Evaluation of the control ability of five essential oils against *Aspergillus* section *Nigri* growth and ochratoxin A accumulation in peanut meal extract agar conditioned at different water activities levels. *International Journal of Food Microbiology* 159, 198-206. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.019

Pawar V. and V. Thaker, 2006. In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. *Mycoses* 49, 316-323. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2006.01241.x

Perrone, G., G. Mule, A. Susca, P. Battilani, A. Pietri, A. Logrieco, 2006. Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of Aspergillus carbonarius, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 680-685. DOI: 10.1128/AEM.72.1.680-685.2006

Prakash B., A.Kedia, P.K. Mishra and N.K. Dubey, 2015. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities-potentials and challenges. *Food Control* 47, 381-391. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.023

Qjidaa S., A. Selouane, S. Zouhair, D.Bouya, C.Decock and A. Bouseta, 2014. In vitro effect of pyrimethanil on the fungal growth of ochratoxigenic and no-ochratoxigenic species of *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus foetidus* isolated from Moroccan grapes. *South Asian Journal of experimental Biology* 4, 76-84.

Rasooli I., M. H. Fakoor, D. Yadegarinia, L. Gachkar, A. Allameh and M. Bagher Rezaei, 2008. Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum L*. essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 122, 135-139. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.048

Rasooli, I. and P. Owlia, 2005. Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Phytochemistry* 66, 2851-2856. DOI: 10.1016/j.phytochem.2005.09.029

Remmal A., T. Bouchikhi, K. Rhayour, M. Ettayebi and A. Tantaoui-Elaraki, 1993.Improved Method for the Determination of Antimicrobial Activity of Essential Oils in Agar Medium. *Journal of Essential Oil Research* 5, 179-184. https://doi.org/10.1080/10412905.1993.9698197

Risaliti L., A. Kehagia, E. Daoultzi, D. Lazari, M.C. Bergonzi, S. Vergkizi Nikolakaki, D. Hadjipavlou-Litina and A.R. Bilia, 2019. Liposomes loaded with *Salvia triloba* and *Rosmarinus officinalis* essential oils: In vitro assessment of antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial activities, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. doi.org/10.1016/j.jddst.2019.03.034

Santamarina M. P., J. Rosello, S. Gimenez and M. A. Blazquez, 2016. Commercial *Laurusnobilis L.* and *Syzygium aromaticum L. Merr.* & *Perry* essential oils against post-harvest Phytopathogenic fungi on rice. *LWT - Food Science and Technology* 65, 325-332. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.040

Selouane A., S. Zouhair, D. Bouya, A. Lebrihi, and A.Bouseta. 2009. Natural occurrence of ochratoxigenic *Aspergillus* species and ochratoxin a in Moroccan grapes. *World Applied Sciences Journal* 7, 297-305.

Sharma A., S. Rajendran, A. Srivastava, S. Sharma and B. Kundu, 2017. Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporumf. sp. lycopersici* 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 123, 308-313. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2016.09.011

Sharma N. and A. Tripathi, 2008. Effects of *Citrussinensis (L.) Osbeck epicarp* essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological Research* 163, 337-344. DOI: 10.1016/j.micres.2006.06.009

Sivakumar D. and S. Bautista-Baños. 2014. A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop Protection* 64, 27-37. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.05.012

Storari, M., Bigler, L., Gessler, C., Broggini, G.A.L., 2012. Assessment of the ochratoxin A production ability of *Aspergillus tubingensis*. Food Addit Contam Part A. 29, 1450-1454. DOI:10.1080/19440049.2012.698656

Takayama C., F. Meira de-Faria, A.C. Alves de Almeida, R.J. Dunder, L. P. Manzo, E.A.R. Socca, L.M. Batista, M.J. Salvador, A.R.M. Souza-Brito, A. Luiz-Ferreira, 2016. Chemical composition of *Rosmarinus officinalis* essential oil and antioxidant action against gastric damage induced by absolute ethanol in the rat. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 6, 677-681. http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.09.027

Talebi F., A. Misaghi, A. Khanjari, A. Kamkar, H. Gandomi, M. Rezaeigolestani. 2018. Incorporation of spice essential oils into poly-lactic acid film matrix with the aim of extending microbiological and sensorial shelf life of ground beef. *LWT - Food Science and Technology*. doi: 10.1016/j.lwt.2018.05.067.

Tavakol Noorabadi M., V. Babaeizad, R. Zare, B. Asgari, M. Haidukowski, F. Epifani, G. Stea, A. Moretti, A.F. Logrieco, A. Susca, 2020. Isolation, Molecular Identification, and Mycotoxin Production of *Aspergillus* Species Isolated from the Rhizosphere of Sugarcane in the South of Iran. *Toxins* 12, 122. DOI: 10.3390/toxins12020122

Wan Ainiza W.M., S. Jinap, and M. Sanny, 2015. Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in single and mixed spices. *Food Control* 50, 913-918. https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.09.027

Zinedine A., J.M. Soriano, C. Juan, B. Mojemmi, J.C. Moltó, A. Bouclouze, Y. Cherrah, L. Idrissi, R. El Aouad and J. Mañes. 2007. Incidence of ochratoxin A in rice and dried fruits from Rabat and Salé area, Morocco. *Food Additives and Contaminants* 24, 285-291.DOI:10.1080/02652030600967230

Zouhair S., S. Qjidaa, A. Selouane, D. Bouya, C. Decock and A. Bouseta.2014. Effect of five fungicides on growth and ochratoxin A production by two *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus niger* isolated from Moroccan grapes. *South Asian Journal of Experimental Biology* 4, 118-126.

3. Effet *in vitro* et *in vivo* des huiles essentielles sur la croissance fongique, la production de l'OTA et l'expression des gènes responsables de la biosynthèse de l'OTA par des souches d'*Aspergillus carbonarius* et *A. niger*

Pour mettre en évidence l'effet des HE sur la biosynthèse de l'OTA et vu que la capacité de production des souches d'*A. tubingensis* et *A. luchuensis* est faible, des tests préliminaires ont été réalisés sur l'effet de plusieurs HE sur la croissance fongique et la production de l'OTA par différentes souches appartenant à plusieurs espèces. Nous avons ainsi sélectionné des souches ayant des capacités de production d'OTA élevées (*A. carbonarius* MUCL 49345 et *A. niger* MUCL 49226) et à titre comparatif d'autres souches ayant une production très faible mais appartenant aux mêmes espèces (*A. carbonarius* MUCL 49232, MUCL 49233 et *A. niger* MUCL 49227). Pour le choix des HE, celles du romarin, du clou de girofle et du thym ont été sélectionnées pour leur efficacité à réduire la croissance fongique. L'effet de l'HE du thym sur la production de l'OTA a été également étudié. Pour le test *in vivo* et l'expression des gènes responsable de la biosynthèse de l'OTA chez deux souches d'*A carbonarius* (MUCL 49345) et *A. niger* (MUCL 49227) en présence ou non des deux HE les plus efficaces (thym et clou de girofle) a été étudié.

3.1. Effet des huiles essentielles sur la phase de latence et la croissance radiale des souches *d'Aspergillus niger et A. carbonarius*

Rappelons que l'étude in *vitro* a été réalisée sur milieu CYA supplémenté ou non par trois huiles essentielles différentes, le romarin (*Rosmarinus officinalis*), le clou de girofle (S*yzygium aromaticum*) et le thym (*Thymus satureioides*) à différentes concentrations : 25, 50,100, 200 et 500 µL/L. La croissance fongique d'*A. carbonarius* et d'*A. niger* a été évaluée par la phase de latence et le taux de croissance.

3.1.1. Effet de l'huile essentielle du romarin (*Rosmarinus officinalis*) sur la phase de latence et la croissance fongique

La Figure 25 illustre un exemple de la croissance mycélienne d'une souche d'*A. carbonarius* MUCL 49233 sur milieu CYA sans ajout de l'HE (Témoin) et en présence de différentes concentrations de l'huile essentielle du romarin (25 à 200 µL/L).

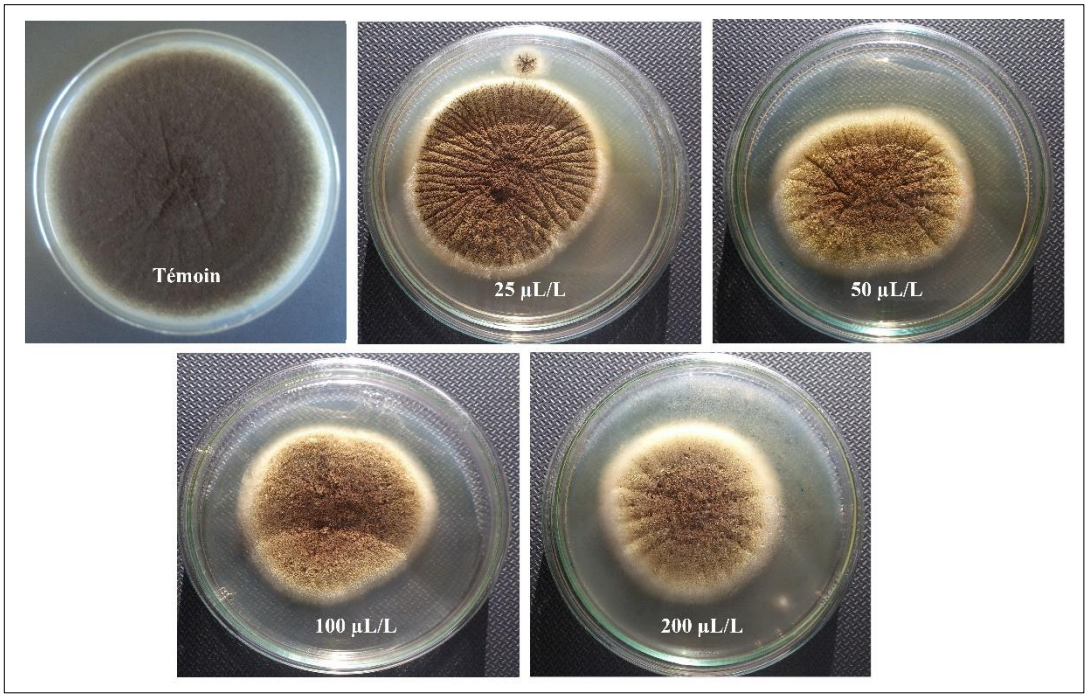


Figure 25. Croissance phénotypique d'une souche d'*A. carbonarius* MUCL 49233 sur milieu CYA additionné de l'huile essentielle de *R. officinalis* (0 : témoin ; 25 ; 50 ; 100 et 200 µL/L) à différentes concentrations après 7 jours d'incubation à 25°C.

Les résultats de cette partie ont montré que la phase de latence dépend essentiellement de la dose, elle varie de un à trois jours en appliquant des doses respectives de 25 et 500 µL/L (Tableau 10). Les taux de croissance des isolats sur milieu CYA supplémenté de l'huile essentielle du romarin à différentes concentrations sont présentés sur la Figure 26. Comme on peut le constater, les taux de croissance des souches d'*Aspergillus* en absence de l'huile essentielle sont compris entre 6.96 et 7.81 mm/jour avec une moyenne de 7.45 mm/jour (Figure 27). En effet, l'utilisation de différentes doses en HE a peu d'effet sur la croissance fongique avec seulement une légère diminution du taux de croissance pour les souches appartenant à l'espèce *A. niger* avec un pourcentage d'inhibition qui varie entre 11.54% (à 25 µL/L) et 35.33% (à 500 µL/L). Pour *A. carbonarius*, les taux d'inhibition varient de 5.89% à 25 µL/L à 31.70% à 500 µL/L.

Tableau 10. Effet de différentes concentrations en huile essentielle du romarin (*Rosmarinus officinalis*) sur la phase de latence (jour) des isolats d'*A. carbonarius* et *A. niger*.

Dose (µL/L)	Souches fongiques				
	A. carbonarius			*A. niger*	
	MUCL49232	MUCL49233	MUCL49345	MUCL49227	MUCL49226
Témoin	<1	<1	<1	<1	<1
25	1	1	1	1	1
50	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2
100	2	2	2	2	2
200	2	2	2	2	2
500	3	3	3	3	3

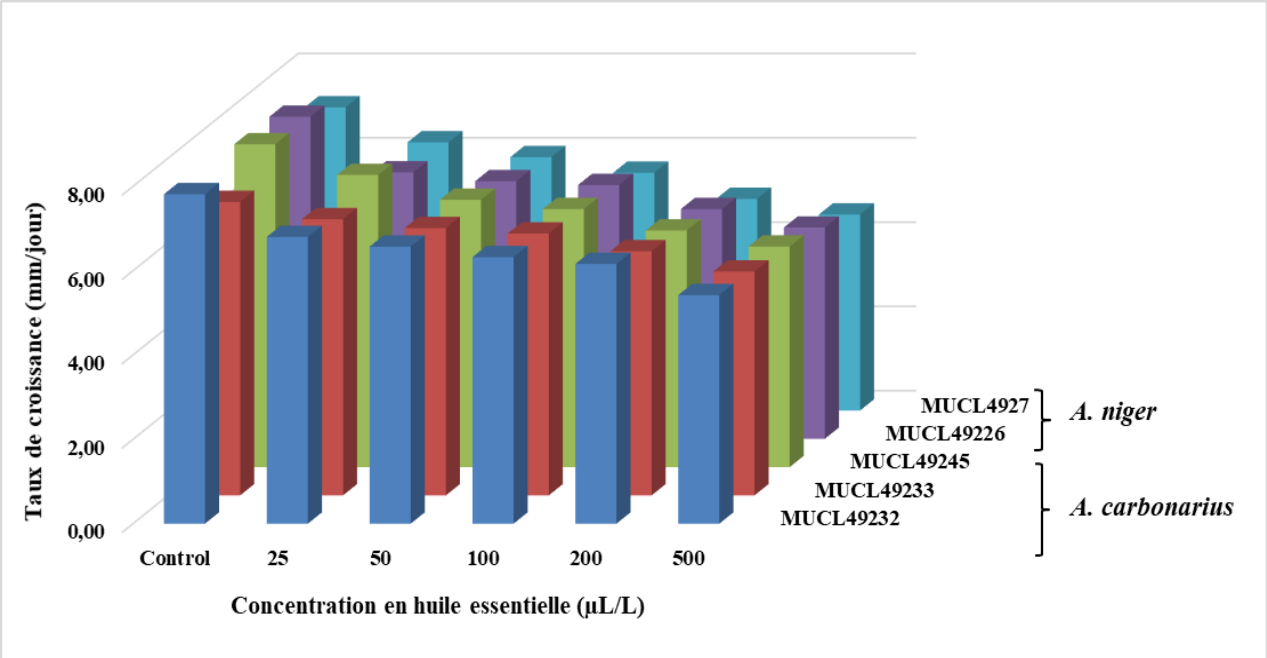


Figure 26. Croissance radiale (mm/jour) des souches d'*A. carbonarius* et *A. niger* sur milieu CYA en présence de l'huile essentielle du romarin (*Rosmarinus officinalis*) à différentes doses (0 : témoin ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 et 500 µL/L) et incubé à 25°C.

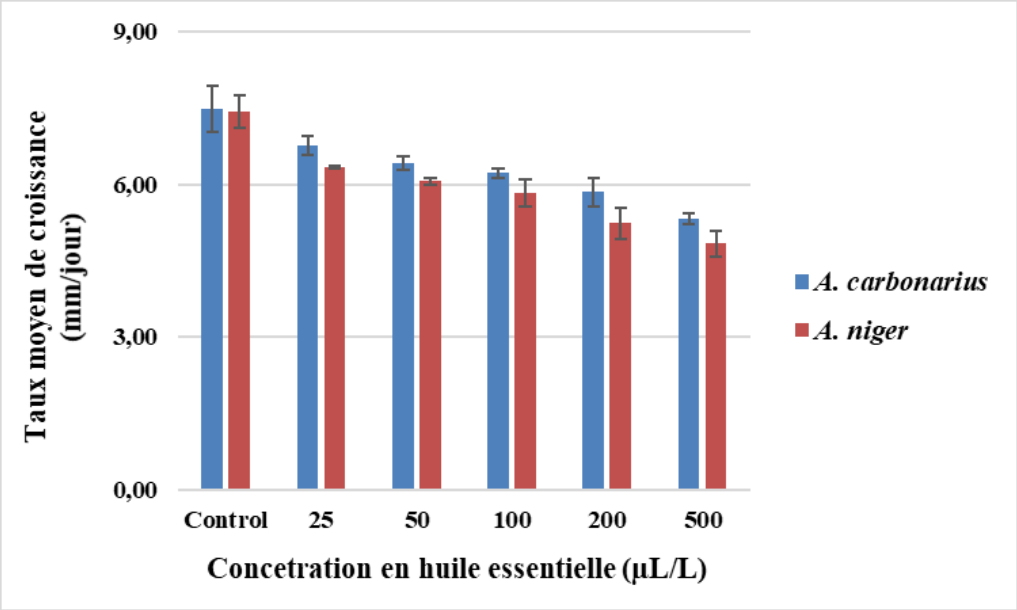


Figure 27. Taux de croissance moyen (mm/jour) calculé pour toutes les souches d'*A. carbonarius* et d'*A. niger* sur milieu CYA additionné de l'huile essentielle du romarin à différentes doses (0 : témoin ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 et 500 µL/L) et incubé à 25°C.

3.1.2. Effet de l'HE du clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) sur la phase de latence et la croissance fongique

Le tableau 10 montre qu'en général, la phase de latence augmente avec l'augmentation des concentrations en huile essentielle indépendamment de la souche et de la dose. Pour tous les témoins, la phase de latence était inférieure ou égale à 1 jour, quelle que soit la souche.

Les résultats du tableau 11 montrent qu'après 7 jours d'incubation, aucune croissance n'a été observée pour le traitement avec la concentration la plus élevée (500 µL/L). Cependant, l'application de l'HE à une concentration finale dans le milieu de culture de 200 µL/L n'a pas pu inhiber complétement la croissance fongique des cinq souches. Ainsi, la phase de latence varie de 4 à 5 jours pour les deux espèces d'*Aspergillus* à la même concentration. De plus, nos résultats ont également montré que la phase de latence variait de un à trois jours pour les cinq souches d'*A. carbonarius* et *A. niger* aux concentrations de 25 à 100 µL/L.

Les résultats de l'effet *in vitro* de l'huile essentielle du clou de girofle sur la croissance radiale des souches *d'A. carbonarius et A. niger* ont mis en évidence l'activité antifongique importante de cette huile essentielle. A titre d'exemple, l'aspect de la souche *A. carbonarius* MUCL 49345 sur milieu CYA supplémenté de l'huile essentielle à différentes concentrations est illustré sur la Figure 28. Comme on peut le remarquer, l'augmentation de la concentration

finale de l'huile essentielle dans le milieu de culture diminue fortement le diamètre de la colonie. Une réduction importante a été observée à partir de 50 µL/L avec une inhibition totale à 500 µL/L. Quant aux témoins, la colonie avait déjà atteint les bords de la boite de Pétri en 7 jours d'incubation.

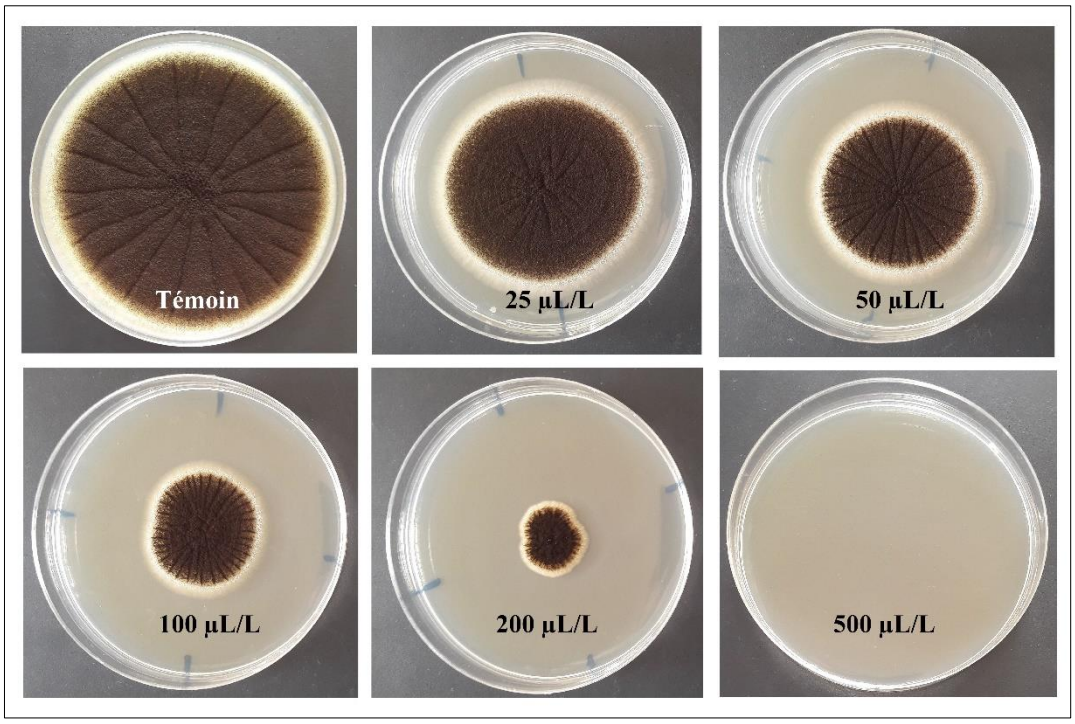


Figure 28. Croissance radiale d'une souche d'*A. carbonarius* (MUCL49345) sur milieu CYA additionné d'huile essentielle de *S. aromaticum* à différentes concentrations (0 : témoin ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 et 500 µL/L), après 7 jours d'incubation à 25°C.

Tableau 11. Effet de différentes concentrations en huile essentielle du clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) sur la phase de latence (jour) des isolats d'*A. carbonarius* et *A. niger*.

Dose (µL/L)	Souches fongiques				
	A. carbonarius			*A. niger*	
	MUCL49232	MUCL49233	MUCL49345	MUCL49227	MUCL49226
Témoin	<1	1	<1	1	<1
25	1	1	1	1	1
50	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2
100	3	3	3	3	3
200	4	5	5	5	5
500	AC	AC	AC	AC	AC

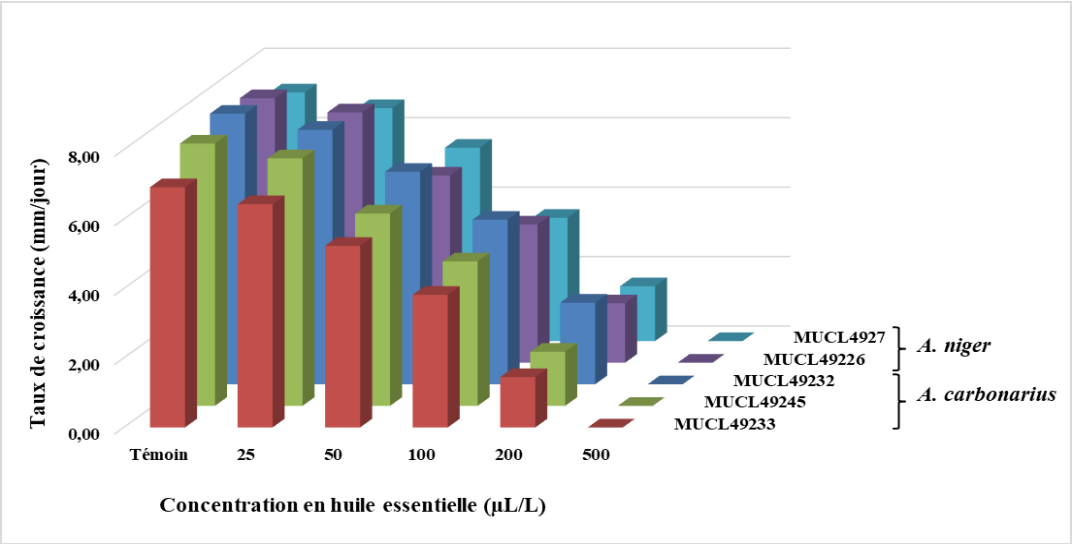


Figure 29. Taux de croissance radiale (mm/jour) des souches d'*A. carbonarius* et A. niger sur milieu CYA en présence de l'huile essentielle du clou de girofle (S*yzygium aromaticum*) à différentes doses (0 : témoin ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 et 500 µL/L) et incubé à 25°C

Les taux de croissance radiale obtenus dans les différentes expériences sont présentés sur la Figure 29. En général, le taux de croissance diminue avec l'augmentation de la dose de l'huile essentielle appliquée. La concentration la plus efficace pour inhiber complètement la croissance des deux espèces d'*Aspergillus* était 500 µL/L, même après 7 jours d'incubation. En absence de l'HE, les taux de croissance des isolats varient de 6.92 à 7.79 mm/jour. Pour mieux visualiser l'effet de l'HE sur la croissance fongique des deux espèces, les taux moyens de croissance pour les souches des deux espèces étudiées ont été calculés (Figure 30). L'ajout de l'HE au milieu de culture diminue le taux de croissance et cette réduction dépend de la concentration et de la souche. Ainsi, à la plus faible dose de l'HE (25 µL/L), le taux de croissance moyen des *A. carbonarius* est de 6.52 mm/jour avec un taux d'inhibition moyen de 12.17%. Quant aux souches d'*A. niger*, les taux d'inhibition moyens varient de 11.91 à 12.46%. A 200 µL/L, le pourcentage de réduction du taux de croissance moyen était compris entre 69.85 et 79.36% pour *A. carbonarius* et entre 77.56 et 77.74% pour *A. niger*. Dans les conditions testées, la concentration la plus efficace est de 500 µL/L, elle inhibe la croissance de toutes les souches 100%.

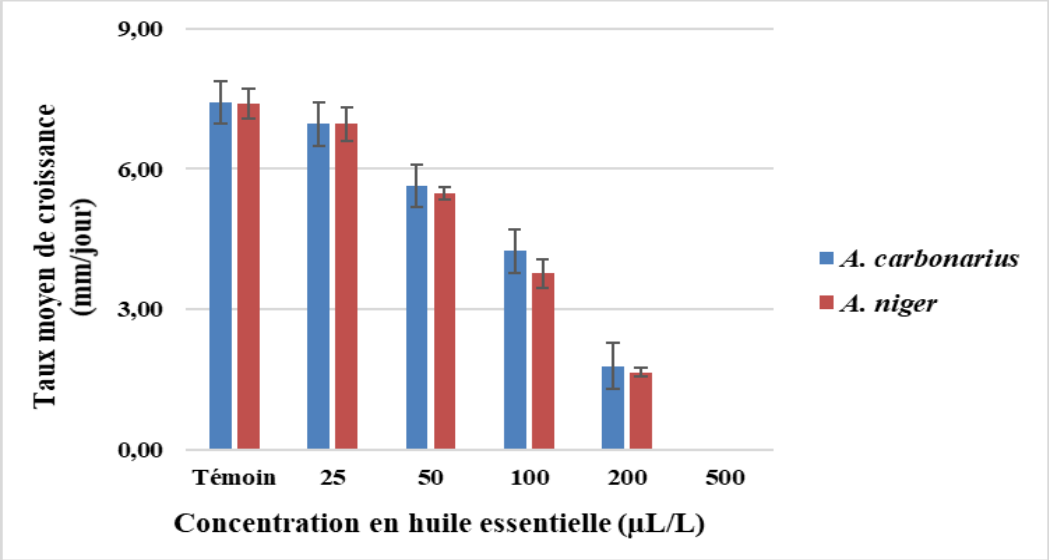


Figure 30. Taux de croissance moyen (mm/jour) calculé pour toutes souches *A. carbonarius* et *A. niger* sur milieu CYA additionné de différentes doses (0 : témoin ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 et 500 µL/L) de l'huile essentielle du clou de girofle à 25°C.

3.1.3. Composition et Effet de l'huile essentielle du thym (*Thymus satureioides*) sur la phase de latence et la croissance fongique

a) Composition de l'huile essentielle

Après hydrodistillation de l'huile essentielle de *Thymus satureioides*, le rendement d'extraction de la partie aérienne a été estimé à 2.3 mL pour 100 g du matériel végétal sec. L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle *Thymus satureioides* a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée d'une part à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) et d'autre part à un spectromètre de masse (GC-MS). Les composés séparés sur une colonne capillaire apolaire ont été identifiés sur base de la comparaison de leurs indices de rétention et leurs spectres de masse par rapport à ceux des composés standards analysés (MS, IR, STD) dans les mêmes conditions ou par rapport à ceux de la banque de données (NIST) et de la littérature (MS, IR).

Plus d'une centaine de composés ont été détectés dont le carvacrol, l'Ocimène et le γ-terpinène et le bornéol représentent plus de 81% des composés détectés (Tableau 12). En effet, les composés majeurs sont le carvacrol avec une proportion de 44.95%, suivie de l'Ocimène (18.93%) et du γ-terpinène (15.26%). Les autres composés ont des proportions qui ne dépassent pas 3.2%.

Tableau 12. Composition chimique de l'HE de thym (*Thymus satureioides*).

Composé	IR[a]	Identification[b]	Proportion (%)[c]
α-thujène	932	MS, IR	0.79
α-pinène	939	MS, IR, STD	0.62
camphène	956	MS, IR	0.73
β-pinène	980	MS, IR, STD	0.02
myrcène	996	MS, IR	0.73
δ-3-carène	1012	MS, IR	0.15
monoterpène	1018	MS	0.05
p-menth-1,4(8)-diène	1024	MS	2.09
Ocimène	1035	MS, IR, STD	**18.93**
γ-terpinène	1069	MS, IR, STD	**15.26**
cis-sabinène	1079	MS, IR	0.44
Non identifié	1110	MS	1.76
borneol	1185	MS, IR, STD	2.41
terpinène-4-ol	1193	MS, IR	0.24
thymol	1307	MS, IR	0.26
carvacrol	1318	MS, IR, STD	**44.95**
diméthyléthylphénol	1326	MS	3.12
α-humulène	1442	MS, IR, STD	1.57
β-caryophyllène	1477	MS, IR	0.05
γ-cadinène	1520	MS, IR	0.22
δ-cadinène	1543	MS, IR	0.20
spathulenol	1609	MS	0.34
Caryophyllene oxide	1615	MS	0.43
Total			**95.36**

[a]IR (Indice de rétention «indice de Kovats » déterminés sur colonne capillaire apolaire TR-5); [b]Identification (MS : basée sur la comparaison des spectres de masse avec ceux de la banque de données NIST ; RI: comparaison des indices de rétention avec ceux de la littérature ; Std: confirmés par injection des standards); [c]Proportion (%) : surface du pic du composé par rapport à la surface totale de tous les composés détectés).

b) Effet de l'huile essentielle du thym sur la phase de latence et la croissance fongique

En général, nos résultats ont montré que la phase de latence, dans les traitements où il y'a une croissance fongique, a augmenté par rapport aux témoins et ce avec des valeurs qui varient selon la souche et la dose appliquée de l'huile essentielle du thym (Tableau 13). Toutes les souches testées ont montré une phase de latence qui ne dépasse pas un à deux jours à des concentrations entre 25 et 100 µL/L, par contre l'application de l'HE à une dose de 200 µL/L

augmente la phase de latence avec des valeurs comprises entre deux et trois jours. Une dose de 500 µL/L de cette HE, conduit à une absence totale de la croissance fongique pour 60% des souches étudiées (2 souches d'*A. carbonarius* et une souche d'*A. niger*). Seules deux souches ont montré une faible croissance à la même dose (500 µL/L), avec une phase de latence qui a atteint 7 jours. La Figure 31 illustre croissance radiale de la souche *A. niger* MUCL49226 sur milieu CYA en présence l'huile essentielle de *Thymus satureioides* à différentes doses.

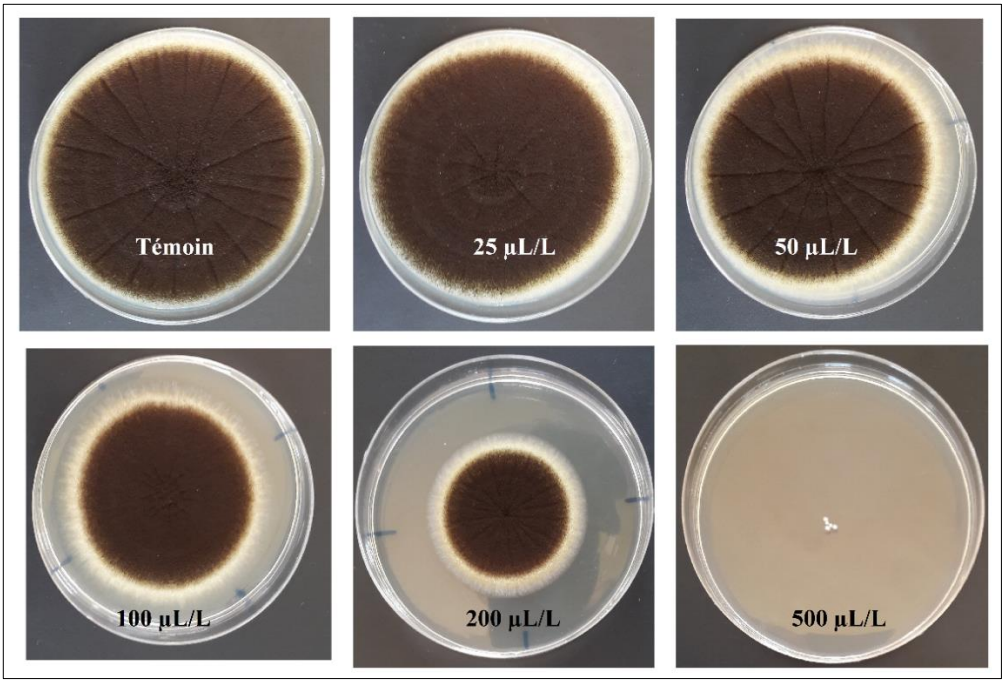


Figure 31. Croissance phénotypique d'une souche d'*A. niger* (MUCL49226) sur milieu CYA additionné de différentes concentrations d'huile essentielle de *Thymus satureioides* (0 : témoin ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 et 500 µL/L) après 7 jours d'incubation à 25°C.

Tableau 13. Effet de différentes concentrations en huile essentielle du thym (*Thymus satureioides*) sur la phase de latence (jour) des isolats d'*A. carbonarius* et *A. niger*.

Dose (µL/L)	**Souches fongiques**				
	A. carbonarius			***A. niger***	
	MUCL49232	**MUCL49233**	**MUCL49345**	**MUCL49227**	**MUCL49226**
Témoin	<1	<1	<1	<1	<1
25	1-2	1	1	1-2	1
50	2	1-2	1	2	1-2
100	2	2	1-2	2	2
200	3	2-3	2-3	3	2-3
500	AC	AC	7	AC	7

Les taux de croissance des souches d'*A. carbonarius* et *A. niger* sur milieu CYA supplémenté de l'huile essentielle du thym à différentes concentrations (0 : témoin ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 et 500 µL/L) sont présentés sur la Figure 32. Comme on peut le constater, les taux de croissance des souches en absence de l'HE sont compris entre 6.92 et 7.79 mm/jour avec une moyenne de 7.41 mm/jour.

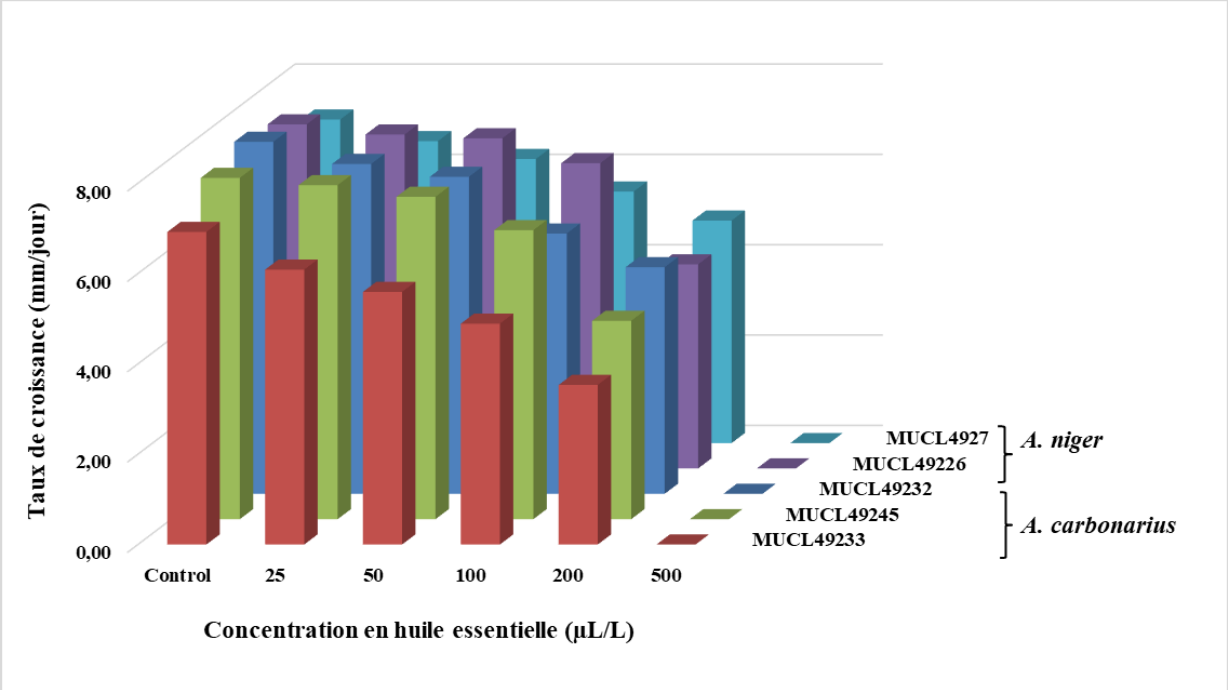


Figure 32. Croissance radiale (mm/jour) des souches d'*A. carbonarius* et *A. niger* sur milieu CYA en présence de l'huile essentielle du thym (*Thymus satureioides*) à différentes doses (0 : témoin ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 et 500 µL/L) et incubé à 25°C.

L'ajout de l'HE du thym provoque en général une réduction de la croissance radiale par rapport aux témoins pour la plupart des concentrations et des isolats testés. A titre d'exemple, les taux de croissance de l'isolat *Aspergillus niger* MUCL54426 varient, selon la concentration de l'HE, de 7.62 mm/jour pour le témoin à 1.71 mm/jour pour une concentration de 200 µL/L avec un taux d'inhibition de 77.56%. Les moyennes des taux de croissance des isolats appartenant à l'espèce *A. carbonarius* varient de 6.52 à 0 mm/jour pour les concentrations respectives de l'HE de 25 à 500 µL/L (Figure 33). Pour *A. niger*, les moyennes des taux de croissance varient de 6.49 à 0 mm/jour correspondants à l'ajout de l'huile du thym aux concentrations respectives de 25 à 500 µL/L.

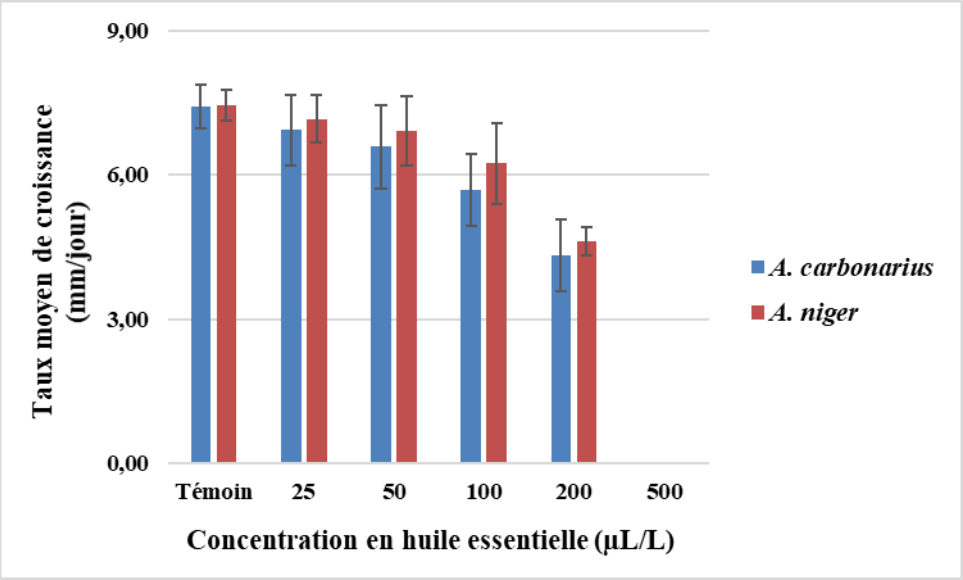


Figure 33. Taux de croissance moyen (mm/jour) calculé pour toutes souches *A. carbonarius* et *A. niger* sur milieu CYA additionné de différentes doses (0 : témoin ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 et 500 µL/L) de l'huile essentielle du thym à 25°C.

3.2. Analyse statistique

Le Tableau 14 montre que les souches (S), les huiles essentielles (HE) et leurs concentrations (C) pris individuellement ainsi que leurs différentes interactions (S×C, S×HE, C×HE, S×C×HE) influencent fortement le taux de croissance radiale (p=0.000).

Tableau 14. Analyse de la variance de l'effet des souches (S), des trois huiles essentielles (HE), de leurs concentrations (0-500 µL/L) et de leurs interactions sur les taux de croissance d'*A. carbonarius* et A. niger sur milieu CYA.

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	D	Sig.
Modèle corrigé	1488,502	89	16,725	393,227	,000
Ordonnée à l'origine	7510,028	1	7510,028	176573,630	,000
S	10,095	4	2,524	59,339	,000
C	1036,147	5	207,229	4872,317	,000
HE	151,085	2	75,543	1776,135	,000
S * C	3,412	20	,171	4,011	,000
S * HE	5,523	8	,690	16,231	,000
C * HE	276,226	10	27,623	649,455	,000
S * C * HE	6,015	40	,150	3,536	,000
Erreur	7,656	180	,043		
Total	9006,187	270			
Total corrigé	1496,158	269			

ddl : degré de liberté
D : liberté
Sig : signification

3. 3. Effet de l'huile essentielle du thym (*Thymus satureioides*) sur la production de l'OTA par des isolats *A. carbonarius* et *A. niger*

Rappelons que l'extraction de l'OTA à partir des milieux de culture a été réalisée selon le protocole décrit par Bragulat *et al*. (2001). Les extraits de culture ont été analysés par HPLC-FLD. Tous les tests ont été réalisés en triple.

Tableau 15. Effet de l'HE de thym (*Thymus satureioides*) sur la production de l'OTA par *A. carbonarius* et *A. niger* sur milieu CYA.

Souches	OTA (µg/g de gélose)					
	Témoin	Concentration de l'HE dans le milieu CYA (µL/L)				
		25	50	100	200	500
MUCL 49232	ND	ND	ND	ND	ND	AC
MUCL 49233	ND	ND	ND	ND	ND	AC
MUCL 49345	92.7±8.44	93±8.26	118.41±3.57	167.88±22.93	160.29±11.97	AC
MUCL 49226	117.47±13.72	99.23±12.84	100.52±67.63	179.84±23.67	184.37±26.08	AC
MUCL 49227	ND	ND	ND	ND	ND	AC

Le tableau 14 montre l'effet de l'huile essentielle du thym sur la production de l'OTA par les souches d'*A. carbonarius* et *A. niger*. L'OTA n'a pas été détecté dans les milieux de culture des 3 isolats d'*A. carbonarius* et *A. niger*, quelle que soit la concentration de l'HE appliquée. Pour les témoins, les teneurs en OTA dans le milieu de culture sont comprises entre 92.7 et 117.47 µg/g de gélose. Comme nous pouvons le constater, une légère réduction de la production de l'OTA a été détectée en présence de l'HE du thym à une concentration de 25 µL/L chez la souche *A. niger* MUCL 45226. Cependant, la biosynthèse de l'OTA a été stimulée chez les deux souches MUCL 45226 et MUCL 45245 aux concentrations 50, 100 et 200 µL/L.

3.4. Effet *in vivo* de l'huile essentielle de *S. aromaticum* et *T. satureioides* sur les raisins

Les HE et extraits végétaux sont utilisés depuis plusieurs décennies dans la conservation des aliments, les produits pharmaceutiques, la médecine alternative et les thérapies naturelles. A cet effet, nous avons testé *in vivo* l'activité antifongique de deux HE (clou de girofle et thym) sur la contamination causée par les *Aspergillus* sur les raisins frais. Dans cet objectif, nous avons étudié l'activité de ces HE sur la réduction de la contamination et aussi sur l'indice en anthocyane, le pourcentage de contamination dans chaque baie de raisin nous donnera une idée sur la teneur en anthocyane dans ces baies de raisin. Comme le montre les figures 34 et 35, les deux HE ont exercé un effet important sur la réduction de la contamination fongique.

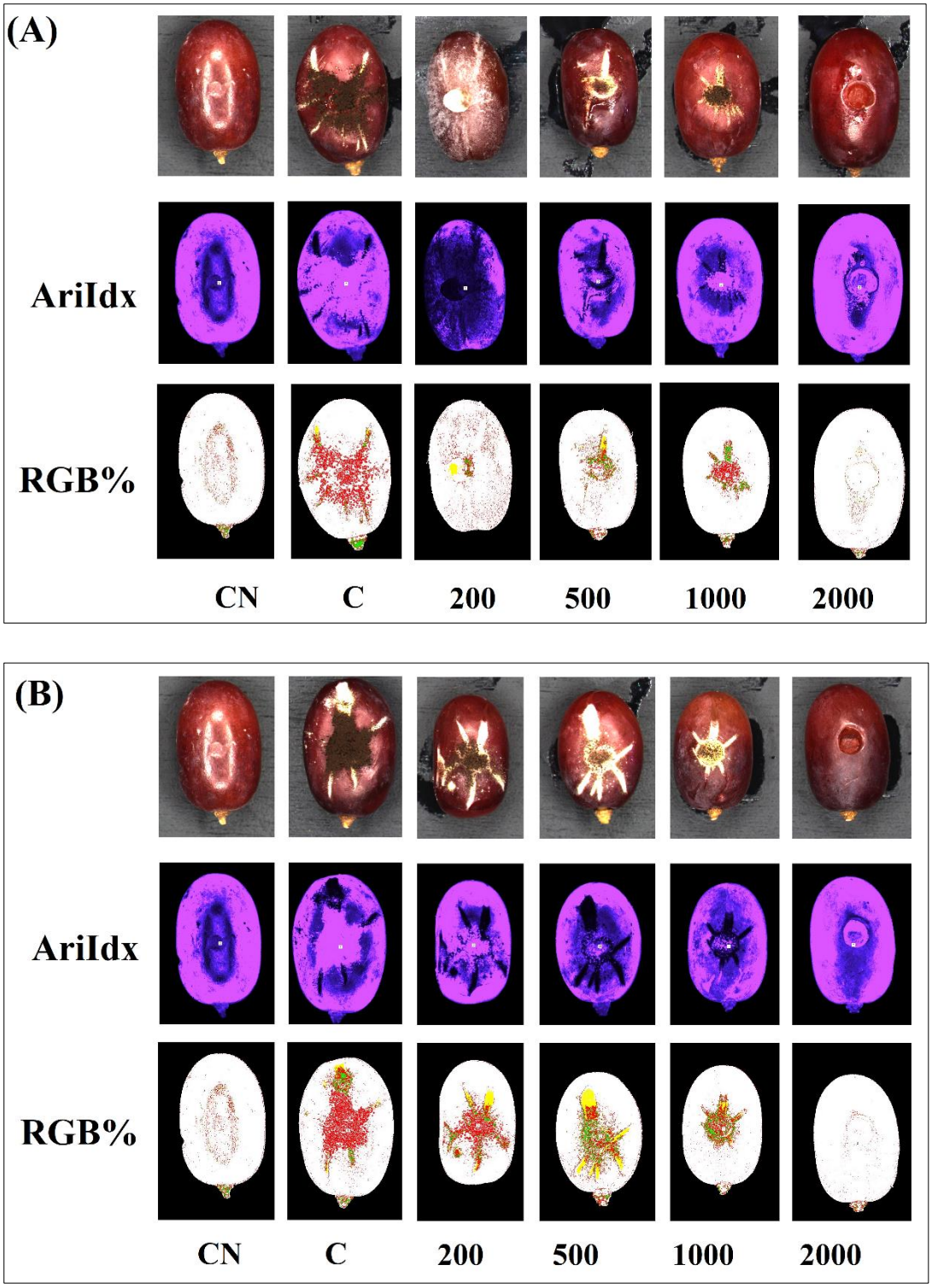


Figure 34. Effet in vivo de l'huile essentielle de *S. aromaticum* sur la croissance des souches *A. carbonarius* MUCL 49345 (A) et *A. niger* MUCL 49226 (B) sur les baies de raisin, à différentes doses (CN : contrôle négatif ; C : contrôle ; 200 ; 500 ; 1000 et 2000 µL/L).

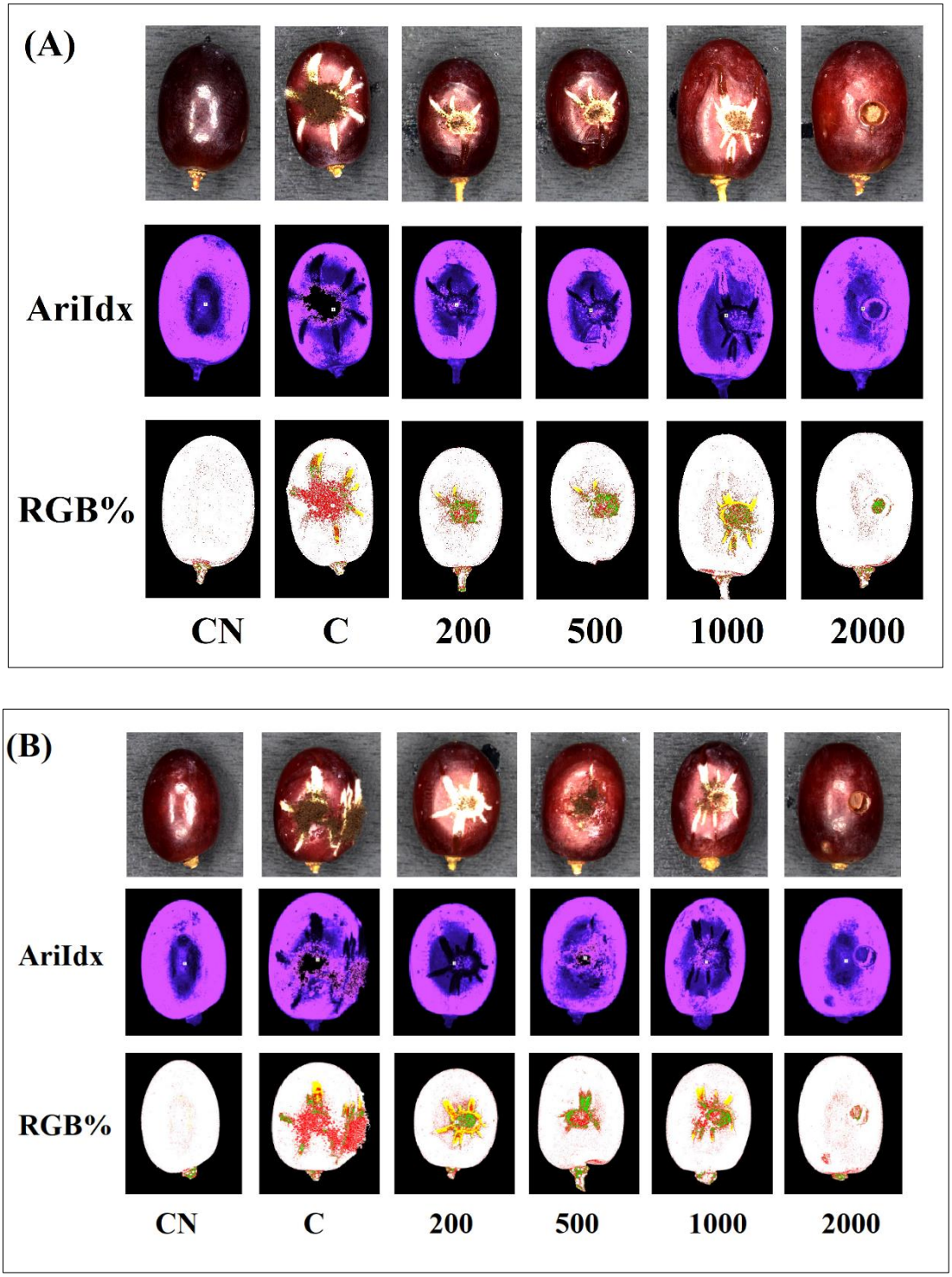


Figure 35. Effet in vivo de l'huile essentielle de *T. satureioides* sur la croissance des souches *A. carbonarius* MUCL 49345 (A) et *A. niger* MUCL 49226 (B) sur les baies de raisin, à différentes doses (CN : contrôle négatif ; C : contrôle ; 200 ; 500 ; 1000 et 2000 µ/L/).

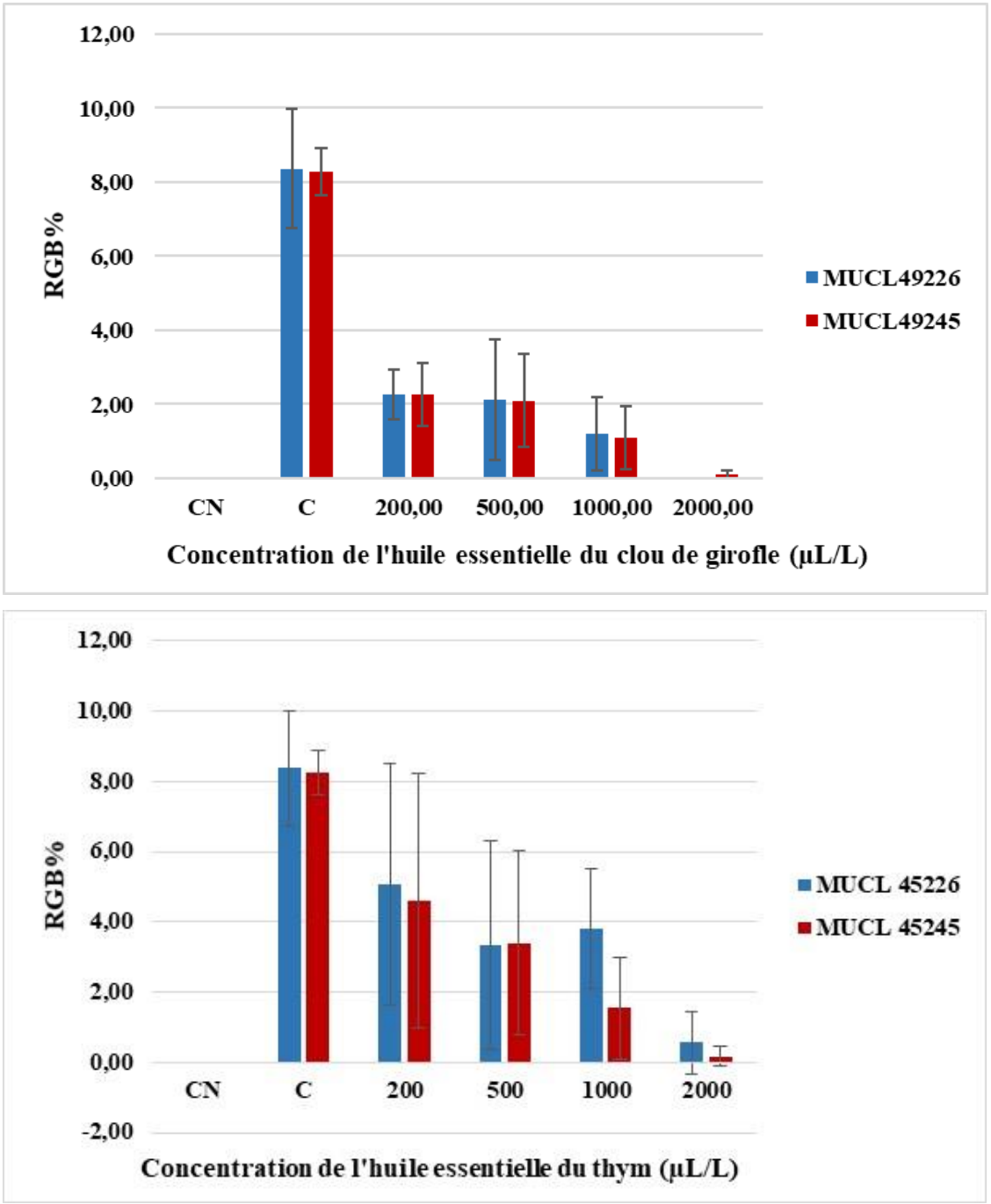


Figure 36. Effet des HE du thym et du clou de girofle sur le pourcentage de contamination fongique (RGB%).

L'application des deux HE provoque en général, une réduction de la contamination fongique (RGB%) par rapport aux témoins pour la plupart des concentrations appliquées. La Figure 36 montre que les RGB% d'*A. niger* MUCL54226 varient selon l'huile essentielle et la concentration appliquée. La réduction des RGB%, varie de 8.37% pour le témoin à 0.1% pour une concentration de 2000 µL/L. À une concentration de 1000 µL/L, la contamination fongique (RGB%) est de 3.80 pour le thym et 1.53% pour le clou de girofle. Pour la souche *A.*

carbonarius MUCL54245, les pourcentages atteignent 1.20 pour l'HE du thym et 1.10 % pour l'HE du clou de girofle. Une concentration de 2000 µL/L du thym provoque une réduction de la contamination avec le %RGB maximal de 0.57% pour *A. niger* et 0.17% pour *A. carbonarius*. Par contre, à la même concentration, l'effet est plus remarquable pour la souche d'*A. niger* où une inhibition totale a été observée.

Concernant l'effet des HE sur l'indice d'anthocyane, la Figure 37 montre que l'utilisation des deux huiles essentielles à une concentration de 2000 µL/L, n'affecte pas cet indice. Les valeurs de l'indice d'anthocyane à cette dose sont similaires à celles obtenues chez les contrôles négatifs. Cependant, l'application de faibles doses en HE (100 et 500 µL/L), induisent une diminution de l'indice d'anthocyanes (AriIdx).

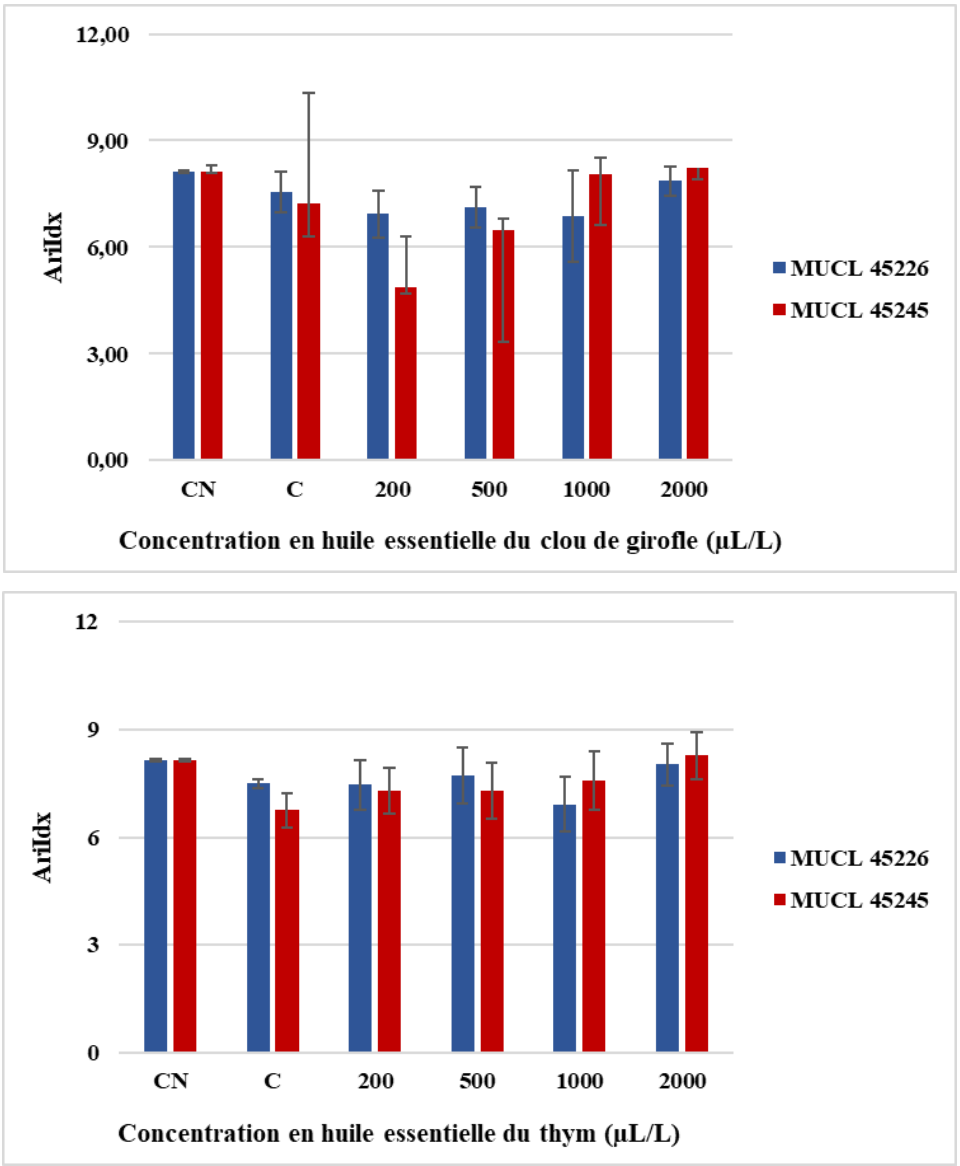


Figure 37. Effet des HE du thym et du clou de girofle sur l'indice d'anthocyane (AriIdx).

3.5. Analyses des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'OTA par *A. carbonarius* et *A. niger*

L'effet des HE du thym et du clou de girofle sur l'expression des gènes d'*A. carbonarius* et *A. niger* a été évalué. Les deux souches (MUCL 45245 et MUCL 45226) utilisées dans cette étude ont montré une expression des gènes PKS, NRPS et HAL. Les différents profils d'expression relative de ces gènes spécifiques liés à chaque souche sont présentés sur la Figure 38 et 39.

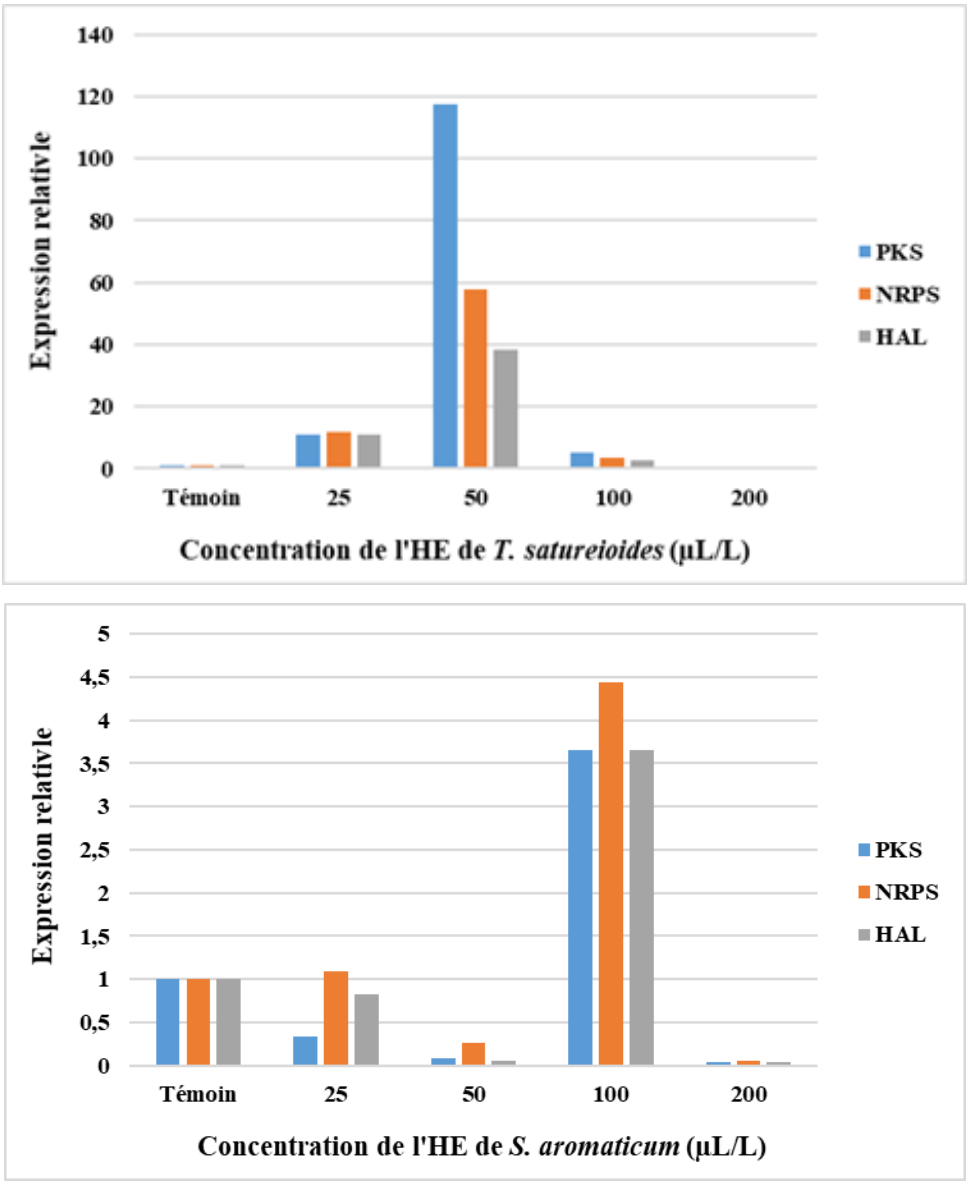


Figure 38. Effet de l'HE du thym et du clou de girofle sur l'expression des gènes (PKS, NRPS et HAL) responsables de la production de l'OTA chez *A. niger*.

En appliquant l'HE du thym contre *A. niger* aux différentes concentrations (figure 37), on constate une surexpression des gènes PKS, NRPS et HAL aux concentrations 25, 50 et 100 µL/L. Cependant, à une concentration de 100 µL/L de l'HE du clou de girofle les mêmes gènes ont été surexprimés. Nous remarquons que pour des concentrations supérieures à 50 µL/L de l'HE du thym, une diminution de l'expression des gènes étudiés. Le même phénomène est observé pour l'HE du clou de girofle pour une dose supérieure à 100 µL/L. Un comportement similaire a été observé pour *A. carbonarius* par l'HE de la mandarine à une concentration de 700 µL/L (Lappa *et al.*, 2016).

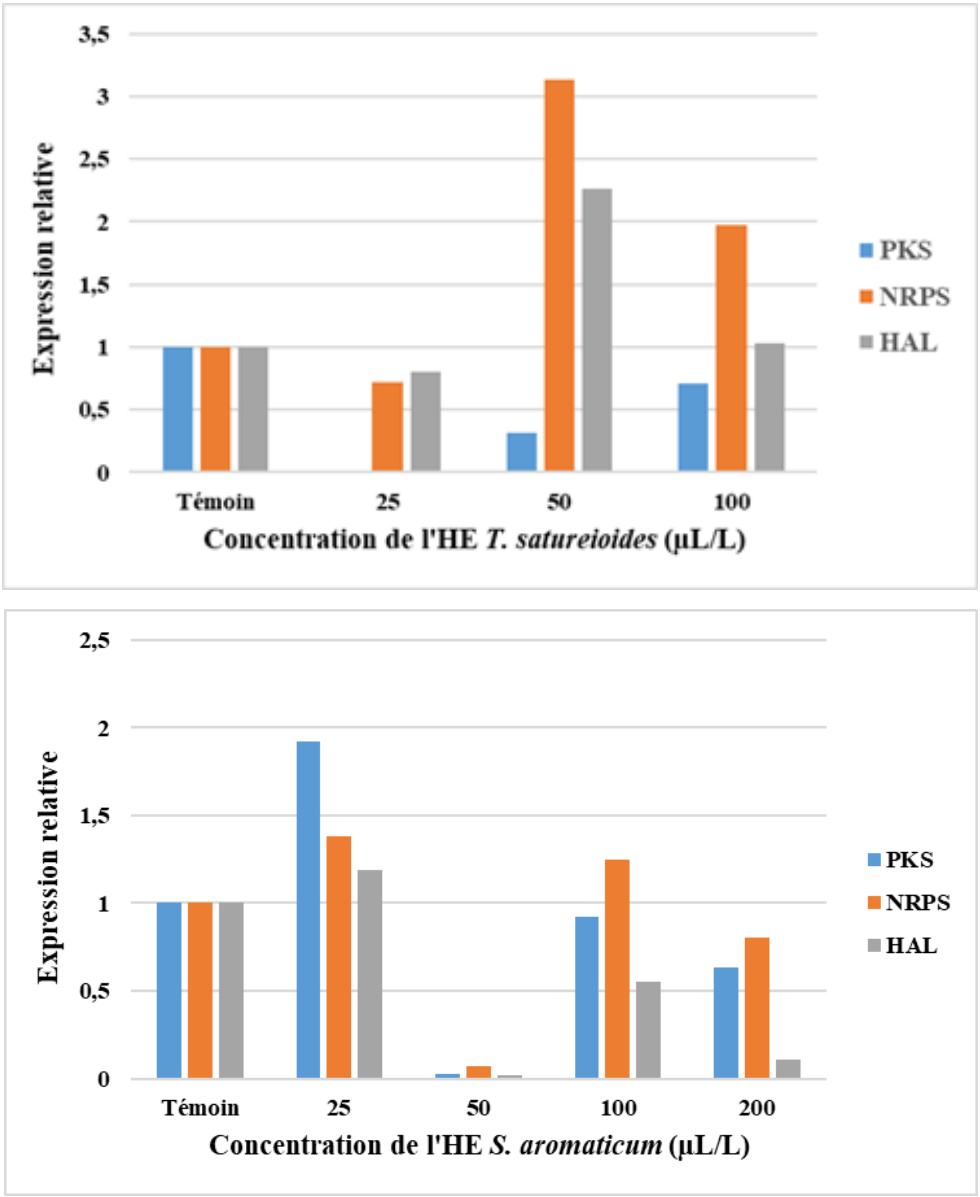


Figure 39. Effet de l'HE du thym et du clou de girofle sur l'expression des gènes (PKS, NRPS et HAL) responsables de la production de l'OTA chez *A. carbonarius*.

Chez la souche *A. carbonarius* MUCL 49345, l'expression des gènes de structure PKS, NRPS et HAL est affectée par les deux HE. En effet, à une dose de 50 µL/L de l'HE du thym, l'expression des gènes NRPS et HAL a augmenté. Par contre, une diminution de l'expression des deux gènes (NRPS et HAL) est obtenue pour une dose de 100 µL/L.

Concernant l'effet de l'HE du clou de girofle, un effet stimulateur de l'expression des gènes étudiés (PKS, NRPS et HAL) a été observé à une dose de 25 µL/L. A l'exception de la dose de 50 µL/L, les activités d'induction de ces gènes diminuent en fonction de la concentration appliquée (100 et 200 µL/L) (Figure 39). Le phénomène observé à 50 µL/L (trois répétitions), est difficile à interpréter à la lumière de ce qui a été rapporté dans la littérature.

4. Discussion

Pour réduire l'utilisation des substances phytosanitaires, la recherche d'autres alternatives, comme l'utilisation des HE ont fait l'objet de plusieurs études. En effet, les HE ont un large spectre d'activité biologique et peuvent constituer un moyen de lutte efficace contre les champignons phytopathogènes.

Dans la présente étude, nous avons testé l'activité antifongique de trois HE (Romarin : *Rosmarinus officinalis* ; thym : *Thymus satureioides* et clou de girofle : *Syzygium aromaticum*) sur la croissance mycélienne et la production de l'OTA par des souches d'*A. carbonarius* et *A. niger* agrégats. Les huiles essentielles ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée d'une part à un détecteur à ionisation de flamme et d'autre part, à un spectromètre de masse. L'analyse GC a révélé que les composés majeurs des HE du romarin, thym et clou de girofle étaient respectivement, l'eucalyptol, le carvacrol et l'eugénol. Du point de vue composition chimique, les résultats des analyses par GC-MS et GC-FID de l'HE de ***Thymus*** *satureioides* ont montré que le carvacrol représente 44.95% du total des composés volatils. Ces résultats sont en accord avec ceux observés par El Bouzidi *et al*. (2013) qui ont rapporté que le carvacrol était le composé majoritaire avec un pourcentage de 26.5% suivi du bornéol (20.1%). Des résultats similaires ont aussi été notés par Chraibi *et al*. (2016) avec des proportions respectives du bornéol et de carvacrol de 34.26 et 31.21%. Ramzi *et al*. (2019), ont rapporté que le composé majeur des HE de *Thymus satureioides* provenant aussi du Maroc, était le bornéol avec des proportions variant de 20.07 à 48.23%. Pour le clou de girofle, l'eugénol représente 86,41%, ces résultats sont similaires à ceux observés par Santamarina *et al.* (2016) qui ont montré que la proportion d'eugénol dans une HE commercial du clou de girofle était 88,58%. Bozik *et al.* (2017) ont également signalé que l'eugénol était le principal constituant de deux HE commerciales de clou de girofle avec des valeurs de 81.74 et 77.76%. Des études de Boukaew *et al.* (2017) et Sharma *et al.* (2017) ont montré que l'eugénol constitue respectivement 62,43 et 75,41% dans cette HE. En ce qui concerne le romarin, la présente étude a montré que l'eucalyptol représente 35,88% des composés volatiles totaux. Risaliti *et al.* (2019) ont également rapporté des résultats similaires, avec une proportion de 48,72%. L'étude de Farhat *et al*. (2017) ont rapporté que la proportion d'eucalyptol variait de 20,82 à 64,71%, selon les méthodes d'extraction de l'HE du romarin d'origine tunisienne. L'analyse des HE du

romarin du Brésil (Takayama *et al*., 2016) et du Maroc (Bouyahya *et al*., 2017) a montré que le principal composé était l'eucalyptol avec un pourcentage de 28,5 et 23,67%, respectivement.

Des études sur la composition chimique des huiles essentielles ont révélé une grande variabilité dans leur profil chimique. En effet, la composition chimique des HE varie d'une huile à l'autre, cette variation est due essentiellement aux conditions climatiques, au sol, aux zones géographiques où elles sont cultivées, à la période de collecte, au stade de développement, aux méthodes d'extraction et d'analyse et même l'existence de nouveaux chémotypes comme suggéré précédemment par Kokkini *et al*. (2004) et Sharma et Tripathi. (2008). La composition chimique ainsi que l'activité antibactérienne des HE du romarin, du thym et du clou de girofle ont été décrites par plusieurs auteurs. Cependant, les études sur l'activité antifongique de ces huiles essentielles contre les espèces *A. carbonarius* et *A. niger* agrégats et leur effet sur la biosynthèse de l'OTA sont rares.

Dans la présente étude, la phase de latence, la croissance radiale et la production d'ochratoxine A par les souches d'*A. carbonarius* et *A. niger* agrégats ont été fortement influencées par les HE testées. En général, l'analyse statistique a montré que les huiles essentielles, leurs concentrations, les souches et leurs interactions ont un effet hautement significatif (p=0,000) sur la croissance radiale.

Pour l'HE de clou de girofle, des taux d'inhibition moyens supérieurs à 90% ont été obtenus à 200 µL/L, montrant que l'efficacité de l'HE du clou de girofle dépasse certains fongicides largement utilisés au Maroc (Zouhair *et al*., 2014 ; Laaziz *et al*., 2017). En fait, les taux d'inhibition varient de 1,19 à 13,34% à la concentration la plus faible de l'HE (25 µL/L) et ont atteint 69,18 à 100% à 200 µL/L d'HE de clou de girofle. L'étude de Passone *et al.* (2012) ont rapporté que l'application de 500 µL/L de l'huile essentielle du clou de girofle inhibait la croissance d*'Aspergillus* section *Nigri* avec des taux d'inhibition de 48,8 à 100%, cette réduction dépend de la concentration, des souches et l'activité de l'eau. En 2016, Santamarina *et al.* ont noté une activité antifongique significative de l'HE de clou de girofle contre les souches de *Fusarium*. Ils ont démontré qu'à partir d'une concentration de 300 mg/ml, il y avait une réduction de la croissance de 88% de *F. graminearum*. Boukaew *et al*. (2017) ont également étudié l'effet antifongique de l'HE du clou de girofle, sur des souches d'*A. flavus* isolées du maïs en Thaïlande et responsable de la détérioration du maïs en stockage. Ils ont démontré que de faibles concentrations de l'huile essentielle de clou de girofle (1 et 10 µL/L) induisent une

inhibition importante de croissance (85,7 et 94,0%, respectivement) et une inhibition complète de la croissance (100%) a été obtenue à des concentrations de 50 et 100 µL/L.

En ce qui concerne l'activité antifongique de l'HE du romarin, la présente étude a montré que les taux d'inhibition de la croissance fongique d'*A. carbonarius* et *A. niger agrégats* variaient de 23,50 à 41,20% (200 µL/L), selon la concentration de l'HE. Bouddine *et al.* (2012) ont également rapporté que l'HE du romarin avait un effet plus faible sur *A. niger*. L'activité antifongique du romarin à 20 µl, en utilisant la méthode de diffusion sur disque, a montré un effet inhibiteur contre *A. parasiticus* avec un taux d'inhibition de 17% (Rasooli *et al.*, 2008). Dans une étude précédente, la même huile essentielle a inhibé la croissance de *F. verticillioides* (29,7%) à une concentration de 300 µg/mL (Bomfim *et al*., 2015). La faible activité antifongique de l'HE du romarin (1,56 à 24,17% à 1 µL/mL) a également été démontré par Matusinsky *et al*. (2015).

A l'instar de ce qui a été constaté pour le clou de girofle et le romarin, l'HE du thym exerce aussi un effet antifongique important sur les souches d'*A. carbonarius* et *A. niger*. En effet, les taux de croissance varient de 2.13 à 48.94% à des concentrations de 25 à 200 µL/L, voir une inhibition totale (100%) à la dose la plus élevée (500 µL/L). Ces résultats sont similaires à ceux observés par Boubaker *et al.* (2016) qui ont montré que les pourcentages d'inhibition pour cette HE étaient respectivement 75 et 100% contre *P. digitatum* et *P. italicum* à une concentration de 1000 µL/L. L'étude de Kohiyama *et al.* (2015) ont rapporté que l'activité inhibitrice de l'HE du thym contre *A. flavus* s'est produite à une concentration de 250 µg/ml. L'activité antifongique de cette HE a été démontrée par la réduction de la production de l'ergostérol par une souche d'*A. flavus*.

L'étude des effets synergiques entre les composés des huiles essentielles peut donner un meilleur aperçu sur la façon dont ces HE réagissent. En fait, Morcia *et al.* (2012) ont démontré que l'eugénol, le composé majoritaire de l'HE du clou de girofle, présentait une activité antifongique importante contre *A. tubingensis* et *A. carbonarius*. Cependant, l'eucalyptol (composé majeur de l'HE du romarin) n'était actif qu'aux doses les plus élevées (2%). Nazzaro *et al*. (2017) ont également signalé que l'eucalyptol et l'eugénol exerçaient une importante activité antifongique. Les propriétés lipophiles et le faible poids moléculaire des huiles essentielles leur permettent de traverser la membrane cellulaire, causant des dommages irréversibles à la paroi cellulaire et aux organites cellulaires, tout en affectant l'équilibre des

ions inorganiques et l'homéostasie du pH (Helal *et al.*, 2007 ; Rasooli *et al*., 2006 ; Pawar *et al*., 2006).

Parallèlement à l'effet inhibiteur de la croissance fongique des différentes huiles essentielles testées, il y avait un effet contradictoire sur la biosynthèse de l'OTA par les isolats d'*Aspergillus* testés (réduction ou stimulation). L'effet inhibiteur de l'HE du romarin et du thym a été signalé par El Khoury *et al*. (2016), ils ont constaté que ces huiles essentielles inhibaient considérablement la production d'OTA par *A. carbonarius*. Bomfim *et al*. (2015) ont également étudié l'effet de l'HE du romarin sur la production des fumonisines B1 et B2 par *F. verticillioides*, ils ont conclu que cette HE réduisait la production des deux mycotoxines. Rasooli *et al*. (2008) ont également démontré une réduction de la production d'aflatoxine en utilisant l'HE du romarin contre *A. parasiticus*. Kohiyama *et al*. (2015) ont également conclu que l'HE du thym réduit la production de l'AFB1 et l'AFB2 chez *A. flavus*. L'utilisation d'eugénol à 500 µg/mL a également provoqué une réduction de la production d'aflatoxine B1 par *A. parasiticus* (Jahanshiri *et al*., 2015). De plus, il a été démontré qu'une concentration de 0,5 mM d'eugénol permettait une inhibition complète de la production d'aflatoxine B1 avec un impact limité sur la croissance d'*A. Flavus* (Caceres *et al*., 2016).

D'autres études ont montré que l'utilisation de certaines huiles essentielles comme agent de lutte biologique contre les champignons conduisait à la stimulation de la biosynthèse des mycotoxines. En fait, la stimulation de la production d'OTA dépendait de la souche, de la nature de l'huile essentielle et de la dose appliquée. Les résultats de la présente étude ont montré que certaines concentrations sub-létales d'HE semblent stimuler la production d'OTA par *A. tubingensis, A. carbonarius* et *A. niger*. Lappa *et al*. (2017) ont démontré que le traitement d'*A. carbonarius* avec des huiles essentielles de citronnelle, de cannelle et de mandarine entraîne une diminution du taux de croissance mais augmente la production de l'OTA. La stimulation de la biosynthèse de l'OTA par les huiles essentielles a également été rapportée par Passone *et al*. (2012), ils ont démontré que les espèces d'*A. niger* agrégats et d'*A. carbonarius* avaient montré une stimulation de l'OTA en présence de 1000 µL/L de l'huile essentielle de *Lippia turbinata*. De plus, Mateo *et al*. (2017) ont également signalé qu'une stimulation de la production de l'AFB1, AFB2, AFG1 et AFG2 a été enregistrée dans certaines cultures traitées avec des films de copolymère éthylène-alcool vinylique (EVOH) contenant de l'origan, du carvacrol et de la cannelle, ces résultats sont similaires à ceux rapportés par Bluma *et al*. (2008) pour l'espèce *Aspergillus* section *flavi*.

La production des mycotoxines peut être stimulée lorsque des conditions environnementales stressantes et des doses d'agents antifongiques sous-létaux sont maintenues dans le milieu de culture pendant la croissance des champignons producteurs de mycotoxines (Mateo *et al*., 2013 ; Prakash *et al*., 2015).

Concernant les niveaux d'expression des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'OTA, en présence des HE, nos résultats ont confirmé que la stimulation de l'OTA chez *A. carbonarius* et *A. niger* était accompagné par une surexpression des gènes de structure. Les résultats ont démontré que les HE testées (clou de girofle et thym) ont influencé l'expression relative des gènes liés à la biosynthèse de l'OTA. De plus, des différences de l'expression des gènes entre les deux souches productrices d'OTA (MUCL 49345 et MUCL 49226) ont été constatées. Ces différences soulignent la complexité du mécanisme de régulation des voies de biosynthèse de l'OTA. Une surexpression a été observée dans de nombreux cas, liée à des changements dans l'accumulation de l'OTA. Dans la littérature, il existe peu de travaux sur les l'effet des HE sur l'expression génique. Récemment, l'effet des HE sur la régulation des gènes de biosynthèse de l'OTA a été démontré chez *A. carbonarius* (EL Khoury *et al*., 2016 ; Lappa *et al*., 2016), et pour l'aflatoxine chez *A. parasiticus* (Jahanshiri *et al*., 2015) et *A. flavus* (Caceres *et al*., 2016 ; Liang *et al*., 2015). Dans le cas de l'OTA, El khoury et al. (2016) ont rapporté que l'application des huiles essentielles du thym et de clou de girofle à une concentration de 1µL/mL a totalement inhibé la croissance d'une souche d'*A. carbonarius*. Pour la même dose d'HE du romarin, une diminution de la production de l'OTA chez la même souche et qui s'accompagne d'une répression des gènes de structure (PKS et NRPS) ainsi que de régulation (veA et leaA). Une induction de l'OTA par une souche d'*A. carbonarius* à une concentration de 700 µL/L de l'HE de la mandarine a été observée (Lappa *et al.*, 2016). Cette stimulation de la production de la mycotoxine est accompagnée d'une surexpression du gène de structure PKS (responsable de la synthèse de la dihydro-isocoumarine polycétide).

5. Conclusion

Les activités fongicides des huiles essentielles, la littérature croissante sur leurs mécanismes d'action, ainsi que la connaissance de leurs utilisations traditionnelles et nouvelles, mettent l'accent sur les applications possibles de ces substances naturelles dans de nombreux domaines, comme la médecine humaine, l'agriculture, les technologies alimentaires et surtout la réduction de l'utilisation de substances de synthèse et d'additifs.

Dans le test d'inhibition de la croissance mycélienne, les résultats ont montré que les huiles essentielles avaient un effet prononcé et que les taux d'inhibition de la croissance augmentaient en fonction de la concentration de l'HE atteignant 41.20% pour le romarin, 77.56% pour le thym et 100% pour le clou de girofle lorsque la concentration d'HE était de 200 µL/L. Nos résultats ont également montré que les HE testées réduisaient la croissance fongique et cette réduction dépend très significativement ($p \leq 0.001$) de la souche, de la dose appliquée, de l'huile essentielle et de leurs interactions. Les principaux constituants des HE étudiées sont respectivement, l'eugénol (86,41%), l'eucalyptol (35,88%) et le carvacrol (44.95%) pour les HE du clou de girofle, du romarin et du thym.

En ce qui concerne l'efficacité des HE à inhiber la croissance fongique et la production l'OTA, notre étude a démontré des différences entre les souches d*'A. carbonarius* et *A. niger* agrégats. Dans l'ensemble, les HE du clou de girofle et du thym se sont avérées les plus efficaces pour contrôler la croissance fongique mais cette réduction a été accompagnée dans certains cas par une réduction/stimulation de la production de l'OTA. En effet, une relation entre les niveaux de transcription des gènes PKS, HAL et NRPS et la production d'OTA a été observée dans de nombreux cas. Les profils d'expression relatifs ont donné des tendances similaires avec la production d'OTA entre les traitements et les témoins. L'étude des trois gènes structuraux impliqués dans la voie de biosynthèse de l'OTA par q-RT-PCR a mis en évidence une certaine variation entre les deux souches fongiques.

Conclusion générale et perspectives

La contamination des aliments par les champignons et/ou leurs métabolites toxiques, présente un grand problème dans le secteur agricole et agroalimentaire. En effet, plusieurs types de mycotoxines ayant un effet néfaste sur la santé humaine et animale peuvent contaminer les denrées alimentaires, entrainant ainsi des pertes économiques considérables. L'ochratoxine A est l'une des mycotoxines les plus étudiées à cause de sa production par plusieurs espèces de moisissures douées d'un pouvoir toxinogène, principalement les espèces des genres *Penicillium et Aspergillus*. Raison pour laquelle la prévention et la maitrise de la contamination des aliments demeurent indispensables, de ce fait, l'application des fongicides est souvent préconisée. Par ailleurs, l'utilisation des substances naturelles, comme alternatives aux fongicides synthétiques qui stimulent dans certaines conditions la production de l'OTA même si la croissance fongique est réduite, s'avère nécessaire.

Les premiers objectifs de ce projet était l'étude de l'effet de trois fongicides (Hexa, Ortiva et Pyrus) et de l'activité de l'eau (0,90 ; 0,95 ; 0,99) sur la croissance fongique et la production de l'OTA par cinq souches d'*Aspergillus carbonarius* et *Aspergillus*. Les résultats de cette étude ont montré que tous les fongicides réduisent de manière hautement significative la croissance radiale des souches testées et cette réduction dépend du fongicide, de la souche et de la concentration appliquée. Le taux de croissance diminue avec l'augmentation de la dose appliquée des différents agents antifongiques. Il est à noter que parmi les trois fongicides testés, Pyrus « pyriméthanil » s'est avérés le plus efficace, suivi de l'Hexa « hexaconazole », ils ont complétement inhibé la croissance fongique quelles que soient la dose et l'activité de l'eau, excepté pour une souche d'*A. niger* où une croissance a été noté à une dose de $0.01\times DR/0.99a_w$ pour l'hexaconazole. Cependant, l'Ortiva « azoxystrobine » était le moins efficace des trois fongicides. L'effet de l'interaction de l'activité de l'eau (0.90, 0.95 et 0.99) et des fongicides (azoxystrobine, pyriméthanil et hexaconazole) sur la croissance fongique des souches d'*Aspergillus carbonarius et A. niger* a révélé que la diminution de l'activité de l'eau de 0.99 à 0.90 augmente la phase de latence pour les témoins, généralement les colonies ne sont visibles qu'après deux à six jours. D'une manière générale, l'interaction de l'activité de l'eau et les doses des trois fongicides influence aussi bien les phases de latence que les taux d'inhibition des différentes souches testées. Ainsi, la diminution de l'activité de l'eau de 0.99 à 0.90 a_w en appliquant l'Ortiva, augmente la phase de latence et diminue le taux de croissance fongique. A une concentration équivalente à 2×DR, la phase de latence est prolongée jusqu'à cinq jour à

0.95 a_w et jusqu'à 6-7 jours à 0.90 a_w et les taux de croissance moyen sont de l'ordre de 2.2 mm/jour et 0.7 mm/jour. En ce qui concerne l'effet de ces fongicides sur la production de l'OTA, l'application de différentes doses du fongicide à différentes a_w a réduit les concentrations de l'OTA dans les milieux de culture.

En raison de la sensibilité croissante des consommateurs aux effets toxiques de nombreux fongicides de synthèse, l'importance de l'utilisation de produits alternatifs qui respectent la nature et la santé humaine devient nécessaire. Dans ce cadre, le deuxième objectif de notre thèse était de tester *in vitro* l'effet de trois huiles essentielles (clou de girofle « *Syzygium aromaticum* », romarin *« Rosmarinus officinalis »* et thym *« Thymus satureoides »*) sur la croissance fongique et la production de l'OTA par des souche d'*A. carbonarius* et *A. niger* agrégats. Nos résultats ont révélé que le romarin inhibe la croissance fongique mais les taux d'inhibition moyens sont compris entre 13 et 42%.

Les résultats de l'activité antifongique des huiles essentielles de *T. satureoides* et de *S. aromaticum* sur la croissance radiale et la production de l'OTA par les différentes souches a monté que ces huiles ont une activité antifongique remarquable. En effet, les taux moyens d'inhibition de la croissance fongique pour les deux HE varient selon la souche et la dose appliquée (31.22 et 100%), avec une inhibition totale en appliquant l'HE à une concentration dans le milieu de 500 µL/L. L'analyse statistique a montré que les différentes concentrations des huiles essentielles, les souches et leurs interactions ont un effet hautement significatif (p=0,000) sur la croissance radiale. Dans cette étude, l'évaluation de la production de l'OTA par les souches d'*Aspergillus carbonarius et A. niger* agrégats a montré que la production de l'OTA a été stimulée en appliquant les huiles du thym, du romarin et du clou de girofle. Cependant, la biosynthèse de l'OTA a été stimulée chez les deux souches A. niger (MUCL 49226) et A. carbonarius (MUCL 49345) aux concentrations 50, 100 et 200 µL/L avec l'HE du thym et aux doses sous-létales (25 et 50 µL/L) pour l'huile du clou de girofle. L'ajout du romarin au milieu de culture (200 µL/L) favorise la production de l'OTA par *A. tubingensis*.

Le troisième objectif de notre étude était d'évaluer l'effet *in vivo* des huiles essentielles du thym et du clou de girofle sur le pourcentage de contamination (RGB%) et sur l'indice d'anthocyanes. Nos résultats ont montré que l'augmentation de la dose en huile essentielle de 200 à 2000 µL/L réduit clairement le pourcentage de contamination chez les baies de raisin testées. Généralement, les deux huiles essentielles étaient actives à une dose de 2000 µL/L avec un taux d'inhibition qui atteint 100%, selon la souche. L'application de ces deux HE a montré

que l'indice d'anthocyanes (AriIdx) des baies de raisin reste stable en appliquant la dose la plus élevée. Cependant, l'utilisation de faibles doses réduit l'indice d'anthocyanes, ce qui suggère une réduction du taux d'anthocyanes dans les raisins infectés.

Etant donné que nos huiles essentielles ont stimulé la production de l'OTA, des études approfondies étaient nécessaires pour expliquer ce phénomène. Dans ce cadre, l'effet de ces deux huiles sur l'expression des gènes responsable de la production de l'OTA par deux souches d'*A. carbonarius* et *A. niger* a été évalué. Nos résultats ont montré que l'application de l'HE du thym contre *A. niger* induit une surexpression des gènes de structure (PKS, NRPS et HAL) au concentrations 25, 50 et 100 µL/L. De plus, l'induction de l'expression des mêmes gènes a été observée avec l'huile essentielle du clou de girofle aux doses 25 et 100 µL/L. Cependant, à une dose de 200 µL/L du clou de girofle et du thym, une diminution de l'expression des gènes a été observée.

Pour mieux cerner ces phénomènes de stimulation ou de réduction de la production de mycotoxines et les mécanismes de régulation liés à l'application des HE, ce travail ouvre de nouvelles perspectives. Il serait donc intéressant d'une part, d'élargir les effets de ces HE sur plusieurs souches appartenant à d'autres genres fongiques (*Fusarium* et *Penicillium*) et d'autre part, d'évaluer l'effet de ces huiles sur l'expression et la régulation des gènes impliqués dans la biosynthèse des mycotoxines.

Il serait aussi intéressant, de tester l'effet des composés majeurs (eucalyptol, eugénol, … etc) sur l'expression des gènes de régulation et de structure de l'OTA ainsi que d'autres mycotoxines d'intérêt. Ces travaux permettraient une meilleure connaissance des phénomènes impliqués dans l'inhibition/stimulation de la production des mycotoxines et les mécanismes de régulation des gènes du cluster de ces métabolites secondaires. Ceci permettra certainement le développement d'antifongiques naturels sans risque pour la santé humaine et animale.

Références bibliographiques

Abarca, M.L., Accensi, F., Cano, J. et Cabanes, F.J. 2004. Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86, 33-49.

Abbas, H.K., Cartwright, R.D., Xie, W. and Shier, W.T. 2006. Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, Zea mays) hybrids in Arkansas. *Crop Protection* 25, 1-9.

Agostini-Costa, T.S., Vieira, RF., Bizzo, H.R., Silveira, D., Gimenes, M.A. 2012. Secondary Metabolites. In: *Chromatography and its applications*. Dhanarasu DS (ed) In Tech Brazil.

Ahmad, A., Khan, A., and Manzoor, N. 2013. Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazole. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48, 80–86.

Arisan-Atac, I.H.E. and Kubicek, C.P. 1995. Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting identifies subgroups of *Trichoderma viride* and other *Trichoderma sp*. capable of chesnut blight biocontrol. *FEMS Microbiology Letters*. 126, p. 249–256.

Arrus, K., Blank, G., Abramson, D., Clear, R. and Holley, R.A. 2005. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. *Journal of Stored Products Research* 41, 513-527.

Astoreca, A., Barberis, C., Magnoli, C., Combina, M. and Dalcero, A. 2009. Influence of ecophysiological factors on growth, lag phase and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate strains in irradiated corn grains. *International Journal of Food Microbiology* 129: 174-179.

Atukwase, A., Kaaya, A.N. and Muyanja, C. 2009. Factors associated with fumonisin contamination of maize in Uganda. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 2393-2398.

Lecellier, A. 2013. Caractérisation et identification des champignons filamenteux par spectroscopie vibrationnelle. P. 28.

Avantaggiato, G., Havenaar, R. and Visconti, A. 2003. Assessing the zearalenone binding activity of adsorbent materials during passage through a dynamic in vitro gastrointestinal model. *Food and Chemical Toxicology*, 41(10), 1283-1290.

Avantaggiato, G., Havenaar, R. and Visconti, A. 2004. Evaluation of the intestinal absorption of deoxynivalenol and nivalenol by an in vitro gastrointestinal model, and the binding efficacy of activated carbon and other adsorbent materials. *Food and Chemical Toxicology*, 42(5), 817-824.

Avantaggiato, G., Havenaar, R. and Visconti, A. 2007. Assessment of the multimycotoxin binding efficacy of a carbon/aluminosilicate-based product in an in vitro gastrointestinal model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4810-4819.

Awuah, R.T. and Ellis, W.O. 2002. Effects of some groundnut packaging methods and protection with *Ocimum* and *Syzygium* powders on kernel infection by fungi. *Mycopathologia*, 154, 26-29.

Bacha, N., Atoui, A., Mathieu, F., Liboz, T. and Lebrihi, A. 2009. *Aspergillus westerdijkiae* polyketide synthase gene "aoks1" is involved in the biosynthesis of ochratoxin A. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 77-84.

Bacha, N., Mathieu, F., Liboz, T. and Lebrihi, A. 2012. Polyketide synthase gene aolc35-12 controls the differential expression of ochratoxin a gene aoks1 in *Aspergillus westerdijkiae*. *World Mycotoxin Journal*, 5, 177-186.

Bahraminejad, S., Seifolahpour, B. and Amiri, R. 2016. Antifungal effects of some medicinal and aromatic plant essential oils against *Alternaria solani*. *Journal of Crop Protection*; 5(4):603-616.

Bajpai, VK. and Kang, SC., 2010. Antifungal activity of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *Journal of the American Oil Chemists' Society*; 87:327-336.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chemical and Toxicology*. 46:446–75.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Zhiri, A., Baudouxc, D. and Idaomar, M. 2006. Antigenotoxic effects of three essential oils in diploid yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) after treatments with UVC radiation, 8-MOP plus UVA and MMS. *Mutation Research*, 27–38.

Ballantyne, B., 2003. Toxicology of fungicides. In: Marrs, T.C., Ballantyne, B. (Eds.), *Pesticide Toxicology and International Regulation*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.

Bankole, S., Mabekoje, OO. 2004. Mycoflora and occurrence of aflatoxin B1 in dried yam chips from markets in Ogun and Oyo States, Nigeria. *Mycopathologia*, 157: 111-115.

Bassole, I.H.N. and Juliani, H.R. 2012. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules* 17, 3989-4006.

Battilani, P., Giorni, P., Bertuzzi, T., Formenti, S., Pietri, A., 2006. Black aspergilli and ochratoxin A in grapes in Italy. *International Journal of Food Microbiology* 111, 53-60.

Battilani, P., Pietri, A., Bertuzzi, T., Formenti, S., Barbano, C., Languasco, L. 2003. Effect of fungicides on ochratoxin A producing black aspergilli. *Journal of Plant Pathology* 85:285-291.

Baturo-Cieśniewska, A., Lukanowski, A. et Kolenda, M. 2011. Effect of fungicide application on wheat head blight, occurrence of Fusarium spp. And mycotoxin production. *Plant breeding and seed science* 63, 29-38.

Bau, M., Castellà, G., Bragulat, M.R. and Cabañes, F.J. 2005b. DNA-based characterization of ochratoxin A producing and non-producing *Aspergillus carbonarius* strains from grapes. *Reserach in Microbiology* 156, 375-381.

Bau, M., Castellá, G., Bragulat, M.R., Cabañes, F.J., 2006. RFLP characterization of Aspergillus niger aggregate species from grapes from Europe and Israel. *International Journal of Food Microbiology*, 111, 18-21.

Baydar, H., Săgdiç, O., Özkan G., Karadŏgan, T., 2004. Antibacterial activity and composition of essential oils from *origanum, thymbra* and *satureja* species with commercial importance in turkey. *Food Control* 15, 169-172.

Bayram, O., Krappmann, S., Ni, M., Bok, J.W., Helmstaedt, K., Valerius, O., Braus-Stromeyer, S., Kwon, N.J., Keller, N.P., Yu, J.H. and Braus, G.H. 2008. VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* 13:1504-1506.

Beckman, C.H. 2000. Phenolic-storing cells: key to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defense response in plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57, 101-110.

Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P. and Lebrihi, A. 2004. Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *Journal of Applied Microbiology* 97, 1038-1044.

Belli, N., Mariın, S., Sanchis, V., Ramos A.J. 2006. Impact of fungicides on *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on synthetic grape-like medium and on grapes. *Food Additives and Contaminants* 23:1021-1029.

Belli, N., Ramos, A.J., Sanchis, V. et Marin, S. 2004. Incubation time and water activity effects on ochratoxin A production by *Aspergillus* section Nigri strains isolated from grapes. Food Technology Department. *Letters in Applied Microbiology* 38, 72-77.

Bennett, J.W., Machida, M., and Gomi, K. 2010. An overview of

Bennett, J.W., Machida, M., and Gomi, K. 2010. An overview of

Bennett, J.W., Machida, M., and Gomi, K. 2010. An overview of the genus *Aspergillus*, In *Aspergillus*. Vol. 1, pp. 1–17. *Molecular Biology and Genomics*. Caister Academic Press.

Beretta, B., Gaiaschi, A., Galli, C. L. and Restani, P. 2000. Patulin in apple-based foods: Occurrence and safety evaluation. *Food Additives & Contaminants* 17(5), 399-406.

Bernauer, O., Gaines-Day, H. and Steffan, S. 2015. Colonies of Bumble Bees (*Bombus impatiens*) produce fewer workers, less bee biomass, and have smaller mother queens following fungicide exposure. *Insects* 6(4):478-488.

Bethke, N.W., Conard, C.A., Fosdick, L. E., Fox, E.J., Grunig, D., Kirkvold, S.W., *et al.* 2014. Method and apparatus for reducing aflatoxin-contaminated corn. *US Patent Publication*, No. 8919569 B2.

Bhat, R., Rai, R.V. and 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.

Bhat, R., Sridhar, K. R. and Velmourougane, K. 2007. Microbial quality evaluation of velvet bean seeds (Mucuna pruriens L. DC.) exposed to ionizing radiation. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 7, 29-40

Biology and Genomics. Caister Academic Press

Biology and Genomics. Caister Academic Press

Bluma R. and Etcheverry, M. 2008. Application of essential oils in maize grain: impact on *Aspergillus* section *Flavi* growth parameters and aflatoxin accumulation. *Food Microbiology* 25, 324-334.

Bode, H.B., Bether, B., Hofs, K., Zeeck, A. 2002. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *Chembiochem* 3:619-627.

Bomfim D.S., Nakassugi, L.P., Oliveira, J.F.P, Kohiyama, C.Y., Mossini, S.A.G., Grespan, R., Nerilo, S.B., Mallmann, C.A., Filho, B.A.A. and Machinski, M. 2015. Antifungal activity and inhibition of fumonisin production by *Rosmarinus officinalis L*. essential oil in *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. *Food Chemistry* 166, 330-336.

Borgers, M. 1980. Mechanism of Action of Antifungal Drugs, with Special Reference to the Imidazole Derivatives [with Discussion]. *Reviews of Infectious Diseases* 2:520-534.

Botton, B., Breton, A., Fèvre, M., Gauthier, S., Guy, P., Larpent, J.P., Reymond, P., Sanglier, J.J., Vayssier, Y. and Veau, P. 1990. Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle, Ed. *Masson,* Paris, 512p.

Bouddine, L., Louaste, B., Achahbar, S., Chami, N., Chami, F and Remmal, A. 2012. Comparative study of the antifungal activity of some essential oils and their major phenolic components against *Aspergillus niger* using three different methods. *African Journal of Biotechenology* 11, 14083-14087.

Bougnoux, M.E. and Espinasse, F. 2003. Nouvelles applications des techniques de biologie moléculaire en mycologie médicale. *Revue française des laboratoires* (351):67-71.

Boukaew, S., Prasertsan, P. and Sattayasamitsathit, S., 2017. Evaluation of antifungal activity of essential oils against aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and their allelopathic activity from fumigation to protect maize seeds during storage. *Industrial Crops and Products* 97, 558-566.

Bouyahya, A., Et-Touys, A., Bakri, Y., Ahmed, T., Fellah, H., Abrini, J. and Dakka, N. 2017. Chemical composition of *Mentha pulegium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. *Microbial Pathogenesis* 111:41-49.

Boxall, A.B., Hardy, A., Beulke, S., Boucard, T., Burgin, L., Falloon, P.D., Haygarth, P.M., Hutchinson, T., Kovats, R.S., Leonardi, G., Levy, L.S., Nichols, G., Parsons, S.A., Potts, L., Stone, D., Topp, E., Turley, D. B., Walsh, K., Wellington, E. M. and Williams, R. J. 2009.

Impacts of climate change on indirect human exposure to pathogens and chemicals from agriculture. *Environmental Health Perspectives* 117 (4), 508-514.

Boyacioglud, D., Hettiarachchy, N. S., Stack, R. W. 1992. Effect of three systemic fungicides on deoxynivalenol (vomitoxin) production by *Fusarium graminearum* in wheat. *Canadian Journal of Plant Science* 72, 93-101.

Božik M., M. Císarová, D. Tančinová, L. Kouřimská, L. Hleba and P. Klouček, 2017. Selected essential oil vapours inhibit growth of Aspergillus spp. in oats with improved consumer acceptability. *Industrial Crops and Products* 98, 146-152.

Božik, M., Císarová, M., Tančinová, D., Kouřimská, L., Hleba, L and Klouček, P., 2017. Selected essential oil vapours inhibit growth of *Aspergillus spp*. in oats with improved consumer acceptability. *Industrial Crops and Products* 98, 146-152.

Bragulat, M.R., Abarca, M.L. and Cabanes, F.J. 2001. An easy screening method for fungi producing Ochratoxin in Pure Culture. *International Journal of Food Microbiology* 71, 139-144.

Broggli, L.E., Resnik, S.L., Pacin, A.M., Gonzalez, H.H.L., Cano, G. and Taglieri, D. 2002. Distribution of fumonisins in dry-milled corn fractions in Argentina. *Food Additives & Contaminants* 19, 465-469.

Bucheli, P. and Taniwaki, M.H. 2002. Research on the origin, and on the impact of post-harvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee. *Food Additives and Contaminants* 19, 655-665.

Caceres, I., El Khoury, R., Medina, A., Lippi, Y., Naylies, C., Atoui, A., El Khoury, A., Oswald, I. P., Bailly, J.D. and Puel, O. 2016. Deciphering the Anti-Aflatoxinogenic Properties of Eugenol Using a Large-Scale q-PCR Approach, *Toxins* 8, 123.

Cahagnier, B., Richard-Molard, D. 1998. Analyse mycologique in Moisissures des aliments peu hydratés, Ed. Tec & Doc, p 140-158.

Cakir, A., Kordali, S., Zengin, H., Izumi, S. and Hirata, T. 2004. Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium*. *Flavour and Fragance Journal* 19(1).

Calvo, A.M., Bok, J. and Brooks, W., Keller, N.P. 2004. VeA is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 4733-4739.

CAST, 2003. Mycotoxins: Risks in Plant Animal and Human Systems. Report No. 139. Ames, Iowa, USA: *Council for Agricultural Science and Technology*.

Chabasse, D., Bouchara, J.P., De Gentile, L., Cimon, B., Brun, S. et Penn, P. 2002. Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de Formation Biologie Médicale, n°25, EGOPRIM éd., Paris, 189.

Chapeland-Leclerc, F., Papon N., Noël T. and Villard J. 2005. Moisissures et risques alimentaires (mycotoxicoses). *Revue Française des Laboratoires* 373.

Chen, Y., Zeng, H., Tian, J., Ban, X., Ma, B. and Wang, Y. 2013. Antifungal mechanism of essential oil from *Anethum graveolens* seeds against *Candida albicans*. Journal of Medical Microbiology 62, 1175-1183.

Cheong, K., Strub, C., Montet, D., Durand, N., Alter, P., Meile, J.C, Schorr, S. and Fontana, A. 2016. Effect of different light wavelengths on the growth and ochratoxin a production in Aspergillus carbonarius and Aspergillus westerdijkiae. *Fungal Biology* 120, 745-751.

Chiotta, M.L., Reynoso, M.M., Torres, A.M., Combina, M., Chulze, S.N., 2010b. Molecular characterization and toxigenic profile of *Aspergillus* section *Nigri* populations isolated from the main grape-growing regions in Argentina. *Journal of Applied Microbiology* 110, 445-454.

Chraibi, M., Farah, A., Lebrazi, S., El Amine, O., Iraqui Houssaini, M. and Fikri-Benbrahim, K. 2016. Antimycobacterial natural products from Moroccan medicinal plants: Chemical composition, bacteriostatic and bactericidal profile of *Thymus satureioides* and *Mentha pulegium* essential oils. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedecine* 6(10), 836-840.

CHU, F.S. 1974. A comparative study of the interaction of ochratoxins with bovine serum albumin. *Biochemical Pharmacology* 23, 1105-1113.

Chung, S., la Vecchia, C. and Boffetta, P. 2009. Liver cancer: descriptive epidemiology and risk factors other than HBV and HCV infection. *Cancer Letters* 286, 9-14.

Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T. and Hermans, N. 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic

medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology* 79, 213-220.

Clough, JM. and Godfrey, CRA. 1998. The strobilurin fungicides. In: Hutsun D, Miyamoto J, editors. Fungicidal Activity. *Chemical and Biological Approaches to Plant Protection*. West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd. p. 254.

Cole, R.J., Jarvis, B.B. and Schweikert, M.A. 2003, Handbook of Secondary Fungal Metabolites, Vol 3, *New York,* Academic Press.

Combrinck, S., Regnier, T. and Kamatou, G.P.P., 2011. In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. *Industrial Crops and Products* 33, 344-349.

Commission of the European Communities. 2006. Commission Regulation (EC) No 1881/2006.Official Journal of the European Communities L 364: 5-24.

Commission of the European Communities. 2012. Commission Regulation (EU) No 899/2012 Official Journal of the European Union L 273/1.

Commission of the European Communities. 2017. Commission Regulation (EU) No 2017/171 Official Journal of the European Union L 30/45.

Copetti M.V., Pereira, J.L., Iamanaka, B.T., Pitt, J.I. and Taniwaki, M.H., 2010. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. *International Journal of Food Microbiology* 143, 67-70.

Copetti, M., Iamanaka, B., Nester, M., Priscilla, E. and Taniwaki, M. 2013. Occurrence of ochratoxin A in cocoa by-products and determination of its reduction during chocolate manufacture. *Food chemistry*. 100-136. 10.1016/j.foodchem.2012.07.093

Corbett, D. 2003. Patulin-U.K. producers perspective. In Patulin technical symposium. February 18-19, 2003; Kissimmee, Fla. *National Center for Food safety and Technology*, Summit, Ill.

Coronel, M.B., Sanchis, V., Ramos, A.J. and Marin, S., 2010. Ochratoxin A: presence in human plasma and intake estimation. *Food science and Technology International* 16, 5-18.

Crespo-Sempere, A., Marín, S., Sanchis, V. and Ramos, A.J. 2013. VeA and LaeA transcriptional factors regulate ochratoxin a biosynthesis in Aspergillus carbonarius. *International Journal of Food Microbiology* 166, 479-486.

Cvetnić, Z., and Pepeljnjak, S. 1997. Distribution and mycotoxin-producing ability of some fungal isolates from the air. *Atmospheric Environment*, 31(3), 491–495. doi:10.1016/s1352-2310(96)00158-6

Czerwiecki, L., Czajkowska, D. and Witkowska-Gwiazdowska, A. 2002. On ochratoxin A and fungal flora in Polish cereals from conventional and ecological farms - Part 1: Occurrence of ochratoxin A and fungi in cereals in 1997. *Food Additives and Contaminants* 19, 470-477.

Dachoupakan, C., Ratomahenina, R., Martinez, V., Guiraud, J.P., Baccou, J.C. & Schorr-Galindo, S. 2009. Study of the phenotypic and genotypic biodiversity of potentially ochratoxigenic black aspergilli isolated from grapes. *International Journal of Food Microbiology* 132 (1). 14-23,

De Medeiros, F.C.M., Gouveia, F.N., Bizzo, H.R., Vieira, R.F. and Del Menezzi, C.H.S. 2016. Fungicidal activity of essential oils from Brazilian Cerrado species against wood decay fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* 114, 87-93.

De Souza, E. L. 2016. The effects of sublethal doses of essential oils and their constituents on antimicrobial susceptibility and antibiotic resistance among food-related bacteria: A review. *Trends Food Science and Technology* 56,1-12.

de Valk, H.A., Klaassen, C.H. and Meis, J.F. 2008. Molecular typing of *Aspergillus* species. *Mycoses*. Nov; 51(6), 463-476.

Deising, H.B., Reimann, S. and Pascholati, S.F. 2008. Mechanisms and significance of fungicide resistance. *Brazilian Journal of Microbiology* 39(2), 286–295.

Del Prete, V., Rodriguez, H., Carrascosa, A. V., de las Rivas, B., Garcia-Moruno, E., and Munoz, R. 2007. *In vitro* removal of OTA by wine lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection* 70, 2155-2160.

Dias, M.C. 2012. Phytotoxicity: An overview of the physiological responses of plants exposed to fungicides. *Journal of Botany* 1-4.

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

Dragacci, S., Grosso, F. and Frémy, J. 2005. Analyse et détection des mycotoxines.

Driehuis, F. and Oude-Elferink, S. J. 2000. The impact of the quality of silage on animal health and food safety: A review. *Veterinary Quarterly* 22, 212-216.

Duran, R.M., Cary, J.W. and Calvo, A.M. 2007. Production of cyclopiazonic acid, aflatrem, and aflatoxin by *Aspergillus flavus* is regulated by veA, a gene necessary for sclerotial formation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73, 1158-1168.

Dwivedi, P. and Burns, R.B. 1986. The natural occurrence of ochratoxin A and its effects in poultry: a review. Part I. Epidemiology and toxicology. *World's Poultry Science Journal* 42, 32-47.

Ebani, V.V., Nardoni, S., Bertelloni, F., Najar, B., Pistelli, L. and Mancianti, F. 2017. Antibacterial and antifungal activity of essential oils against pathogens responsible for Otitis Externa in dogs and cats. *Medicines*; 4(2):21. DOI: 10.3390/medicines402002.

Edris, A.E. 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review. *Phytotherapy Research* 21, 308-323.

El Adlouni, C., Tozlovanu, M., Naman, F., Faid, M. and Pfohl- Leszkowicz, A., 2006. Preliminary data on the presence of mycotoxins (ochratoxin A, citrinin and aflatoxin B1) in black table olives 'Greek Style' of Moroccan origin. *Molecular Nutrition and Food Research* 50, 507-512.

EL Khoury, R. 2017. La lutte biologique contre l'ochratoxine A: utilisation des extraits de plantes médicinales ainsi que des souches d'actinobactéries et mise en évidence de leur mode d'action. *Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse).* P. 55-56

El Khoury, R., Atoui, A., Verheecke, C., Maroun, R., El Khoury, A. and Mathieu, F. 2016. Essential Oils Modulate Gene Expression and Ochratoxin A Production in *Aspergillus carbonarius*. *Toxins*, 8(8): pii: E242.

Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. 2004. *Botrytis spp*. and diseases they cause in agricultural systems-an introduction. In Elad Y, Williamson B, Tudzynski P & Delen

N (Eds), Botrytis: *Biology, Pathology and Control*: Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Pays-Bas, pp 1-9.

Esteban, A., Leong, S.L., Hocking, A.D., Abarca, M.L., Cabanes, F.J., Dinh, N.T. 2008. Utility of microsatellite markers and amplified fragment length polymorphism in the study of potentially ochratoxigenic black aspergilli. *Current Microbiology* 57(4), 348-355.

Ezekiel, C.N., Atehnkeng, J., Odebode, A.C. and Bandyopadhyay, R. 2014. Distribution of aflatoxigenic *Aspergillus* section Flavi in commercial poultry feed in Nigeria. *International Journal of Food Microbiology* 189, 18-25.

Fandohan, P., Zoumenou, D., Hounhouigan, D. J., Marasas, W. F., Wingfield, M. J. and Hell, K. 2005. Fate of aflatoxins and fumonisin during the processing of maize into food products in Benin. *International Journal of Food Microbiology* 98, 249-259.

FAO, 2002. Manual on the application of the HACCP system in mycotoxin prevention and control. Rome, Italy: Joint FAO/WHO Food Standards Programme FAO.

FAO, 2003.Worldwide Regulations for Mycotoxins in Food and Feed in 2003, p. 27. Available online: *http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e00.htm#Contents* (accessed on 12 April 2016).

FAO, 2008. United Nations Food and Agriculture Organization Rome.

FAO, 2009. Code of practice for the prevention and reduction of ochratoxin a contamination in coffee. CAC/RCP 69-2009.

Fao-who, 2013. Proposed draft annex for the prevention and reduction of aflatoxins and ochratoxin a contamination in sorghum (code of practice for the prevention and reduction of mycotoxin contamination in cereals (*cac/rcp 51- 2003*). Codex Alimentarius Commission.

Farber, P. and Geisen, R. 2004. Analysis of differentially-expressed ochratoxin A biosynthesis genes of *Penicillium nordicum*. *European Journal of Plant Pathology* 110, 661-669.

Farhat, A., Benmoussa, H., Bachoual, R., Nasfi, Z., Elfalleh, W., Romdhane, M and Bouajilal, J. 2017. Efficiency of the optimized microwave assisted extractions on the yield, chemical composition and biological activities of Tunisian Rosmarinus officinalis L.essential oil, *Food and Bioproducts Processing*.

Fazeli, M. R., Hajimohammadali, M., Moshkani, A., Samadi, N., Jamalifar, H., Khoshayand, M. R., *et al.* 2009. Aflatoxin B1 binding capacity of autochthonous strains of lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection* 72(1), 189-192.

Ferrara, M., Perrone, G., Gambacorta, L., Epifani, F., Solfrizzo, M. and Gallo, A. 2016. Identification of a Halogenase Involved in the Biosynthesis of Ochratoxin A in *Aspergillus carbonarius*. *Applied and Environmental Microbiology* 82, 5631-5641.

Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., L.G. Pedro and Scheffer J.J.C. 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: Volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* 23, 213-226.

Filali, A., Ouammi, L., Betbeder, M., Baudrimont, I., Soulaymani, R., Benayada, A. and Creppy, E.E. 2001.Ochratoxin A in beverages from Morocco: a preliminary survey. *Food Additives and Contaminant* 18 (6), 565-568.

Fisher, M.C., Henk, D.A., Briggs, C.J., Brownstein, J.S., Madoff, L.C., Mc Craw, S.L. and Gurr, S.J. 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, 484 (7393), 186-194.

Folcher, L., Jarry, M., Weissenberger, A., Ge´ rault, F., Eychenne, N. Marc Delos, N. et Regnault-Roger, C. 2009. Comparative activity of agrochemical treatments on mycotoxin levels with regardto corn borers and Fusarium mycoflora in maize (*Zea mays L.)* fields. *Crop Protection* 28, 302-308.

Freisesleben, S.H. and Jager, A.K. 2014. Correlation between plant secondary metabolites and their antifungal mechanism-a review. *Medicinal and Aromatic Plants* 3, 1-6.

Frisvad, J.C. 2015. Taxonomy, chemodiversity, and chemoconsistency of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* species. *Frontiers in Microbiology* 5, 1-7.

Frisvad, J.C., Bridge, P.D., Arora, D.K. 1998. Chemical fungal taxonomy. *New York*: Marcel Dekker, p.

Frisvad, J.C., Larsen, T.O. 2015. Chemodiversity in the genus *Aspergillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99 (19):7859-7877.

Frisvad, J.C., Larsen, T.O., Thrane, U., Meijer, M., Varga, J., Samson, R.A., Nielsen, K.F. 2011. Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. PLoS One 6:e23496.

Fritz, R., Lanen, C., Chapeland-Leclerc, F. and Leroux, P. 2003. Effect of the anilinopyrimidine fungicide pyrimethanil on the cystathionine β-lyase of Botrytis cinerea. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 77, 54-65.

Fritz, R., Larsen, C., Colas, V., and Leroux, P.1997. Inhibition of methionine biosynthesis in *Botritis cinerea* by the anilinopyrimidine fungicide pyrimethanil. *Pestic, sci* 49, 40-46.

Fuchs, S., Sontag, G., Stidl, R., Ehrlich, V., Kundi, M. and Knasmüller, S. 2008. Detoxification of patulin and OTA, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 1398e1407

Furuya, E.G., Chang, H. T., Miura, Y. and Noll, K.E. 1997. A fundamental analysis of the isotherm for the adsorption of phenolic compounds on activated carbon. *Separation and Purification Technology* 11, 69-78.

Galarreta, B.C., Tabatabaei, M., Guieu, V., Peyrin, E. and Lagugne-Labarthet, F. 2013. Microfluidic channel with embedded SERS 2D platform for the aptamer detection of ochratoxin A, *Analytical Bioanalytical Chemistry* 405, 1613-1621.

Gallo, A., Bruno, K. S., Solfrizzo, M., Perrone, G., Mule, G., Visconti, A. and Baker, S. E. 2012. New insight into the ochratoxin A biosynthetic pathway through deletion of a nonribosomal peptide synthetase gene in *Aspergillus carbonarius*. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 8208-8218.

Gallo, A., Ferrara, M. and Perrone, G. 2017. Recent advances on the molecular aspects of ochratoxin A biosynthesis. *Current Opinion of Food Sciences* 17, 49-56.

Gamza, N. K., Ozbey, F and Kabak, B. 2015. Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in cereal flours commercialized in Turkey. *Food Control* 54, 275-281.

García, P. C., Rivero, R. M., Ruiz, J. M. and Romero, L. 2003. The role of fungicides in the physiology of higher plants: Implications for defense responses. *The Botanical Review* 69(2), 162-172.

Garcia-Cela, E., Ramos A. J., Sanchis, V., Marin, S. 2011. Ochratoxigenic moulds and effectiveness of grape field antifungals in a climatic change scenario. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92,1455-1461.

Gareis, M. and J. Ceynowa. 1994. Influence of the fungicide Matador (tebuconazole/triadimenol) on mycotoxin production by *Fusarium culmorum*. *European Food Research and Technology* 198, 244-248.

Geiser, D.M., Klich, M.A., Frisvad, J.C., Peterson, S.W., Varga, J. and Samson, R.A. 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 59,1-10.

Ghali, R., Hmaissia-Khlifa, K., Ghorbel, H., Maaroufi, K. and Hedili, A. 2009. Incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Tunisian foods. *Food Control* 19, 921-924.

Ghannoum, M.A. and Rice L.B. 1999. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 12, 501-517.

Gill, A.O., Delaquis, P., Russo, P and Holley, R.A. 2002. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology* 73, 83-92.

Gil-Serna, J., García-Díaz, M., González-Jaén, M.T., Vázquez, C. and Patiño, B. 2018. Description of an orthologous cluster of ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus* and *Penicillium* species. A comparative analysis. *International Journal of Food Microbiology* 268, 35-43.

Gil-Serna, J., Vazquez, C. and Patino, B. 2019 Genetic regulation of aflatoxin, ochratoxin A, trichothecene, and fumonisin biosynthesis: A review. International Microbiology, 23(1), 89-96.

Gil-Serna, J., Vázquez, C., González-Jaén, M.T. and Patiño, B. 2014. Mycotoxins: toxicology. In: Batt C, Tortorello ML (eds) Encyclopedia of food microbiology, 2nd edn. Elsevier Ltd. *Academic Press, Amsterdam*, pp 1539-1547.

Giorni, P, Formenti, S., Bertuzzi, T., Magan, N and Battilani, P. 2014. Influence of water activity and anti-fungal compounds on development and competitiveness of *Fusarium verticillioides*. *Phytopathologia Mediterranea* 53 (3), 459-469.

Gnonlonfin, G. J. B., Hell, K., Adjovi, Y., Fandohan, P., Koudande, D.O., Mensah, G.A. *et al.* 2013. A review on aflatoxin contamination and its implications in the developing world: A Sub-Saharan African perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 53, 349-365.

Goldblatt, L. 2012. Aflatoxin: scientific background, control, and implications. *Elsevier*.

González, M., Caetano, P. and Sànchez, M.E. 2017.Testing systemic fungicides for control of Phytophthora oak root disease. *Forest Pathology*, 47(4):1-3. DOI: 10.1111/efp.12343.

Goussous, S.J., Abu el-Samen, F.M. and Tahhan, R.A. 2010. Antifungal activity of several medicinal plants extracts against the early blight pathogen (*Alternaria solani*). *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 43, 1745-1757.

Guenther E., 1972. The essential oils. Vol. 1 (2e ad.), Krieger R.E. Publ., Malabar, Florida (USA), 87-226.

Gul Ameer, S., Zahid, H. S., Syed Tufail, H. S., Sirajuddin Shafi, M. N. and Safaraz, A. M. 2016. Decontamination of poultry feed from ochratoxin A by UV and sunlight radiations. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96, 2668-2673.

Gupta, P.K., 1988. *Veterinary Toxicology*. Cosmo, New Delhi.

Gupta, P.K., 2016. Fundamental of Toxicology: Essential Concepts Sand Applications. Elsevier-BSP, *Elsevier/Academic Press*, USA, p. 398.

Hahn, M. 2014. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *Journal of Chemical Biology*7(4), 133-141.

Hajjaji, A., El Otmani, M., Bouya, D., Bouseta, A., Mathieu, F., Collin, S., and Lebrihi, A., 2006. Occurrence of mycotoxins (ochratoxin A, deoxynivalenol) and toxigenic fungi in Moroccan wheat grains: impact of ecological factors on the growth and ochratoxin A production. *Molecular Nutrition and Food Research* 50, 494-499.

Hakala, K., Hannukkala, A.O., Huusela-Veistola, E., Jalli, M. and Peltonen-Sainio, P. 2011. Pests and diseases in a changing climate: a major challenge for Finnish crop production. *Agricultural and Food Science* 20, 3-14.

Hald, B., Krogh, P. 1972. Ochratoxin residues in bacon pigs. In Proceedings of the IUPAC: *Symposium on the Control of Mycotoxins*, Göteborg, Sweden, 21-22.

Hamaker, J.W. and Thompson, J.M. 1972. Adsorption in organic chemicals in the Soil Environment; Goring, C. A., Hamaker, J. W., Eds.; Vol. 1, Marcel Dekker: New York, 49-143.

Hamilton, D. 2000. Toxic fungus threatens health of consumers: In Bankole, S. A., and Adebanjo, A. (2003). Mycotoxins in food in West Africa: Current situation and possibility of controlling it. *African Journal of Biotechnology* 2(9), 254-263.

Haque, E., Irfan, S., Kamil, M., Sheikh, S., Hasan, A., Ahmad, A., Lakshmi, V., Nazir, A. and Mir, S.S. 2016. Terpenoids with antifungal activity trigger mitochondrial dysfunction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 85, 436-443.

Harborne, JB. and Williams, C.A. 1995. Anthocyanins and other flavonoids. *Natural products Research* 7, 639-657.

Harris, J.P. and Mantle, P.G. 2001. Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry* 58, 709-716.

Haskard, C., Binnion, C. and Ahokas, J. 2000. Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chemico-Biological Interactions* 128(1), 39-49.

Haskard, C., El-Nezami, G. S., Kankaanpaa, P. E., Salminen, S., and Ahokas, J. T. 2001. Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3086-3091.

Hayat, A. Paniel N., Rhouati A., Marty, J., Barthelmebs, L., 2012. Recent advances in ochratoxin A producing fungi detection based on PCR methods and ochratoxin A analysis in food matrices. *Food Control* 26, 401-415.

Hector R.F. 1993. Compounds active against cell walls of medically important fungi. *Clinical Microbiology Reviews* 6, 1-21.

Helal, G., Sarhan, M., Abu Shahla, A and Abou El-Khair, E. 2007. Effects of *cymbopogon citratus l.* Essential oil on the growth, morphogenesis and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* mL2-strain. *Journal of Basic Microbiology* 47, 5-15.

Hell, K., Cardwell, F.K. and Poehling, H.M. 2003. Relationship between management practices, fungal infection and aflatoxin for stored maize in Benin. *Journal of Phytopathology* 151, 690-698.

Hocking, A.D., Varelis, P., Pitt J.I., Cameron, S.F. and Leong, S.LL. 2003. Occurrence of ochratoxin A in Australian wine. *Australian Journal Grape and Wine Research* 9, 72-78.

Hohler, D. 1998. Ochratoxin A in food and feed: occurrence, legislation and mode of action. Z. Ernaehrungswiss 37, 2-12.

Huff, W.E. and Hamilton, P.B. 1979. Mycotoxins-their biosynthesis in fungi: Ochratoxins-metabolites of combined pathways. *Journal of Food Protection* 42, 815-820.

Hunt, D.C., Philip, L.A. and Crosby, N.T. 1979. Determination of ochratoxin A in pig's kidney using enzymatic digestion, dialysis and high-performance liquid chromatography with post-column derivatization. *The Analyst* 104, 1171-1175.

Hyldgaard, M., Mygind, T. and Meyer, R. L. 2012. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology* 3, 1-24.

Iamanaka, B.T., Taniwaki, M.H., Menezes, H.C., Vicente, E. and Fungaro, M.H.P., 2005. Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil. *Food Additives & Contaminants* 22, 1258-1263.

IARC (International Agency for research on cancer) 2002. IARC Monograph on Evaluation of Carcinogen Risk to Humans, vol. 82: Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphtalene and Styrene. *International Agency for Research on Cancer*, Lyon, France, pp. 171-300.

IARC (International Agency for research on cancer), 1993. Ochratoxin A. In: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurringsubstances; food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, 56., Lyon, 489-521

IARC. International Agency for Research on Cancer, 2009. Agents Reviewed by the IARC Monographs vols. 1-100a (by cas numbers) P:10.

Iavicoli, I., Brera, C., Carelli, G., Caputi, R., Marinaccio, A., Miraglia, M., 2002. External and internal dose in subjects occupationally exposed to ochratoxin A. *International archives of occupational and environmental health* 75, 381-386.

Iqbal, S.Z., Asi, M.R., Jinap, S. and Rashid, U. 2014. Detection of aflatoxins and zearalenone contamination in wheat derived products. *Food Control* 35, 223-226.

Jahanshiri Z., Shams-Ghahfarokhi, M., Allameh, A and Razzaghi-Abyaneh, M. 2015. Inhibitory effect of Eugenol on aflatoxin B1 production in *Aspergillus parasiticus* by downregulating the expression of major genes in the toxin biosynthetic pathway, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 31, 1071-1078.

Jarda, G., Liboz, T., Mathieua, F., Guyonvarc'h, A. and Lebrihi, A. 2011. Review of mycotoxin reduction in food and feed: From prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Additives & Contaminants* 28(11), 1590-1609.

Jo, E.J., Mun, H., Kim, S.J., Shim, W.-B., Kim, M.G. 2016. Detection of ochratoxin A (OTA) in coffee using chemiluminescence resonance energy transfer (CRET) aptasensor, *Food Chemistry* 194, 1102-1107.

Jobling, J., 2000. Essential oils: A new idea for postharvest disease control. *Good Fruit and Vegetables Magazine* 11(3), 50-54.

Johnson, D.A., Hamm, P.B., Miller, J.S. and State, W. 2014. Fungicide application for management of potato late blight in the Columbia Basin.

Joint FAO/WHO CODEX ALIMENTARIUS, J.F.W.F.S.P., WORLD HEALTH ORGANIZATION 2003. Codex Alimentarius: Food hygiene, basic texts, Food & Agriculture Org.

Juan, A., Zinedine, A., Idrissi, L. and Mañes, J. 2008. Ochratoxin A in rice on the Moroccan retail market. *International Journal of Food Microbiology* 126, 83-85.

Juan, C., Zinedine, A., Moltó, J.C., Idrissi, L. and Mañes, J. 2008. Aflatoxins levels in dried fruits and nuts from Rabat-Salé area, Morocco. *Food Control* 19, 849-853.

Juven, BJ., Kanner, J., Schved, F. and Weisslowicz, H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*76(6), 626-631.

Kanapitsas, A., Batrinou, A., Aravantinos, A., Sflomos, C. and Markaki, P. 2016. Gamma radiation inhibits the production of Ochratoxin A by Aspergillus carbonarius. Development of a method for OTA determination in raisins. *Food Bioscience* 15, 42-48.

Kang, Z., Huang, L., Krieg, U., Mauler-Machnin, A. et Buchenauer, H. 2001. Effets of tebuconazole on morphology, structure, cell wall componants and trichothecene production of *Fusarium culmorum in vitro*. *Pest Management Science* 57, 491-500.

Kange, A.M., Cheruiyot, E.K., Ogendo, J.O. et al. 2015. Effect of sorghum (Sorghum bicolor L.Moench) grain conditions on occurrence of mycotoxin-producing fungi. *Agriculture & Food Security* 4, 15.

Karlovsky, P., Suman, M., Berthiller, F., De Meester, J., Eisenbrand, G., Perrin, I., Oswald, I., Speijers, G., Chiodini, A., Recker, T. and Dussort, P. 2016. Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. *Mycotoxin Research* 32, 197-205.

Khayoon, W.S., Saad, B., Yan, C.B., Hashim, N.H., Mohamed Ali, A.S., Salleh, M.I. and Salleh B. 2010. Determination of aflatoxins in animal feeds by HPLC with multifunctional column clean-up. *Food Chemistry* 118, 882-886.

Kirk, G.D., Bah, E. and Montesano, R. 2006. Molecular epidemiology of human liver cancer: insights into etiology, pathogenesis and prevention from The Gambia, *West Africa. Carcinogenesis* 27, 2070-2082.

Knobloch, L., Weigand, H., Weis, N., Schwarn, HM. and Vigenschow, H. 1985. Action of terpenoids on energy metabolism. In: Brunke E-J, editor. *Progress in Essential Oil Research*. USA: Walter de Gruyter; pp. 429-448.

Köhl, J., J. Postma, P. Nicot, M. Ruocco and Blum, B. 2011. Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria. *Biological Control* 57, 1-12.

Kokkini S., Handilou, E and Karouscou, R., 2004. Clinal variation of *Mentha pulegium* essential oils along the climatic gradient of Greece. *Journal of Essential Oil Research* 16, 588-93.

Krska, R., de Nijs, M., McNerney, O., Pichler, M., Gilbert, J., Edwards, S., Suman, M., Magan, N., Rossi, V., van der Fels-Klerx, H. J. *et al.* 2016. Safe food and feed through an integrated

toolbox for mycotoxin management: the MyToolBox approach. *World Mycotoxin Journal* 9, 487-495.

Kuiper-Goodmann, T. and Scott, P.M. 1989. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. Biomed. *Environmental Sciences* 2, 179-240.

Kumeda, Y., and Asao, T. 2001. Heteroduplex panel analysis, a novel method for genetic identification of *Aspergillus* section *Flavi* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 4084-4090.

Laaziz, A., S. Qjidaa, Y. El Hammoudi, A. Hajjaji and A. Bouseta. 2017. Chemical control of fungal growth and ochratoxin A production by *Aspergillus* isolated from Moroccan grapes. *South Asian Journal of Experimental Biology* 7, (2) 84-91.

Lacey, J., 1985. Factors affecting mycotoxin production. In: Mycotoxins and phycotoxins. Steyn, P.S. et Vleggaar, R. (eds). *6th International IUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxins*, Pretoria, South Africa.

Lai, X., Liu, R., Ruan, C., Zhang, H. and Liu, C., 2015. Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in rice samples from six provinces in China. *Food Control* 50, 401-404.

Lang, G., and Buchbauer, G. 2012. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour Fragrance J*ournal 27(1),13-39.

Langcake, P. 1981. Disease resistance of vitis spp and the producyion of the stress metebolites resveratrol, epsilon-viniferine, alpha-viniferine and ptérostilbene. *Physiological plant pathology* 18, 213-226.

Lanyasunya, T.P., Wamae, L.W., Musa, H.H., Olowofeso, O. and Lokwaleput, I.K. 2005. The risk of mycotoxins contamination of dairy feed and milk on small holder dairy farms in Kenya. *Pakistan Journal of Nutrition* 4, 162-169.

Lappa, I. K., Simini, E., Nychas, G. E and Panagou, E. Z. 2017. In vitro evaluation of essential oils against *Aspergillus carbonarius* isolates and their effects on Ochratoxin A related gene expression in synthetic grape medium. *Food Control* 73, 71-80.

Lecellier, A. 2013. Détection, caractérisation et identification des moisissures par spectroscopie vibrationnelle infrarouge et Raman. Université de Reims Champagne-Ardenne. 196.

Leong, S.L.L., Hocking, A.D., Varelis, P., Giannikopoulos, G and Scott, ES. 2006. Fate of ochratoxin A during vinification of Semillon and shiraz grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 6460-6464.

Leroux, P. 1994. Effect of pH, amino acids and various organic compounds on the fungitoxicity of pyrimethanil, glufosinate, captafol, cymoxanil and fenpiclonil in Botrytis cinerea. *Agronomie* 14 541-554.

Leroux, P. 2003. Mode of action of agrochemicals towards plant pathogens. *Comptes Rendus de Biologies* 326, 9-21.

Leroux, P. 2003b. Mode of action of agrochemicals towards plant pathogens. *Comptes Rendus de Biologies* 326, 9-21.

Leroux, P. et Gredt, M. 1995. Étude in vitro de la résistance de *Botrytis cinerea* aux fongicides anilinopyrimidines. *Agromomie* 15, 367-370.

Leroux, P., Chapeland, F., Desbrosses, D. and Gredt, M. 1999. Patterns of cross-resistance to fungicides in Botryotinia fuckeliana (Botrytis cinerea) isolates from French vineyards. *Crop Protection* 18, 687-697.

Leroux, P.2003a. Fungicide resistance in plant pathogens: A phenomenon difficult to manage. *Phytoma* 566, 36-40.

Lesemann, S.S., Schimpke, S., Dunemann, F. and Deising, H.B. 2006. Mitochondrial heteroplasmy for the cytochrome b gene Controls the level of strobilurin resistance in the apple powdery mildew fungus *Podosphaera leucotricha* (Ell. & Ev.) E.S. Salmon. *Journal of Plant Diseases and Protection* 113(6), 259-266.

Linde, T., Zoglowek, M., Lübeck, M., Frisvad, J.C. and Lübeck, P.S. 2016. The global regulator LaeA controls production of citric acid and endoglucanases in *Aspergillus carbonarius*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 43(8), 1139-1147.

Liu, Y. L., Meng, G. Q., Wang, H. R., Zhu, H. L., Hou, Y. Q., Wang, W. J., *et al.* 2011. Effect of three mycotoxin adsorbents on growth performance: Nutrient retention and meat quality in broilers fed on mould-contaminated feed. *British Poultry Science* 52, 255-263.

Lo Curto, R., Pellicano, T., Vilasi, F., Munafo, P and Dugo, G. 2004. Ochratoxin A occurrence in experimental wines in relationship with different pesticide treatments on grapes. *Food Chemestry* 84, 71-75.

Lucchetta, G., Bazzo, I., Dal Cortivo, G., Stringher, L., Bellotto, D., Borgo, M., Angelini, E., 2010. Occurrence of black aspergilli and ochratoxin A on grapes in Italy. *Toxins* 2, 840-855.

Lui, Y. and Wu, F. 2010. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. Environ. *Health Perspect* 118 (6), 818-824.

Luo, Y., Liu, X. and Li, J. 2018. Updating techniques on controlling mycotoxins - A review. *Food Control* 89 123-132.

Maaroufi, A., Achour, A., Zakhama, A., Ellouz, F., El May, M., Creppy, E.E. and Bacha, H. 1996. Human nephropathy related to ochratoxin A in Tunisia. *Journal of Toxicology*: *Toxin Reviews*, 15, 223-237.

Maestroni, B. and Cannavan, A. 2011. Sampling strategies to control mycotoxins. In *Determining Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in Food and Feed*. Edited by De Saeger S. Woodhead Publishing Limited.

Magan, N. and Aldred, D. 2007. Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology* 119, 131-139.

Magan, N., Sanchis, V. and Aldred, D. 2004. Role of spoilage fungi in seed deterioration. Fungal biotechnology in agricultural, *food and environmental applications* 311-323.

Magan, R., Hope, R., Colleate, A.and Baxter, E. S. 2002. Relationship between growth and mycotoxin production by Fusarium species, biocides and environment. *Eur. J. Plant Pathol* 108, 685-690.

Magnoli, A. P., Texeira, M., Rosa, C. A., Miazzo, R. D., Cavaglieri, L. R., Magnoli, C. E., *et al.* 2011. Sodium bentonite and monensin under chronic aflatoxicosis in broiler chickens. *Poultry Science* 90, 352-357.

Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Malir, J. and Toman, J. 2016. Ochratoxin a: 50 Years of research. *Toxins* (Basel) 04, 8.

Mally, A., Keim-Heusler, H., Amberg, A., Kurz, M., Zepnik, H., Mantle, P., Volkel, W., Hard, G.C. and Dekant, W. 2005. Biotransformation and nephrotoxicity of ochratoxin B in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 206, 43-53.

Marıín, S., Hodzic, I., Ramos, A.J. and Sanchis, V. 2008. Predicting the growth/no-growth boundary and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* in pistachio nuts. *Food Microbiology* 25, 683-689.

Marín, P., Ory, A., Cruz, A., Magan, N. et González-Jaén, M.T. 2013b. Potential effects of environmental conditions on the efficiency of the antifungal tebuconazole controlling *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* growth rate and fumonisin biosynthesis. *International Journal of Food Microbiology* 165, 251-258.

Marquardt, R.R. and Frohlich, A.A. 1992. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *Journal of Animal Science* 70, 2968-3988.

Martínez, J.A., 2012. Natural fungicides obtained from plants, fungicides for plant and animal diseases, Dr. Dharumadurai Dhanasekaran editor. InTech;. ISBN: 978-953-307-804-5. Available from: http://www.intechopen.com/books/fungicides-for-plant-and-animal-diseases/ natural-fungicides-obtained-from plants

Maruya, K., Reddy, V., Hayes, A.W. and Berndt, W.O.1982. Embryocidal, fetotoxic and teratogenic effects of ochratoxin A in rats. *Toxicology 25*, 175-185.

Marvin, L.F., Roberts, M.A., Fay, L.B. 2003. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-offlight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta* 337(1-2), 11-21.

Masner, P., Muster, P., Schmid, J. 1994. Possible methionine biosynthesis inhibition by pyrimidinamine
fungicides. Pesticide Science 42, 163-166.

Mateo, E. M., Gómez, J. V., Domínguez, I., Gimeno-Adelantado, J. V., Mateo-Castro, R., Gavara, R and Jiménez, M. 2017. Impact of bioactive packaging systems based on EVOH films and essential oils in the control of aflatoxigenic fungi and aflatoxin production in maize. *International Journal of Food Microbiology* 254, 36-46.

Mateo, E.M., Valle-Algarra, F.M., Jiménez, M and Magan, N., 2013. Impact of three sterol biosynthesis inhibitors on growth of *Fusarium langsethiae* and on T-2 and HT-2 toxin production in oat grain under different ecological conditions. *Food Control* 34, 521-529.

Mateo, EM., Gil-Serna., J, Patiño., B, Jiménez., M. 2011. Aflatoxins and ochratoxin A in stored barley grain in Spain and impact of PCR based strategies to assess the occurrence of aflatoxigenic and ochratoxigenic *Aspergillus spp*. *International Journal of Food Microbiology* 149, 118-126.

Matusinsky P., Zouhar, M., Pavela, R and Novy, P., 2015. Antifungal effect of five essential oils against important pathogenic fungi of cereals. *Industrial Crops and Products* 67, 208-215.

McClanahan, C. 2009. BioFiles; 4.3:10.

McGrath, M.T. 2004. What are Fungicides? *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2004-0825-01.

Medina, A., M. Jimenez, R. Mateo, and N. Magan. 2007a. Efficacy of ´natamycin for control of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains under different environmental conditions. *J. Appl. Microbiol* 103, 2234-2239.

Medina, A., Mateo, R., Valle-Algarra, FM., Mateo, EM. and Jiménez, M. 2007b. Effect of carbendazim and physicochemical factors on the growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius* isolated from grapes. *International Journal of Food Microbiology* 119, 230-235.

Miguez, M., Reeve, C., Wood, P.M. and Hollomon, D.W. 2004. Alternative oxidase reduces the sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* to QOI fungicides. *Pest Management Science* 60(1), 3-7.

Mitchell, D., Parra, R., Aldred, D. and Magan, N. 2004.Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *Journal of Appllied Microbiology* 97, 439-445.

Mobashar, M., Blank, R., Hummel, J., Westphal, A., Tholen, E. and Südekum, K.H. 2012. Ruminal ochratoxin A degradation-contribution of the different microbial populations and influence of diet. *Animal Feed Science and Technology* 85-97.

Moghaddam, M., Pourbaige, M., Kourosh Tabar, H., Farhadi, N. and Ahmadi Hosseini, SM. 2013. Composition and antifungal activity of peppermint (Mentha piperita) essential oil from Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 16, 506-512.

Molen, V.K.M., Raja, H. A., El-Elimat, T., Oberlies, N. H. 2013. Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. *AMB Express* 3, 71.

Molinie, A., Faucet, V., Castegnaro, M. and Pfohl-Leszkowicz, A., 2005. Analysis of some breakfast cereals on the French market for their contents of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B1: development of a method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin. Food Chemistry 92, 391-400.

Moosavy, MH., Basti, AA., and Ali, M. 2008. Effect of Zataria multiflora Boiss. Essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in a food model system and on the bacterial. *International Journal of Food Microbiology* 43, 69-76.

Morcia, C., Malnati, M and Terzi, V. 2012. *In vitro* antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. *Food Additives & Contaminants: Part A* 29 (3) 415-422.

Moreno, M. R., Lopez, H. R., Ray, B. D., Pojan, I. M., Moruno, E. G., Doria, F., *et al.* 2013. Biological degradation of OTA into ochratoxin. *US Patent Application Publication*. No. 20130209609 A1

Mourey, A. and Canillac, N. 2002. Anti-Listeria monocytogenes activity of essential oils components of conifers. *Food Control* 13, 289-292.

Mueller D.S. 2006. Fungicides: Terminology. *Integrated Crop Management*, 120-123.

Mullis, KB., Faloona FA., Scharf SJ., Saiki RK., Horn GT., Erlich HA. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51, p. 263-273.

Murphy, P.A., Hendrich, S., Landgren, C and Bryant, C.M. 2006. Food mycotoxins: an update. *Journal of Food Science* 71, 51-65.

Nazari, L., Pattori, E., Terzi, V., Morcia, C. et Rossi, V. 2014. Influence of temperature on infection, growth, and mycotoxin production by *Fusarium langsethiae* and *F. sporotrichioides* in durum wheat. *Food Microbiology* 39, 19-26.

Nazzaro, F, Fratianni, F., Coppola, R and De Feo, V. 2017. Essential oils and antifungal activity, *Pharmaceuticals* 10, 86.

Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R. and De Feo V. 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals* 6:1451-1474.

Nesci, A., M. Rodriguez, and M. Etcheverri. 2003. Control of Aspergillus growth and aflatoxin production using antioxidants at different conditions of water activity and pH. *J. Appl. Microbiol*. 95, 279-287.

Nesic, K., Milicevic, D., Nesic, V. and Ivanovic, S. 2015. Mycotoxins as one of the foodborne risks most susceptible to climatic change. *Procedia Food Science* 5, 207-210.

Niderkorn, V., Morgavi, D. P., Aboab, B., Lemaire, M. and Boudra, H. 2009. Cell wall component and mycotoxin moieties involved in binding of fumonisin B1 and B2 by lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 106, 977-985.

O'Brien, E., Dietrich, DR. 2005. Ochratoxin A: the continuing enigma, *Critical Reviews in Toxicology* 35, 560, 33-60.

Oliver, R.P., Hewitt, H.G. 2014. Fungicides in crop protection. 2th Ed. *CAB International*.

Oliveri, L.C., Torta et Catara, V. 2008. A polyphasic approach to the identification of ochratoxin Aproducing black Aspergillus isolates from vineyards in Sicily. *International Journal of Food Microbiology* 127(1-2), 147-154.

Ostry, V., Malir, F., Ruprich, J. 2013. Producers and important dietary sources of Ochratoxin A and citrinin. *Toxins*, 5, 1574-1586.

Ostry, V., Ruprich, J. and Šakarkova, J. 2002. Grape, ochratoxin A and human health. *Mycotoxin Research* 18(2), 178-182.

Otteneder, H. and Majerus, P. 2001. Ochratoxin A (OTA) in coffee: nation-wide evaluation of data collected by German Food Control 1995-1999, Food Additives and Contaminants 18, 431-435.

Passamani, F.R.F., Hernandes, T., Lopes, N.A., Bastos, S.C., Santiago, W.D., Cardoso, M.D. G. and Batista, L.R. 2014. Effect of temperature, water activity, and pH on growth and production of ochratoxin A by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* from Brazilian grapes. *Journal of Food Protection* 77, 1947-1952.

Passone M.A., Girardi, N.S and Etcheverry, M., 2012. Evaluation of the control ability of five essential oils against *Aspergillus* section *Nigri* growth and ochratoxin A accumulation in peanut meal extract agar conditioned at different water activities levels. *International Journal of Food Microbiology* 159, 198-206.

Pawar, V. and V. Thaker. 2006. In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. *Mycoses* 49, 316-323.

Peberby, J.F. (1990) Fungal cell walls-a review. In: P.J. Kuhn, A.P.J. Trinci, M.J. Jung, M.W.Goosey and L.G. Copping (Eds) Biochemistry of cell walls and membranes in Fungi, *Springer*, Berlin, PP.5-30.

Peltonen, K., El-Nezami, H., Haskard, C., Ahokas, J. and Salminen, S. 2001. Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Dairy Science* 84(10), 2152-2156.

Peraica, M., Domijan, A. M., Jurjevic, Z. and Cvjetkovic, B. 2002. Prevention of exposure to mycotoxins from food and feed. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 53, 229-237.

Perlin, D.S., Seto-Young, D. and Monk, B.C. 2006. The plasma membrane H+ ATPase of fungi. A candidate drug target? *Annals of the New York Academy Sciences* 834, 609-617.

Perrone, G., Susca, A., Epifani, F., Mule, G. 2006. AFLP characterization of Southern Europe population of *Aspergillus* Section *Nigri* from grapes. *Internationl Journal of Food Microbiology*. Sep 1;111 Suppl 1:S22-7.

Perrone, G., Susca, A., Stea, G., Mule, G. 2004. PCR assay for identification of Aspergillus carbonarius and Aspergillus japonicus. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 641-649.Petkova-Bocharova et al. 1991

Petchkongkaew, A., Taillandier, P., Gasaluck, P. and Lebrihi, A. 2008. Isolation of *Bacillus spp.* From Thai fermented soybean (Thua-nao): Screening for aflatoxin B1 and OTA detoxification. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1495-1502.

Petzinger, E. and Ziegler, K. 2000. Ochratoxin A from a toxicological perspective, *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 23, 91-98.

Pfliegler, W. P., Pusztahelyi, T. and Pócsi, I. 2015. Mycotoxins-prevention and decontamination by yeasts. *Journal of Basic Microbiology* 55, 805-818.

Phillips, S.D., 2001. Fungicides and biocides. In: Sullivan, J.B., Krieger, G.R. (Eds.), *Clinical Environmental Health and Toxic Exposures,* second ed., vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 11091125.

Pirgozliev, S.R., Edwards, S.G., Hare, M.C. et Jenkinson, P. 2002. Effect of dose rate of azoxystrobin and metconazole on the development of *Fusarium* head blight and the accumulation of deoxynivalenol (DON) in wheat grain. *European Journal of Plant Pathology* 108, 469-478.

Pirgozliev, S.R., Edwards, S.G., Hare, M.C. et Jenkinson, P. 2002. Effect of dose rate of azoxystrobin and metconazole on the development of *Fusarium* head blight and the accumulation of deoxynivalenol (DON) in wheat grain. *European Journal of Plant Pathology 108, 469-478.*

Pitt, J. 2000. Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin* 56, 184-192.

Pitt, J. 2008. Understanding plant–fungus associations as a key to mycotoxin control. In *Food Contaminants.* Edited by Siantar D, Trucksess M, Scott P, Herman E. ACS Symposium Series

Pitt, J.I., Wild, C.P., Baan, R. A., Gelderblom, W.C.A, Miller, J.D., Riley, R.T., Wu, F. 2012. Improving public health through mycotoxin control. *International Agency for Research on Cancer* Nº 158. Lyon: IARC, France,

Pohland, A.E., Schüller, P. L., Steyn, P. S., and Van Egmond, H. 1982. Physico-chemical data for selected mycotoxins. *Pure of Applied Chemistry* 54, 2219-2284.

Popovski, S. et Celar, F.A. 2012. The impact of environmental factors on the infection of cereals with *Fusarium* species and mycotoxin production – a review. *Acta agriculturae Slovenica* 101, 105-116.

Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P.K. and Dubey, N.K. 2015. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities-potentials and challenges. *Food Control* 47, 381-391.

Qjidaa, S. 2015. Effet des fongicides, du resvératrol et de l'huile essentielle de Mentha pulegium sur la croissance fongique et la production de l'OTA par des souches *d'Aspergillus tubingensis* et *A. foetidus* isolées à partir du raisin marocain. *Université Sidi Mohammed Ben Abdellah Faculté des Sciences Dhar El Mahraz-Fès*

Qjidaa, S., Selouane, A., Zouhair, S., Bouya, D., Decock, C. and Bouseta, A. 2014. In vitro effect of pyrimethanil on the fungal growth of ochratoxigenic and no-ochratoxigenic species of *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus foetidus* isolated from Moroccan grapes. *South Asian Journal of experimental Biology* 4, 76-84.

Ramirez, M. L., Chulze, S. and Magan, N. 2004. Impact of environmental factors and fungicides on growth and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentinian wheat. *Crop Protection* 23, 117-125.

Ramzia, H., Ismailib, M. R., Aberchaneb, M. and Zaanouna, S. 2017. Chemical characterization and acaricidal activity of *Thymus satureioides* C. & B. and *Origanum elongatum* E. & M. (Lamiaceae) essential oils against *Varroa destructor Anderson* & *Trueman* (Acari: Varroidae). *Industrial crops and products* 108, 201-207.

Rao, B.R.R. 2009. Chemical composition and uses of Indian rose-scented geranium (Pelargonium species) essential oil – A Review. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 12: 381-394.

Rasooli, I. and Owlia, P. 2005. Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Phytochemistry* 66, 2851-2856.

Rasooli, I., Fakoor, M. H., Yadegarinia, D., Gachkar, L., Allameh, A. and Bagher Rezaei, M. 2008. Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum L*. essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 122, 135-139.

Reddy, K.R.N., Salleh, B., Saad, B., Abbas, H.K., Abel, C.A. and Shier, W.T. 2010. An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. *Toxin Reviews* 29, 3-26.

Remmal, A., T-Eiaraki, A., Bouchikhi, T., Aha your,K., Ettayebi, M.1993.- Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in Agar medium. *Journal of Essential Oil Research* 5, 179-184.

Reverberi, M., Gazzetti, K., Punelli, F., Scarpari, M., Zjalic, S., Ricelli, A., Fabbri, A.A., Fanelli, C. 2012. Aoyap1 regulates OTA synthesis by controlling cell redox balance in *Aspergillus ochraceus*. Applied Microbiology and Biotechnology 95, 1293-1304.

Reverberi, M., Ricelli, A., Zjalic, S., Fabbri, A.A. and Fanelli, C. 2010. Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 87, 899-911.

Riba, A., Mokrane, S., Mathieu, F., Lebrihi, A. and Sabaou, N., 2008. Mycoflora and ochratoxin a producing strain of *Aspergillus* in Algerian wheat. *International Journal of Food Microbiology* 122, 85-92.

Riba, A., Zebiri, S., Mokrane, S. and Sabaou, N., 2016. Occurrence of toxigenic fungi, aflatoxins and ochratoxin A in wheat and dried fruits commercialized in Algeria. *International Congress of Mycotoxins and Cancer*. March 24-25, 2016. Marrakech, Morocco.

Richard, J.L., Cutlip, R.C., Thurston, J.R. and Songer, J. 1980. Response of turkey poults to aerosolized spores of *Aspergillus fumigatus* and aflatoxigenic and non aflatoxigenic strains of Aspergillus flavus. *Avian Diseases* 25, 53-67.

Richardson, DM. 2009. Assessment of the impact on crop protection by the 'cut-off criteria' in a new regulation for authosisation of plant protection products. Communications in *Agricultural and Applied Biological Sciences* 74(1), 3-8.

Ringot, D., Chango, A., Schneider, Y.J. and Larondelle, Y. 2006. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-Biological Interactions* 18-46.

Risaliti, L., Kehagia, A., Daoultzi, E., Lazari, D., Bergonzi, M.C., Vergkizi Nikolakaki, S., Hadjipavlou-Litina, D. and Bilia, A.R. 2019. Liposomes loaded with *Salvia triloba* and *Rosmarinus officinalis* essential oils: In vitro assessment of antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial activities, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*.

Rocher, F. 2007. Lutte chimique contre les champignons pathogènes des plantes : évaluation de la systémie phloémienne de nouvelles molécules à effet fongicide et d'activateurs de réactions de défense. Université de Poitiers. 164.

Rodriguez, A., Rodriguez, M., Martin, A., Delgado, J. and Cordoba, J.J., 2012a. Presence of ochratoxin A on the surface of dry-cured Iberian ham after initial fungal growth in the drying stage. *Meat Science* 92, 728-734.

Rodriguez, A., Rodriguez, M., Martin, A., Nunez, F. and Cordoba, J.J., 2012b. Evaluation of hazard of aflatoxin B1, ochratoxin A and patulin production in dry-cured ham and early detection of producing moulds by qPCR. *Food Control* 27, 118-126.

Rodriguez, H., Reveron, I., Doria, F., Costantini, A., De Las, R. B., Munoz, R., *et al.* 2011. Degradation of OTA by *Brevibacterium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 10755-10760.

Romero, S.M., Comerio, R.M., Larumbe, G., Ritieni, A., Vaamonde, G. and Fernández Pinto, V. 2005. Toxigenic fungi isolated from dried vine fruits in Argentina. *International Journal of Food Microbiol* 104, 43-49.

Romero, S.M., Patriarca, A., Fernández Pinto, V. and Vaamonde, G. 2007. Effect of water activity and temperature on growth of ochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from Argentinean dried vine fruits. *International Journal of Food Microbiology* 115, 140-143.

Roßberg, D., Neptun, 2009 - Weinbau. Berichte aus der BBA 2009, 151.

Rosslenbroich, H.J, Stuebler, D. 2000. Botrytis cinerea – history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection* 19, 557-561.

Ruadrew, S., Craft, J. and Aidoo, K. 2013. Occurrence of toxigenic *Aspergillus spp*. and aflatoxins in selected food commodities of Asian origin sourced in the West of Scotland. *Food and Chemical Toxicology* 55, 653-658.

Saiki, R.K., Sharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. & Arnheim, N. 1985. Enzymic amplification of ß-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science* 230, 1350-4.

Saladin, G., Magné C. and Clément C. 2003. Effects of fludioxonil and pyrimethanil, two fungicides used against *Botrytis cinerea*, on carbohydrate physiology in Vitis vinifera L. *Pest Management Science* 59(10), 1083-1092.

Samson, R. A., Visagie, C.M., Houbraken, J., Hong, S-B., Hubka, V., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Susca, A., Tanney, J.B., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Yaguchi, T., Frisvad, J.C. 2014. Taxonomy, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 78, 141-173.

Samson, R.A., Hoekstra, E.S. and Frisvad, J.C., 2004. Introduction to Food- and Airborne Fungi In: Samson, R.A., Hoekstra, E.S. (Eds.),7th ed. *Centraal bureau Voor Schimmel cultures*, Utrech, The Netherlands. 389.

Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. 1996. Introduction to food borne fungi. 4e édition, *Centraalbureau voor Schimmelcutures*, Netherlands, 1-232p.

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

Sangare-Tigori, B., Moukha, S., Kouadio, J.H., Dano, D.S., Betbeder, A.-M., Achour, A. and Creppy, E.E., 2006. Ochratoxin A in human blood in Abidjan, Cote d'Ivoire. *Toxicon* 47, 894-900.

Santamarina, M. P., Rosello, J., Gimenez, S. and Blazquez, M. A. 2016. Commercial *Laurus nobilis L.* and *Syzygium aromaticum L. Merr.* & *Perry* essential oils against post-harvest Phytopathogenic fungi on rice. *LWT - Food Science and Technology* 65, 325-332.

Santos, L., Marin, S., Sanchis, V. and Ramos, A. J. 2013. In vitro effect of some fungicides used in cultivation of Capsicum spp. On growth and ochratoxin A production by *Aspergillus* species. *World Mycotoxin Journal* 6(2), 159-165.

Savary, S., Teng, P.S., Willocquet, L. and Nutter, F.W. 2006. Quantification and modeling of crop losses: A review of purposes. *Annual Review of Phytopathology* 44, 89-112.

Schmidt-Heydt, M., Baxter, E., Geisen, R. et Magan, N. 2007. Physiological relationship between food preservatives, environmental factors, ochratoxin and otapksPV gene expression by *Penicillium verrucosum*. *International Journal of Food Microbiology* 119, 277-283.

Schmidt-Heydt, M., Rüfer, C., Raupp, F., Bruchmann, A., Perrone, G. and Geisen, R. 2011. Influence of light on food relevant fungi with emphasis on ochratoxin producing species. Int J Food Microbiol 145, 229-237.

Schmidt-Heydt, M., Stoll, D., Geisen, R. 2013. Fungicides effectively used for growth inhibition of several fungi could induce mycotoxin biosynthesis in toxigenic species. *International Journal of Food Microbiology* 166, 407-412.

Scott, P.M., van Walbeek, W., Harwig, J., Fennell, D.I. 1970. Occurrence of a mycotoxin, Ochratoxin A, in wheat and isolation of Ochratoxin A and citrinin producing strains of *Penicillium viridicatum*. *Canadian Journal of Plant Science* 50, 583-585.

Scott, P.M., van Walbeek, W., Kennedy, B., Anyeti, D. 1972. Mycotoxins (Ochratoxin A, citrinin, and sterigmatocystin) and toxigenic fungi in grains and agricultural products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 20, 1103-1109.

Scudamore, K. A. and Banks, J. N. 2004. The fate of mycotoxins during cereal processing, In: Meeting the mycotoxin menace. In D. Barug, H. van Egmond, R. Lopez-Gar cıa, T. van Osenbruggen, & A. Visconti (Eds.), *Proceedings of the 2nd World Mycotoxin Forum*, Nordwijk, Netherlands (Vols. 17-18, pp. 165-181)

Selouane, A., Bouya, D., Lebrihi, A. and Bouseta, A. 2009b. Impact of some environmental factors on growth and production of ochratoxin A of/by *Aspergillus tubingensis, A. niger* and *A. carbonarius* isolated from Morrocan grapes. *The Journal of Microbiology* 411-419

Selouane, A., Qjidaa, S., Zouhair, S., Lebrihi, A., Bouya, D. and Bouseta, A. (2014). Effect of culture medium, temperature and incubation time on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus tubingensis* and *A. niger* isolated from Moroccan vineyards. *South Asian Journal of Experimental Biology*, 4 (6) 290-299.

Selouane, A., Zouhair, S., Bouya, D., Lebrihi, A. and Bouseta A. 2009a. Natural occurrence of ochratoxigenic Aspergillus species and ochratoxin A in Moroccan grapes. *World Applied Sciences Journal* 7 (3), 297-305.

Set-Young, D., Monk, B.C., Mason, A.B. and Perlin, D.S. 1997. Exploring an antifungal target in the plasma membrane H+ ATPase of fungi. *Biochimica et Biophysica Acta* 1326, 249-256.

Shank, R.C., Gordon, J.E., Wogan, G.N., Nondasuta, A. and Subhamani, B. 1972a. Dietary aflatoxins and human liver cancer. III. Field survey of rural Thai families for ingested aflatoxins. *Food and cosmetics toxicology* 10, 71-84.

Shank, R.C., Wogan, G.N. and Gibson, J.B. 1972b. Dietary aflatoxins and human liver cancer. I. Toxigenic moulds in foods and foodstuffs of tropical south-east asia. *Food and cosmetics toxicology* 10, 51-60.

Sharma, A., Rajendran, S., Srivastava, A., Sharma, S. and Kundu, B. 2017. Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 123, 308-313.

Sharma, N. and Tripathi A. 2008. Effects of *Citrus sinensis (L.) Osbeck epicarp* essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological Research* 163, 337-344.

Shephard, G.S. 2016. Current status of mycotoxin analysis: a critical review. *Journal of AOAC International* 99, 842-848.

Shotwell, O.L., Hesseltine, C.W. and Goulden, M.L. 1969. Ochratoxin A: Occurrence as natural contaminant of a corn sample. *Applied Microbiology* 17, 765-766.

Skandamis, P.N., and Nychas, G.J.E. 2001. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology* 91(6),1011-1022.

Sokmen, A., Jones, B.M. and Erturk, M. 1999. The in vitro antibacterial activity of Turkish medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 67, 79-86.

Stoev, S.D., Denev, S., Dutton, M.F., Njobeh, P.B., Mosonik, J.S., Steenkamp, P.A., Petkov, I. 2010. Complex etiology and pathology of mycotoxic nephropathy in south african pigs. *Mycotoxin Res 26*, 31-46.

Stoll, D., Schmidt-Heydt, M., Geisen, R. 2013. Differences in the regulation of ochratoxin a by the HOG pathway in *Penicillium* and *Aspergillus* in response to high osmolar environments. *Toxins* 5,1282-1298.

Stove, S. D. 2013. Food safety and increasing hazard of mycotoxin occurrence in foods and feeds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 53, 887-901.

Strange, R.N. and Scott, P.R. 2005. Plant disease: a threat to global food security. *Annual Review Phytopathology* 43, 83-116.

Susca, A., Proctor, R. H., Butchko, R. A. E., Haidukowski, M., Stea, G., Logrieco, A., Moretti, A. 2014. Variation in the fumonisin biosynthetic gene cluster in fumonisin-producing and nonproducing black aspergilli. *Fungal Genetics and Biology* 73, 39-52.

Susca, A., Proctor, R.H., Morelli, M., Haidukowski, M., Gallo, A., Logrieco, A.F. and Moretti, A. 2016. Variation in fumonisin and ochratoxin production associated with differences in biosynthetic gene content in *Aspergillus niger* and *A. welwitschiae* isolates from multiple crop and geographic origin. *Frontiers Microbiology* 7,1412.

Tabassum, N. and Vidyasagar, G.M., 2013. Antifungal investigations on plant essential oils: A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5(2), 19-28.

Takayama, C., Meira de-Faria, F., Alves de Almeida, A.C., Dunder, R.J., Manzo, L. P., Socca, E.A.R., Batista, L.M., Salvador, M.J., Souza-Brito, A.R.M., Luiz-Ferreira, A. 2016. Chemical composition of *Rosmarinus officinalis* essential oil and antioxidant action against gastric damage induced by absolute ethanol in the rat. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 6, 677-681.

Taniwaki, M.H., Pitt, J.I., Magan, N. 2018. Aspergillus species and mycotoxins: occurrence and importance in major food commodities, *Current Opinion in Food Science*, https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.05.008

Tantaoui-Elaraki, A. and Le Tutour, B., 1985. Possible mycotoxin contamination of olives and olive products: latest developments. *Oleagineux* 40: 451-454.

Tantaoui-Elaraki, A. and Mannioui, A., 1994. Essais de traitement antifongique des olives noires (façon Grèce). *Microbiologie Aliments Nutrition* 14, 5-14.

Tao, Y., Xiea, S., Xua, F., Liu, A., Wang, Y., Chenb, D., Pan, Y., Huang L., Penga, D., Wanga, X. and Yuana, Z. 2018. Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism. *Food and Chemical Toxicology* 112, 320-331.

Tatsadjieu, N., Jazet M., Ngassoum, MB., Etoa, X. and Mbofung, MF. 2010. Investigations on the essential oil of Lippia rugosa from Cameroon for its potential use as antifungal agent against *Aspergillus flavus* Link ex. Fries. *Food Control* 5, 161-166.

Teixeira, B., Marques, A., Ramosa, C., Nengc, N.R., Nogueirac, J.M.F., Saraiva, J.A., Nunes, M.L., 2013. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products* 43, 587-595.

Temba, B.A., Sultanbawa, Y., Kriticos, D.J., Fox, G.P., Harvey, J.J.W. and Fletcher, M.T. 2016. Tools for defusing a major global food and feed safety risk: nonbiological postharvest procedures to decontaminate mycotoxins in foods and feeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64, 8959-8972.

Terra, M. F., Nathasha De A. Lira, Fabiana R. F. Passamani, 2016. Wilder Douglas Santiago, Maria Das Graças Cardoso, And Luis Roberto Batista. 2016. Effect of Fungicides on Growth and Ochratoxin A Production by *Aspergillus carbonarius* from Brazilian Wine Grapes. *Journal of Food Protection* 79 (9), 1508-1516.

the genus Aspergillus, In Aspergillus. Vol. 1, pp. 1–17. Molecular
the genus Aspergillus, In Aspergillus. Vol. 1, pp. 1–17. Molecular
Tóth, B., Török, O., Kótai, É., Varga M., Toldiné Tóth, É., Pálfi, X., Háfra, E., Varga, J. Téren, J. and Mesterházy Á. 2012. Role of *Aspergilli* and *Penicillia* in mycotoxin contamination of maize in Hungary. *Acta Agronomica Hungarica* 60(2), 143–149.

Valenta, H. and Richter, W. 1998. Untersuchungen zur reversibilitaeteines ochratoxin ADekontaminationsverfahrens. In: 20. *Mykotoxin-Workshop*, 8-10 June 1998, Detmold: Bundesanstalt fuer Getreide, Kartoffel-und Fettforchung, 10.

Van der Merve, K.J., Steyn, P.S. et Fourie, L. 1965. Mycotoxins. Part II The constitution of chratoxins A, B and C, metabolites of Aspergillus ochraceus Wilh. *Journal of Chemical Society*, 7083-7088.

Var, I., Kabak, B., Erginkaya, Z. 2008. Reduction in ochratoxin A levels in white wine, following treatment with activated carbon and sodium bentonite. *Food Control* 19, 592-598.

Varga, J. et Kozakiewicz, Z. 2006. Ochratoxin A in grapes and grape-derived products. *Trends in Food Science and Technology* 17, 72–81.

Varga, J., Kocsubé, S., Tóth, B., Frisvad, J.C., Perrone, G., Susca, A., Meijer, M., Samson, R.A. 2007. *Aspergillus brasiliensis sp.* nov., a biseriate black Aspergillus species with world-wide distribution. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 1925-1932.

Varga, V., Kocsubé, S., Szigeti, G., Baranyi, N. and Tóth. B. 2015. *Aspergillus* mycotoxins. In Paterson R. R. M., Lima, N. (Eds.), *Molecular Biology of Food and Water Borne cycotoxigenic and Mycotic Fungi* (pp. 165–186). Baton Rouge: CRC Press.

Verger, Ph., Volatier, J.L., Dufour A. and CSHPF. 1999. Les mycotoxines dans l'alimentation: évaluation théorique de l'exposition aux aflatoxines, éditions *Technique et Documentation, Lavoisier*, Paris, France.

Verscheure, M., Lognayn G., Marlier, M. 2002. Revue bibliographique: les méthodes chimiques d'identification et de classification des champignons. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 6, 131-142.

Vidal, A., Marin, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, G. and Sanchis, V., 2013. Determination of aflatoxins, deoxynivalenol, ochratoxin A and zearalenone in wheat and oat based bran supplements sold in the Spanish market. *Food and Chemical Toxicology* 53, 133-138.

Vincelli, P., Clarke, B. and Munshaw, G. 2017. Chemical Control of Turfgrass Diseases

Waffa, E.W., Yahya, R.S., Sobh, M.A., Eraky, I., El Baz, M., El Gayar, H.A.M., Betbeder, A.M. and Creppy, E.E. 1998. Human ochratoxicosis and nephropathy in Egypt: a preliminary study. *Human Experimental Toxicology* 17, 124-129.

Wagacha, J.M. and Muthomi, J.W. 2008. Mycotoxin problem in Africa: current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *International Journal of Food Microbiology* 124, 1-12.

Walker G. and White N. 2012. Introduction to fungal physiology. In: *Fungi: biology and applications*. Editor: Kavanagh K. Published by John Wiley & Sons, Inc.

Walter, P. P., Tunde, P. and Istvan, P. 2015. Mycotoxins-prevention and decontamination by yeast. *Journal of Basic Microbiology* 55, 805-818.

Wan Ainiza, W.M., Jinap, S. and Sanny, M. 2015. Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in single and mixed spices. *Food Control* 50, 913-918.

Wang, X., Ma, P., Jiang, D., Peng, Q. and Yang, H., 2006. The natural microflora of Xuanwei ham and the no-mouldy ham production. *Journal of Food Engineering* 77, 103-111.

Wang, L., Wang, Y.,Wang, Q., Liu, F., Selvaraj, J.N., Liu, L., Xing, F., Zhao, Y., Zhou, L. and Liu, Y. 2015. Functional characterization of new polyketide synthase genes involved in ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus* fc-1. *Toxins* (Basel) 7, 2723-2738.

Weiden Börner, M. 2001. Encyclopedia of food mycotoxins. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. Germany, 181-187.

Williams, J.H., Phillips, T.D., Jolly, P.E., Stiles, J.K., Jolly, C.M. and Aggarwal, D. 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American journal of clinical nutrition* 80, 1106-1122.

World Health Organization (WHO), 2008. The World Health Report 2008: Primary Health Care – Now More Than Ever. Geneva

Wu, F., Groopman, J. D. and Pestka, J.J. 2014. Public health impact of foodborne mycotoxins. *Annual Review of Food Science and Technology* 5, 351-372.

Xu, D., Wang, H., Zhang, Y., Yang, Z. and Sun, X. 2013. Inhibition of non-toxigenic *Aspergillus niger* FS10 isolated from Chinese fermented soybean on growth and aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus. Food Control* 32(2), 359–365.

Yiannikouris, A. and Jouany, J.P. 2002. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. *Animal Research* 51, 81-99.

Yu, J., Bhatnagar, D. and Ehrlich, K. 2002. Aflatoxin biosynthesis. *Revista Iberoamericana de Micologia* 19, 191-200.

Yu, J., Bhatnagar, D., and Cleveland, T. E. 2004. Completed sequence of aflatoxin pathway gene cluster in Aspergillus parasiticus. *FEBS Letters* 564, 126-130.

Yuan, Y., M. Huang, Y. X. Pang, F. L. Yu, C. Chen, L. W. Liu, Z. X. Chen, *et al.* 2016. Variations in essential oil yield, composition, and antioxidant activity of different plant organs from Blumea balsamifera (L.) DC. at different growth times. *Molecules* 21:1024.

Zaied, C., Abid, S., Zorgui, L., Bouaziz, C., Chouchane, S., Jomaa, M. and Bacha, H., 2009. Natural occurrence of ochratoxin A in Tunisian cereals. *Food Control.* 20: 218-222.

Zhang, H., Wang, L., Zheng, X., and Dong, Y. 2007. Effect of yeast antagonist in combination with heat treatment on postharvest blue mold decay and Rhizopus decay of peaches. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 53e58

Zheng, D., Olaya, G., Koller, W. 2000. Characterization of laboratory mutants of *Venturia inaequalis* resistant to the strobilurin-related fungicide kresoxim-methyl. *Current Genetics* 38: 148-155.

Zhu, Y., Hassan, Y., Watts, C. and Zhou, T. 2016. Innovative technologies for the mitigation of mycotoxins in animal feed and ingredients—a review of recent patents. *Animal Feed Science and Technology*, 216:19-29.

Zinedine, A., Brera, C., Elakhdari, S., Catano, C., Debegnach, F., Angelini, S., De Santis, B., Faid, M., Benlemlih, M., Minardi, V. and Miraglia, M., 2006. Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. *Food Control* 17, 868-874.

Zinedine, A., Soriano, J.M., Juan, C., Mojemmi, B., Moltó, J.C., Bouclouze, A., Cherrah, Y., Idrissi, L., El Aouad, R. and Mañes J. 2007. Incidence of ochratoxin A in rice and dried fruits from Rabat and Salé area, Morocco. *Food Additives and Contaminants* 24, 285-291.

Zinedine, A., Soriano, J.M., Juan, C., Mojemmi, B., Moltó, J.C., Bouclouze, A., Cherrah, Y., Idrissi, L., El Aouad, R. and Mañes, J., 2007d. Incidence of ochratoxin A in rice and dried fruits from Rabat and Salé area, Morocco. *Food Additives and Contaminants* 24: 285-291.

Zouhair, S, Qjidaa., S, Selouane A, Bouya., D, Decock., C Bouseta, A. 2014. Effect of five fungicides on growth and ochratoxin A production by two *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus niger* isolated from Moroccan grapes. *South Asian Journal of Experimental Biology* 4 (3), 118-126.

Zouhair, S. 2017. Effet des fongicides sur la croissance fongique et la production de mycotoxines (ochratoxine A et déoxynivalénol) par des souches d'*Aspergillus* dans la filière raisin et des souches de *fusarium* dans la filière céréale. *Université Sidi Mohammed Ben Abdellah Faculté des Sciences Dhar El Mahraz-Fès*

Zubrod, J. P., Bundschuh, M., Arts, G., Brühl, C. A., Imfeld, G., Knabel, A., Payraudeau, S., Rasmussen, J. J., Rohr, J., Scharmüller, A., Smalling, K., Stehle, S., Schulz, R. and Schafer, R.B. 2019. Fungicides: An Overlooked Pesticide Class? *Environmental Science and Technology*, 53, 3347-3365.

Zuzarte, M. and Salgueiro L. 2015. Essential oils chemistry. In: Bioactive Essential Oils and Cancer, *Springer International Publishing*, Switzerland, pp. 19–61.